

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. A. Neubauer

**Regulationsmechanismen des Interferon regulatorischen Faktors
IRF-4 in der chronisch myeloischen Leukämie**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg und
dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg

vorgelegt von

Christina Ann Ortmann, geb. Friedrich aus Bad Homburg
Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

am 18.08.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. A. Neubauer

Koreferent: Prof. Dr. Sedlacek

Meinen Eltern

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die chronische myeloische Leukämie (CML)	1
1.1.1	Klinische Aspekte	1
1.1.2	Molekulare Genetik und Biologie der CML	3
1.2	Der Transkriptionsfaktor IRF-4	5
1.2.1	Die Familie der Interferon regulatorischen Faktoren (IRF)	5
1.2.2	Der Interferon regulatorische Faktor IRF-4	6
1.2.3	Die Bedeutung der IRFs für die CML	8
1.3	Epigenetische Regulation durch Methylierung	9
1.3.1	Definition der Epigenetik	9
1.3.2	Grundbegriffe der DNA-Methylierung	10
1.3.3	DNA-Methylierung und inaktiver Chromatinstatus	11
1.3.4	Epigenetische Veränderungen und Krebsentstehung	11
1.3.5	Ursache und Steuerung der aberranten DNA-Methylierung	13
1.3.6	DNA-Methylierung und Gen-Inaktivierung: Ursache oder Konsequenz?	15
1.3.7	Die Bedeutung von Epigenetik für Klinik und Forschung	15
1.4	Zielsetzung der Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Material	20
2.1.1	Zelllinien	20
2.1.2	Patientenproben und Normalblut	20
2.1.3	Primer	21
2.1.4	Antikörper	22
2.1.5	Lösungen und Puffer	22
2.1.6	Reagenzien	23
2.2	Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1	Zellkultur	26
2.2.2	Dextran-Zellseparation zur Isolierung von Leukozyten	27
2.2.3	RNA-Extraktion	27
2.2.4	cDNA Synthese	28
2.2.5	DNA-Extraktion	28
2.2.6	Quantifizierung von DNA und RNA	28
2.2.7	Restriktionsverdau	29
2.2.8	Bisulfit-Behandlung von DNA	29

Inhaltsverzeichnis	II
2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion	31
2.2.10 Agarosegelelektrophorese	34
2.2.11 Protein-Extraktion	35
2.2.12 Western-Blotting	35
2.2.13 Klonierung.....	37
2.2.14 Sequenzierung	39
3 ERGEBNISSE	42
3.1 IRF-4-Expression der Zelllinien.....	42
3.2 Suppression der IRF-4-Expression beruht nicht auf Promotor-Aberrationen.....	42
3.3 Anstieg der IRF-4-Expression in hämatopoetischen Zelllinien nach Inhibition der Methylierung.....	43
3.3.1 Behandlung mit 5-Aza-2-deoxycytidin (AzadC)	43
3.3.2 Behandlung mit 5-Azacytidin (AzaC) oder Trichostatin A (TSA)	44
3.4 Analyse des IRF-4-Promotors mit methylierungsspezifischen Restriktionsendonukleasen (Restriktions-PCR-Assay).....	44
3.4.1 Restriktions-PCR-Assay der Fragmente FI und FII	45
3.4.2 Restriktions-PCR-Assay des Fragments FIII	46
3.5 Bestätigung der inhibierten <i>de novo</i> Methylierung durch Restriktions-PCR-Assay von AzadC-behandelten Zellen	47
3.6 Methylierung spezifischer CpG-Inseln des IRF-4-Promotors.....	48
3.7 Vergleich der Ergebnisse aus Restriktions-PCR-Assay und Bisulfit-Sequenzierung.....	51
3.8 Sequenz und Methylierungsstatus von Kontrollpersonen und CML-Patienten.....	51
3.9 Bestätigung der demethylierenden Wirkung von 5-Aza-2-deoxycytidin (AzadC) durch Sequenzierung.....	52
3.10 Fehlende Korrelation der IRF-4-Promotor-Methylierung mit der Expression von DNA Methyltransferasen (DNMT) und Methyl-CpG-Bindungsproteinen (MBP)	53
4 DISKUSSION	54
4.1 Methodik	54
4.1.1 Inhibition der <i>de novo</i> Methylierung durch AzadC.....	54
4.1.2 Restriktions-PCR-Assay	55
4.1.3 Bisulfit-Sequenzierung	56

4.1.4	Auswahl der Proben: Hämatopoetische Zelllinien als Modellsystem	57
4.2	Untersuchungen zur Regulation der IRF-4-Expression in Leukämiezellen.....	58
4.2.1	Genetische Veränderungen des IRF-4-Promotors.....	58
4.2.2	Die aberrante Hypermethylierung des IRF-4-Promotors in IRF-4-negativen Zelllinien.....	59
4.2.3	Veränderte Expression von DNMTs/ MBPs als mögliche Ursache aberranter Methylierung ..	62
4.2.4	Aberrante DNA-Methylierung: Henne oder Ei?	63
4.3	Die Rolle von IRF-4 in der CML.....	64
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	67
6	AUSBLICK: WEITERFÜHRENDE EXPERIMENTE.....	69
6.1	Stabile Transfektion humaner Zelllinien durch Elektroporation	69
6.2	Durchflusszytometrie und Apoptose-Assay	70
6.2.1	Stimulation mit Chemotherapeutika	71
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	72
8	LITERATURVERZEICHNIS	75
9	VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER.....	89
10	DANKSAGUNG	90

1 Einleitung

1.1 Die chronische myeloische Leukämie (CML)

1.1.1 Klinische Aspekte

Die CML beruht auf der malignen Entartung einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks (Fialkow et al. 1977). Der Wachstumsvorteil der leukämischen Zellen gegenüber normalen hämatopoetischen Zellen liegt einerseits in einer erhöhten Proliferation, andererseits in einer gestörten Fähigkeit zum programmierten Zelltod (Bedi et al. 1994; McGahon et al. 1994). Schleichend entwickelt sich eine zunehmende autonome Proliferation von Zellen der Granulopoese und es kommt zur verstärkten Ausschwemmung von Leukozyten aller Reifungsstufen. Die schließlich exzessiv produzierten Granulozyten sind funktionstüchtig; im peripheren Blut kommt es zu einer pathologischen Linksverschiebung mit Auftreten von Vorstufen der Granulopoese bis hin zum Myeloblasten. Das Knochenmark ist hyperzellulär mit Dominanz der Granulopoese. Die Inzidenz der Erkrankung beträgt etwa 1/100.000/Jahr, der Altersgipfel bei Krankheitsmanifestation liegt bei 45-55 Jahren (Cortes et al. 1996). Die CML ist durch drei Krankheitsphasen gekennzeichnet: Die **chronische Phase** beginnt schleichend, kann über Jahre stabil bleiben und ist charakterisiert durch unspezifische Allgemeinsymptome wie Leistungsminderung, unklares Fieber, Gewichtsverlust, sowie die Leitsymptome Splenomegalie und Leukozytose (Savage et al. 1997). Die myeloischen Zellen besitzen in dieser chronischen Phase noch die Möglichkeit zur Ausdifferenzierung. Nach im Mittel 3-5 Jahren kann die Erkrankung zur **Akzelerationsphase** fortschreiten. In dieser unscharf definierten Phase kommt es zu zunehmender Leukozytose und Linksverschiebung (10-30% Blasten), Anämie, Thrombozytopenie und Zunahme der Milzvergrößerung (Kantarjian et al. 1988). Die in der chronischen Phase zunächst erfolgreich durchgeführte Chemotherapie verliert in diesem Stadium an Wirksamkeit. Die **Blastenkrise** entwickelt sich schließlich nach 4-6 Jahren bei allen Patienten mit CML, die nicht zuvor an einer anderen Komplikation versterben. Der Verlauf ähnelt einer akuten Leukämie und endet in der Regel rasch letal (Giles et al. 2004). Der terminale Blastenschub (Griffin et al. 1983) ist in circa 2/3 der Fälle myeloisch, mit Anstieg der Myeloblasten und Promyelozyten auf >30% im Differentialblutbild. In 1/3 der Fälle, insbesondere bei Vorbehandlung mit Interferon- α (IFN- α), entwickelt sich eine lymphatische Blastenkrise.

Nach bisherigen Erfahrungen ist eine Heilung nur durch die allogene Knochenmarkstransplantation (KMT) oder Stammzelltransplantation (SZT) nach myeloablativer Therapie möglich (Grossman et al. 1996; Gale et al. 1998; Gupta et al. 1999). Da die Transplantation im fortgeschrittenen Stadium weniger Aussicht auf Erfolg hat, muss die

Indikation zur KMT/SZT frühzeitig geprüft werden. Diese Risikoabwägung und die Suche nach prognostischen Markern stellen daher nach wie vor eine hohe Herausforderung dar (Gratwohl et al. 1998; 2003). Die Wahl der medikamentösen Therapie der CML ist komplex und muss individuell für jeden Patienten ausgewählt werden. Während der chronischen Phase erfolgte sie bisher hauptsächlich mit den antiproliferativ wirksamen Substanzen Interferon- α (IFN- α), Hydroxyurea, Busulfan oder Cytarabine. Therapieziele sind Minderung der Beschwerden, Suppression der extrem gesteigerten Granulopoese und Verlängerung der chronischen Phase. 75% der Patienten mit CML-Erstdiagnose sprechen auf eine Therapie mit IFN- α an; dabei werden in >50% der Fälle hämatopoetische Remissionen, in <10% komplette zytogenetische Remissionen erreicht (Faderl et al. 1999). Die Therapie mit IFN- α ist leider mit Nebenwirkungen belastet, wie Fieber, Schüttelfrost oder rheumatischen Beschwerden. Dennoch haben mehrere Studien und eine Meta-Analyse signifikant höhere Ansprechraten und vor allem den lebensverlängernden Effekt von IFN- α im Vergleich zu anderen Therapien, wie Hydroxyurea oder Busulfan, gezeigt (Talpaz et al. 1991; 1994; Allan et al. 1995; 1997). Der genaue Wirkungsmechanismus von IFN- α in der CML ist noch nicht bekannt. *In vitro* Versuche zeigen einen direkt antiproliferativen Effekt von IFN- α auf CML-Zellen von solchen Patienten, die auch klinisch auf eine IFN- α -Therapie ansprachen (Cornelissen et al. 1998; Gordon et al. 1998). Daneben scheint IFN- α auch indirekte Effekte auf die Leukämiezellen auszuüben: Wiederherstellung der defekten Zytoadhärenz (Bhatia et al. 1996), Erhöhung der Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Rekrutierung von akzessorischen Zellen des Immunsystems (Pfeffer et al. 1998) sind einige der bereits bekannten Wirkungsmechanismen. Es gibt Hinweise, dass IFN- α über die Induktion CML-spezifischer, zytotoxischer Lymphozyten, die beispielsweise BCR-ABL-Peptide oder PR1-Peptide erkennen, eine Remission herbeiführen kann (Molldrem et al. 1996; 1997; Clark et al. 2001). PR1 ist ein Bestandteil von Myeloblastin, welches in CML-Zellen überexprimiert wird (Burchert et al. 2003). Einige Studien haben gezeigt, dass die Expression von Genen, die im Interferon-Signalweg eine Rolle spielen (IRF-4, ICSBP, IFN- α Rezeptor 2c) mit dem Therapieansprechen auf IFN- α und der Prognose korrelieren (Schmidt et al. 2000; 2001; Barthe et al. 2001).

Die Tatsache, dass das Fusionsprotein BCR-ABL ursächlich an der Entstehung der CML beteiligt ist (siehe 1.1.2), macht dieses Onkogen zu einem idealen therapeutischen Angriffspunkt. Imatinib (STI571, Gleevec, Glivec) ist ein Inhibitor der ABL-Tyrosinkinase (Druker et al. 1996): Dieses Molekül blockiert die ATP-Bindungsstelle von BCR-ABL und verhindert damit die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten von Zielproteinen sowie von BCR-ABL selbst. Neben ABL werden auch die Tyrosinkinasen c-KIT und der PDGF-Rezeptor durch Imatinib gehemmt (Buchdunger et al. 2000). Die Therapie mit Imatinib führte bei IFN- α resistenten Patienten in fast 90% (75% komplett) zu zytogenetischen Remissionen; im Vergleich hierzu wurden mit der Vergleichstherapie IFN- α plus Cytarabin nur in 35%

zytogenetische Remissionen erreicht (O'Brien, Guilhot et al. 2003). Die Rate der Patienten, die nach 18 Monaten frei von Progression waren, betrug dabei fast 97% (IFN- α plus Cytarabin: 92%). IFN- α -resistente Patienten, die unter Imatinib eine zytogenetische Remission erreichen, haben gegenüber Kontrollen eine signifikant verlängerte Überlebenszeit. Dagegen ist die Überlebensrate von Patienten, bei denen der zytogenetische Status unverändert bleibt, schlechter als bei Patienten, die weiterhin Standardtherapie erhalten (Marin et al. 2003). Es wird spekuliert, dass dieser Effekt durch die Selektion resistenter, mutierter Klone auftreten könnte. Die Therapie mit Imatinib scheint den herkömmlichen medikamentösen Therapien bezüglich zahlreicher Endpunkte (Responseraten, Progression-free survival etc.) und auch bezüglich der beobachteten Nebenwirkungen überlegen zu sein (IRIS-Studie) (Kantarjian et al. 2002; Talpaz et al. 2002; Kantarjian, Talpaz et al. 2003; Marin et al. 2003; O'Brien, Deininger 2003; O'Brien, Guilhot et al. 2003) und hat als erste „targeted therapy“ einen völlig neuen Ansatz der Krebstherapie eröffnet. Dennoch fehlen bisher Langzeiterfahrungen, denn Imatinib wurde erst 1998 in Phase I-Studien aufgenommen und die derzeit laufenden Phase III-Studien lassen noch keine Aussagen über Langzeitnebenwirkungen und Langzeitüberleben, insbesondere auch im Vergleich zur Transplantation, zu.

1.1.2 Molekulare Genetik und Biologie der CML

Die CML nimmt unter den malignen Erkrankungen eine besondere Stellung ein: Hier konnte ein *einzelnes* Onkogen identifiziert werden, dessen Expression für das Entstehen der CML zugleich ausreichend und notwendig ist. In über 90% ist die CML durch die reziproke Translokation t(9; 22)(q34; q11) zwischen den langen Armen der Chromosomen Nr. 9 und Nr. 22 charakterisiert (Rowley 1973). Das Chromosom 22 wird durch ein *BCR*-Gen-Rearrangement zum sogenannten Philadelphia-Chromosom (Ph) (Shtivelman et al. 1985), verursacht durch Translokation des *c-ABL*-Protoonkogens von Chromosom 9 zu Chromosom 22 in die Region des *BCR*-Gens (breakpoint cluster region). Der Promotor des *BCR*-Gens kontrolliert somit die Expression des *BCR-ABL*-Hybridgens (Heisterkamp et al. 1983). Diese Translokation verursacht die Expression eines 210kDa Fusionsproteins (p210^{*BCR-ABL*}) (Ben-Neriah et al. 1986), welches Tyrosinkinaseaktivität besitzt (McWhirter et al. 1991). Abl-Proteine sind rezeptorunabhängige Tyrosinkinasen, die eine große Bedeutung in der Regulation des Zellzyklus haben (Wang 1993; 2000). Durch die Juxtaposition der *BCR*-Sequenzen wird die Abl-Tyrosinkinase unkontrolliert exprimiert; durch Interaktion der beiden Proteinanteile ist die Kinase zudem konstitutiv aktiviert (Kurzrock et al. 1988). Nach wie vor gibt es keine klaren Vorstellungen darüber, wie und unter welchen Umständen es zur Bildung des *BCR-ABL*-Fusionsgens kommt; es sind beispielsweise keine eindeutigen Risikofaktoren für die Entstehung bekannt.

Die Tatsache, dass dieses Onkogen in hämatopoetischen Zellen Faktor-unabhängiges, leukämisches Wachstum und in Mäusen ein CML-ähnliches Krankheitsbild erzeugt (Daley et al. 1990), deutet auf seine pathogenetische Schlüsselrolle in der CML hin. In diesem Kontext sind die Studien zweier Gruppen interessant, die überraschenderweise auch bei gesunden Erwachsenen BCR-ABL-mRNA in geringer Konzentration nachweisen konnten (Biernaux et al. 1995; Bose et al. 1998). Die Wirkung dieses Onkogens auf die Progenitorzelle besteht in deregulierter Proliferation, herabgesetzter Adhärenz an das Knochenmarkstroma und reduzierter

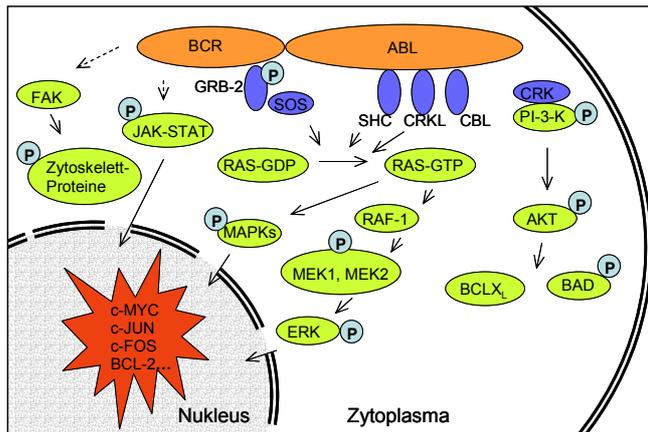


Bild 1.1: Durch BCR-ABL beeinflusste Signalwege (modifiziert nach Goldman et al. 2003)

Die Effekte von BCR-ABL werden durch Interaktion mit verschiedenen Proteinen bewirkt. Die meisten Interaktionen resultieren in Tyrosin-Phosphorylierungen und setzen die Bindung von BCR-ABL an Adapter-Proteine, wie GRB-2, CRKL usw. voraus. Der RAS-Signalweg bildet das Zentrum der wichtigsten Signalwege in der CML und wird durch eine Serie von Adapterproteinen aktiviert (nicht vollständig dargestellt). CBL: Casitas-B-lineage lymphoma protein, SHC: SRC-homology containing protein, MAPKs: mitogen-activated protein kinases, GRB2: growth factor receptor-bound protein 2, FAK: focal adhesion kinase, SOS: son-of-sevenless, PI-3-K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, CRKL: CRK-like protein, MEK: MAP kinase kinase, ERK: extracellular signal-regulated kinase, AKT: Protein Kinase B, BAD: BCLXL/Bcl-2 associated death promoter

Induzierbarkeit von Apoptose durch verschiedene Stimuli (Bedi et al. 1994; McGahon et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass $p210^{BCR-ABL}$ auf zahlreiche Signaltransduktionswege der Zelle

Einfluss nimmt, wie die MYC-, RAS-RAF-, MAP-Kinase-, PI3-Kinase (Skorski et al. 1995)- und, für diese Arbeit von besonderem Interesse, die JAK-STAT-Signalwege (Bild 1.1). Obwohl aber zahlreiche aberrant phosphorylierte Proteine bekannt sind, fehlen Daten darüber, welche aktivierten Signalwege die entscheidende Rolle in der Transmission des „leukämischen“ Signals des Onkogens spielen. Das Vorhandensein des Philadelphia-Chromosoms scheint zudem das Auftreten weiterer genetischer Aberrationen zu fördern (Wada et al. 1994). So ist das Fortschreiten der Erkrankung durch die Akkumulation weiterer genetischer Defekte wie beispielsweise Trisomie 8, Trisomie 19 oder Mutation/Deletion von *RB-1*, *P53*, *RAS* etc. gekennzeichnet.

Für diese Arbeit von besonderem Interesse sind die bereits bekannten Änderungen des Methylierungsstatus in CML-Zellen (Ritter et al. 1995): Die Methylierung des *ABL*-Promotors korreliert beispielsweise mit der Erkrankungsdauer der CML und Wahrscheinlichkeit einer Progression und kann durch IFN- α -Therapie reduziert werden (Ben-Yehuda et al. 1997); die Methylierung des Calcitonin-Gens geht einher mit der Transition der chronischen in die Blastenphase (Malinen et al. 1991).

1.2 Der Transkriptionsfaktor IRF-4

1.2.1 Die Familie der Interferon regulatorischen Faktoren (IRF)

Die Familie der IRFs wurde ursprünglich als eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren definiert, die nach Stimulation mit Typ-I-Interferonen (Interferon- α s und - β) induziert werden (Williams 1991) und eine gemeinsame, konservierte N-terminale DNA-Bindungsdomäne (DBD) (5 Tryptophan repeats, charakteristische helix-turn-helix-Struktur von 115 Aminosäuren) (Escalante et al. 1998; Furui et al. 1998) besitzen. Die konservierte DBD dient der Erkennung und Bindung von spezifischen DNA-Sequenzen, wie dem Interferon stimulated response element (ISRE) (Darnell et al. 1994), der Interferon consensus sequence (ICS) (Driggers et al. 1990) oder dem IRF-element (IRF-E) (Tanaka et al. 1993) im Promotor IRF-induzierbarer Gene (ISRE Sequenz: $^A/G$ NGAAANNGAAACT). Für IRF-2 konnte die Sequenz **AANNGAAA** als Erkennungssequenz in diesen DNA-Elementen definiert werden und aufgrund der homologen DBD-Struktur der anderen IRFs wird auch für diese eine ähnliche, wenn nicht gleiche Erkennungssequenz angenommen (Fujii et al. 1999). Neben der Vermittlung der biologischen Effekte der Interferone (Typ I und II) wurden in Folge zahlreiche andere Funktionen der IRFs entdeckt, die unabhängig vom Interferon-Signalweg sind.

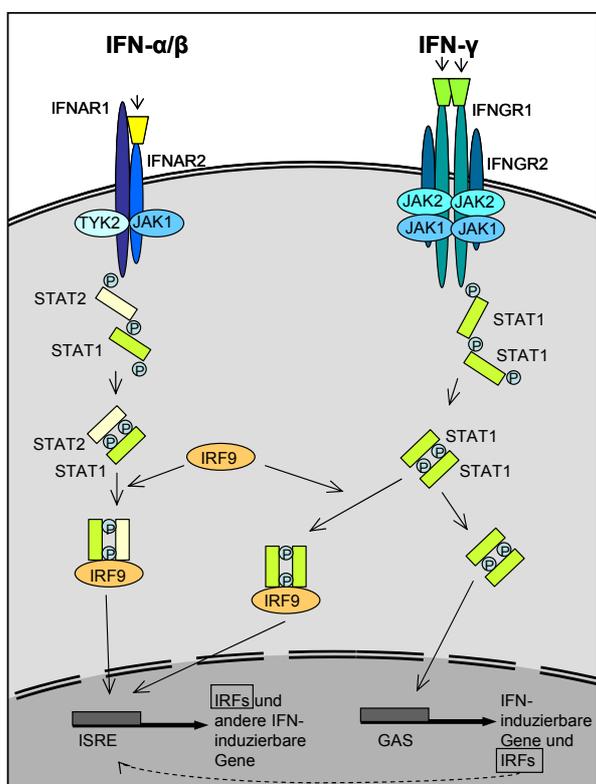


Bild 1.2: IRFs im Interferon-Signalweg (modifiziert nach Taniguchi et al. 2001)

Im IFN- α/β -Signalweg kommt es nach Bindung von IFN- α/β an ihren Rezeptor zur Aktivierung von JAK1 und TYK2, welche den IFN- α -Rezeptor1 (IFNAR1) an einem intrazellulären Tyrosin (Position 455) phosphorylieren. STAT2 bindet nun an den phosphorylierten IFNAR1, wird ebenfalls phosphoryliert und rekrutiert STAT1. STAT1 und STAT2 bilden, zusammen mit IRF-9, einen heterotrimeren Komplex, ISGF3 γ , der an das ISRE-Element von IRFs und anderen IFN-induzierbare Gene bindet.

Im IFN- γ -Signalweg kommt es nach Bindung eines IFN- γ -Dimers zur Aktivierung der Januskinasen JAK1 und JAK2 und damit zur Phosphorylierung eines intrazellulären Tyrosins (Position 423) des IFNGR1. STAT1 wird nach Bindung an dieses Tyrosin selbst phosphoryliert und bildet ein Homodimer, den GAF-Komplex, welcher die Transkription von IRFs und anderen IFN-induzierbaren Genen aktiviert. Zusammen mit IRF-9 kann das STAT1-Dimer auch an ISRE-Elemente binden.

Diese beinhalten unter anderem Einflüsse auf Zellzyklusregulation, Apoptose, onkogene Transformation und Immunreaktionen (Taniguchi et al. 1997). Die Aktivierung einiger IRFs erfolgt außerdem nicht nur durch Interferone, sondern auch durch andere Stimuli, wie

beispielsweise virale Infektion oder Rezeptor-Crosslinking. Die Rolle der IRFs im Interferon-Signalweg ist in Bild 1.2 dargestellt: Nach Bindung eines Interferons an seinen Rezeptor, wird die Transkription von IRFs im Rahmen dieses Signalweges über ISRE-Elemente (Tanaka et al. 1993) und GAS-Elemente (IFN- γ -activated sites) (Decker et al. 1997) induziert.

Zu den von IRFs regulierten Genen gehören unter anderem IFN- β , Fas-Ligand (Chow et al. 2000), *P15^{INK4b}* (Schmidt et al. 2004), verschiedene Interleukine (IL-21, IL-18 etc.), die Gene der MHC Klasse-I (Driggers et al. 1990) und, vermittelt über den Transaktivator CIITA, der MHC Klasse-II (Muhlethaler-Mottet et al. 1998; Koenig Merediz et al. 2000; van der Stoep et al. 2004). Der biologische Effekt eines IRF wird zum einen durch die Bildung von Proteinkomplexen, beispielsweise mit anderen IRFs (Bovolenta et al. 1994) oder Faktoren wie PU.1 (Eisenbeis et al. 1995), Spi-B (Ray et al. 1992), STATs (Veals et al. 1993) etc., oder durch proteolytische Prozessierung (Palombella et al. 1992) sowie Phosphorylierung (Sharf et al. 1997) des IRF moduliert. Inzwischen sind 10 Mitglieder der IRF-Familie identifiziert, dazu kommen virale IRFs, die eventuell mit den zellulären IRFs interagieren (Mamane et al. 1999).

1.2.2 Der Interferon regulatorische Faktor IRF-4

IRF-4 wurde in verschiedenen Zusammenhängen und in unterschiedlicher Terminologie charakterisiert: Als Pip, einem Bindungsfaktor des Immunglobulin Leichtketten Enhancers $E_{\lambda 2-4}$ (Eisenbeis et al. 1995), als LSIRF, einem neuem Mitglied der IRF-Familie, welches nur in Lymphozyten exprimiert wird (Matsuyama et al. 1995), als MUM1, einem Onkogen in multiplen Myelomen (Iida et al. 1997) und als ICSAT, einem Bindungsfaktor an den Promotor des Interleukin-5-Gens (Yamagata et al. 1996). IRF-4, bestehend aus 450 Aminosäuren (Bild 1.3) und auf Chromosom 6p23-25 lokalisiert (Grossman et al. 1996), findet sich im Unterschied zu anderen IRFs nur in spezifischen Zelltypen.

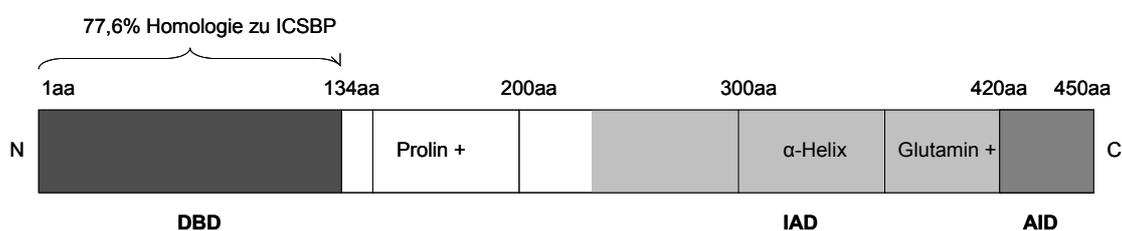


Bild 1.3: Schematische Darstellung von IRF-4 (Yamagata et al. 1996).

Die funktionellen Domänen von IRF-4 sind grau hinterlegt: DNA-Bindungs-Domäne (DBD) in „winged helix-turn-helix“-Struktur; IRF-Assoziationsdomäne (IAD) zur Interaktion mit anderen Proteinen und IRFs; Autoinhibitionsdomäne (AID), verhindert zum Teil die DNA-Bindung ohne Interaktionspartner; N: Aminoterminus; C: Carboxyterminus.

IRF-4 wird in B-Lymphozyten (maximale Expression in Plasmazellen), aktivierten T-Lymphozyten und Makrophagen, daneben in Melanozyten exprimiert. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der IRF-Familie wird IRF-4 durch Signale induziert, wie sie bei einer Antigenstimulation auftreten. Dazu gehören CD3-Crosslinking, Stimulation mit Concanavalin A,

Lipopolysaccharid (LPS), Phorbol-Myristat-Acetat-A23187 (PMA), Interleukin-4 (Gupta et al. 1999), Anti-IgM-Antikörper (Matsuyama et al. 1995) sowie Aktivierung von CD40 (Gupta et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion von IRF-4 über diese Mitogene über den Transaktivator c-Rel (Familie der Rel/Nuclear-Factor- κ B-Transkriptionsfaktoren) vermittelt wird (Grumont et al. 2000); der IRF-4-Promotor besitzt κ B-Elemente, die Rel/Nuclear-Factor- κ B-Komplexe binden. Im Gegensatz zu der lange vertretenen Auffassung, dass IRF-4 *in vitro* nicht durch Interferone induziert wird, demonstrierten Lehtonen *et al* kürzlich die Induktion von IRF-4 nach IFN- α - oder IL-12-Stimulation in T-Zellen und NK-Zellen (Lehtonen et al. 2003). In B-Zellen wird die konstitutive Expression von IRF-4 durch Bindung eines noch nicht identifizierten 60kDa-Proteins an einen GC-reichen Promotorabschnitt von IRF-4 vermittelt: Deletion dieser Region (-51 bis -28) führt zur Abnahme der Promotoraktivität (Nishiya et al. 2004). In humanen T-Zellen wird IRF-4 auch durch Infektion mit dem humanen T-Zell-Leukämie-Virus-1 (HTLV1) über das *TAX*-Onkogen induziert (Sharma et al. 2002); die konstitutive Hochregulation von IRF-4 ist dabei mit einem leukämischen Phänotyp assoziiert. IRF-4 wirkt je nach Kontext, das heißt in Abhängigkeit von Bindungspartnern (z.B. PU.1, Stat6 oder ICSBP/IRF-8), Kofaktoren (z.B. BCL-6, Blimp-1) und dem entsprechenden Promotor (z.B. ISRE- oder GAS-Motiven), als Repressor oder Aktivator der Transkription.

IRF-4 besitzt *in vitro* onkogenes Potential und seine deregulierte Überexpression findet sich in adulten T-Zell-Leukämien (Yamagata et al. 1996) sowie bei einer Gruppe der multiplen Myelome (Iida et al. 1997). Trotzdem reicht die isolierte Überexpression von IRF-4 in Lymphozyten transgener Mäuse nicht zur Leukämieentstehung aus (Saito et al. 1999).

IRF-4-Knockout-Mäuse (Mittrucker et al. 1997) weisen bis zum Alter von 4-5 Wochen eine normale Verteilung der Lymphozyten auf. Dann entwickeln sie eine progressive, generalisierte Lymphadenopathie mit Expansion der B- und T-Zellen. Aus einem Block in der späten, peripheren B-Zell-Reifung resultieren stark reduzierte Immunglobulin-Spiegel, fehlende Plasmazellen in Milz und Lymphknoten sowie die Unfähigkeit zur Antikörperproduktion nach Immunisierung mit T-Zell-unabhängigen Antigenen. Auch die T-Zell-Differenzierung ist grundlegend gestört: Trotz normaler Antigenpräsentation können die IRF-4 *-/-* Zellen keine zytotoxische, Anti-Tumor-Aktivität oder Graft-versus-Host-Reaktion aufbauen. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass T-Helferzellen (Th) von IRF-4 *-/-* Mäusen eine dysregulierte Differenzierung in Th1- und Th2-Lymphozyten aufweisen (Lohoff et al. 2002). IRF-4 ist somit essentiell für die Funktion und Homeostase von reifen B- und T-Zellen. In Knockout-Mäusen, in denen neben IRF-4 auch ICSBP fehlt, entsteht ein Block in der frühen B-Zell-Entwicklung und die Transition von pre-B- zu B-Zellen wird verhindert (Lu et al. 2003). Dieses Phänomen tritt nicht bei Verlust von IRF-4 oder ICSBP allein auf und weist in diesem Zusammenhang auf die Kooperation dieser beiden IRFs hin.

Die Expression von IRF-4 scheint eine Art „Checkpoint“ zu sein, an dem verschiedene, für die B- oder T-Zellaktivierung wichtige Signale zusammenlaufen und an dem sich entscheidet, ob eine Immunreaktion aufgebaut wird oder ob sie verebbt (reviewed von Pernis 2002). IRF-4 spielt auch in der Apoptose-Regulation eine entscheidende Rolle. In unterschiedlichen Experimenten wurden IRF-4 dabei sowohl pro- als auch antiapoptotische Eigenschaften zugesprochen: Fanzo *et al* (Fanzo *et al.* 2003) zeigten, dass die Expression von IRF-4 die Apoptoserate von Lymphozyten nach Bindung des Fas-Liganden (FasL) an den Fas-Rezeptor erhöht. Lohoff *et al* (Lohoff *et al.* 2004) wiesen jedoch nach, dass IRF-4 T-Helferzellen vor Apoptose nach T-Zell-Rezeptor-Aktivierung oder Bindung von FasL schützt. Diese scheinbar widersprüchlichen Daten werden als Ergebnis der Interaktion von IRF4 mit unterschiedlichen Kofaktoren diskutiert. Interessanterweise verursacht sowohl ein Mangel (IRF-4 $-/-$ Maus) als auch eine Überexpression von IRF-4 (Multiples Myelom, Adulte T-Zell-Leukämie) eine lymphoproliferative Störung. Dies deutet zum einen auf die eng regulierte Expression dieses Transkriptionsfaktors in Lymphozyten hin, zum anderen lässt sie wieder unterschiedliche Effekte von IRF-4 in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen vermuten. In jedem Fall stellt IRF-4 ein Verbindungsglied zwischen Aktivierungs- und Apoptoseprogramm in Zellen des Immunsystems dar.

1.2.3 Die Bedeutung der IRFs für die CML

Unter den Interferon regulatorischen Faktoren scheinen insbesondere IRF-4 und ICSBP (= IRF-8) in der Pathogenese der CML eine entscheidende Rolle zu spielen. Eine wichtige Grundlage und Ausgangspunkt dieser Arbeit sind die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zur Expression von IRF-4 bei verschiedenen hämatologischen Krankheitsbildern (Schmidt *et al.* 2000): In peripherem Blut von Patienten mit CML in der chronischen Phase ist die IRF-4-Expression im Vergleich zu Normalblut signifikant herunterreguliert. Eine Therapie mit IFN- α vermag das IRF-4-Level der Patienten wieder anzuheben, *in vitro* hat IFN- α jedoch keinen Effekt auf die IRF-4-Expression von CML-Zellen und Zelllinien. Interessanterweise besteht zwischen gutem Therapie-Ansprechen mit kompletter zytogenetischer Remission und hohem IRF-4-Level, beziehungsweise zwischen schlechtem Ansprechen und niedrigem IRF-4-Level eine signifikante Korrelation (retrospektive Analyse). Diese Daten weisen auf eine Funktion von IRF-4 in der antileukämischen Wirkungsweise von IFN- α hin. Sollte sich diese Assoziation in einer prospektiven Studie bestätigen, könnte sie dazu dienen, IFN- α -resistente Patienten frühzeitig zu identifizieren. Genauere Untersuchungen der Zellpopulationen zeigten, dass die Suppression von IRF-4 hauptsächlich in den CD3⁺ T-Zellen von CML-Patienten zu finden ist. Obwohl die CML auf der unkontrollierten Proliferation myeloischer Zellen beruht, scheinen T-Lymphozyten eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CML zu spielen: So werden spezifische Anteile des p210-Proteins über HLA-A3 von leukämischen Zellen präsentiert und

induzieren die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (Bocchia et al. 1995; 1996). Individuen mit HLA-A3 oder HLA-DR4 weisen gleichzeitig eine signifikant niedrigere Inzidenz von CML auf (Posthuma et al. 1999; 2000), besitzen also einen protektiven Mechanismus gegen die Expansion der Bcr-Abl-präsentierenden Leukämiezellen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass einige Mitglieder der IRF-Familie, IRF-1, IRF-2 und ICSBP, für die Regulation der Expression von MHC Klasse-II Rezeptoren über den Transaktivator CIITA (Koenig Merediz et al. 2000) (M.Schmidt, S. Koenig-Merediz, C. Ortmann et al., Publikation in Vorbereitung) von großer Bedeutung sind. In B-Zellen ist ein Komplex aus IRF-4 und anderen Proteinen essentiell für die Induktion von CIITA über den CIITA-Promotor III (van der Stoep et al. 2004).

Interessanterweise erzeugen CML-Zellen im Serum der Patienten ein spezifisches Zytokin-Profil, welches beispielsweise die Proliferation hämatopoetischer, Kolonie-bildender Zellen stimulieren kann (Brown et al. 1986; 1987; Estrov et al. 1991). Denkbar wäre somit auch ein hemmender Einfluss auf zytotoxische T-Zellen durch von den Leukämiezellen produzierte Zytokine. Die entscheidende Rolle des Immunsystems spiegelt sich auch in der Erfahrung wider, dass eine positive Korrelation zwischen Graft-versus-Host-Disease (GvHD) und vermindertem Rezidiv-Risiko besteht (Gale et al. 1990; Horowitz et al. 1990). Das Rezidiv-Risiko ist zudem bei T-Zell-depletierter Stammzell-Transplantation erhöht (Marmont et al. 1991). Patienten, die nach allogener Transplantation einen Rückfall erleiden, können durch Infusion von Spender-Lymphozyten (donor lymphocyte infusion, DLI) effektiv therapiert werden (Kolb et al. 1995; Collins et al. 1997). Zytotoxische T-Zellen vermögen dabei, die *BCR-ABL*-vermittelte Apoptose-Resistenz zu überwinden (Fuchs et al. 1995). Dieses Phänomen wird als Graft-versus-Leukämie Effekt bezeichnet; die Antigene, die dabei von den Killerzellen erkannt werden, sind noch nicht eindeutig charakterisiert.

1.3 Epigenetische Regulation durch Methylierung

1.3.1 Definition der Epigenetik

Obwohl die Zellen eines multizellulären Organismus genetisch einheitlich sind, zeichnen sie sich aufgrund differentieller Genexpression doch durch eine erstaunliche funktionelle und morphologische Variabilität aus. Der Begriff Epigenetik beschreibt den Mechanismus der stabilen Genexpressionsänderung von Zellen, der keine Änderungen der DNA-Sequenz beinhaltet, sondern Prozesse umfasst, die außerhalb (*epi*, griechisch) der konventionellen Genetik liegen. Wichtige epigenetische Mechanismen sind die DNA-Methylierung, auf die hier näher eingegangen werden soll, und Histon-Modifikationen. Epigenetische Prozesse spielen bei zahlreichen physiologischen Prozessen, wie der Inaktivierung des X-Chromosoms, dem genomischen Imprinting, der Entwicklung des Embryos und dem Schutz vor intragenomischen Parasiten, aber auch beim Alterungsprozess und bei malignen Erkrankungen eine wichtige Rolle

(Monk 1995). In den vergangenen Jahren wurde zunehmend erkannt, dass Krebs nicht nur eine *genetische* Erkrankung mit definierten Mutationen, Deletionen, Translokationen etc. ist, sondern dass die Krebszelle auch einen aberranten *Epigenotyp* erworben hat.

1.3.2 Grundbegriffe der DNA-Methylierung

DNA-Methylierung als postreplikative DNA-Modifikation tritt vor allem bei Cytosinen des Dinukleotids CG auf. In dieser Arbeit wird der Begriff DNA-Methylierung synonym mit der enzymatischen Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin verwendet. Die Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert dabei die Übertragung einer Methylgruppe vom Donor S-Adenosylmethionin (SAM) auf Cytosin. 5-Methylcytosin wird in humaner DNA vor allem im Kontext des Palindroms 5'-CpG-3' (*Cytosine phosphorylated Guanine*) gefunden. Dieses CG-Dinukleotid ist, wahrscheinlich aufgrund der erhöhten Mutationsrate von 5-Methylcytosin, in der Gesamt-DNA circa 5fach unterrepräsentiert. DNA-Regionen mit einer hohen CpG-Dichte sind repetitive Sequenzen, wie Satelliten-DNA, und vor allem die so genannten CpG-Inseln. Bis 15% der CpGs sind in diesen CpG-Inseln lokalisiert (Ng et al. 1999), welche sich in der Mehrzahl in Promotorregionen, seltener auch in Intron- oder Exonsequenzen oder am 3'-Ende von Genen befinden (Costello et al. 2000). Eine mathematische Definition der CpG-Insel beinhaltet einen G+C-Gehalt von über 55% (im Gesamtgenom 40%) und ein Verhältnis von CpG zu GpC von mindestens 0,65 (Gardiner-Garden et al. 1987; Laird 2003). CpG-Inseln umgeben den Transkriptionsstart von 50-60% aller Gene (Antequera et al. 1993) und sind, abgesehen von Inseln, die mit dem inaktivierten X-Chromosom, genomischem Imprinting oder einigen gewebespezifischen Genen assoziiert sind, normalerweise unmethyliert. Dies ist unabhängig von der Expression des nachgeschalteten Gens (Bird 1986). Diesen methylierungsfreien CpGs innerhalb der Inseln stehen die zu circa 80% methylierten CpGs der restlichen DNA gegenüber (Jaenisch et al. 2003). Wie die CpG-Inseln in diesem Umfeld methylierungsfrei bleiben, ist nach wie vor eine offene Frage.

Der Methylierungsstatus spezifischer CpGs einer Zelle wird nach der DNA-Synthese durch Methyltransferasen (DNMTs) aufrechterhalten und so identisch auf die Tochterzelle vererbt (Wigler et al. 1981). DNMT1 ist das Hauptenzym bei Säugern und für die postreplikative Vervollständigung hemi-methylierter DNA zu vollständig methylierter DNA zuständig; sie wird daher auch als „Erhaltungs-Methyltransferase“ bezeichnet. Die kürzlich entdeckten Enzyme DNMT3A und DNMT3B hingegen sind an der Methylierung von vorher nackter DNA beteiligt. Ihre simultane Inaktivierung blockiert in embryonalen Stammzellen die *de novo* Methylierung (Okano et al. 1999); sie sind somit mit großer Wahrscheinlichkeit die lang gesuchten „*de novo* Methyltransferasen“.

1.3.3 DNA-Methylierung und inaktiver Chromatinstatus

Es scheint mehrere Mechanismen zu geben, wie DNA-Methylierung und die Transkription von Genen zusammenhängen: Zunächst einmal wird das Binden einer Reihe von Transkriptionsfaktoren durch CpG-Methylierung im Promotorbereich blockiert (Tate et al. 1993), allerdings ist die Signifikanz dieses Mechanismus noch nicht völlig klar. Während einige Faktoren am Binden gehindert werden, wird das Andocken der so genannten Methyl-CpG-bindenden Proteine (Meehan et al. 1989; Lewis et al. 1992; Meehan, Lewis and Bird 1992) (MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP2) durch die Methylierung erst ermöglicht. Diese Proteine agieren als Transkriptions-Repressoren, indem sie Ko-Repressoren wie Histondeacetylasen (HDAC) zur DNA rekrutieren und schließlich einen inaktiven Chromatinstatus herstellen (Jones et al. 1998). Chromatin, welches deacetyliertes Lysin in den Histonen enthält, hat eine kompakte Struktur, die hemmend auf die Transkription wirkt. HDAC-Inhibitoren, wie Trichostatin A (TSA), können daher einen Teil der epigenetisch inaktivierten Gene reaktivieren. Auch die Methyltransferase DNMT1 bindet an ihrem N-terminalen Ende Histondeacetylase und Ko-Repressoren der Transkription (Robertson et al. 2000); DNA-Methylierung und Herstellen eines inaktiven Chromatinstatus verlaufen hier also parallel.

DNA-Methylierung ist demzufolge nicht ein unabhängiger Bestandteil der epigenetischen Regulation, sondern es besteht eine intensive, sich selbst verstärkende Rückkopplung zwischen dem „CpG-Methylierungs-Code“ und dem „Histon-Code“. Die epigenetische Regulation ist also ein dynamischer Prozess, der die Transkription eines Gens graduell und in mehreren Schritten reguliert (Jaenisch et al. 2003).

Trotz der zahlreichen Beispiele der inversen Korrelation zwischen Genexpression und DNA-Methylierung, existieren auch Gene, deren methylierungsunabhängige Expression nachgewiesen wurde: Das Vitellogenin-Gen wird beispielsweise auch bei vollständiger Methylierung exprimiert (Gerber-Huber et al. 1983). Je nach Zell- oder Gewebetyp wirkt sich ein identischer Methylierungsstatus eines Gens außerdem unterschiedlich stark auf die Expression aus (Wolfl et al. 1991). Eine Erklärung dieser Widersprüche bietet möglicherweise die Einbeziehung von zusätzlichen Faktoren, wie den MBPs, die die Methylierung eines Gens erst in Transkriptionshemmung „übersetzen“ (Meehan, Lewis, Cross et al. 1992).

1.3.4 Epigenetische Veränderungen und Krebsentstehung

In der Vergangenheit wurde angenommen, dass lediglich genetische Aberrationen, das heißt direkte Änderungen der DNA-Sequenz durch Mutation, zur Karzinogenese beitragen. Zunehmend wird jetzt die Rolle von epigenetischen Veränderungen, wie der DNA-Methylierung, deutlich und die Verknüpfungen zwischen Genetik und Epigenetik erkannt. Die Erweiterung der Forschung auf *epigenetische* Veränderungen in Zellen, wird das Spektrum bekannter molekularer Veränderungen in malignen Zellen wahrscheinlich wesentlich erweitern.

Im Folgenden werden die Mechanismen dargestellt, durch die DNA-Methylierung zur Entartung von Zellen beitragen kann. Dabei wird deutlich, dass Methylierungsveränderungen der Zellen einen frühen Schritt einer mehrstufigen Karzinogenese darstellen könnten, in dem die prämaligene Zelle mit einem mutationsfördernden Phänotyp ausgestattet wird.

1.3.4.1 Methylierungsinduzierte Mutationen

5-Methylcytosin im Kontext des CG-Dinukleotids wurde während des evolutionären Prozesses im humanen Genom zunehmend eliminiert und tritt daher nur zu 5-10% der theoretisch zu erwartenden Frequenz auf. Es wird angenommen, dass 5-Methylcytosin→Thymin-Konversionen durch spontane hydrolytische Deaminierung auftreten. Interessanterweise erhöht CpG-Methylierung zusätzlich die Empfindlichkeit der DNA gegenüber Noxen wie UV-Licht (Tommasi et al. 1997) und Karzinogenen wie Benzpyren (Denissenko et al. 1997; Chen et al. 1998), während gleichzeitig die Reparatur von methylierten CpGs durch Reparaturenzyme gegenüber der übrigen DNA erschwert ist (Denissenko et al. 1998). Es wird angenommen, dass die Bindung von Karzinogenen an die DNA durch die Methylierung gefördert wird. Hier besteht also eine direkte Verbindung zwischen Epigenetik und Genetik, die eventuell einen Beitrag zu dem beobachteten Phänomen leistet, dass Hypermethylierung und Mutationen oft die gleichen Gene betreffen (Baylin et al. 2000).

1.3.4.2 Aberrante Promotormethylierung und Transkriptionshemmung in Tumorzellen

Aberrante Hypermethylierung wird in unterschiedlichem Ausmaß in allen untersuchten humanen Tumoren gefunden. Hypermethylierung des Promotors ist dabei mit verzögerter Replikation, kondensierter Chromatinstruktur und Transkriptionshemmung des nachgeschalteten Gens assoziiert. Neben dem Expressionsverlust ist die Hypermethylierung in den meisten Fällen mit den Merkmalen „Fehlen einer genetischen Mutation“ und „Wiederherstellung der Transkription durch demethylierende Agentien“ verknüpft (Baylin et al. 1998; Jones et al. 1999). Inaktivierung durch Hypermethylierung von Promotorregionen ist mindestens genauso häufig wie Inaktivierung durch Mutation von Genen (Jones et al. 2002). Costello *et al.* schätzten bei globalen Analysen in Tumorzellen, dass circa 600 der 45000 CpG-Inseln in malignen Zellen aberrant methyliert sind (Costello et al. 2000; Smiraglia et al. 2001). Die Liste von hypermethylierten Promotorregionen in Tumorzellen wächst stetig und zahlreiche zelluläre Signalwege werden durch diese epigenetische Läsion inaktiviert: Zell-Zyklus (*P53*, *RB*, *P16^{INK4a}*, *P15^{INK4b}*, *P14^{ARF}*), Adhärenz (*CDH1*, *CDH13*), Apoptose (*DAPK*, *Caspase-8*, *APAF-1*), Metabolismus (*GSTP1*), hormonelle Regulation (*ER*, *PGR*, *AR*, *RARβ*), Signaltransduktion (*RASSF1*, *LKB1/STK11*) und DNA-Repair (*MLH1*, *O6-MGMT*, *MGMT*). DNA-Methylierung reguliert damit entscheidende Signalwege, die in der Tumorentstehung essentiell sind (Herman et al. 1995; Delgado et al. 1998; Tang et al. 2000; Teitz et al. 2000; Soengas et al. 2001). Die

Hypermethylierung und Transkriptionseinhibition von Genen, die an der Reparatur von DNA beteiligt sind, führt zur Akkumulation von Mutationen (Nakagawa et al. 2001) und ist ein weiteres Beispiel für die zahlreichen Zusammenhänge zwischen Epigenetik und Genetik in der Tumorentstehung.

Interessanterweise finden sich in Krebszellen sowohl Methylierungsmuster, die relativ einheitlich bei vielen Tumoren gefunden werden, als auch tumorspezifische Methylierung bestimmter CpGs (Costello et al. 2000). Eine Tumorzelle scheint also ihren eigenen, spezifischen und nicht zufälligen Epigenotyp, oder „Methylotyp“ (Esteller 2003) zu besitzen und für verschiedene Leukämien und Lymphome wurden bereits eigene Methylierungsprofile definiert (Issa et al. 1997; Toyota et al. 2001; Melki et al. 2002).

1.3.4.3 Hypomethylierung

Während CpG-Inseln während der Karzinogenese zunehmend *hypermethyliert* werden, kommt es gleichzeitig zu einer globalen *Hypomethylierung* des Genoms der Krebszelle. Diese Hypomethylierung betrifft vor allem die kodierenden Abschnitte und Introns von Genen, sowie repetitive Sequenzen. Verglichen mit einer gesunden Zelle verliert die Krebszelle dabei 20-60% der genomischen methylierten Cytosine (Esteller et al. 2001). Die große Mehrheit der hämatologischen Neoplasien besitzt, verglichen mit den Ausgangszellen (Esteller, Fraga et al. 2002; Stach et al. 2003), eine globale Hypomethylierung. Wie Hypomethylierung zur Entartung einer Zelle beitragen kann, soll im Rahmen dieser Arbeit nur kurz angesprochen werden. Grundsätzlich werden drei Mechanismen diskutiert: Chromosomale Instabilität, Reaktivierung von Transposons und Verlust des Imprinting (Esteller 2003). Hypomethylierung der DNA scheint zu gesteigerter mitotischer Rekombination zu führen und somit die Häufigkeit von Transpositionen, Genverlusten etc. erhöhen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass intragenomische parasitäre DNA-Sequenzen, beispielsweise LINES (long interspersed nuclear elements), durch den Verlust der Methylierung reaktiviert, transkribiert oder in andere DNA-Abschnitte transponiert werden. Schließlich können durch Verlust des Imprinting Gene reaktiviert werden (Cui et al. 2002): Die Aktivierung von Onkogenen durch Hypomethylierung wird immer wieder als möglicher Mechanismus angesprochen, hierfür gibt es jedoch keine konkreten Beweise.

1.3.5 Ursache und Steuerung der aberranten DNA-Methylierung

Bei der Suche nach den Ursachen der aberranten Hypermethylierung in Tumorzellen stellen sich gleich mehrere Fragen, die bisher nur zum Teil erforscht sind.

Wie kommt es zur Methylierung von normalerweise unmethylierten CpG-Inseln?

Es wurde bereits in mehreren Neoplasien gezeigt, dass das Level der bekannten DNA-Methyltransferasen in Tumoren gegenüber normalem Ausgangsgewebe erhöht ist, unter anderen in der AML und CML (Melki et al. 1998). Überexpression von DNMT1 führt in transfizierten

Zellen nach einigen Zellpassagen zur Methylierung vorher unmethylierter CpG-Inseln in Promotorregionen (Vertino et al. 1996). Trotzdem verhindert das Ausschalten von DNMT1 in Kolonkarzinomzellen nicht die aberrante Hypermethylierung (Rhee et al. 2000), so dass auch die *de novo* Methyltransferasen hier eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. In der AML konnte eine positive Korrelation zwischen dem DNMT1-Level und der Hypermethylierung von p15^{INK4b} nachgewiesen werden (Mizuno et al. 2001). Dennoch, dieser Zusammenhang hat keineswegs universelle Gültigkeit und wurde beispielsweise in Bronchialkarzinom-Zelllinien nicht gefunden (Sato et al. 2002).

Auch die Frage, warum spezifische CpG-Inseln in bestimmten Tumoren hypermethyliert vorliegen, während andere unmethyliert bleiben, lässt sich nur hypothetisch beantworten. So ließe sich die Methylierung als evolutionärer Prozess verstehen, in dem die Methylierung bestimmter Gene der Zelle einen Selektionsvorteil bietet. Dieses evolutionäre Konzept wird von der Tatsache unterstützt, dass in einem Tumortyp oft die gleichen Gene entweder durch Mutationen oder durch Hypermethylierung betroffen sind (Baylin et al. 2001). Die epigenetische Regulation bietet der Tumorzelle dabei einige Vorzüge gegenüber der genetischen Regulation: Im Gegensatz zu genetischen Veränderungen sind Hypermethylierungen potentiell reversibel und das Transkriptionslevel ist über die Methylierungsdichte dosierbar. Diese epigenetische Plastizität ermöglicht es der Krebszelle, dynamisch auf Umwelterfordernisse zu reagieren. Die Reversibilität von Promotormethylierung in Anpassung an veränderte Umweltbedingungen, wie sie beispielsweise während der Metastasierung auftritt, wurde anhand der E-Cadherin-Methylierung in Primärtumor versus Metastasen bereits nachgewiesen (Graff et al. 2000).

Neben dieser Theorie einer rein stochastischen Hypermethylierung im Rahmen eines evolutionären Selektionsprozesses gibt es Hinweise auf Unterschiede in der Empfänglichkeit individueller CpG-Inseln für eine *de novo* Methylierung. So gelang es Feltus *et al.*, in DNMT1-überexprimierenden Zellen methylierungs-empfindliche von methylierungs-resistenten CpG-Inseln zu unterscheiden. Sie postulieren, dass die Empfänglichkeit gegenüber Methylierung auf der DNA-Sequenz beruht und somit vorausgesagt werden kann (Feltus et al. 2003). Methylierung könnte somit über die Interaktion der DNA mit sequenzspezifisch bindenden Proteinen gesteuert sein. Von anderen Autoren wurde vorgeschlagen, dass repetitive Sequenzen, wie Alu, als Foci dienen könnten, von denen ausgehend sich Methylierung über die DNA ausbreitet (Graff et al. 1997). Eine weitere Hypothese, die aus der Beobachtung von embryonalen Zellen stammt, ist das Vorhandensein von protektiven Faktoren, die bestimmte Sequenzen, hier SP1-Elemente, vor Methylierung schützen (Brandeis et al. 1994) und in Tumorzellen verloren gegangen sein könnten.

Di Croce *et al.* (Di Croce et al. 2002) entdeckten ein weiteres Konzept der Steuerung von DNA-Methylierung und gleichzeitig eine faszinierende Verbindung zwischen genetischen und

epigenetischen Veränderungen: Sie konnten zeigen, dass das Onkogen *PML-RAR* DNA-Methyltransferasen und Histondeacetylasen zur Promotorregion eines Tumorsuppressorgens rekrutiert und dieses somit dauerhafte epigenetisch supprimiert. Solche Studien legen nahe, dass den beobachteten epigenetischen Fehlregulationen in Tumoren primär genetische Läsionen zugrunde liegen könnten (Esteller 2003). Schließlich ist zu erwähnen, dass auch eine individuelle Veranlagung zu einer gestörten epigenetischen Regulation und damit zu einem erhöhten Risiko für bestimmte Krebserkrankungen führen könnte. Beispielsweise wurden Polymorphismen im Folat-Metabolismus (Methylgruppen-Donor) gefunden, die mit einem erhöhten Gehalt an hypermethylierten CpG-Inseln und einem gesteigerten Risiko für bestimmte kindliche Leukämie-Formen korrelieren (Wiemels et al. 2001; Paz et al. 2002). Es besteht also nicht nur ein Einfluss des Methylierungsstatus auf genetische Veränderungen, wie in Punkt 1.3.4.1 und 1.3.4.3 beschrieben, sondern eine *wechselseitige* Beziehung, die die Tumorprogression vorantreiben könnte.

1.3.6 DNA-Methylierung und Gen-Inaktivierung: Ursache oder Konsequenz?

Gegenstand aktueller Forschung ist die Frage, an welcher Stelle die DNA-Methylierung in den Prozess des Abschaltens eines Gens einzuordnen ist. Es ist nach wie vor nicht völlig klar, ob CpG-Methylierung Ursache und erster Schritt oder als Folge und Endpunkt von Transkriptionshemmung zu interpretieren ist (Baylin et al. 2002; Clark et al. 2002). Derzeit wird von vielen Wissenschaftlern angenommen, dass Methylierung nicht der Initiator des Abschaltens eines Gens ist, sondern den Endpunkt des Inaktivierungsprozesses darstellt. Umgekehrt scheint fortlaufende Transkription eines Gens dessen Promotor vor Methylierung schützen. Zu dieser Theorie passt die Beobachtung bei humanen Mammaepithelzellen im Selektionsprozess, dass zunächst die Expression von *P16^{INK4}* supprimiert wird und dann die Promotor-Hypermethylierung einsetzt (Foster et al. 1998; Huschtscha et al. 1998). Dennoch, trotzdem das Gen schon vor der Methylierung inaktiviert zu sein scheint, konnte die Behandlung mit demethylierenden Agenzien die Expression wieder reaktivieren. Methylierung scheint hier also als sekundäres Element des Abschaltens eines Gens aufzutreten, welches dann für die Aufrechterhaltung des inaktiven Status wichtig ist (Bachman et al. 2003). Diese Studien legen nahe, dass DNA-Methylierung den Inaktivierungsprozess eher „einfriert“ als initiiert.

1.3.7 Die Bedeutung von Epigenetik für Klinik und Forschung

Die Erforschung von DNA-Methylierung verspricht zahlreiche klinische Anwendungsgebiete, von verbesserter Diagnostik bis hin zu neuen therapeutischen Strategien.

1.3.7.1 DNA-Methylierung und Tumordiagnostik

Mehrere Studien haben gezeigt, dass aberrante Methylierung früh während der Karzinogenese (Belinsky et al. 1996) und sogar in zahlreichen prämaligenen Läsionen, wie dem Barrett-

Ösophagus (Wong et al. 2001), der Hepatitis induzierten Zirrhose (Kaneto et al. 2001) oder metaplastischem Bronchialepithel von Rauchern (Kersting et al. 2000) auftritt. Die hohe Spezifität von Methylierungsmustern ermöglicht, ähnlich wie die Zytogenetik oder Expressions-Microarrays, die Klassifizierung von Neoplasien (Paz et al. 2003). Die Tatsache, dass vom Tumor freigesetzte DNA mit spezifischem Methylierungsmuster im freien Blutstrom über methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion nachgewiesen werden kann, bietet faszinierende Möglichkeiten für eine frühe Tumordiagnostik. Da normale Zellen keine DNA in den Blutstrom freisetzen, haben diese Untersuchungsverfahren eine extrem hohe Spezifität bei guter Sensitivität (Kawakami et al. 2000; Sullivan Pepe et al. 2001; Sidransky 2002). Aberrante CpG-Methylierung wurde auch als Marker für Tumorzellen in Sputum (Palmisano et al. 2000), bronchoalveolärer Lavage (Ahrendt et al. 1999) oder Lymphknoten (Sanchez-Cespedes et al. 1999) eingesetzt. Da epigenetische Veränderungen zu den frühesten beobachteten Ereignissen in der Karzinogenese gehören, stellen sie exzellente Angriffspunkte für eine frühe Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen, sowie für die Einschätzung der Malignität prämaligener Läsionen dar.

1.3.7.2 DNA-Methylierung und Prognose

Besonders interessant sind hier bereits erforschte Verknüpfungen zwischen Methylierungsstatus und Prognose sowie Ansprechen auf Therapie. Beispielsweise ist die Methylierung von *P15^{INK4b}* bei myelodysplastischen Syndrom (MDS), AML und ALL mit einer schlechten Prognose korreliert (Uchida et al. 1997; Quesnel et al. 1998; Wong et al. 2000). Die Hypermethylierung des DNA-Reparatur-Gens *MGMT* (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) verschiedener Tumoren gilt als ein Marker für gutes Ansprechen auf bestimmte Chemotherapeutika und ist an prognostischer Aussagekraft zahlreichen klinischen Prognosescores überlegen (Esteller et al. 1999; 2000; 2002). Die Inaktivierung des DNA-Reparaturgens scheint hier die Effektivität der Chemotherapie zu erhöhen, indem Tumorzellen den gesetzten Schaden nicht mehr reparieren können. DNA-Methylierungsmarker besitzen dabei eine von anderen Prognosefaktoren unabhängige Aussagekraft und sind nicht nur mit diesen korreliert (Maruyama et al. 2001; Powell et al. 2002)

1.3.7.3 Epigenetische Veränderungen als therapeutischer Angriffspunkt

Die potentielle Reversibilität von aberranter Methylierung bietet viel versprechende Angriffspunkte für neue Therapiekonzepte mit demethylierenden Agenzien. Die hohe Attraktivität dieser Substanzen besteht in der möglichen Reaktivierung von Tumorsuppressor-Genen. Decitabin (= 5-Aza-2-deoxycytidin, AzadC), ein in den 1960er Jahren entwickeltes Cytosin-Analogon, hemmt die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1): Als Nukleosid-Analogon wird Decitabin in die DNA eingebaut und bildet dann einen stabilen Komplex mit DNMT1; in

Folge sinkt die extrahierbare Methylaseaktivität der Zelle (Bild 1.4). Decitabin bewirkt nicht nur eine verminderte CpG-Methylierung, sondern auch einen offenen Chromatinstatus durch Beeinflussung des Acetylierungs- und Methylierungsstatus der Histone (Nguyen et al. 2002; Kondo et al. 2003). Einige Phase II Studien haben bereits einen moderaten bis signifikanten therapeutischen Effekt von Decitabin gezeigt, unter anderem in allen Phasen der CML (Sacchi et al. 1999; Kantarjian et al. 2002; Kantarjian, O'Brien et al. 2003) und beim myelodysplastischen Syndrom (Lubbert et al. 2001). In beiden Studien fiel die relativ lange Zeitdauer bis zum Eintreten eines therapeutischen Effekts und die fehlende Dosisabhängigkeit auf. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass

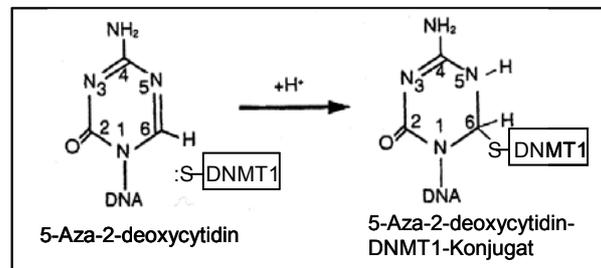


Bild 1.4: Wirkungsmechanismus (Santi et al. 1984) von 5-Aza-2-deoxycytidin (Decitabin). Die Methylase DNMT1 interagiert mit C6 und bildet ein stabiles Konjugat. Dies führt zum Abfallen der extrahierbaren Methylaseaktivität

Decitabin wahrscheinlich nicht wie andere Cytosin-Analoga primär zytotoxisch wirkt. Vielmehr scheinen Demethylierungsprozesse und Reaktivierung von Genen auch *in vivo* zum tragen zu kommen (Daskalakis et al. 2002). Ein Nachteil der relativ unselektiven Blockierung der Methylierung ist die hohe Toxizität der derzeit vorhandenen Substanzen. Interessanterweise bewirkt die kombinierte Behandlung von Krebszellen mit TSA, einem Inhibitor der Histondeacetylase, und AzadC eine effektivere Reaktivierung von Tumorsuppressor-Genen, indem wieder ein Transkriptions-permissiver Chromatinstatus hergestellt wird (Cameron, Bachman et al. 1999). Weitere Studien haben dann auch den synergistischen antineoplastischen Effekt auf Tumorzellen (Bovenzi et al. 2001; Gagnon et al. 2003; Primeau et al. 2003) und leukämische Zellen (Shaker et al. 2003) nachgewiesen. Die Synergie der beiden Substanzen könnte in der klinischen Anwendung durch Reduktion der Einzelkonzentrationen die Toxizität für den Patienten verringern; derzeit sind Phase I Studien für die klinische Anwendung in Entwicklung (Mompfaler 2003).

In vitro wurde kürzlich der synergistische Effekt von Imatinib und Decitabin nachgewiesen, erste klinische Versuche zu dieser Kombination wurden bereits gestartet (La Rosee et al. 2004). Viel versprechend ist auch der Ansatz, „epigenetische Medikamente“ als Sensitizer einer gezielten Therapie einzusetzen: In der AML und anderen Tumoren konnte beispielsweise durch Vorbehandlung mit HDAC das Ansprechen der Zellen auf Retinolsäure wieder hergestellt werden (Ferrara et al. 2001). Auch zahlreiche Gene des Interferon-Signalweges, wie die Interferon regulatorischen Faktoren (IRF), liegen in Tumorzellen epigenetisch inaktiviert vor und deren Reaktivierung ist durch Decitabin möglich (Kulaeva et al. 2003). Diese Tatsache lässt an die Kombination von Decitabin mit Interferon- α denken. Hier werden also Gene zunächst

durch epigenetische Modulation reaktiviert und in einem zweiten Schritt über eine gezielte Therapie angesteuert.

Trotz dieser Erfolge von Decitabin in der Krebstherapie darf nicht vergessen werden, dass diese Substanz zunächst durch karzinogene Eigenschaften auffiel. So wurden im Mausmodell in mehreren Studien durch regelmäßige low-dose AzadC-Injektionen zahlreiche Tumoren induziert (Stoner et al. 1973; 1978; Carr, Reilly and Riggs 1984; Carr, Reilly, Smith et al. 1984). Diese Daten zeigen das therapeutische Potential, aber auch die Gefahren der epigenetischen Manipulation.

1.3.7.4 Epigenetik und Forschung

Wenn eine Vielzahl von Tumorsuppressor-Genen in Krebszellen hypermethyliert vorliegt, so besteht umgekehrt ein gewaltiges Potential, über die Suche nach Methylierung eventuell neue, krebsrelevante Gene zu identifizieren. Ein erster Hinweis auf die Tumorsuppressor-Funktion von p15^{INK4b} wurde beispielsweise über die Verknüpfung seiner aberranten Methylierung mit dem beobachteten Expressionsverlust gewonnen (Herman, Jen et al. 1996). Dabei bleibt natürlich zu bedenken, dass nicht jede CpG-Methylierung eines Gens diesem eine Rolle in der Karzinogenese zuweist.

Ähnlich wie in der klassischen Genetik werden zunehmend Umweltfaktoren bekannt, die über epigenetische Veränderungen an der Karzinogenese beteiligt sind. Epigenetische Veränderungen könnten ein wichtiges Verbindungsglied zwischen Umwelteinflüssen und der Krebsentstehung darstellen. Wie in der Vergangenheit die Genetik könnte auch die Epigenetik Erklärungen bieten, wie Umwelteinflüsse, beispielsweise protektive Faktoren für Krebserkrankungen, oder der Alterungsprozess eine Zelle beeinflussen. Die Mechanismen, über die Faktoren wie Diät auf Langzeiterkrankungen Einfluss nehmen, sind nämlich nur teilweise bekannt und einige Autoren spekulieren, dass die Kumulation epigenetischer Veränderungen zur Manifestation von Krebs und anderen Krankheiten führen könnte (Petronis 2001; Tremolizzo et al. 2002) Die mit dem Alter akquirierten Methylierungsveränderungen könnten einen Vorläufer der aberranten Methylierung darstellen und damit zu dem altersabhängig steigenden Krebsrisiko beitragen (Ahuja et al. 1998; 2000).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die Gründe für das Fehlen der Transkripte für IRF-4 in CML-Patienten geklärt werden (Schmidt et al. 2000). Die beobachtete Deregulation der IRF-4-Expression könnte durch Aberrationen von upstream-Regulationsfaktoren der IRFs oder durch Promotorveränderungen des IRF-4-Gens bedingt sein. Diese Arbeit konzentriert sich hauptsächlich auf die Untersuchung des IRF-4-Promotors. Als Modellsystem dienen vor allem IRF-4-positive und -negative Leukämie-Zelllinien im Vergleich. Das Vorhandensein dauerhafter genetischer Aberrationen des IRF-4-Promotors ist aufgrund der Reversibilität der IRF-4-Expression nach IFN- α -Therapie (Schmidt et al. 2000) unwahrscheinlich. Dennoch sollen Mutationen oder Deletionen des IRF-4-Promotors durch Sequenzierung von IRF-4-negativen und IRF-4-positiven Zelllinien, sowie von CML-Patienten und Kontrollpersonen ausgeschlossen werden. Anschließend wird der IRF-4-Promotor in Leukämie-Zelllinien und CML-Patienten mittels zwei verschiedener, selbst etablierter Methoden auf Methylierungsveränderungen untersucht. Gleichzeitig sollen IRF-4-negative Zelllinien mit demethylierenden Substanzen behandelt und anschließend die IRF-4-Expression gemessen werden. Schließlich soll die Expression von DNA-Methyltransferasen und Methyl-CpG-Bindungsproteinen in IRF-4-negativen und IRF-4-positiven Zelllinien verglichen werden, um eine mögliche Ursachen für detektierte Methylierungsunterschiede zu untersuchen. Im Anhang finden sich Vorversuche zur Untersuchung des Einflusses von IRF-4 und ICSBP auf das Apoptose-Verhalten transfizierter Zellklone.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene humane hämatopoetische Zelllinien kultiviert und für Experimente eingesetzt (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Verwendete humane Zelllinien

Zelllinie	Art	Herkunft
BV-173	B-Zell Vorläufer Leukämie, CML, Blastenkrise	DSMZ ²
RPMI-8226	Multiples Myelom (IgG lamda)	DSMZ ²
SD-1	B Lymphoblasten, ALL	DSMZ ²
K-562	CML in Blastenkrise, Ph+	ATCC ¹
U-937	Histiozytäres Lymphom, Monozyten-Marker	ATCC ¹
Jurkat	T-Zell Leukämie, ALL	ATCC ¹
LAMA-84	CML in Blastenkrise, megakaryozytäre und erythrozytäre Marker	DSMZ ²
CML-T1	T-Zell Leukämie, CML, Blastenkrise, bcr-abl +	DSMZ ²
EM-2	CML in Blastenkrise, Ph+	DSMZ ²

¹American Type Culture Collection, Rockville, USA; ²Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland

2.1.2 Patientenproben und Normalblut

Tabelle 2.2: Patientenproben und Normalblut

Patient (CML)/ Normalblut (NB)	Interne Probennummer	Geburtsjahr, Geschlecht	CML-Phase	BCR-ABL-Translokation, Bruchpunkt	IRF-4
CML 1	366/94	1961, männlich	Chronische Phase, Erstdiagnose	b3a2/b2a2	-
CML 2	359/95	1947, männlich	Chronische Phase, Erstdiagnose	b3a2	-
CML 3	331/95	1949, männlich	Blastenkrise, Erstdiagnose	b3a2	-
NB 1	242/95	k.A., weiblich	Normalblut	---	+
NB 2	933/95	1963, weiblich	Normalblut	---	+
NB 3	777/00	1970, weiblich	Normalblut	---	k.A

k.A. = keine Angabe

Bei den Proben handelt es sich um peripheres Blut von CML-Patienten und Normalpersonen. Bei den CML-Patienten wurde Gesamtblut bei Erstdiagnose, das heißt nicht sortierte Zellpopulationen vor Therapie verwendet. Der IRF-4-Status der CML-Patienten war in der RT-

PCR negativ, der IRF-4-Status der Normalpersonen NB1 und NB2 positiv (NB3 nicht getestet). Zwei der CML-Patienten befanden sich in chronischer Phase, ein Patient in Blastenkrise.

2.1.3 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma „TIB MOLBIOL“, Berlin, bezogen.

Tabelle 2.3: Sequenzen der Primer zur mRNA-Expressionsanalyse

Gen	Name	Richtung	Sequenz 5'-3'
β-Actin	Act-1	sense	CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT
	Act-3	reverse	AATTCATCTTGTTTTCTGCG
IRF4	IAT-3	sense	TCCCCACAGAGCCAAGCATAAGGT
	IAT-4	reverse	AGGGAGCGGCCGTGGTGAGCA
ICSBP	ICS-1	sense	CAGTGGCTGATCGAGCAGATTGA
	ICS-2	reverse	ATTCACGCAGCCAGCAGTTGCCA
DNMT1	DNMT1-1	sense	CCCCTGAGCCCTACCGAAT
	DNMT1-2	reverse	CTCGCTGGAGTGGACTTGTG
DNMT3A	DNMT3A-1	sense	GACAGAGGCACCGTTCAC
	DNMT3A-2	reverse	AGGGCATGGCGGGCATCT
DNMT3B	DNMT3B-1	sense	TGTGGGTCATACCGTGTA
	DNMT3B-2	reverse	TTGCAATAACTGTCTTGG
MBD1	MBD1-1	sense	CACCCTCTTCGACTTCAAACAAG
	MBD1-2	reverse	CAACCTGACGTTTCCGAGTCTT
MBD2	MBD2-1	sense	AACCCTGCTGTTTGGCTTAAC
	MBD2-2	reverse	CGTACTTGCTGTACTCGCTCTTC
MBD4	MeCP2-1	sense	GGACAACAACCTGCTCACC
	MeCP2-2	reverse	ACAGGTATTGCCATTTTG
MeCP2	MeCP2-1	sense	CCCACCCTGCCTGAA
	MeCP2-2	reverse	GATGTGTCGCCTACCTTTTCG

Tabelle 2.4: Sequenzen der Primer im Restriktions-PCR-Assay

Gen	Name	Richtung	Sequenz 5'-3'
IRF4 Assay Fragment I	hIRF4p-7	sense	TTGAGATGGAGTCTTGCTCTGT
	hIRF4p-8	reverse	ATCACTTCCAGACTTCAGTTCACCT
IRF4 Assay Fragment II	hIRF4p-1	sense	AAGGTGAACTGAAGTCTGGAAGTGA
	hIRF4p-6	reverse	CCAGGACCTCAGGAGGCCAGTCA
IRF4 Assay Fragment III (getestete Primer)	hIRF4p-5	sense	GTGATTGACTGGCCTCCTGAGGT
	hIRF4p-9	sense	TGAGGTCCTGGCGCAAAGGCGAGA
	hIRF4p-4	reverse	CTCGCCCTGGACTCGGAGCTGAG
	hIRF4p-3	reverse	GAGGGCAGCGGTGGGTCCCAAGA
	hIRF4p-10	reverse	AGCGGTGAACTGAGAGTGCGAGGT
	hIRF4p-11	reverse	TCCTCCGCCCGCTCTGCTCTGCA
	hIRF4p-In1	reverse	GGTCTCTCTGGTATCAGCCTCAC

Tabelle 2.5: Sequenzen der Primer zur Klonierung des IRF-4-Promotors, Sequenzierprimer

Gen	Name	Richtung	Sequenz 5'-3'
IRF4 Promotor Fragment 1	hIRF4p-7	sense	TTGAGATGGAGTCTTGCTCTGT
	hIRF4p-6	reverse	CCAGGACCTCAGGAGGCCAGTCA
IRF4 Promotor Fragment 2	hIRF4p-12	sense	GCCACATCGCTGCAGTTTAG
	hIRF4p-10	reverse	AGCGGTGAACTGAGAGTGCGAGGT
IRF4 Promotor Bisulfit 1.PCR	hIRF4p-2s	sense	TATTTGGATTTTTAGGGAGTTTTTTTT
	hIRF4p-4s	reverse	CTCACCTAAACTCAAACTAAAAAC
	hIRF4p-2s	sense	TATTTGGATTTTTAGGGAGTTTTTTTT

Gen	Name	Richtung	Sequenz 5'-3'
IRF4 Promotor Bisulfit Fragment 1	hIRF4p-2s	sense	TATTTGGATTTTATAGGGAGTTTTTTTT
	hIRF4p-6s	reverse	ACCCAACCTCCCTTAAACTATTAAACT
IRF4 Promotor Bisulfit Fragment 2	hIRF4p-5s	sense	AGTTTAATAGTTTAAGGGAGTTGGGT
	hIRF4p-4s	reverse	CTCACCCCTAAACTCAAAACTAAAAAC
Sequenzierung	T7	sense	TAATACGACTCACTATAGGG
Sequenzierung	M13rev	reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

2.1.4 Antikörper

Die für das Western-Blotting verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper im Western-Blotting

Spezifität	Spezies	Besonderheit	Stock-Konzentration	Konzentration	Hersteller
β-Actin (AC-74)	Maus	monoklonal	200µg/ml	1:2500	Sigma
IRF4 (ICSAT) (M17)	Ziege	polyklonal	200µg/ml	1:200	Santa Cruz
ICSBP (C-19)	Ziege	polyklonal	200µg/ml	1:200	Santa Cruz
Anti-Maus	Ziege	HRP-konjugiert	300µg/ml	1:2000	DAKO
Anti-Ziege	Esel	HRP-konjugiert	400µg/ml	1:1000	Santa Cruz

2.1.5 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer, die in der Arbeit zum Einsatz kamen, wurden nach den in Tabelle 2.7 angegebenen Vorschriften angesetzt.

Tabelle 2.7: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Agarose-Mischung	1Teil Agarose; 1Teil Nusieve Agarose ('low melting' Agarose)
Chloroform-Isoamylalkohol, 25:1	24 Teile Chloroform, 1 Teil Isoamylalkohol
Dextranlösung	5g Dextran T500, 0,876g NaCl, <i>ad</i> 100ml mit dH ₂ O
Ethidiumbromid, 10mg/ml	1g Ethidiumbromid, <i>ad</i> 100ml mit dH ₂ O
Elektroporationsmedium	10mM Dextrose, 0.1mM DTT in RPMI 1640 Medium
Blotting Puffer, 1x	15,1g TrisOH, 42,75g Glycin, 500ml Methanol, <i>ad</i> 5000ml mit dH ₂ O
Luria-Bertani-Festmedium (LB)	5g Bacto-Trypton, 5g NaCl, 2.5g Yeast-Extrakt, 3.75g Agar, 0.005mg/ml Ampicillin, 0.04mg/ml x-Gal in DMSO
Luria-Bertani-Flüssigmedium (LB)	5g Bacto-Trypton, 5g NaCl, 2.5g Yeast-Extrakt, 0.005 mg/ml Ampicillin
Lyse-Puffer (10x) Dextran Zellseparation	8,02g Ammoniumchlorid, 1g Kaliumhydrogen-carbonat, 0,037g EDTA, <i>ad</i> 100ml mit dH ₂ O
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 0.5M, pH8.0	186.1g EDTA, <i>ad</i> 800ml mit dH ₂ O, pH-Wert Einstellung mit NaOH-Plättchen
Gelladepuffer	0.25% Bromphenolblau, 40% (w/v) Sucrose in dH ₂ O

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
SDS, 10%	10g Dodecylsulfat (SDS), <i>ad</i> 100ml mit dH ₂ O
Trenngel 10% (Western-Blotting)	20ml 1,5M TrisHCl (pH8,8), 26,8ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 33,2ml dH ₂ O, 0,8ml SDS (10%)
Sammelgel 3% (Western-Blotting)	15ml 0,5M TrisHCl (pH6,8), 6ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 39ml dH ₂ O, 0,6ml SDS (10%)
Probenpuffer (Western-Blotting)	1ml Glycerol, 0,5ml β -Mercaptoethanol, 3ml 10% SDS, 1,25ml 1M TrisHCl (pH 6,7), 1-2mg Bromphenolblau
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), 50x	0,04M TrisAcetat, 0,0001M EDTA (z.B. 242g TrisOH, 57,1ml Eisessig, 100ml 0,5M EDTA pH8,0, <i>ad</i> 1000ml mit dH ₂ O)
Zellkultur-Medium	RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
Elektrophoresepuffer (Western-Blotting), 1x	30,3g TrisOH, 144,2g Glycin, 25g SDS, <i>ad</i> 1000ml mit dH ₂ O
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE), 1x	0,045M TrisBorat, 0,001M EDTA
TBST-Puffer	1000ml 1x TBS-Puffer, 500 μ l Tween 20
TBS-Puffer, 10x	44,4g TrisHCl, 26,5g TrisOH, 80,69g NaCl, 2g KCl, <i>ad</i> 1000ml mit dH ₂ O
PCR-Puffer (Perkin Elmer)	100mM TrisHCl pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl ₂ , 0.01% (w/v) Gelatine
RIPA-Puffer	1xPBS, 1% NP40, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, frisch dazu: 1mmol/l PMSF, 2 μ g/ml Leupeptin, 4 μ g/ml Aprotinin, 1,5 μ g/ml Pepstatin, 1 μ g/ml Trypsininhibitor, 10 μ l/ml Natriumorthovanadat (100mM)

2.1.6 Reagenzien

In Tabelle 2.8 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, in Tabelle 2.9 die benutzten Kits und in Tabelle 2.10 eingesetzten Reagenzien aufgeführt.

Tabelle 2.8: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i>	Fermentas
Restriktionsendonuklease <i>MspI</i>	Fermentas
Restriktionsendonuklease <i>HaeII</i> (<i>BspI43II</i>)	Fermentas
Restriktionsendonuklease <i>Bsh1236II</i> (<i>FnuDII</i>)	Fermentas
Restriktionsendonuklease <i>HpaII</i>	Fermentas
Ampli-Taq DNA Polymerase	Perkin Elmer
Taq DNA Polymerase	Qiagen
SuperScript TM Reverse Transcriptase	Gibco/BRL
Platinum Pfx Polymerase	Gibco/BRL

Tabelle 2.9: Verwendete Kits

Enzym	Hersteller
QIAamp DNA Mini-Kit	Qiagen
TOPO TM TA Cloning Kit (mit pcR2.1 Vector)	Invitrogen
Wizzard DNA cleaning Kit	Promega
GeneClean Spin Kit	Bio101 Inc.
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1	Applied Biosystems

Enzym	Hersteller
Microcon-Mikrokonzentratoren (Typ 100)	Millipore
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
RPN 2109 ECL Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech

Tabelle 2.10: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
β -Mercaptoethanol	Merck
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl(-D-Galactopyranoside) (x-Gal)	Sigma
5-Aza-2-deoxycytidin und 5-Azacytidin	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Biorad
Agar (bacteriological grade)	Sigma
Agar Nusieve	Biozym
Agarose	Serva
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-RAD
Ampicillin	Sigma
Aprotinin	Sigma
Aqua dest.	Merck, Braun
Bacto- Trypton	DIFCO Laboratories
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform (Trichlormethan)	Roth
Color Marker Wide Range (C3437)	Sigma
Cycloheximid (CHX)	Sigma
Dextran (MW 500.000)	Sigma
Dextranblau	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dithiotreitol (DTT)	Gibco/BRL
DNA-Marker, 123bp-Leiter	Gibco/BRL
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Gibco/BRL
Ethanol, absolut	Serva
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Formamid deionisiert	Merck
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco/BRL
Geneticin (G418)	Gibco/BRL
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Isopropyl-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Leupeptin	Sigma
L-Glutamin	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Riedel-de Haen
Natriumacetat	Merck
Natriumbisulfit (pH 5,0)	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumdeoxycholat	Fluka
Natriumfluorid	Roth
Nonidet P-40	Sigma

Reagenz	Hersteller
Nusieve Agarose (low melting Agarose)	Biozym
Orthovanadate	Sigma
Paraffin-Öl, dickflüssig	Merck
PBS-Dulbecco's	Biochrom
Penicillin-Streptomycin	Biochrom
Pepstatin A	Sigma
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phorbolmyristalacetat (PMA)	Sigma
Poly(dA-dT)poly(dA-dT) Kopolymer	Amersham Pharmacia Biotech
Protein Color Marker, Wide Range	Sigma
RNAsin	Promega
RPMI Medium 1640	Gibco/BRL
Salzsäure	Merck
Sephadex	Amersham Pharmacia Biotech
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	ICN
Tetraethylenmethyldiamin (TEMED)	Bio-RAD
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck
TRIS-Base	Roth
TRIS-hydrochlorid	Roth
Trypsininhibitor	Sigma
Tween 20	Sigma
Urea	Sigma
Western-blocking Reagent	Roche
Yeast extract	Roth

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle immortalisierten Zelllinien wurden in RPMI-1640 Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 5%CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank kultiviert. Alle 2-4 Tage wurden die Zellen passagiert: Nach Zellzählung eines mit Trypanblau (1:1, Blaufärbung von toten Zellen) versetzten Aliquots in der Neubauer-Zählkammer wurden die Zelllinien auf eine Konzentration von 2-5x10⁵ Zellen pro 1ml Medium eingestellt. Zum Einfrieren wurden 1x10⁷ Zellen in Kryo-Röhrchen in 1ml Einfriermedium aufgenommen, für 24h im Isopropanol-Ständer bei -80°C langsam eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert. Beim Auftauen wurden die Zellen schnell auf 37°C erwärmt. Um das DMSO herauszuwaschen, wurden die Zellen 1-2 mal in 30ml Kulturmedium gegeben und anschließend abzentrifugiert (5min, 300g) bevor sie in frisches Medium aufgenommen wurden. Zur Stimulation von Zelllinien wurden diese in einer Konzentration von 5x10⁵ Zellen pro ml Kulturmedium mit den entsprechenden Substanzen versetzt und für einen bestimmten Zeitraum im Brutschrank inkubiert. Stets wurden Kontrollen ohne Stimulanz mitgeführt. Anschließend erfolgte die RNA-, DNA- oder Proteinextraktion.

2.2.1.1 Inkubation mit 5-Aza-2-deoxycytidin (AzadC)

Die zytotoxische Substanz 5-Aza-2-deoxycytidin (AzadC) bindet irreversibel und kovalent an das Enzym DNA-cytosin-5-methyltransferase (DNA MTase) (Santi et al. 1984). Dieses Enzym ist nach der DNA-Synthese in Zellen für die Methylierung von Cytosin an Position 5 im Pyrimidin-Ring verantwortlich. Die Zielsequenz der DNA MTase ist das Dinukleotid-Palindrom CG, auch abgekürzt als CpG. Inkubiert man Zellen mit AzadC, fällt deshalb die MTase Aktivität und damit die Methylierung von CpGs in den Tochterzellen ab. Um den Einfluss der Demethylierung auf die IRF-4 Expression zu untersuchen, wurden Zelllinien sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig mit AzadC stimuliert. Wegen der kurzen Halbwertszeit von AzadC wurde alle 24h die Ausgangsmenge neu hinzugegeben.

Tabelle 2.11: Stimulation mit 5-Aza-2-deoxycytidin (AzadC)

Zelllinien	Endkonzentration	Inkubationsdauer
CML-T1, EM-2, Jurkat, Lama-84, K562, U937	0,5µM, 1µM, 3µM, 10µM	72h
CML-T1, EM-2, Jurkat, K-562, U-937, SD-1, RPMI-8226, BV-173	3µM	24h, 48h, 72h

2.2.1.2 Inkubation mit 5-Azacytidin (AzaC) und Trichostatin A (TSA)

Die Zelllinien Jurkat und CML-T1 wurden konzentrationsabhängig mit den Substanzen 5-Azacytidin (AzaC) oder Trichostatin A (TSA) stimuliert. AzaC hemmt wie AzadC die Methylierung und Trichostatin A (TSA) ist ein Inhibitor der Histondeacetylase und nimmt daher Einfluss auf die kondensierte Chromatinstruktur. AzaC wurde in den Konzentrationen 0; 0,5; 1; 3; 5 und 10 μ M eingesetzt. TSA kam in den Konzentrationen 0; 50; 100; 250; 500 und 1000nM zur Anwendung.

2.2.2 Dextran-Zellseparation zur Isolierung von Leukozyten

Die Dextran-Zellseparation dient der Abtrennung von Leukozyten von den restlichen Bestandteilen des Blutes; Grundlage der Methode ist die durch Dextran beschleunigte Sedimentation und eine sich anschließende Lyse von Rest-Erythrozyten.

Blut und Dextranlösung wurden im Verhältnis 5:1 gemischt und für 40min bei RT inkubiert. Der Plasma-Überstand mit dem Leukozytensaum wurde abgehoben, in ein neues Röhrchen überführt und für 10min bei 370g zentrifugiert. Nach Abheben und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment in 2ml 1xLyse-Puffer resuspendiert und mit 1xLyse-Puffer auf 10ml aufgefüllt. Nach exakt 5min Inkubation bei RT wurde 10min mit 370g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellsediment wurde zum Waschen in 10ml PBS aufgenommen und erneut wie oben zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die Leukozyten zur Weiterverarbeitung (RNA-, DNA-Extraktion etc.) auf Eis gelagert oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.3 RNA-Extraktion

Die Extraktion der Gesamtzell-RNA aus humanen Zelllinien erfolgte mittels Phenol/Chloroform und Guanidiumthiocyanat, basierend auf der Einzelschritt-Methode nach Chomczynski and Sacchi (Chomczynski et al. 1987). Diese Methode beruht auf der Besonderheit von RNA, sich in saurer Umgebung (pH 4) in Wasser zu lösen, während sich DNA und Proteine in einer organischen Phase (bzw. Interphase) absondern lassen. Alle Schritte wurden auf Eis, in 1,5ml Eppendorf-Röhrchen und, da RNAzol Phenol enthält, unter dem Abzug durchgeführt. Durch Abzentrifugieren einer entsprechenden Menge an Kulturmedium erhielt man ein Zell-Pellet aus maximal 5×10^6 Zellen. Diese wurden mit 900 μ l RNAzol gründlich durchmischt. Das RNAzol enthält Phenol und Guanidiumthiocyanat und bewirkt die Zellyse. 100 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) wurden hinzugegeben, das Gemisch gevortext (mindestens 30s), für 5min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (20min, 4°C, 12000g). Es entstanden drei abgrenzbare Phasen: Eine untere organische Phase (Hauptanteil der Proteine, kleine DNA-Fragmente), eine Interphase (einige Proteine, große DNA-Fragmente) und schließlich die obere, wässrige Phase, in der die RNA gelöst ist. Diese obere Phase wurde vorsichtig abgehoben, in

einem neuen Röhrchen mit 2-Propanol (1:1) versetzt und zur Fällung der RNA über Nacht bei –20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (20min, 4°C, 12000g) wurde der Überstand verworfen, das RNA-Pellet zur Entfernung von Salzresten in 600µl 75% Ethanol resuspendiert und erneut zentrifugiert (20min, 4°C, 12000g). Nach möglichst vollständiger Abnahme des Überstandes wurde das Zell-Pellet luftgetrocknet, in 20-30µl DEPC-behandeltem destilliertem Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurden photometrisch bestimmt, eine eventuelle Degradation durch Agarosegelelektrophorese abgeschätzt.

2.2.4 cDNA Synthese

Um die RNA in PCR-Reaktionen einsetzen zu können, muss die messenger-RNA (mRNA) in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Diese Reaktion wird durch eine modifizierte virale RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase, RT) katalysiert; als Primer dienen 6bp DNA-Fragmente mit zufälliger Basenverteilung (random hexamer-primer). Zur Denaturierung der RNA wurden in einem Volumen von 20µl 1µg RNA mit 5µM random hexamer primer, 625µM von jedem dNTP, 10mM DTT und 1xPCR Puffer auf 70°C für 10min erhitzt. Nach Abkühlung auf Eis wurden 40U RNasin, ein Inhibitor von Ribonukleasen, und 140U Superscript-RT, die reverse Transkriptase, hinzugefügt und der Ansatz zunächst für 10min bei Raumtemperatur, dann für 40min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der RT erfolgte abschließend eine Inkubation für 5min bei 90°C. Die relativ stabile cDNA wurde bei –20°C gelagert. In jeder RT-Reaktion wurden Negativkontrollen (ohne RNA) und Positivkontrollen (bereits getestete RNA) mitgeführt.

2.2.5 DNA-Extraktion

Als Vorlage für die Sequenzierung des IRF4-Promotors diente reine DNA, die mit Hilfe von Silicasäulen aus Zelllinien gewonnen wurde. Die DNA-Isolierung wurde unter Benutzung des QIAamp® DNA Mini Kits nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Dieses Verfahren beruht auf der Eigenschaft von DNA, bei hohen Salzkonzentrationen an Silicate zu binden. Nach anschließenden Waschschritten und Degradation der RNA durch RNase kann die DNA durch einen Puffer mit niedriger Salzkonzentration eluiert werden. Die DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.6 Quantifizierung von DNA und RNA

Konzentration und Reinheit von RNA und DNA wurden photometrisch bestimmt. Hierbei wird die Absorption (optische Dichte = OD) der Nukleinsäurelösung bei 260nm gemessen. Die Konzentration in ergibt sich dann aus folgender Formel: $c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = OD_{260\text{nm}} \times$

Verdünnungsfaktor x 40 (bei RNA) bzw. 50 (bei DNA). Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} spiegelt den Grad der Kontamination mit Protein wieder und sollte größer als 1,5 sein.

2.2.7 Restriktionsverdau

Für den Restriktions-PCR-Assay wurde Gesamt-DNA aus humanen Zelllinien mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die spezifische, 4bp bis 8bp lange DNA-Sequenzen, erkennen und an die DNA an dieser Stelle schneiden. Hier wurden methylierungssensitive Enzyme (*HpaII*, *Bsh1236I* und das *HaeII*-Isochizomer *Bsp143II*) und als Kontrollen ein methylierungsinsensitives Enzyme (*MspI*) eingesetzt. Die methylierungssensitiven Enzyme *HpaII* und *HaeII* konnten nur dann schneiden, wenn in der Restriktionsschnittstelle das Cytosin des CpG-Dinucleotids *nicht* methyliert war – CpG-Methylierung blockierte also den Verdau. *EcoRI* besitzt keine Schnittstelle im Promotorbereich und diente deshalb als Positivkontrolle für die PCR; *MspI* hat mehrere Schnittstellen und wurde deshalb als Kontrolle für den vollständigen Verdau der DNA verwendet. Nach der Restriktion diente die DNA als Template für drei verschiedene PCRs im IRF-4-Promotor-Bereich (Bild 2.1).

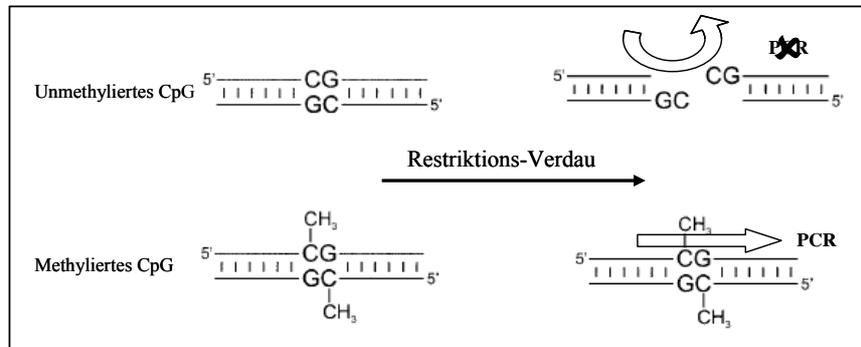


Bild 2.1: Prinzip des Restriktions-PCR-Assays (modifiziert nach Dahl et al. 2003)

In einem 40µl-Ansatz wurden zunächst 1000ng Gesamt-DNA mit 40U Enzym in dazugehörigem 1xPuffer für 6h bei 37°C verdaut. Um vollständiges Schneiden zu gewährleisten, wurden zu diesem Ansatz dann nochmals 20U Enzym hinzugegeben, das Volumen auf 70µl 1xPuffer erhöht und die Restriktion für weitere 16h fortgesetzt. Die verdaute DNA wurde bei +4°C gelagert.

2.2.8 Bisulfit-Behandlung von DNA

Die Methode der Bisulfit-Behandlung genomischer DNA wurde 1992 von Frommer *et al* (Frommer et al. 1992) entwickelt und eröffnete die Möglichkeit, den Methylierungsstatus eines spezifischen Cytosins durch methylierungsabhängige Veränderungen der DNA-Sequenz zu

bestimmen. Diese Technik beruht auf der Tatsache, dass Bisulfit unmethyliertes Cytosin durch Deaminierung effizient in Uracil umwandelt, während 5-Methylcytosin vor dieser Modifikation weitgehend geschützt ist. Damit alle unmethylierten Cytosine möglichst vollständig konvertiert werden, ist die Denaturierung der DNA vor Bisulfit-Exposition wichtig. Die Deaminierung vollzieht sich über die Schritte Sulfonierung, hydrolytische Deaminierung und alkalische Desulfonierung. Nach der Bisulfit-Behandlung liegen dann zwei nicht mehr zueinander komplementäre Einzelstränge vor (Bild 2.2). Bei der sich anschließenden PCR-Amplifikation verhält sich Uracil wie Thymin. Die Bisulfit-induzierten Sequenzänderungen bilden dann die Basis für die Unterscheidung von methylierten und unmethylierten Cytosinen und können durch Sequenzierung und Vergleich mit der Ausgangsequenz (Bild 2.3) bestimmt werden.

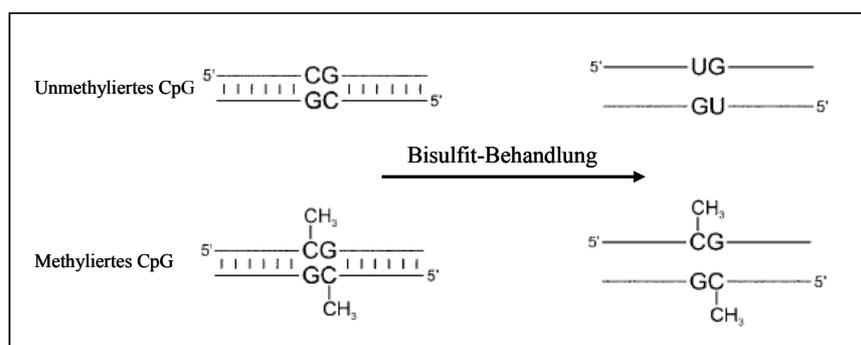


Bild 2.2: Prinzip der Bisulfit-Behandlung (modifiziert nach Dahl et al. 2003)

Die **Bisulfit-Behandlung** der genomischen DNA erstreckte sich über einen Zeitraum von drei Tagen (Kersting et al. 2000):

Tag 1: In einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde 1µg DNA mit 2µg Poly(dA-dT)poly(dA-dT) Kopolymer in 0,3M NaOH im 50µl -Ansatz für 15min bei 37°C denaturiert. Nach leichtem Vortexen wurden 30µl 10mM Hydrochinon, 520µl 3M Natriumbisulfit (pH 5,0) und 7-8 Tropfen Mineralöl hinzugegeben. Der Ansatz für 20h im Dunkeln bei 55°C inkubiert.

Tag 2: 1ml Reinigungsharz wurden in einem 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 570µl des Inkubationsansatzes gründlich vermischt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte über das Harz in Säulen des Promega Wizzard DNA cleaning kits. Das DNA-Reinigungsharz-Gemisch wurde dabei mittels Vakuum durch die Säulen gezogen (Aufstecken der Säulen auf eine Vakuumflasche, Regulation durch 3-Wege-Hähne). Unter weiterer Vakuumapplikation wurde die Säule für circa 60s mit 80%igem Isopropanol gewaschen, anschließend in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zentrifugation (2min, RT, 3000g) vom restlichen Isopropanol befreit. Nach Überführung in ein neues Reaktionsgefäß wurden 50µl TE-Puffer (80°C) auf die Säule aufgetragen, 20min bei RT inkubiert und die Säule zentrifugiert (20s, RT, 8000g). Dieser Vorgang wurde mit 30µl TE-Puffer (80°C) und Inkubation für 1min wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen. Um komplette Desulfonierung zu erreichen, wurde das Eluat mit

35µl 1N NaOH (Endkonzentration 0,3M) versetzt und für 10min bei 37°C inkubiert. Zur Fällung der DNA erfolgte die Zugabe von 12µl 3M Natriumacetat (pH 7,0) und 320µl absolutem Ethanol (4°C), anschließend wurde der Ansatz über Nacht bei -20°C gelagert.

Tag 3: Nach Zentrifugation (30min, 4°C, 12000g) wurde der Überstand vorsichtig abgehoben, das Pellet mit 300µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (20min, 4°C, 12000g) und der Überstand möglichst vollständig entfernt. Nach kurzer Lufttrocknung wurde die DNA in 50µl destilliertes Wasser aufgenommen.

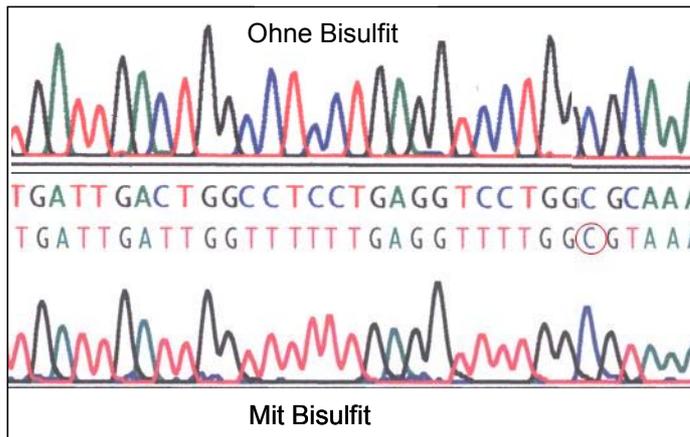


Bild 2.3: Sequenzanalyse mit und ohne DNA-Bisulfit-Behandlung.

Durch Bisulfit werden alle unmethylierten Cytosine (C) in Uracil umgewandelt. Nach Sequenzierung erscheinen sie als Thymin (T). Das in diesem Abschnitt vorhandene CG-Dinukleotid liegt hier methyliert vor, so dass C auch nach Bisulfit-Behandlung erhalten bleibt (Kreis). A: Adenin, G: Guanin.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase Chain Reaction (PCR), 1985 von Kary B. Mullis entwickelt und 1989 von Science zur Methode des Jahres gekürt, stellt eine unverzichtbare, effiziente Methode zur Amplifikation definierter DNA bzw. cDNA-Bereiche dar. Sie wurde in dieser Arbeit sowohl bei Expressionsuntersuchungen, als auch als wichtiger Baustein von Klonierung, Sequenzierung, Restriktions-PCR-Assay und Bisulfit-Methylierungsuntersuchungen eingesetzt. Grundidee dieser Methode ist die Synthese der komplementären DNA zu einem ausgewählten DNA-Zielstrang (Template) durch das Enzym Taq Polymerase (isoliert aus *thermophilus aquaticus*) in dreischrittigen Zyklen. Als Startsequenz für die Polymerase dienen zwei Oligonukleotide (Primer), die bei bestimmten Temperaturen an die Ziel-DNA bzw. den Tochterstrang binden und damit den zu amplifizierenden Abschnitt der DNA definieren. Ein klassischer PCR-Zyklus besteht aus folgenden drei Abschnitten: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge durch Erhitzen (Temp. > 92°C). 2. spezifische Primer-Hybridisierung an das Template (Annealing) während der Annealing-Temperatur (Temperatur, bei der die Hälfte der Oligonukleotide an die DNA bindet). 3. Synthese des Tochterstrangs vom freien 3'-OH-Ende ausgehend durch die thermostabile Polymerase (Extension). Eine PCR besteht in der Regel aus einer „Kette“ von 20-35 Zyklen, die in einem Thermalcycler automatisiert ablaufen. Da die in einem Zyklus generierten DNA-Tochterstränge als Matrize für den nächsten Zyklus dienen, kommt es zur exponentiellen Amplifikation. Im Reaktionsgemisch müssen neben DNA, Primern und Polymerase alle 4 Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in einer Pufferlösung enthalten

sein. In mehreren PCRs des IRF-4-Promotors wurden aufgrund der CG-reichen Sequenz Lösungsmittel, wie DMSO oder LösungQ (Qiagen), eingesetzt, um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen.

Bei jedem PCR-Ansatz wurden Leerwertkontrollen und Positivkontrollen mitgeführt. Um Quantität und Qualität jeder einzelnen cDNA/DNA-Probe zu überprüfen, wurde jeweils eine PCR des β -Aktin-Gens (ubiquitär exprimiertes Zytoskelett-Protein) als Referenz-Gen vorangestellt. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem DNA Thermal Cycler 480 oder 9600 (Perkin Elmer) in 0,5ml Eppendorfgläser beziehungsweise PCR-Gefäßen durchgeführt; das Reaktionsgemisch wurde mit 2 Tropfen Paraffinöl überschichtet (im Cycler Modell 480). Die Beurteilung der Amplifikation erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese.

2.2.9.1 β -Aktin-PCR und Expression von IRF-4, DNMTs und MBPs

Eine allgemeine PCR-Reaktion lief unter folgenden Bedingungen ab:

Ansatz: circa 50ng cDNA, jeweils 500nM Primer, jeweils 200 μ M dNTPs, 0.625U AmpliTaq-Polymerase (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), 1xPCR-Puffer (Perkin Elmer) und ddH₂O in einem Volumen von 25 μ l. Bei DNMT3A und DNMT3B Einsatz von 10%DMSO.

Tabelle 2.12: PCR-Bedingungen zur Expressionsuntersuchung

Gen	Primer	Denaturierung ¹	Annealing	Elongation ²	Zykluszahl
β -Aktin	Act-1, Act-3	94°C, 1min	55°C, 1min	72°C, 1min	21
ICSBP	ICS-1, ICS-2	94°C, 1min	61°C, 1min	72°C, 1min	28
IRF-4	IAT-3, IAT-4	94°C, 1min	61°C, 1min	72°C, 1min	29, 31, 35 ³
DNMT1	DNMT1-1, DNMT1-2	94°C, 1min	50°C, 1min	72°C, 1min	28
DNMT3A	DNMT3A-1, DNMT3A-2	94°C, 1min	51°C, 1min	72°C, 1min	30
DNMT3B	DNMT3B-1, DNMT3B-2	94°C, 1min	51°C, 1min	72°C, 1min	30
MBD1	MBD1-1, MBD1-2	94°C, 1min	50°C, 1min	72°C, 1min	28
MBD2	MBD2-1, MBD2-2	94°C, 1min	50°C, 1min	72°C, 1min	28
MBD4	MBD4-1, MBD4-2	94°C, 1min	50°C, 1min	72°C, 1min	28
MeCP2	MeCP2-1, MeCP2-2	94°C, 1min	50°C, 1min	72°C, 1min	28

¹Die initiale Denaturierung im 1. Zyklus der PCR erfolgte für 3min. ²Auf den letzten Zyklus folgte eine Inkubation für 10min bei 72°C, um eine Komplettierung der noch unvollständigen Moleküle zu ermöglichen. ³29 Zyklen: Standard-PCR zur IRF-4 Expression; 31 Zyklen: Nachweis von IRF-4 nach Stimulation mit AzadC; 35 Zyklen wurden angewendet, um zu überprüfen, ob IRF-4 bei hohen Zykluszahlen nachgewiesen werden konnte.

2.2.9.2 PCR-Bedingungen des Restriktions-PCR-Assays

Für die PCR-Amplifikation nach Restriktionsverdau wurde der IRF-4-Promotor in drei sich überlappende Fragmente, FI, FII und FIII, unterteilt (siehe Bild 3.8). Trotz zahlreicher

Lösungsversuche gelang die Amplifikation des Fragments FIII nach Restriktionsverdau nicht (siehe auch 3.4.2).

Ansatz: circa 160ng DNA nach Restriktionsverdau (2.2.7), jeweils 500nM Primer, jeweils 200 μ M dNTPs, 0.625U AmpliTaq-Polymerase (Perkin Elmer), 1xPCR-Puffer (Perkin Elmer), 10% DMSO und ddH₂O in einem Volumen von 25 μ l.

Um Fragment FIII nach Restriktion zu amplifizieren, wurden die PCR-Bedingungen des oben beschriebenen Ansatzes mehrfach variiert:

Variationen: Einsatz von 40ng DNA, Aufreinigung der DNA mit Microcon-100 Microconcentrator Säulen (Millipore), Variation der Primer, Variation der Annealingtemperatur und Zykluszahl, Einsatz verschiedener DNA-Polymerasen: Ampli-Taq (Perkin Elmer), Taq-Polymerase (Qiagen), Platinum Pfx Polymerase (Gibco BRL), Zusatz von LösungQ (Qiagen), zwei verschiedene Restriktionsprotokollen (2.2.7 bzw. Ben-Yehuda et al. 1997).

Tabelle 2.13: PCR-Bedingungen des Restriktions-PCR-Assays

Gen	Primer	Denaturierung ¹	Annealing	Elongation ²	Zykluszahl
Fragment FI (341bp)	hIRF4p-7, hIRF4p-8	94°C, 1min	62°C, 1min	72°C, 1min	35
Fragment FII (474bp)	hIRF4p-1 hIRF4p-6	94°C, 1min	62°C, 1min	72°C, 1min	35

¹Die initiale Denaturierung im 1. Zyklus der PCR erfolgte für 3min. ²Auf den letzten Zyklus folgte eine Inkubation für 10min bei 72°C, um eine Komplettierung der noch unvollständigen Moleküle zu ermöglichen.

2.2.9.3 PCR-Bedingungen zur Klonierung des IRF-4-Promotors

Die Einklonierung des IRF-4-Promotors von Position 91 bis 1179 (GenBank # U52683) erfolgte in zwei Fragmenten (siehe Bild 3.8). Die PCR-Reaktion lief unter folgenden Bedingungen ab:

Ansatz: 200ng DNA, jeweils 500nM Primer, jeweils 200 μ M dNTPs, 1,5U Taq-Polymerase (Qiagen), 1xQ-Solution (Qiagen), 1xPCR-Puffer (Qiagen) und ddH₂O in einem Volumen von 50 μ l.

Tabelle 2.14: PCR-Bedingungen zur Klonierung des IRF-4-Promotors

Gen	Primer	Denaturierung ¹	Annealing	Elongation ²	Zykluszahl
Fragment 1 (792bp)	hIRF4p-6, hIRF4p-7	94°C, 1min	62°C, 1min	72°C, 1min	37
Fragment 2 (392bp)	hIRF4p-10, hIRF4p-12	94°C, 1min	62°C, 1min	72°C, 1min	35

¹Die initiale Denaturierung im 1. Zyklus der PCR erfolgte für 3min. ²Auf den letzten Zyklus folgte eine Inkubation für 10min bei 72°C, um eine Komplettierung der noch unvollständigen Moleküle zu ermöglichen.

2.2.9.4 PCR-Bedingungen zur Klonierung des IRF-4 Promotors nach Bisulfit-Behandlung

Die Einklonierung des IRF4-Promotors nach Bisulfit-Behandlung der DNA wurde als semi-nested PCR in zwei Fragmenten (BS-1, BS-2) von Position 440 bis 1205 (GenBank # U52683) durchgeführt (siehe Bild 3.8). Dabei wird das in der 1.PCR gewonnene PCR-Produkt in einer zweiten, so genannten semi-nested PCR nochmals amplifiziert. Da in der semi-nested PCR jeweils ein ursprünglicher Primer und ein neuer, innen liegender Primer verwendet werden, entstehen zwei Fragmente.

Die **Primerkonstruktion** muss die nach Bisulfit-Behandlung veränderte Sequenz der DNA berücksichtigen. Als Primerbindungsstellen wurden DNA-Regionen ausgewählt, die keine CpG-Dinukleotide enthalten. Die in der Sequenz vorhandenen Cytosine liegen daher alle mit hoher Wahrscheinlichkeit unmethyliert vor und werden dadurch vollständig in Uracil umgewandelt. Die Primer wurden demnach komplementär zu der vermuteten veränderten DNA-Sequenz konstruiert, in der alle Cytosine in Uracil, beziehungsweise nach erster PCR-Amplifikation in Thymin, umgewandelt sind.

Die PCR-Reaktionen liefen unter folgenden Bedingungen ab:

Ansatz 1.PCR: circa 100ng (4µl) Bisulfit-behandelte DNA, jeweils 500nM Primer, jeweils 200µM dNTPs, 0.75U Taq-Polymerase (Qiagen), 1x Q-Solution (Qiagen), 1xPCR-Puffer (Qiagen) und ddH₂O in einem Volumen von 25µl.

Ansatz seminested PCR: 1µl PCR-Produkt, jeweils 500nM Primer, jeweils 200µM dNTPs, 0.75U Taq-Polymerase (Qiagen), 1x Q-Solution (Qiagen), 1xPCR-Puffer (Qiagen) und ddH₂O in einem Volumen von 25µl.

Tabelle 2.15: PCR-Bedingungen zur Klonierung des IRF-4-Promotors nach Bisulfit-Behandlung

PCR	PCR-Produkt	Primer	Dena-turierung ¹	Annealing	Elongation ²	Zyklus-zahl
1.PCR	IRF-4-Promotor	hIRF4p-2s, hIRF4p-4s	95°C, 3min	49°C, 2min	72°C, 1min	30
Seminested PCR	Fragment BS-1 (187bp)	hIRF4p-2s, hIRF4p-6s	95°C, 1min	51°C, 1min	72°C, 1min	36
Seminested PCR	Fragment BS-2 (674bp)	hIRF4p-4s, hIRF4p-5s	95°C, 1min	51°C, 1min	72°C, 1min	36

¹Dem 1. Zyklus vorangeschaltet war eine zusätzliche Denaturierung bei 96°C für 3min. ²Auf den letzten Zyklus folgte eine Inkubation für 10min bei 72°C, um eine Komplettierung der noch unvollständigen Moleküle zu ermöglichen.

2.2.10 Agarosegelelektrophorese

Die Beurteilung sowohl der Qualität von RNA als auch der Amplifikation von PCR-Produkten erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung (80V für 1-2h) in 3%igen Agarosegelen. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten vor Klonierung und bei der Elektrophorese von Plasmiden

wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Durch Zusatz von 0,5µg/ml Ethidiumbromid zu Gel und zu 1xTAE-Elektrophoresepuffer (Tris-Acetat-EDTA) wurden DNA bzw. RNA angefärbt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen und ist durch UV-Licht anregbar. Die PCR-Produkte bzw. die RNA wurden mit Gelladepuffer versetzt und zusammen mit 1µg eines Molekulargewicht-Standards (123bp DNA-Leiter, GibcoBRL) aufgetragen. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte auf einem UV-Durchleuchtungstisch bei 254nm, das Ergebnis wurde mit einer Polaroidkamera dokumentiert.

2.2.11 Protein-Extraktion

Die folgenden Schritte zur Herstellung von Gesamtzelllysaten für Western-Blotting-Experimente wurden stets auf Eis durchgeführt. Ein Zell-Pellet aus circa 1×10^6 Zellen wurde zunächst mit PBS gewaschen und dann in 80µl RIPA-Puffer mit frisch hinzu gegebenen Inhibitoren (Orthovanadate, Pepstatin, PMSF) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30min auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (5min, 4°C, 12000g), der Überstand abpipettiert und seine Proteinkonzentration mit Hilfe der BCA-Methode (Pierce) bestimmt. Diese Methode basiert auf der Reduktion von Cu^{+2} zu Cu^{+1} durch Protein in alkalischer Lösung (sogenannte Biuret-Reaktion) und der nachfolgenden Bildung eines farbigen Komplexes mit BCA (Bicinchoninic Acid). Nach den Vorgaben des Herstellers wurden hier 10µl des Proteinextraktes bzw. je 10µl der Proteinstandards (0, 125, 500, 750, 1000, 1500, 2000µg/ml) mit 200µl BCA Working Reagent (50 Teile BCA Reagenz A, 1 Teil BCA Reagenz B) in einer 96-well-Platte versetzt. Nach 15-30min Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde die Extinktion (OD) bei 562nm im Elisareader (Multiscan RC, Labsystems, Frankfurt) gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve ermittelt. Die Proteinextrakte wurden bei -80 °C gelagert; nach dem Auftauen der Aliquots wurde die Proteinbestimmung jedoch stets wiederholt.

2.2.12 Western-Blotting

Western-Blotting wird verwendet, um spezifische Proteine, die von Antikörpern erkannt werden, zu identifizieren. Die Proteine werden zunächst in 4xProbenpuffer gelöst, durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und schließlich elektrophoretisch auf eine Membran (hier PVDF) transferiert. Um unspezifische Signale zu vermeiden, werden alle freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert, hier durch Blocking-Reagent. Erst dann wird die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert und dieser bindet an das nachzuweisende Antigen. Mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, der mit Horseradish-Peroxidase gekoppelt und gegen den primären Antikörper gerichtet ist, lässt sich auf einem Röntgenfilm die Bande des zu detektierenden Proteins sichtbar machen. Die Horseradish-Peroxidase katalysiert hierbei eine Reaktion, bei der Licht frei wird.

2.2.12.1 Gelelektrophorese

In einer Mini-Western-Blotting-Einheit (Biorad) wurde das Gel für die SDS-PAGE gegossen. Zwischen zwei senkrecht eingespannte Glasplatten wurde soviel Trenn-Gel (10%) gegossen, bis 2/3 der Plattenhöhe erreicht waren und dieses mit 100% Ethanol überschichtet, damit eine glatte Oberfläche entstand. Nach 25min Polymerisationszeit wurde das Ethanol mit destilliertem Wasser abgewaschen, das Trenn-Gel mit einem Sammel-Gel (4%) überschichtet und der Kamm zur Bildung von 10 Taschen eingefügt. Nach Polymerisation wurde das fertige Gel in 1xElektrophoresepuffer eingespannt und der Kamm gezogen. Anschließend wurden 50-150µg Protein mit 4xProbenpuffer versetzt (beispielsweise 20µl Proteinlösung + 5µl 4xProbenpuffer), das Gemisch bei 95°C 5min denaturiert und auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurden zusätzlich 10µl Proteinmarker denaturiert (95°C, 5min) und mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V für 1,5h in 1xElektrophoresepuffer. Danach wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, das Sammel-Gel abgeschnitten und das Trenn-Gel dem Semidry-Blotting zugeführt.

2.2.12.2 Blotting

Der Aufbau des Sandwichblot entspricht dem Prinzip des Semi-dry-Blottings:

- Kathodenplatte
- 2 Lagen Whatman-Papier, getränkt in Kathodenpuffer
- Trenn-Gel
- PVDF-Membran (5min in 100%Methanol vorinkubiert)
- 2 Lagen Whatman-Papier, getränkt in Anodenpuffer 1
- 2 Lagen Whatman-Papier, getränkt in Anodenpuffer 2
- Anodenplatte

Die Proteine wurden für 1h mit 200mA (bei 2 Membranen) auf die Membran geblottet.

2.2.12.3 Detektion

Die Membran wurde nun für 1h bei RT in 10ml 1% Blocking-Reagenz gelegt. Die entsprechende Menge des primären Antikörpers wurde in 2ml 0,5% Blocking-Reagenz gelöst und die Membran zwischen zwei Plastikfolien bei RT für 1h darin inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dann 1x 5min in TBST, 2x 10min in TBS und 2x 10min in 0,5% Blocking-Reagenz auf dem Schüttler bei RT gewaschen. Auch der sekundäre Antikörper wurde in 2ml 0,5% Blocking-Reagenz gelöst und die Membran darin bei RT für 30min inkubiert. Wieder wurden überschüssige Antikörper durch Waschen auf dem Schüttler in TBST (3x 5min) und TBS (2x 5min) entfernt.

Die Detektion der gebundenen Antikörper wurde unter Benutzung des ECL-Kits (Amersham pharmacia biotech) durchgeführt: Detection reagent 1 und 2 wurden 1:1 gemischt und die Membran für 1min in 2ml dieser Lösung inkubiert. Die Membran wurde schließlich in eine

Plastikhülle gelegt und in der Dunkelkammer in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm (Koadak X-OMAT) exponiert. Die Expositionsdauer betrug je nach Signalstärke 10s – 1min.

2.2.12.4 Strippen der Membran

Durch das sogenannte Strippen der Membran werden die vorher aufgetragenen Antikörper abgelöst und die Membran kann mehrmals mit verschiedenen Antikörpern untersucht werden. Die Membranen wurden für 30min bei 50°C im Wasserbad in Strip-Buffer inkubiert und dann in TBST (3x 5min) und TBS (2x 5min) gewaschen. Die Membran wurde dann erneut geblockt (1% Blocking-Reagenz, 1h, RT), bevor wieder eine Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte.

2.2.13 Klonierung

Die Isolierung von einzelnen DNA-Molekülen aus einem PCR-Produkt, welches unter Umständen ein Gemisch von Fragmenten gleicher Länge aber variierender Sequenz beinhaltet, und die identische Vervielfältigung dieser DNA-Moleküle ist das Ziel der molekularen Klonierung. Prokaryotische kompetente Wirtszellen werden dabei mit einem rekombinanten DNA-Molekül genetisch verändert, transformiert. Diese rekombinante DNA besteht aus einem Vektor, in diesem Fall einem Plasmid, und dem daran gekoppelten DNA-Fragment. Das doppelsträngige, ringförmige Plasmid muss drei Sequenzen enthalten: ein Antibiotikaresistenzgen, das die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien ermöglicht, einen sogenannten „origin of replication“, der für die autonome Replikation in der Wirtszelle notwendig ist, und schließlich eine Region, in die das exogene DNA-Fragment ligiert werden kann. Eine Bakterienzelle nimmt dabei ein einzelnes Plasmid auf und bei der Vermehrung zur Kolonie wird dann auch der Klonierungsvektor beliebig oft vervielfältigt. Die Klonierung setzte sich aus fünf Schritten zusammen: DNA-Extraktion aus Agarosegelen, Ligation, Transformation und Selektion, Plasmidextraktion und Restriktionsanalyse.

2.2.13.1 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um die in einer PCR erzeugten DNA-Fragmente von unspezifischen Nebenprodukten zu befreien, wurden diese auf einem Agarosegel (2%) elektrophoretisch aufgetrennt und die gesuchte Bande unter UV-Licht ausgeschnitten. Unter Benutzung des GeneClean Spin Kits (BIO 101) wurde die DNA aus dem Gel isoliert. Das zugrunde liegende Verfahren nutzt die Tatsache aus, dass DNA bei hohen Salzkonzentrationen an Silicate bindet, sich bei niedrigen Salzkonzentrationen aber wieder eluieren läßt. Das Gelstückchen wurde zusammen mit 400µl GeneClean Spin Glasmilch (enthält Silikate) bei 55°C und unter gelegentlichem Schütteln für 5min geschmolzen. Die Silikatpartikel wurden an die GeneClean Spin Filter gebunden (Zentrifugation bei 10000g, 30s), mit 500µl GeneClean Spin New Wash gewaschen

(Zentrifugation bei 10000g, 30s) und nach dem Trocknen (Zentrifugation bei 10000g, 2min) mit 20µl GeneClean Spin Elution Solution eluiert.

2.2.13.2 Ligation

Ligation, sowie Transformation und Selektion wurden unter Verwendung des Topo TA Cloning[®] Kits (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Insertion des DNA-Fragmentes wird dadurch ermöglicht, dass die Taq-Polymerase eine matrizenunabhängige, terminale Transferaseaktivität hat, durch die Deoxyadenosin (A) an das 3'-Ende von PCR-Produkten angehängt wird. Der linearisierte Vektor, pCR[®]2.1-TOPO, besitzt an seinen 3'-Enden einzelne Deoxythymidin-Überhänge (T). Durch Basenpaarung (T-A) kann sich daher das PCR-Produkt in den sich ringförmig schließenden Vektor einfügen. Die kovalente Bindung wird in dieser Technik nicht durch eine Ligase, sondern durch eine an den Vektor gebundene Topoisomerase katalysiert. Zur Ligation wurden nach Angaben des Herstellers 4µl PCR-Produkt mit 1µl Salt Solution (1,2M NaCl, 0,06 MgCl₂) und 1µl TOPO[®]-Vektor-Lösung für 20min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.13.3 Transformation und Selektion

Die Transformation von kompetenten E.coli Bakterien mit dem Plasmidvektor erfolgte durch Inkubation von 3µl des Ligationsansatzes mit 50µl TOP10F['] E.coli-Zellen auf Eis für 20min und anschließendem Hitzeschock bei 42°C für 30s. Der Hitzeschock bewirkt, dass die Bakterien den Plasmidvektor aufnehmen können. Anschließend wurden 450µl SOC-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 1h bei 37°C und 200rpm in den Schüttelinkubator gestellt. 300µl bzw. 150µl des Ansatzes wurden schließlich auf jeweils einer mit x-Gal (40µg/ml) und Ampicillin (50µg/ml) versetzten, mit 40µl 100mM IPTG bestrichenen Luria-Bertani-Agar-Platte ausgestrichen. Die Platten wurden für 18h bei 37°C inkubiert und dann bei 4°C gelagert. Die Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien wird zum einen durch plasmidvermittelte Ampicillinresistenz, zum anderen durch das sogenannte blue-white-screening gewährleistet. Das blue-white-screening ermöglicht eine Unterscheidung zwischen Kolonien, die nur leeren Vektor aufgenommen haben, und Klonen, deren Vektor das PCR-Produkt enthält. Durch Insertion des PCR-Produktes in das Plasmid wird der Leserahmen des darin enthaltenen LacZ-Gens verschoben. Somit wird die β-Galactosidase, die das x-Gal im Nährboden zu einem blauen Farbstoff abbaut, nicht mehr exprimiert und die erfolgreich transformierten Kolonien bleiben weiß. IPTG ermöglicht die Expression der β-Galactosidase trotz Überexpression des Lac-Repressors in der E.coli-Linie TOP10F[']. Pro Zelllinie bzw. Patientenprobe wurden 10-15 weiße Kolonien gepickt, in jeweils 4ml ampicillinhaltiges (50µg/ml) Luria-Bertani-Flüssigmedium überführt und für 16-18h bei 37°C und 220rpm im Schüttler inkubiert.

2.2.13.4 Plasmidextraktion

Die Extraktion der Plasmide aus der Bakterienkultur wurde unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits durchgeführt. Prinzip dieses Protokolls ist (I) die alkalische Lyse der Bakterien, (II) die Adsorption der DNA an eine Silikatmembran und (III) das Waschen und Eluieren der DNA.

2ml der Bakterienkultur wurden abzentrifugiert (2000rpm für 10min) und das entstandene Bakterien-Pellet in 250µl Puffer P1 (NaOH, SDS, RNase) resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurden dann 250µl Puffer P2 zur Lyse der Zellen und 350µl Puffer N3 zur Neutralisation hinzu gegeben. Das entstandene Präzipitat, das aus chromosomaler DNA, denaturierten Proteinen und Zelltrümmern besteht, wurde abzentrifugiert (12000g für 10min). Der Überstand, der neben Protein und RNA auch die Plasmid-DNA enthält, wurde auf eine QIAprep spin column pipettiert und durchzentrifugiert (12000g für 30s). Die nun an die Silikatmembran der Säule gebundene DNA wurde mit 500µl Puffer PB und 750µl Puffer PE gewaschen (jeweils 12000g für 30s), getrocknet (12000g für 1min) und schließlich mit 50µl ddH₂O eluiert (1min Inkubation, 1min 12000g). Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

2.2.13.5 Restriktionsanalyse

Zur Kontrolle der ordnungsgemäßen Insertion des PCR-Produktes in den Vektor wurde jeweils ein Aliquot der isolierten Plasmide einer Restriktionsanalyse unterworfen. Der Plasmidvektor pCR[®]2.1-TOPO[®] besitzt wenige Basen vor und hinter der Region, in die das PCR-Produkt eingebaut wird, spezifische Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease EcoRI. Durch die Restriktion entstehen daher bei erfolgreicher Klonierung zwei Fragmente: Ein Fragment von circa 3800bp, das dem Vektor entspricht, und ein Fragment, das nur 17 Basen länger ist als das ursprüngliche PCR-Produkt und das auf einem Agarosegel identifiziert werden kann. Es wurden 2µl Plasmidextrakt (circa 500ng Plasmid-DNA) mit 10U EcoRI und 1xPuffer in einem Volumen von 10µl für 90min bei 37°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend mittels Elektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel kontrolliert. Die Plasmide wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.14 Sequenzierung

Die hier angewendete Sequenzierungsmethode, das sogenannte Cycle-Sequenzierung, basiert auf der 1977 von Sanger (Sanger et al. 1977) entwickelten Didesoxy-Kettenabbruch-Methode; die auch als „enzymatische Sequenzierung“ bezeichnet wird. In einer Sequenzierungs-PCR (Sequenzreaktion) wird der zunächst als Doppelstrang vorliegende Plasmidvektor durch Erhitzen denaturiert. Dadurch kann sich der Sequenzierungsprimer bei Abkühlung auf eine definierte Temperatur an den komplementären Bereich des Einzelstranges anlagern und die DNA-Polymerase synthetisiert den Gegenstrang. Dieser Zyklus aus Denaturation, Annealing

und Extension wird mehrmals wiederholt; im Unterschied zur normalen PCR wird nur ein Primer eingesetzt. Als Substrat für die Ampli-Taq® Polymerase FS werden zusätzlich zu den normalen Desoxy-Nucleosid-Triphosphaten (dNTPs) fluoreszenzmarkierte 2'3'Dideoxy-Nucleosid-triphosphate (ddNTPs) in einem definierten Verhältnis eingesetzt. Der zufällige Einbau eines Dideoxy-Nucleotids in einen frisch synthetisierten DNA-Strang bewirkt den Kettenabbruch. Nach Abschluss der Sequenzreaktion liegt somit eine Population von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten vor, die jeweils ein fixes, in allen Molekülen identisches, und ein variables, fluoreszenzmarkiertes Ende aus einer der vier Basen besitzen. Da zur Markierung der ddNTPs vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung stehen, kann die Sequenzreaktion für alle vier Basen in einem Ansatz durchgeführt werden. Durch Gelelektrophorese in einem sehr dünnen, hochauflösenden Polyacrylamidgel entsteht eine DNA-Leiter aus Fragmenten, deren Länge sich jeweils um ein Nukleotid unterscheidet. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden über einen Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488nm angeregt und emittieren jeweils ein unterschiedliches Wellenlängenspektrum, dessen Maximum mit einer CCD (Charged Coupled Device)-Kamera detektiert wird. (ddGTP: R110/540nm; ddATP: R6G/570nm; ddTTP: TAMRA/595nm; ddCTP: ROX/ 625nm) Die Umsetzung in eine Basensequenz erfolgt computergestützt.

In der vorliegenden Sequenzierung wurde das automatische Sequenziergerät ABI 377 (Applied Biosystems) und das ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) eingesetzt. In der Sequenzreaktion kamen zwei verschiedene Primer, T7 und M13rev, zum Einsatz, die ihre Bindungsstellen auf je einer Seite des Inserts im Plasmid haben. Fragmente, die länger als 450bp waren, wurden zusätzlich zu T7 mit M13rev rückwärts sequenziert, um die ganze Länge sauber zu erfassen.

2.2.14.1 Sequenzreaktion

Die PCR-Reaktion für die Sequenzierung lief unter folgenden Bedingungen ab:

Ansatz: 500ng Plasmid-DNA (2µl), 10pmol T7 oder M13rev-Primer und 8µl Ready Reaction Mix in einem Volumen von 20µl.

Der Ready Reaction Mix aus oben genanntem Kit enthält bereits die markierten ddNTPS, dNTPs, TrisHCl (pH 9), MgCl₂, thermostabile Pyrophosphatase und Ampli-Taq® Polymerase FS.

Tabelle 2.16: PCR-Bedingungen der Sequenzreaktion

Probe	Primer	Denaturierung ¹	Annealing	Elongation ²	Zykluszahl
Ursprungs-DNA Bisulfit-behandelt	T7 oder M13rev	96°C, 10s	55°C, 15s	50°C, 4min	30
Normale Ursprungs-DNA	T7 oder M13rev	96°C, 10s	55°C, 15s	60°C, 4min	35

2.2.14.2 Aufbereitung der PCR-Produkte

Zur Entfernung von überschüssigen ddNTPs wurden die PCR-Produkte mittels Spin-Column Chromatographie über Sephadex-Säulen aufgereinigt (Zentrifugation bei 3000g für 2min). Diese Methode basiert darauf, dass DNA die SephadexTM-Gel-Matrix frei passieren kann, während Moleküle geringeren Molekulargewichts zurückgehalten werden. Die Sephadex-Säulen wurden durch Zentrifugation (3000g, 1min) von Sephadex G50-Lösung (83mg/ml H₂O) über ProbeQuant G-50micro-Columns (Pharmacia) hergestellt. Die PCR-Produkte wurden in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und in 4µl einer 5:1 Gelladepuffer:EDTA/Formamid-Lösung aufgenommen und für 2min bei 90°C denaturiert. 1,5µl dieses Ansatzes wurden später auf das Gel geladen.

2.2.14.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Separation der Sequenzprodukte erfolgte in einem 5% Polyacrylamidgel. Zur Herstellung wurde eine Lösung aus 8,4ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 21g Harnstoff, 6ml 10xTBE-Puffer und 21ml dH₂O filtriert (0,2µm Porengröße) und unter einer Vakuumglocke entgast. Zur Polymerisation wurden 300µl 10% Ammoniumpersulfat (Reaktionsstarter) und 20µl TEMED (Vernetzer) zugegeben und das Gel zwischen zwei zusammengeklammerte optische Glasplatten (36x25cm) gegossen. Die Polymerisationszeit für das 0,4mm dicke Gel betrug 90min. Nach einem 30min Vorlauf zur gleichmäßigen Erwärmung des Gels wurden die Proben geladen und die Elektrophorese (Run Module SeqRun 36E-1200: 8h, 2500V, 51°C) in 1xTBE-Puffer gestartet. Datenaufnahme und -analyse wurden mit Hilfe der ABI PRISM 377 Collection Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Systemsteuerung und Rohdatenaufnahme) und der Sequencing Analysis Software Version 3.4 (Applied Biosystems) (Sequenzermittlung) durchgeführt. Bearbeitung und Vergleich der ermittelten Sequenzen erfolgte mit Lasergene DNASTar Version 5.

3 Ergebnisse

3.1 IRF-4-Expression der Zelllinien

In dieser Arbeit wurden 3 IRF-4-positive und 6 IRF-4-negative hämatopoetische Zelllinien einander gegenübergestellt (Bild 3.1). Unter normalen PCR-Bedingungen mit 29 Zyklen zeigen SD-1, RPMI-8226 und BV-173 eine starke IRF-4-Transkription, während die übrigen untersuchten Zelllinien IRF-4-negativ sind. Bei sehr hohen Zykluszahlen wird auch in diesen Zellen IRF-4 in unterschiedlicher Konzentration nachweisbar. Bei 35 Zyklen zeigen U-937 und CML-T1 eine deutlich sichtbare Bande, während IRF-4 in LAMA-84, Jurkat, EM-2 und K-562 (Expression in dieser Reihenfolge abnehmend) gerade nachweisbar wird.

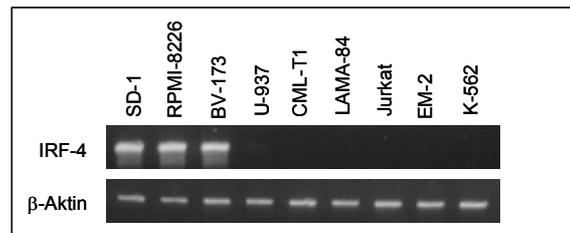


Bild 3.1: IRF-4-Expression der Zelllinien. IRF-4-RT-PCR mit 29 Zyklen und zugehöriger β -Aktin-PCR.

3.2 Suppression der IRF-4-Expression beruht nicht auf Promotor-Aberrationen

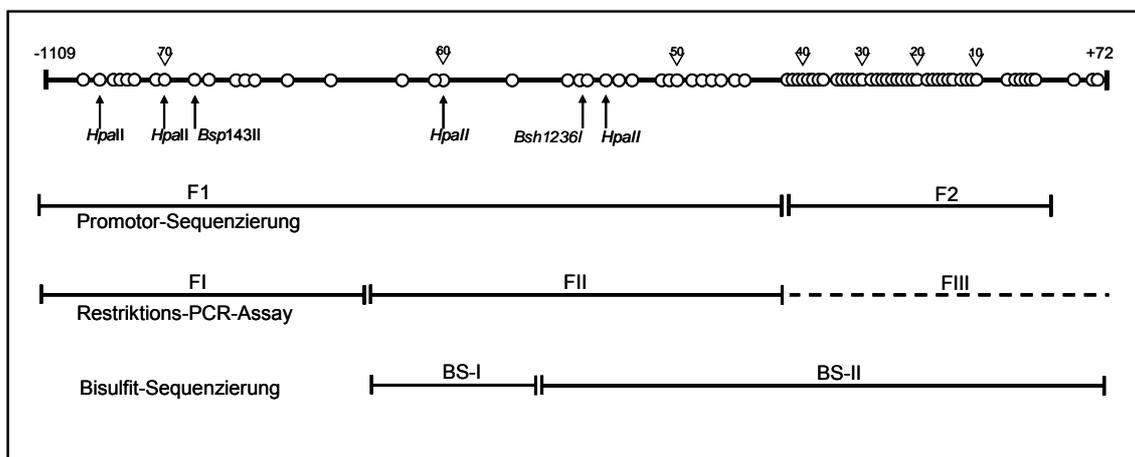


Bild 3.2: Schematische Darstellung des IRF-4-Promotors (-1109 - +72) (Grossman et al. 1996) mit CpG-Dinukleotiden. Jedes CpG erscheint als Kreis und wird vom 3'-Ende ausgehend nummeriert. Die Grenzen der PCR-Fragmente der IRF-4-Promotor-Sequenzierung (F1, F2), des Restriktions-PCR-Assays (F1, FII, FIII) und der Bisulfit-Sequenzierung (BS-I, BS-II) sind unten dargestellt.

Um genetische Aberrationen des IRF-4-Promotors auszuschließen, wurde dieser aus genomischer DNA der Zelllinien BV-173, LAMA-84, Jurkat, EM-2 und K-562 einkloniert und sequenziert (Bild 3.2). Von den übrigen Zelllinien wurde nur die Bisulfit-Sequenzierung

analysiert, die jedoch beim Auftreten von T nicht die eindeutige Entscheidung zulässt, ob es sich in der ursprünglichen DNA um C oder T handelt.

Die Sequenzierung des IRF-4-Promotors zeigte, dass die supprimierte IRF-4-Expression nicht auf genetische Aberrationen zurückgeführt werden kann.

Es wurden zwei Basenpaarvariationen (Bild 3.3) (Nukleotid -1081, T→C und -1068 A→C) sowohl in der IRF-4-positiven Zelllinie BV-173 als auch in den untersuchten IRF-4-negativen Linien LAMA-84, EM-2 und K-562 gefunden. Eine weitere Variation (Nukleotid -116, A→C) wurde in EM-2, K-562 und CML-T1 detektiert; Jurkat, SD-1 (IRF-4-positiv)

und BV-173 (IRF-4-positiv) zeigen an dieser Stelle eine gemischte A/C-Sequenz, während RPMI-8226 (IRF-4-positiv), U-937 und LAMA-84 keine Substitution aufweisen. Da die Aberrationen unabhängig vom IRF-4-Status auftreten, ist daher ein ursächlicher Zusammenhang zur IRF-4-Expression unwahrscheinlich.

SD-1	RPMI-8226	BV-173	U-937	CML-T1	LAMA-84	Jurkat	EM-2	K-562	GenBank	
-	-	C	-	-	C	-	C	C	T	# -1081
-	-	C	-	-	C	-	C	C	A	# -1068
A/C	A	A/C	A	C	A	A/C	C	C	A	# -116

Bild 3.3: Basenpaarvariationen des IRF-4-Promotors.

Basenpaarvariationen im IRF-4-Promotor von IRF-4-positiven und -negativen Zellen im Vergleich zur GenBank-Sequenz an Position 98, 111 und 1063 (GenBank #U52683), beziehungsweise Nukleotid -1081, -1068 und -116 (Hou et al. 1994; Grossman et al. 1996; Grumont et al. 2000; Marecki et al. 2002; Lehtonen et al. 2003).

3.3 Anstieg der IRF-4-Expression in hämatopoetischen Zelllinien nach Inhibition der Methylierung

Einige Substanzen, wie 5-Aza-2-deoxycytidin (AzadC) und 5-Azacytidin (AzaC) verhindern eine de novo Methylierung von DNA und können daher eingesetzt werden, um die Promotormethylierung von Tochterzellen zu reduzieren. Trichostatin A (TSA) ist ein Inhibitor der Histondeacetylase und nimmt Einfluss auf die kondensierte Chromatinstruktur.

3.3.1 Behandlung mit 5-Aza-2-deoxycytidin (AzadC)

Die Behandlung mit AzadC über 72h induzierte eine konzentrationsabhängige Aktivierung der IRF-4-Transkription in CML-T1, LAMA-84, EM-2, K-562, Jurkat und U-937, die mittels RT-PCR nachgewiesen wurde (Bild 3.4 A). Die IRF-4-Transkription zeigte außerdem eine zeitabhängige Induzierbarkeit mit kontinuierlichem Ansteigen der IRF-4-Expression über 72h (Bild 3.4 B). Stärke der Expression und Zeitpunkt des Auftretens von IRF-4 waren in den einzelnen Zelllinien unterschiedlich: CML-T1 reagierte am stärksten und schnellsten auf die AzadC-Behandlung, während K-562 eine nur schwache Induzierbarkeit von IRF-4 aufwies. In den IRF-4-positiven Linien BV-173 und RPMI-8226 hatte die AzadC-Inkubation keinen Effekt auf die Stärke der IRF-4-Transkription. Die IRF-4-Induktion konnte auch auf Protein-Ebene mittels Western-Blotting gezeigt werden (Bild 3.4 C). Analog zur Aktivierung der IRF-4-

Transkription resultierte die AzadC-Behandlung von CML-T1 und EM-2 in einem Ansteigen des IRF-4-Proteins. Diese Ergebnisse legen einen Einfluss des Methylierungsstatus auf die IRF-4-Expression nahe.

3.3.2 Behandlung mit 5-Azacytidin (AzaC) oder Trichostatin A (TSA)

Die konzentrationsabhängige Behandlung von CML-T1 und Jurkat mit TSA (Histondeacetylase-Inhibitor, siehe 1.3.7.3) hatte keine Induktion von IRF-4 zur Folge: mikroskopisch konnte ein rasches Absterben der Zellen beobachtet werden. Die konzentrationsabhängige Inkubation mit AzaC zeigte bei Jurkat keinen nachweisbaren IRF-4-Anstieg, bei CML-T1 jedoch wie AzadC eine Induktion der IRF-4-Transkription (ohne Abbildung).

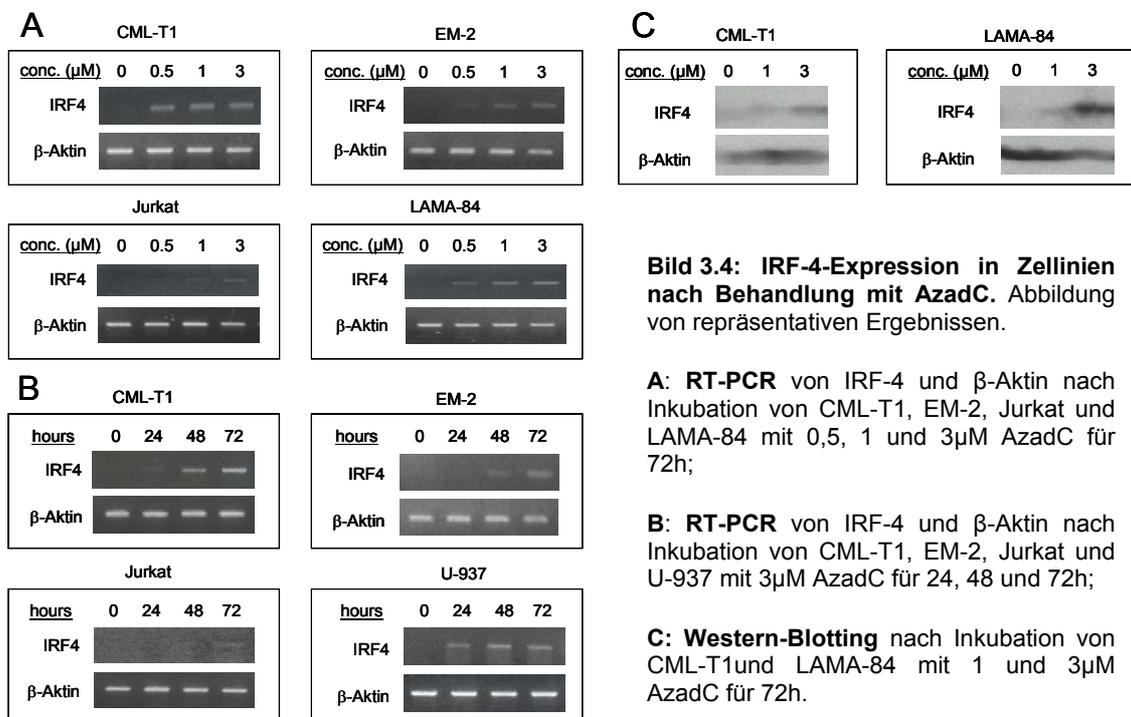


Bild 3.4: IRF-4-Expression in Zelllinien nach Behandlung mit AzadC. Abbildung von repräsentativen Ergebnissen.

A: RT-PCR von IRF-4 und β-Aktin nach Inkubation von CML-T1, EM-2, Jurkat und LAMA-84 mit 0,5, 1 und 3 μM AzadC für 72h;

B: RT-PCR von IRF-4 und β-Aktin nach Inkubation von CML-T1, EM-2, Jurkat und U-937 mit 3 μM AzadC für 24, 48 und 72h;

C: Western-Blotting nach Inkubation von CML-T1 und LAMA-84 mit 1 und 3 μM AzadC für 72h.

3.4 Analyse des IRF-4-Promotors mit methylierungsspezifischen Restriktionsendonukleasen (Restriktions-PCR-Assay)

Zur weiteren Untersuchung von Methylierung als möglichem Regulator der IRF-4-Transkription wurde ein Restriktions-PCR-Assay etabliert. Genomische DNA der Zelllinien Jurkat, CML-T1, U-973, K-562, EM-2 und BV-173 wurde mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen wie *HpaII*, *Bsh1236I* oder dem *HaeII*-Isochizomer *Bsp143II* verdaut. DNA, die an der jeweiligen Schnittstelle methyliert vorliegt, kann durch das methylierungssensitive Restriktionsenzym nicht verdaut werden. Eine sich anschließende PCR-Amplifikation des Promotors ist nur dann positiv. Als Kontrollen wurden die Enzyme *EcoRI*, das keine Schnittstellen im Promotorbereich besitzt, und das methylierungsresistente

MspI, welches mehrere Schnittstellen aufweist, eingesetzt. Für die PCR-Amplifikation wurde der Promotor in 3 sich überlappende Fragmente FI, FII und FIII eingeteilt.

Der Restriktions-PCR-Assay der Fragmente FI und FII wurde durch Variation des DNA-Restriktionsverdau, der PCR-Bedingungen und der eingesetzten DNA-Menge optimiert. Trotz umfangreicher Optimierungsversuche gelang die PCR-Amplifikation des Fragments FIII nach Verdau mit Kontrollenzymen nicht.

3.4.1 Restriktions-PCR-Assay der Fragmente FI und FII

Durch Sequenzierung wurde sichergestellt, dass es sich bei der amplifizierten DNA um die Fragmente FI beziehungsweise FII des IRF-4-Promotors handelt. Nach PCR-Amplifikation von FI beziehungsweise FII wurde ein Verdau mit methylierungssensitiven und –resistenten Restriktionsenzymen (siehe 2.2.7), sowie mit dem Kontrollenzym *EcoRI*, welches keine Schnittstelle in den DNA-Abschnitten besitzt, durchgeführt (Bild 3.5).

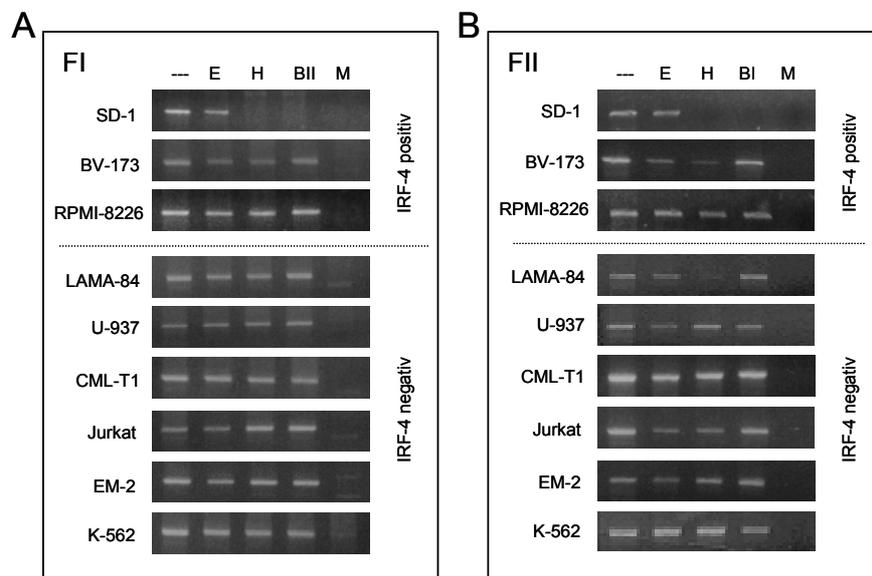


Bild 3.5: Restriktions-PCR-Assay des IRF-4-Promotors in Zelllinien.

Restriktionsverdau von DNA mit *EcoRI* (E, keine Schnittstelle), *HpaII* (H, methylierungssensitiv), *Bsp143II* (BII, methylierungssensitiv), *Bsh1236I* (BI, methylierungssensitiv) und *MspI* (M, methylierungsresistent) und anschließende PCR-Amplifikation. Die oberen 3 Zelllinien (SD-1, BV-173 und RPMI-8226) sind IRF-4-positiv, die unteren Zelllinien IRF-4-negativ.

A: PCR-Fragment I (FI); **B:** PCR-Fragment II (FII).

Nach Restriktion mit *HpaII* und *Bsp143II* zeigte sich eine unveränderte PCR-Amplifikation der Fragmente FI und FII in den IRF-4-negativen Zelllinien Jurkat, CML-T1, U-937, K-562 und EM-2 und der IRF-4-positiven Zelllinie RPMI-8226. Dies spricht für eine Promotormethylierung an den entsprechenden Schnittstellen der Restriktionsenzyme. In der IRF-4-negativen Linie LAMA-84 (Fragment FII) und interessanterweise in den IRF-4-positiven Zelllinien SD-1 (Fragment FI und FII) und BV-173 (Fragment FII) war in das PCR-Produkt nach Restriktion mit *HpaII* im Vergleich zur Kontrolle nicht vorhanden (SD-1) beziehungsweise vermindert,

aber schwach vorhanden (LAMA-84, BV-173). Dies deutet auf eine Assoziation der IRF-4-Expression in BV-173 und SD-1 mit einer geringeren beziehungsweise fehlenden Promotormethylierung an den Restriktions-Schnittstellen im Vergleich zu den IRF-4-negativen Zelllinien hin. Die Amplifikation der IRF-4-positiven Zelllinie RPMI-8226 erfolgte ungehindert und so entstanden hier sehr heterogene Ergebnisse bei den IRF-4-positiven Zelllinien. RPMI-8226 zeigte später in der Bisulfit-Sequenzierung jedoch ebenfalls eine nahezu fehlende Methylierung.

3.4.2 Restriktions-PCR-Assay des Fragments FIII

Beim Versuch der Etablierung des Restriktions-PCR-Assay für Fragment FIII des IRF-4-Promotors konnten zwar PCR-Reaktionen dieses DNA-Abschnitts mit unverdauter DNA erzeugt werden. Jedoch kam nie eine PCR-Amplifikation zustande, wenn die DNA zuvor mit einem der eingesetzten Restriktionsenzyme inkubiert worden war, selbst wenn das entsprechende Enzym keine Schnittstelle in Fragment FIII besaß (Bild 3.6 A). Im Folgenden sind die verschiedenen Lösungsversuche beschrieben:

A) DNA-Verdau und Aufreinigung: Der Restriktionsverdau der genomischen DNA wurde mit zwei unterschiedlichen Protokollen (siehe 1.2.6 bzw. Ben-Yehuda et al. 1997) durchgeführt und mehrmals wiederholt. Dabei wurden unterschiedliche Mengen an DNA eingesetzt und die Inkubationszeiten leicht variiert. Die PCR-Reaktionen unter den verschiedenen Restriktionsbedingungen zeigten in allen drei Fragmenten keine Unterschiede.

Die DNA wurde versuchsweise nach dem Verdau mit Microcon-100-Microconcentrator-Säulen aufgereinigt. Diese Behandlung beruhte auf der Überlegung, dass noch im Ansatz vorhandene Restriktionsenzyme oder Puffer die PCR-Reaktion hemmen könnten.. Das Fragment FIII konnte jedoch nach Restriktionsverdau nicht amplifiziert werden.

B) Primerpaare: Es wurden 11 verschiedene Primerpaare getestet, davon 2 auch im Rahmen einer Nested-PCR. 6 Primerpaare zeigten ein Fragment der richtigen Länge. Der Restriktionsverdau der aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Bande ergab bei 2 Primerpaaren ein Fragmentmuster, welches nicht mit Fragment FIII kompatibel war. Ein Fragment (Primerpaar hIRF-4p5, hIRF-4p10) wurde sequenziert und zeigte die erwartete Basenfolge von Fragment FIII. Die Sequenz zeigte keine Aberrationen zur GenBank (GenBank # U52683). Eine zusätzliche, durch Mutation entstandene oder durch einen Fehler der GenBank-Sequenz übersehene Schnittstelle konnte somit ausgeschlossen werden. .

C) PCR-Bedingungen: Die PCR wurde mit 3 verschiedenen Polymerasen, unter Variation von Annealingtemperatur, Zykluszahlen, eingesetzter DNA-Menge und Einsatz von DMSO oder LösungQ (Qiagen) durchgeführt. DMSO oder LösungQ erhöhen die Spezifität der PCR-Reaktion, konnten hier jedoch die Amplifikation des erwünschten Fragments nicht steigern. Eine der PCR vorgeschaltete Erhitzung der DNA auf 98°C, die die Denaturierung der DNA steigern soll, bewirkte keine sichtbaren Veränderungen der PCR-Reaktion. Die Erhöhung von

Zykluszahl, Menge der eingesetzten DNA und die Herabsetzung der Annealingtemperatur führten jeweils zu verstärktem Auftreten unspezifischer Signale, ohne dass eine Bande erzeugt werden konnte, die aufgrund ihrer Größe oder Eigenschaften im Restriktionsverdau dem Fragment FIII entsprach.

D) Restriktionsenzyme: Um auszuschließen, dass das Kontrollenzym *EcoRI* nicht doch eine Schnittstelle in Fragment FIII besitzt, wurde das PCR-Produkt (Primerpaar hIRF-4p5, hIRF-4p10) nachträglich mit *EcoRI* inkubiert. Die Gelelektrophorese bestätigte jedoch, dass FIII nicht von *EcoRI* geschnitten wird (Bild 3.6 B). Als Restriktionsenzyme, die keine Schnittstelle in FIII besitzen, wurde neben *EcoRI* auch *HindIII* eingesetzt. Auch nach Kontakt mit diesem Restriktionsenzym blieb die Amplifikation von FIII aus.

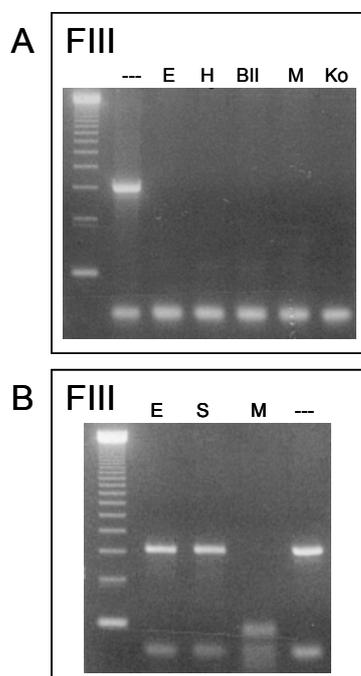


Bild 3.6: A: Restriktions-PCR-Assay Fragment FIII.

Beispielhaft ist die Zelllinie K-562 abgebildet. Hier wurde die PCR mit den Primern hIRF4p-5 und -10 durchgeführt, durch Sequenzierung wurde bestätigt, dass es sich um das richtige Fragment handelt. Trotzdem *EcoRI* keine Schnittstelle innerhalb des Fragments oder der Primer besitzt, verschwindet die Bande bei Zugabe des Enzyms. Restriktion der DNA mit *EcoRI* (E, keine Schnittstelle), *HpaII* (H, methylierungssensitiv), *Bsp143II* (BII, methylierungssensitiv) und *MspI* (M, methylierungsresistent), Ko: PCR-Negativkontrolle, ---: ungeschnittene DNA.

B: Überprüfung der Restriktions-Schnittstellen von Fragment FIII.

Um auszuschließen, dass *EcoRI* (E) durch Mutation von IRF-4 nicht doch eine Schnittstelle in Fragment FIII besitzt, die das Verschwinden des PCR-Produkts nach Verdau erklären könnte (siehe oben), wurde das PCR-Produkt von FIII mit Restriktionsenzymen verdaut (4 µl PCR-Produkt, 10U Enzym für 16h bei 37°C) und auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Kontrolle dienen *MspI* (S) mit mehreren Schnittstellen, sowie *SmaI* (S) ohne Schnittstellen, ---: unverdautes PCR-Produkt. Der Versuch bestätigt, dass *EcoRI* das Fragment FIII nicht schneidet.

Schlussfolgerung: Nach Restriktion mit Enzymen, die *keine* Schnittstelle im amplifizierten Fragment FIII besitzen, war keine PCR-Reaktion mehr möglich. Eine mögliche, wenn auch sicherlich unbefriedigende Erklärung liegt in der hohen CG-Dichte von Fragment III, welche den Ablauf der PCR-Reaktion soweit erschweren könnte, dass kleine Änderungen des Ansatzes die Amplifikation verhindern.

3.5 Bestätigung der inhibierten *de novo* Methylierung durch Restriktions-PCR-Assay von AzadC-behandelten Zellen

DNA der Zelllinien U-937 und CML-T1, die zuvor einer demethylierenden Behandlung mit AzadC (72h, 3µM) unterzogen worden waren, wurde mittels Restriktions-PCR-Assay analysiert (Bild 3.6). Im Vergleich zu unbehandelter DNA zeigte sich ein Verschwinden (U-937) beziehungsweise starke Reduktion (CML-T1) der PCR-Amplifikation von Fragment FI nach

Verdau mit dem methylierungsspezifischen Restriktionsenzym *Bsp143II*. Dies bestätigt die erwartete Inhibition der *de novo* Methylierung durch AzadC an den entsprechenden Restriktionsschnittstellen. Der Restriktions-PCR-Assay von Fragment FI sowie von Fragment FII nach Verdau mit *HpaII* zeigte kein Verschwinden des PCR-Produkts. Dies lässt sich jedoch damit erklären, dass die Demethylierung immer nur die Tochterzellen betrifft und somit noch methylierte DNA vorhanden sein kann, die eine PCR-Amplifikation ermöglicht.

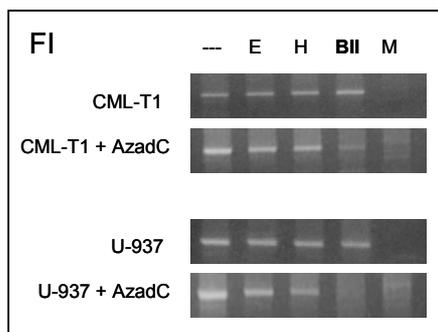


Bild 3.7: Restriktions-PCR-Assay nach Behandlung mit AzadC. Restriktionsverdau der Zelllinien CML-T1 und U-937 nach Inkubation mit 3 μ M AzadC für 72h. Restriktion der DNA mit *EcoRI* (E, keine Schnittstelle), *HpaII* (H, methylierungssensitiv), *Bsp143II* (BII, methylierungssensitiv), *Bsh1236I* (BI, methylierungssensitiv) und *MspI* (M, methylierungsresistent) und anschließende PCR-Amplifikation. Zum Vergleich ist der Assay ohne AzadC-Behandlung mit abgebildet.

3.6 Methylierung spezifischer CpG-Inseln des IRF-4-Promotors

Um das genaue Methylierungsmuster des IRF-4-Promotors zu untersuchen, wurde genomische DNA von jeweils 8 Klonen der Zelllinien Jurkat, CML-T1, U-937, K-562 und EM-2 sowie der Kontrollen BV-173, SD-1 und RPMI-8226 nach einer Bisulfit-Behandlung kloniert und sequenziert (Bild 3.8). Durch die Bisulfit-Behandlung wird unmethyliertes Cytosin in Uracil deaminiert, methyliertes Cytosin ist vor dieser Konversion geschützt und erscheint nach Sequenzierung unverändert. PCR-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der Bisulfit-behandelten DNA enthüllte sowohl Parallelen im Methylierungsmuster der untersuchten Zelllinien, als auch deutliche Unterschiede zwischen IRF-4-positiven und -negativen Zellen.

Generell reicht der Grad der Methylierung von einer komplett unmethylierten Zelllinie (SD-1, IRF-4-positiv) bis zu einer vollständig methylierten Zelllinie (CML-T1, IRF-4-negativ). Die anderen Zelllinien wiesen koexistent homozygot methylierte und homozygot unmethylierte CpGs, als auch CpGs mit gemischtem Methylierungsstatus (beispielsweise 3 von 8 Klonen methyliert) auf. Insgesamt ist das Methylierungslevel der IRF-4-positiven Zelllinien deutlich geringer als das der IRF-4-negativen Linien: Der Prozentsatz methylierter CpGs beträgt bei IRF-4-positiven Linien im Mittel nur 24%, während er bei IRF-4-negativen Linien mit im Mittel 94% deutlich höher liegt. Bei den IRF-4-positiven Zelllinien SD-1 und RPMI-8226 sind die 62 untersuchten CpGs fast vollständig frei von Methylierung: (1/62 CpGs mit 1/8 Klonen methyliert bzw. 9/62 CpGs mit 2/8 Klonen methyliert), bei BV-173 ist der Promotor stärker methyliert (34/62 CpGs mit 5/8 Klonen methyliert). Die IRF-4-negativen Zelllinien Jurkat (54/62 CpGs mit 6,6/8 Klonen methyliert), EM-2 (57/62 CpGs mit 6,5/8 Klonen methyliert), K-562 (58/62 CpGs mit 5,7/8 Klonen methyliert), U-937 (61/62 CpGs mit 7,3/8 Klonen

methyliert) und CML-T1 (62/62 CpGs mit 7,9/8 Klonen methyliert) zeigen ein deutlich höheres Methylierungslevel (siehe auch Tabelle 4.1).

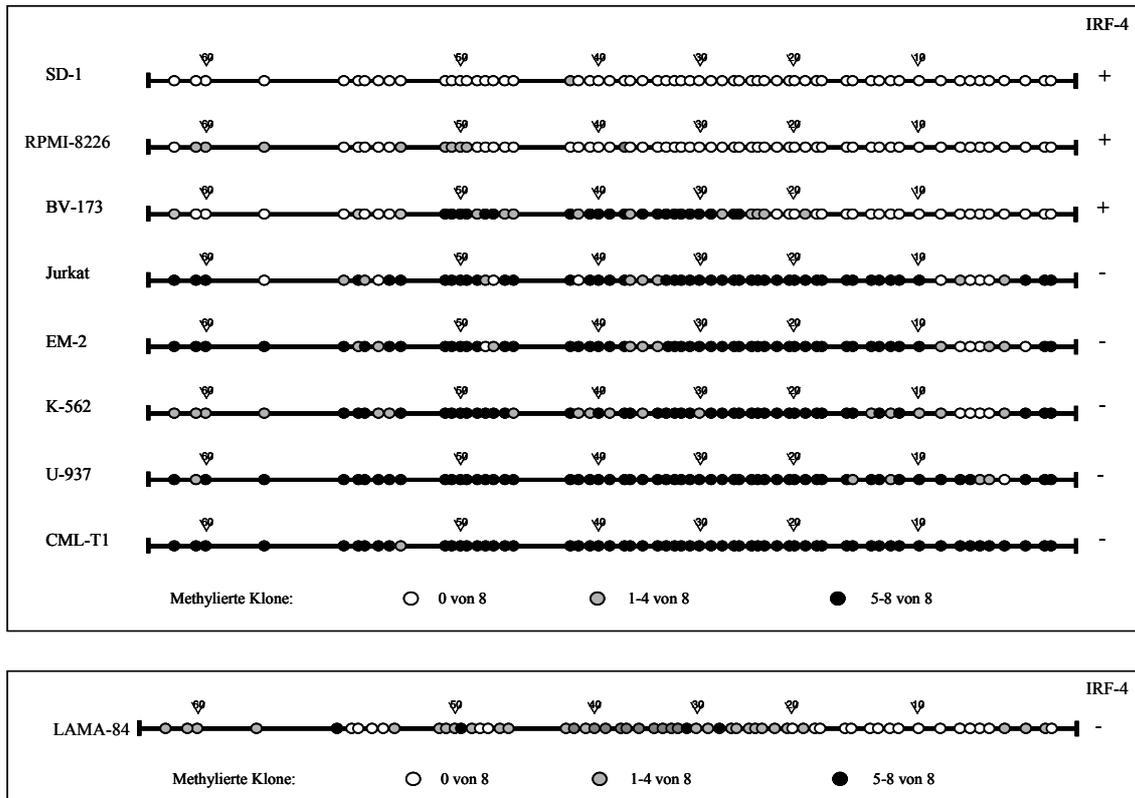


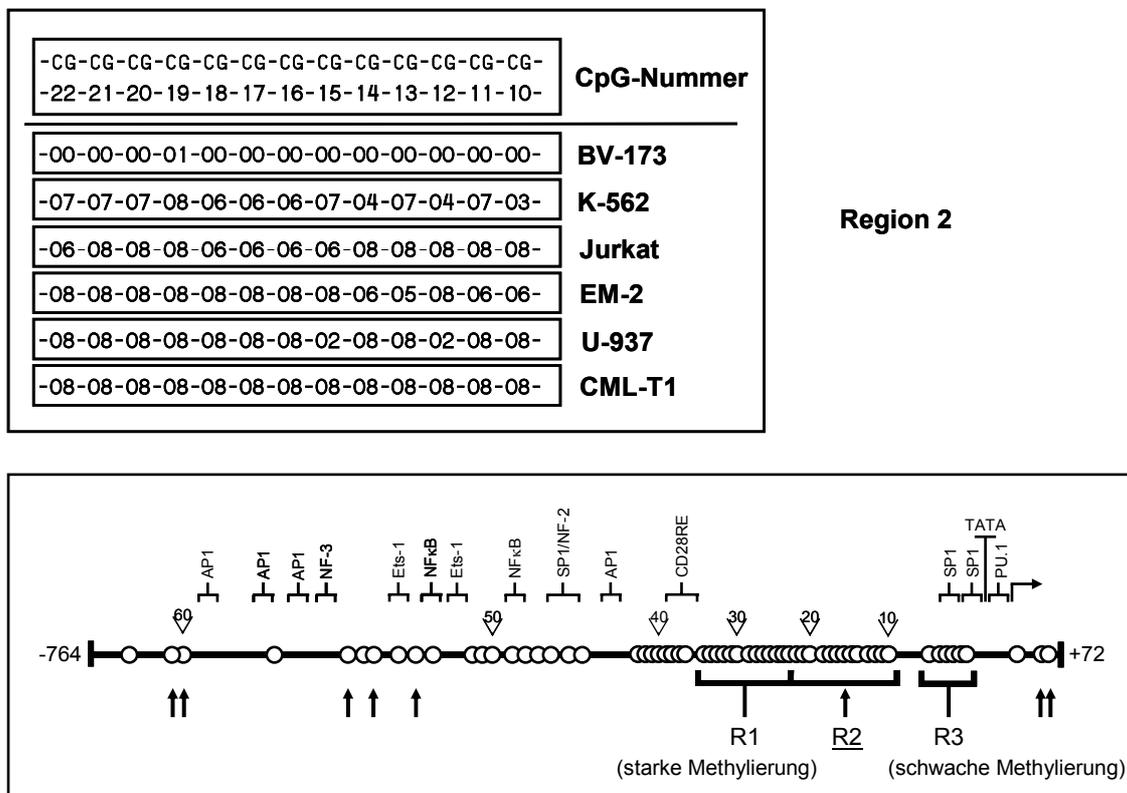
Bild 3.8: Methylierungsmuster der CpGs im IRF-4-Promotor von Zelllinien.

Die Cytosin-Methylierung wird durch Sequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA der Zelllinien detektiert. Pro Zelllinie wurden dabei 8 Klone sequenziert. Schematische Darstellung des IRF-4-Promotors der Zelllinien (siehe Bild 3.2). Jedes CpG ist als Kreis dargestellt: Ein schwarzer Kreis steht für die Methylierung von 5-8 der 8 Klone, ein grauer Kreis steht für die Methylierung von 1-4 der 8 Klone und ein leerer Kreis steht für fehlende Methylierung bei allen 8 Klonen. Die IRF-4-Expression ist rechts dargestellt. Die Zelllinie LAMA-84 wird gesondert betrachtet.

Ein Abschnitt von 13 CpGs (# 10-22) zwischen diesen Regionen (R2) ist interessanterweise stark methyliert in IRF-4-negativen (im Mittel 7,1 von 8 Klonen mit 89% methylierten CpGs), aber unmethyliert in IRF-4-positiven Zelllinien. Weiterhin weisen 10 CpGs am 3'Ende (# 1, 2, 11, 13, 16, 17, 18, 20-22) eine direkte Korrelation zwischen sehr hohem Methylierungslevel (mind. 5 Klone methyliert) und supprimierter IRF-4-Expression beziehungsweise zwischen Methylierungsfreiheit (0 von 8 Klonen) und positiver IRF-4-Expression auf. Außerdem sind 3 CpGs am 5'Ende (# 54, 56, 58) und 4 CpGs am 5'Ende (# 15, 14, 12, 10) in den IRF-4-positiven Linien methylierungsfrei und in den IRF-4-negativen Linien mittel bis stark methyliert. Zusätzlich sind zwei CpG-Motive, die sich in einem NFκB- (# 48) beziehungsweise SP1-Element (# 45) befinden, in IRF-4-negativen stärker als in IRF-4-positiven Zelllinien methyliert (NFκB: im Mittel 1/8 versus 7,9/8 methyliert; Sp1: im Mittel 1/8 versus 8/8 methyliert). Die CpGs # 53 und # 54 grenzen unmittelbar an ein weiteres NFκB-Element an

(Sharma et al. 2002) und zeigen ebenfalls eine Korrelation zwischen Methylierung und IRF-4-Status (im Mittel 0,3/8 versus 6,1/8 methyliert).

Die Methylierungsverteilung zeigt Ähnlichkeiten zwischen den Zelllinien, teilweise auch unabhängig von der IRF-4-Expression. Beispielsweise weisen vier CpGs (# 49-52) in der 5'-Region ein sehr hohes Methylierungslevel (im Mittel 7,7 von 8 Klonen methyliert) auf, das sich auch in der IRF-4-positiven Zelllinie BV-173 (im Mittel 6,8 von 8 Klonen methyliert) und sogar in der sonst fast unmethylierten Linie RPMI-8226 (im Mittel 2,5 von 8 Klonen methyliert) widerspiegelt. Eine 5'-Region (R1) mit 13 hypermethylierten CpGs (im Mittel 5,5 von 8 Klonen mit 77% methylierten CpGs) und eine 3'-Region (R3) mit 6 schwach methylierten CpGs (im Mittel 1,7 von 8 Klonen mit 33% methylierten CpGs) fand sich in fast allen Zelllinien unabhängig von der IRF-4-Expression (Bild 3.8, Tabelle 4.1).



Eine Sonderstellung nimmt die IRF-4-negative Zelllinie LAMA-84 (40/62 CpGs mit 2,7/8 Klonen methyliert) mit einer vergleichsweise schwachen Methylierung ein. Die Daten dieser

Zelllinie sind aus den oben aufgeführten Berechnungen ausgenommen. LAMA-84 steht mit seinem niedrigen Methylierungsstatus damit zwischen den IRF-4-negativen und -positiven Zelllinien. Trotzdem finden sich 4 CpGs (# 58, 22, 21, 2), die bei allen IRF-4-negativen Zelllinien einschließlich LAMA-84 methyliert und bei allen IRF-4-positiven Zelllinien frei von Methylierung sind. Es ist daher zu diskutieren, ob LAMA-84 eventuell einem anderen Regulierungsmechanismus unterliegt oder ob die 4 spezifischen CpGs allein für die Transkriptionsunterschiede verantwortlich sein könnten.

3.7 Vergleich der Ergebnisse aus Restriktions-PCR-Assay und Bisulfit-Sequenzierung

Beim Vergleich der Ergebnisse des Restriktions-PCR-Assays mit den Resultaten der Bisulfit-Sequenzierung ergaben sich folgende Resultate:

Bei der in der Sequenzierung vollständig methylierungsfreien Zelllinie SD-1 zeigte auch der Restriktions-PCR-Assay durch Verschwinden der *HpaII*-, *HaeII*- und *Bsh1236I*-Banden in beiden Fragmenten die Methylierungsfreiheit an. Für LAMA-84 und BV-173 stimmte eine abgeschwächte PCR-Bande im *HpaII*-Assay mit der fehlenden bis geringen Methylierung, die durch die Sequenzierung nachgewiesen wurde, überein. Bei RPMI-8226 hingegen waren die methylierungssensitiven Banden trotz geringer bis fehlender Methylierung positiv. Auch bei Jurkat erschien trotz unmethylierter Schnittstelle eine deutliche Bande bei *HpaII*-Verdau. Ebenfalls falsch positiv war bei LAMA-84 der Assay mit *Bsp143II*. Diese Ergebnisse zeigen die hohe Anfälligkeit des Assays für falsch positive Ergebnisse, die durch inkomplette Restriktion auftreten können. Nur eines der in der Bisulfit-Sequenzierung als bei IRF-4 negativen Zellen methyliert identifizierten CpGs (# 56) überlappte rückblickend auch gleichzeitig mit einer Restriktionsschnittstelle.

3.8 Sequenz und Methylierungsstatus von Kontrollpersonen und CML-Patienten

Die Sequenz des IRF-4-Promotors (Bisulfit-behandelte DNA, jeweils 8 Klone) von 3 Normalpersonen und 3 CML-Patienten wurde analysiert, um eventuelle genetische Aberrationen (Bild 3.10) zu erkennen sowie den Methylierungsstatus zu untersuchen (Bild 3.11). Die CML-Patienten befanden sich in der chronischen Phase. Wie zuvor in den Zelllinien konnten keine genetischen Aberrationen detektiert werden, die die Inhibition von IRF-4 erklären könnten. Wie

NB 1	NB 2	NB 3	CML 1	CML 2	CML 3	GenBank
A/C,T	A/C,T	A	A/C,T	A/C,T	A/C,T	A # -116

Bild 3.10: Basenpaarvariationen des IRF-4-Promotors.

Basenpaarvariationen im IRF-4-Promotor von Normalblut und CML-Patienten an Position 1063 (GenBank #U52683), beziehungsweise Nukleotid -116 (Grossman et al. 1996). C und T sind aufgrund der Bisulfit-Behandlung der Zellen nicht differenzierbar.

in den Zelllinien findet sich an Position 116 des IRF-4-Promotors teilweise eine Konversion von A in C oder T (aufgrund der Bisulfit-Behandlung nicht eindeutig bestimmbar). Bis auf ein Normalblut ohne Mutation weisen alle untersuchten Proben an dieser Stelle eine gemischte A/C bzw. A/T-Sequenz auf. Auch bezüglich der Methylierung bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen CML-Patienten und Normalblut: Insgesamt ist das Methylierungslevel extrem niedrig (im Mittel 0,1 von 8 Klonen methyliert); bei Normalpersonen sind im Mittel 0,08, bei CML-Patienten 0,12 von 8 Klonen methyliert. In der großen Mehrzahl findet sich eine Methylierung dabei lediglich bei einem einzelnen der 8 Klone, in wenigen Fällen in bis zu 3 von 8 untersuchten Klonen. Interessanterweise findet sich eine gewisse Konzentration der, wenn auch schwachen Methylierung in der Region zwischen CpG #20-35 (R1), wo sich in hämatopoetischen Zelllinien eine äußerst dichte Methylierung findet.

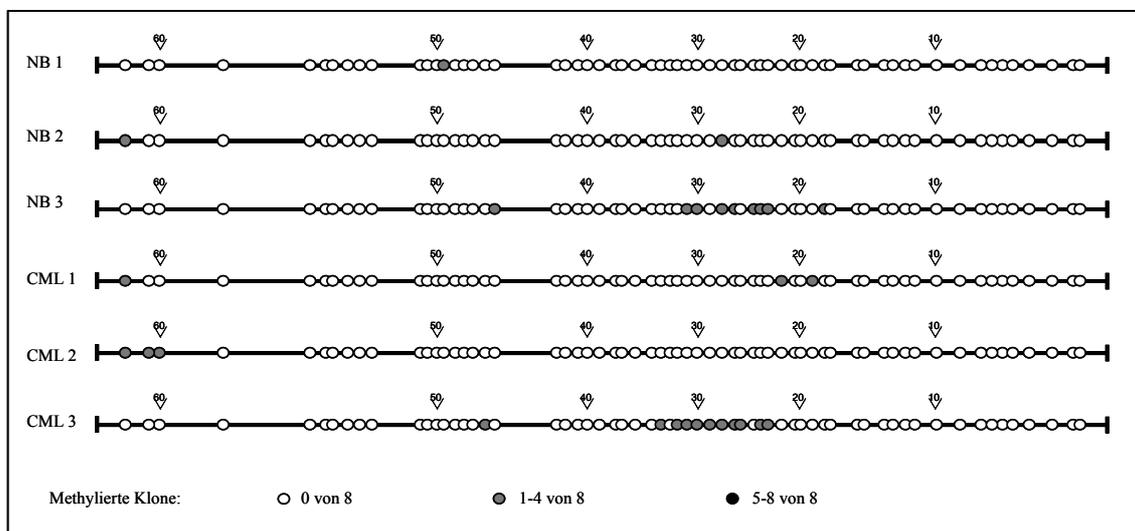


Bild 3.11: Methylierungsmuster des IRF-4-Promotors von CML-Patienten und Kontrollpersonen. Die Methylierung wird durch Sequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA detektiert. Es wurden jeweils 3 CML-Patienten (CML) und drei Proben Normalblut (NB) analysiert (siehe 2.1.2). Je Probe wurden dabei 8 Klone sequenziert. Schematische Darstellung des IRF-4-Promotors der Zelllinien (siehe Bild 3.2). Jedes CpG ist als Kreis dargestellt: Ein grauer Kreis steht für die Methylierung von 1-4 der 8 Klone und ein leerer Kreis steht für fehlende Methylierung bei allen 8 Klonen.

3.9 Bestätigung der demethylierenden Wirkung von 5-Aza-2-deoxycytidin (AzadC) durch Sequenzierung

Um einen Eindruck vom Ausmaß der Demethylierung durch AzadC zu gewinnen, wurden die Zelllinien CML-T1 und EM-2 für 3d mit 3 μ M AzadC behandelt, die extrahierte DNA einer Bisulfit-Behandlung unterzogen und von jeweils 3 Klonen das Fragment FII des IRF-4-Promotors sequenziert. Der Methylierungsstatus der 3 AzadC-behandelten Klone wurde mit dem Methylierungslevel von 8 Klonen der gleichen, aber unbehandelten Zelllinie verglichen. Dieser Vergleich einer unterschiedlichen Anzahl von Klonen lässt zwar keine sicheren

Aussagen über das Ausmaß der Demethylierung zu, dennoch geben die Daten einen Eindruck von der demethylierenden Wirkung der Substanz.

Von den 58 untersuchten CpGs waren bei CML-T1 alle 58 CpGs vollständig methyliert (8/8 Klonen methyliert). Nach Behandlung mit AzadC trat an 19 der 58 CpGs eine vollständige Demethylierung (0/3 Klonen methyliert) ein. Einer Methylierung von 100% (464/464 CpGs) ohne Behandlung steht somit eine Methylierung von 67% (117/174 CpGs) nach Behandlung gegenüber. Bei EM-2 ist der demethylierende Effekt etwas schwächer. Hier sind ohne Behandlung 74% (344/464 CpGs) der CpGs methyliert, nach Behandlung noch 62% (108/174 CpGs). Die nach Stimulation mit AzadC demethylierten CpGs liegen bei den beiden untersuchten Zelllinien an unterschiedlichen Stellen im Promotor.

3.10 Fehlende Korrelation der IRF-4-Promotor-Methylierung mit der Expression von DNA Methyltransferasen (DNMT) und Methyl-CpG-Bindungsproteinen (MBP)

DNA Methyltransferasen (DNMT) und Methyl-CpG-Bindungsproteine (MBP) spielen eine wichtige Rolle im System der methylierungsabhängigen Promotor-Regulation. Um einen möglichen Mechanismus für die beobachteten Methylierungs-unterschiede des IRF-4-Promotors zu untersuchen, wurde deren mRNA-Expression in den verschiedenen Zelllinien mittels RT-PCR bestimmt (Bild 3.12). Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied in der DNMT- (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) oder MBP- (MBD1, MBD2, MBD4, MeCP) Transkription zwischen IRF-4-positiven und –negativen Zellen. Tatsächlich wiesen alle analysierten Zelllinien hohe Level der untersuchten DNMT/MBPs auf. Dieses Ergebnis weist auf eine andere, subtilere Ursache für die detektierten Methylierungsunterschiede hin.

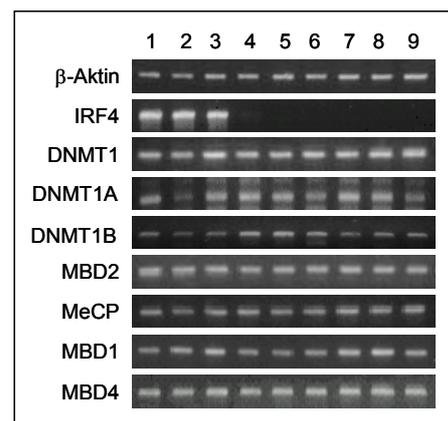


Bild 3.12: DNMT- und MBP-Expression in Zelllinien. RT-PCR der Zelllinien SD-1 (Spalte 1), RPMI-8226 (Spalte 2), BV-173 (Spalte 3), U-937 (Spalte 4), CML-T1 (Spalte 5), LAMA-84 (Spalte 6), Jurkat (Spalte 7), EM-2 (Spalte 8), K-562 (Spalte 9). Als Referenz wurde β -Aktin bestimmt.

4 Diskussion

In malignen Zellen existieren viele Mechanismen, welche die Genexpression von Tumorsuppressorgen beeinflussen. Während genetische Läsionen, wie Mutation, Deletion oder Insertion, permanente Effekte haben, stellen epigenetische Veränderungen sowie Expression oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren reversible Regulationsmechanismen dar. Im peripheren Blut von CML-Patienten in chronischer Phase ist im Vergleich zu Kontrollpersonen der Interferon-regulatorische Faktor IRF-4 herunterreguliert (Schmidt et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde der IRF-4-Promotor auf genetische und epigenetische Veränderungen untersucht, um den Mechanismus der Transkriptionshemmung bei CML zu beleuchten.

4.1 Methodik

Bei der Analyse von DNA-Methylierung kommen unterschiedliche Techniken zur Anwendung, die in der Mehrzahl entweder auf dem Einsatz von methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen oder auf der Bisulfit-Behandlung von DNA beruhen. Die zur Verfügung stehenden Techniken reichen in ihrem Spektrum von der Analyse des genomweiten Methylierungsgehalts bis zur Methylierung einzelner CpGs spezifischer Gene. In dieser Arbeit wurde der Methylierungsstatus des IRF-4-Promotors durch drei verschiedene Methoden analysiert, die sich in ihrer Aussagekraft ergänzen.

4.1.1 Inhibition der *de novo* Methylierung durch AzadC

Das Nucleosid-Analogon 5-Aza-2-deoxycytidin (AzadC) ist ein irreversibler Inhibitor der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1)(siehe 1.3.7.3). In dieser Arbeit wurden Zelllinien zeit- und konzentrationsabhängig mit AzadC behandelt und der Einfluss auf die IRF-4-Expression bestimmt. Die durch die demethylierende Substanz induzierte Expression von Genen wird im Allgemeinen als Hinweis auf eine mögliche Hypermethylierung des zugehörigen Promotors gewertet. Dabei stellt sich die Frage, ob die beobachtete rekonstituierte Expression, hier von IRF-4, tatsächlich auf die Demethylierung des Promotors oder aber auf sekundäre Effekte zurückzuführen ist. Diese Frage lässt sich im Einzelfall nicht eindeutig beantworten; mehrere Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass in der Tat die Demethylierung für die Wirkung auf die Zelle verantwortlich ist: (a) Die Effekte von AzadC sind erblich und dauern ohne weitere Behandlung für viele Generationen an; dabei wurde durch Transfektion von Empfängerzellen mit DNA aus AzadC-behandelten Zellen bewiesen, dass diese Erbllichkeit auf Veränderungen der nackten DNA zurückzuführen ist (Lester et al. 1982; Venolia et al. 1982). (b) Der Zusammenhang zwischen AzadC-Behandlung, Promotor-Demethylierung und transkriptioneller Aktivierung wurde nachgewiesen (Groudine et al. 1981). (c) Die Häufigkeit von Gen-

Aktivierungen ist 5-6-mal höher als sie bei rein mutagenen Substanzen erwartet wird (Harris 1982). (d) Gene, die vor Einschleusen in die Zelle methyliert wurden, können durch AzadC-Behandlung reaktiviert werden (Simon et al. 1983).

Diese Daten deuten darauf hin, dass der Anstieg von IRF-4 nach AzadC-Behandlung tatsächlich auf die Bedeutung einer Promotormethylierung in der Regulation des IRF-4-Gens hinweist.

4.1.2 Restriktions-PCR-Assay

Der Restriktions-PCR-Assay (Singer-Sam et al. 1990) beruht auf der unterschiedlichen Sensitivität von Isochizomeren bakterieller Restriktionsendonukleasen gegenüber dem Methylierungsstatus von Cytosinen an der Schnittstelle. Ein häufig verwendetes und auch hier zur Anwendung kommendes Isochizomerenpaar ist *HpaII/MspI*. Beide Enzyme haben die gleiche Erkennungssequenz (CCGG); *HpaII* schneidet im Gegensatz zu *MspI* jedoch nicht, wenn das innere Cytosin methyliert ist. Durch eine sich anschließende PCR-Amplifikation des untersuchten Bereichs wird sichtbar, ob das Enzym schneiden konnte (PCR negativ) oder nicht (PCR positiv). Ein Vorteil dieser Methode liegt nach Etablierung in der einfachen und schnellen Anwendbarkeit. Mit dieser Technik können jedoch nur Aussagen über einzelne CpGs getroffen werden, die im Schnittstellenbereich eines Restriktionsenzym liegen. Ein Nachteil, der auch im Rahmen dieser Arbeit auffiel, ist die hohe Rate falsch positiver Resultate: Die PCR ermöglicht den Nachweis nur weniger DNA-Moleküle. Trotz Enzymüberschuss und langer Inkubation bleiben nach der Michaelis-Menten-Gleichung (Stryer) zwangsläufig ungeschnittene DNA-Moleküle übrig, welche dann ein falsch positives Ergebnis nach PCR verursachen. Dies gilt insbesondere auch für eine gemischte DNA-Probe, wie sie beispielsweise bei der Untersuchung von Patienten oder Normalblut vorliegen kann. So traten gelegentlich positive Banden bei Verdau mit dem Kontrollenzym *MspI* auf, welches methylierungsinsensitiv ist und in jedem Fall komplett schneiden sollte.

Der Vergleich der Ergebnisse des Restriktions-PCR-Assays mit den Resultaten der Bisulfit-Sequenzierung bestätigte eine Anfälligkeit dieser Methode für falsch positive PCR-Resultate. Dennoch konnte schwache oder fehlende Methylierung an vielen Loci nachgewiesen werden. Bei nachgewiesener Methylierung in der Bisulfit-Sequenzierung zeigte auch der Restriktions-PCR-Assay in jedem Fall die Methylierung an.

Für das Fragment FIII konnte trotz zahlreicher Lösungsversuche der Restriktions-PCR-Assay nicht etabliert werden: Die PCR-Bande verschwand, sobald die DNA vorher mit einem Restriktionsenzym in Kontakt gekommen war, auch wenn dieses keine Schnittstelle innerhalb des Fragments und innerhalb der Primer besaß (siehe 3.4.2, Bild 3.6).

Als interne Kontrolle wurde der Restriktions-PCR-Assay mit DNA durchgeführt, die aus AzadC-behandelten Zellen stammte. Der Assay nach *Bsp143II*-Verdau von Fragment FII zeigte dabei ein Verschwinden oder eine Abschwächung der PCR-Bande. Dies bestätigte die erwartete Demethylierung durch AzadC. Der Restriktions-PCR-Assay von Fragment FI sowie von

Fragment FII nach Verdau mit *HpaII* zeigte kein Verschwinden des PCR-Produkts. Dies lässt sich jedoch damit erklären, dass die Demethylierung immer nur die Tochterzellen betrifft und somit noch methylierte DNA vorhanden sein kann, die eine PCR-Amplifikation ermöglicht.

Ben-Yehuda *et al* (Ben-Yehuda et al. 1997) wandten die Technik des Restriktions-PCR-Assays bei der Analyse des ABL-Promotors an und konnten mit dieser Methode eindeutig zwischen Methylierung (PCR eindeutig positiv) und Nicht-Methylierung (keine Bande vorhanden) unterscheiden. Obwohl probeweise die Versuchsbedingungen dieser Gruppe (identischer Verdau mit *HpaII* und *MspI*, Aufreinigung mit Microcon-100 Microconcentrators) genau nachgeahmt wurden, konnte diese Spezifität der Methode für den IRF-4-Promotor nicht erreicht werden. Das Experimentieren mit PCR-Bedingungen oder eingesetzter DNA-Menge zeigte, dass der Assay äußerst empfindlich auf diese Veränderungen reagiert und, um korrekte Ergebnisse zu erbringen, sehr genau auf das zu untersuchende Gen eingestellt werden muss. Bei dieser Feineinstellung ist es hilfreich, den tatsächlichen Methylierungsstatus zu kennen.

Eine Alternative zum Restriktions-PCR-Assay wäre die Methode der methylierungsspezifischen PCR (Herman, Graff et al. 1996) gewesen. Grundlage dieser zur Zeit weit verbreiteten Technik ist die PCR-basierte Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten CpGs in Bisulfit-behandelter DNA, die auf der Bisulfit-induzierten Sequenzänderung beruht. In einer Standard methylierungsspezifischen PCR werden zwei verschiedene Primer-Paare in zwei Ansätzen eingesetzt, um spezifisch methylierte beziehungsweise unmethylierte DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Der kritische Schritt in der Etablierung dieser Methode ist das Design der Primer, die zwischen Bisulfit-konvertierter und nicht-konvertierter DNA unterscheiden können müssen. Dafür entfällt bei dieser Methode das Problem der unvollständigen Digestion durch Restriktionsenzyme. Auch diese Methode lässt nur eine Aussage über bestimmte, vorher bekannte CpGs im Primerbindungsbereich zu, ist aber wie der Restriktions-PCR-Assay kostengünstig und nach Etablierung schnell und einfach durchführbar.

4.1.3 Bisulfit-Sequenzierung

Die von Frommer (Frommer et al. 1992) entwickelte Methode der Bisulfit-Sequenzierung gilt als Goldstandard der Gen-spezifischen Methylierungsanalyse. Die Bisulfit-Behandlung genomischer DNA führt zur effektiven Deaminierung von unmethyliertem Cytosin in Uracil, während 5-Methylcytosin nur sehr langsam deaminiert wird. Die Bisulfit-induzierten Veränderungen der DNA-Sequenz erlauben dann die Unterscheidung zwischen methylierten (C bleibt C) und unmethylierten (C erscheint als U bzw. T) Cytosinen (siehe 2.2.8). Ein entscheidender Vorteil dieser Methode liegt darin, dass jedes CpG im Genom, unabhängig von Restriktionsenzym-Schnittstellen, untersucht werden kann. Durch die Analyse mehrerer Klone eines Patienten oder eine Zelltyps kann zudem bestimmt werden, wie hoch das Methylierungslevel ist. Ein limitierender Faktor dieser Technik ist die unter Umständen unvollständige Konversion von unmethyliertem Cytosin in Uracil, die vor allem bei

inkompletter Denaturierung der DNA vor Bisulfit-Exposition auftritt. Das Auftreten einer inkompletten Konversion von unmethyliertem Cytosin in Uracil kann in dieser Arbeit nahezu ausgeschlossen werden: In der Cytosin-reichen Sequenz wurden nicht-konvertierte Cs ausschließlich im Kontext des CpG-Dinukleotids gefunden; alle anderen Cytosine, die bekanntermaßen unmethyliert sind, wurden vollständig in Uracil umgewandelt und erschienen als Thymin.

Eine weitere Gefahr besteht darin, dass das eingesetzte Primerpaar in der anschließenden PCR methylierte und unmethylierte DNA in ungleicher Stärke binden könnte. Methylierte und unmethylierte DNA könnte daher mit unterschiedlicher Effizienz amplifiziert werden. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit sowohl vollständig methylierte als auch vollständig unmethylierte Zelllinien entdeckt wurden und dass interne Kontrollen, wie die Sequenzierung von AzadC-behandelten Zellen, konsistente Ergebnisse erbrachten, macht diesen Fehler unwahrscheinlich. Zudem wurden die Primer so ausgewählt, dass sie keine CpGs abdecken; somit kann der Methylierungsstatus eigentlich keinen Einfluss auf die Primerbindung haben. Dennoch, um diesen Pitfall auszuschließen, hätten bekannte Gemische methylierter und unmethylierter DNA sequenziert werden müssen.

4.1.4 Auswahl der Proben: Hämatopoetische Zelllinien als Modellsystem

Um den IRF-4-Promotor ohne Materialbeschränkung und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen untersuchen zu können, wurden als Modellsystem IRF-4-positive und -negative hämatopoetische Zelllinien gewählt. Zusätzlich wurde peripheres Blut von CML-Patienten in chronischer Phase und gesunden Kontrollpersonen untersucht. Der Vergleich von Leukämie-Zelllinien mit und ohne IRF-4-Expression ermöglicht eine Ursachensuche an unbegrenztem Material ohne Verfälschungen durch unterschiedliche Probenqualität oder Blutbilder und lässt experimentelle Verfahren, wie beispielsweise die Behandlung mit demethylierenden Restriktionsenzymen, zu. Trotzdem lassen sich die an Leukämie-Zelllinien gewonnenen Ergebnisse nur mit Vorsicht auf primäre humane Leukämien übertragen. Dies wird vor allem durch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit deutlich, die zeigt, dass Zelllinien im Vergleich zum Ursprungstumor ein viel höheres Gesamtmethylierungslevel aufweisen (Smiraglia et al. 2001). Die in dieser Arbeit unter anderem untersuchten Leukämie-Zelllinien waren dabei 19fach stärker methyliert als die verglichenen primären Leukämie-Proben. Trotzdem wurde gezeigt, dass Zelllinien einige Hypermethylierungs-Merkmale des Ursprungstumors beibehalten.

Diese Daten verdeutlichen, dass die in dieser Arbeit entwickelten Hypothesen zur IRF-4-Regulation erst noch am Patienten überprüft werden müssen. Die Methylierungsbestimmung von peripherem Blut von drei CML-Patienten in chronischer Phase zeigte keine Unterschiede zu Kontrollpersonen. Dieser Versuchsansatz schließt jedoch keineswegs das Vorliegen von Methylierungsunterschieden aus: Die Untersuchung von 8 Klonen eines Patienten reicht wahrscheinlich nicht aus, um die Methylierung der betroffenen T-Zellen im Gesamt-Blutbild

des Patienten zu erfassen. Um Hypermethylierung als Ursache der IRF-4-Suppression in T-Zellen zu beweisen, müsste die IRF-4-Promotor-Methylierung an isolierten, „gesorteten“ Zellpopulationen von CML-Patienten untersucht werden.

4.2 Untersuchungen zur Regulation der IRF-4-Expression in Leukämiezellen

4.2.1 Genetische Veränderungen des IRF-4-Promotors

Da die IRF-4-Expression bei CML-Patienten *in vivo* sowie bei hämatopoetischen Zelllinien *in vitro* durch verschiedene Substanzen induzierbar ist, ist das Vorliegen von permanenten genetischen Veränderungen im IRF-4-Promotor unwahrscheinlich. Dennoch, denkbar wäre ein Verlust der Heterozygotie eines der IRF-4-Allele durch Mutation oder Deletion und die Inaktivierung des anderen Allels über einen anderen Mechanismus (Greger et al. 1989). Dies wurde durch Sequenzierung des IRF-4-Promotors ausgeschlossen. Interessanterweise wurde jedoch ein Polymorphismus (Nukleotid -116, A→C) entdeckt, der sowohl in hämatopoetischen Zelllinien als auch bei CML-Patienten und Kontrollpersonen als gemischte A/C-Sequenz oder vollständige Mutation auftritt. Da dieser Polymorphismus und zwei weitere Basenpaarvariationen (Nukleotid -1081, T→C und -1068 A→C) jedoch unabhängig vom IRF-4-Status auftreten, ist ein ursächlicher Zusammenhang zur IRF-4-Inhibition unwahrscheinlich. Anhand einer Sequenzanalyse (AliBaba2.1, www.gene-regulation.com) befinden sich mögliche Bindungsstellen für folgende Transkriptionsfaktoren an den betroffenen Stellen: Nukleotid -1081: Sp1, Nukleotid -1068: ISGF-3, Nukleotid -116: Sp1 und NF- μ E1. Durch keine der drei Substitutionen ist jedoch eine bereits nachgewiesene Transkriptionsfaktorbindungsstelle betroffen (Grossman et al. 1996; Sharma et al. 2002). Dennoch wäre es unter Umständen interessant, das Auftreten dieser Polymorphismen an einer größeren Zahl von Probanden und Patienten zu vergleichen und damit eine mögliche Assoziation der SNPs (single-nucleotide polymorphism) mit Inzidenz/Prognose etc. auszuschließen.

Neben Aberrationen des Promotors könnte auch die kodierende Region des IRF-4-Gens von Mutationen betroffen sein; so könnte durch eine Mutation frühzeitig ein Stop-Codon entstehen, das die weitere Transkription abbricht. Um diese Möglichkeit auszuschließen, müsste das gesamte IRF-4-Gen sequenziert oder mit anderen Techniken auf Mutationen gescreent werden. Wie oben beschrieben, sind solche Veränderungen aufgrund der Induzierbarkeit von IRF-4 jedoch unwahrscheinlich.

4.2.2 Die aberrante Hypermethylierung des IRF-4-Promotors in IRF-4-negativen Zelllinien

Als nächstes wurde untersucht, ob eine aberrante Promotormethylierung im Zusammenhang mit der supprimierten IRF-4-Expression in myeloiden Leukämien (Schmidt et al. 2000) stehen könnte. Promotorhypermethylierung als Mechanismus der Transkriptionshemmung wurde bereits für IRF-7 (Lu et al. 2000) und PU.1 (Amaravadi et al. 1999), einem Bindungspartner von IRF-4, nachgewiesen.

Um die Relevanz von Methylierung für die Regulation der IRF-4-Expression zu beleuchten, wurden leukämische Zelllinien mit demethylierenden Substanzen stimuliert. Dabei zeigte sich ein zeit- und konzentrationsabhängiger Anstieg der IRF-4-Expression bei Behandlung mit 5-Aza-2-deoxycytidin (AzadC), der auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen wurde. Die Induzierbarkeit von IRF-4 war dabei bei den einzelnen Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt: CML-T1, LAMA-84 und U-937 zeigten einen früher und stärker ausgeprägten Anstieg als Jurkat, EM-2 und K-562. Diese Reihenfolge korreliert mit dem Level der IRF-4-Expression, welches bei hoher Zykluszahl detektiert werden kann: Hier haben U-937, CML-T1 und LAMA-84 im Vergleich zu Jurkat, EM-2 und K-562 höhere IRF-4-Spiegel. AzadC hatte einen wesentlichen schwächeren Effekt, der Histondeacetylasehemmer (HDAC) TrichostatinA (TSA) zeigte keine Wirkung auf die IRF-4-Expression. Diese Ergebnisse decken sich mit Daten von Cameron *et al* (Cameron, Bachman et al. 1999), die zeigten, dass TSA alleine keinen Effekt auf die Reexpression von methylierten Genen hat. Nach minimaler Demethylierung durch low-dose AzadC hatte eine TSA-Behandlung jedoch eine starke Reexpression der methylierten Gene zu Folge. Interessant wäre daher die kombinierte Behandlung der Zelllinien mit einem demethylierenden Agens, wie AzadC, zusammen mit TSA, zumal ein synergistischer antineoplastischer Effekt dieser beiden Substanzen auf Tumorzellen in mehreren Studien nachgewiesen wurde (Bovenzi et al. 2001; Gagnon et al. 2003; Primeau et al. 2003; Shaker et al. 2003). In weiteren Experimenten sollte zudem geklärt werden, ob die Demethylierung auch in einer Induktion von IRF-4-abhängigen Genen resultiert.

Der Restriktions-PCR-Assay zeigte trotz des häufigen Auftretens falsch positiver Resultate bei den IRF-4-positiven Zelllinien BV-173 und SD-1 eine fehlende bis schwache Methylierung und bei den IRF-4-negativen Zelllinien, mit Ausnahme von LAMA-84, eine vorhandene Methylierung der Schnittstellen an.

Zur genauen Untersuchung des Methylierungsmusters des IRF-4-Promotors wurden jeweils 8 Klone der Zelllinien Jurkat, CML-T1, U-937, K-562 und EM-2 sowie der Kontrollen BV-173, SD-1 und RPMI-8226 nach einer Bisulfit-Behandlung kloniert und sequenziert.

Diese Analyse zeigte, dass das Methylierungslevel der IRF-4-positiven Zelllinien deutlich geringer ist als das der IRF-4-negativen Zellen (24% versus 94% im Mittel methylierte CpGs). Interessanterweise ist die komplett methylierungsfreie Zelllinie SD-1 IRF-4-positiv, die komplett

methylierte Zelllinie CML-T1 IRF-4-negativ. Es wurden mehrere CpGs gefunden, deren Methylierungsstatus eine direkte Korrelation zur IRF-4-Expression aufweist: Unter strengsten Kriterien (0 Klone bei IRF-4-positiven-, mind. 5 bei IRF-4-negativen Zelllinien methyliert) finden sich 10 spezifische CpGs, deren Methylierungslevel mit der IRF-4-Expression korreliert. Interessanterweise sind außerdem zwei CpG-Motive, die sich in einem NFκB- (# 48) beziehungsweise SP1-Element (# 45) befinden (Sharma et al. 2002), in IRF-4-negativen stärker als in IRF-4-positiven Zelllinien methyliert. Die CpGs # 53 und 54 grenzen unmittelbar an ein weiteres NFκB-Element an und zeigen ebenfalls eine Korrelation zwischen Methylierung und IRF-4-Status. In zwei Arbeiten (Grumont et al. 2000; Sharma et al. 2002) wurde gezeigt, dass die Induktion von IRF-4 abhängig vom Transaktivator c-Rel ist, der an NFκB-Elemente im IRF-4-Promotor bindet. Bednarik *et al* konnten nachweisen, dass durch Methylierung des zentralen CpGs innerhalb des NFκB-Elements die Bindung des NFκB-Proteins direkt verhindert wird (Bednarik et al. 1991). Damit könnte die Methylierung von CpG # 48 eine entscheidende Rolle bei der Inaktivierung des Gens spielen. Diese Annahme könnte durch spezifische *in vitro* Methylierung des betroffenen CpGs und anschließende Reporter-Gen-Assays sowie EMSAs (electrophoretic mobility shift assay) verifiziert werden. Die Bindung des Transkriptionsfaktors SP-1 wird nach bisherigen Erkenntnissen nicht signifikant durch Methylierung des CpGs innerhalb des SP1-Elements gehemmt (Clark et al. 1997). Es wurde jedoch gezeigt, dass die alleinige oder zusätzliche Methylierung des vorausgehenden Cytosins (^mCCG oder ^mC^mCG) einen inhibitorischen Effekt auf die SP1-Bindung hat (Zhu et al. 2003). Im IRF-4-Promotor wiesen die analysierten SP-1-Elemente jedoch nie eine Methylierung von umgebenden Cytosinen im Sinne einer CpNpG-Methylierung auf. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Nishiya *et al* (Nishiya et al. 2004) zeigte, dass der IRF-4-Promotorbereich zwischen -51 und -28 für die basale Transkription von IRF-4 in B-Zellen essentiell ist. An diesen CG-reichen Abschnitt bindet ein noch nicht identifizierter Transkriptionsfaktor. Die CpGs # 4-7 befinden sich in diesem Bereich und weisen bei allen untersuchten Zellen eine niedrige Methylierung auf, so dass hier kein Zusammenhang hergestellt werden kann.

Eine Sonderstellung unter den untersuchten Zelllinien nimmt LAMA-84 ein: Diese Zelllinie ist IRF-4-negativ und weist trotzdem eine schwache Methylierung auf. Daraus ergeben sich verschiedene mögliche Schlussfolgerungen: Erstens könnten diese Daten den Zusammenhang zwischen Methylierung und IRF-4-Expression widerlegen. Dagegen sprechen zum einen die konsistenten Ergebnisse der anderen 8 Zelllinien, zum anderen, dass LAMA-84 unter Behandlung mit AzadC ebenfalls eine Reaktivierung der IRF-4-Expression zeigt, sowie schließlich die durchgeführten Reporter-Gen-Assays (siehe unten). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass bei LAMA-84 ein anderer Regulationsmechanismus stärker zum tragen kommt oder dass bei LAMA-84 zwar weniger, dafür aber die entscheidenden CpGs methyliert

sind. Es finden sich 4 CpGs, die bei allen IRF-4-negativen Zelllinien einschließlich LAMA-84 methyliert und bei allen IRF-4-positiven Linien frei von Methylierung sind.

Unabhängig von der Art der Zelllinien zeigen sich Parallelen in der Methylierungsverteilung der einzelnen Linien: Einige Regionen sind konsistent stark methyliert (R1, R2, beispielsweise # 49-52), andere konsistent schwächer methyliert (R3, beispielsweise # 5-8). Diese Beobachtung steht in Einklang mit Arbeiten, die eine unterschiedliche Empfänglichkeit spezifischer CpGs gegenüber Methylierung festgestellt haben (Brandeis et al. 1994; Feltus et al. 2003).

Tabelle 4.1: Sequenzierung Bisulfit-behandelter DNA hämatopoetischer Zelllinien

Zelllinien	IRF-4	Methylierte CpGs (in Prozent) ¹				Methylierungslevel (im Mittel) ²			
		Total	R1	R2	R3	Total	R1	R2	R3
SD-1	+	2% 1/62	0% 0/13	0% 0/13	0% 0/6	0.0	0.0	0.0	0.0
RPMI-8226	+	15% 9/62	0% 0/13	0% 0/13	0% 0/6	0.3	0.0	0.0	0.0
BV-173	+	55% 34/62	100% 13/13	8% 1/13	0% 0/6	2.8	5.8	0.1	0.0
Mittel	+	24% 15/62	31% 4/13	0% 0/13	0% 0/13	1.0	1.9	0.0	0.0
Jurkat	-	85% 53/62	100% 13/13	100% 13/13	33% 2/6	5.7	7.5	7.2	0.7
EM-2	-	90% 56/62	100% 13/13	100% 13/13	50% 3/6	6.0	7.5	7.3	1.0
K-562	-	94% 58/62	100% 13/13	100% 13/13	33% 2/6	5.4	7.2	6.1	0.3
U-937	-	98% 61/62	100% 13/13	100% 13/13	83% 5/6	7.2	7.9	7.1	3.7
CML-T1	-	100% 62/62	100% 13/13	100% 13/13	100% 6/6	7.9	8.0	8.0	8.0
Mittel	-	94% 58/62	100% 13/13	100% 13/13	67% 4/6	6.4	7.6	7.1	2.7

Es wurden pro Zelllinie jeweils 8 Klone nach Bisulfit-Behandlung sequenziert. Abkürzungen: R1, Region1 mit relativ hoher Methylierung (13 CpGs #23-35); R2, Region2 mit spezifischen, möglicherweise die IRF-4-Expression bestimmender Methylierung (13 CpGs #10-22); R3, Region 3 mit schwacher Methylierung (6 CpGs #4-9).

¹Prozent der methylierten CpGs mit 1 bis 8 methylierten Klonen in dieser Region (Anzahl der methylierte CpGs/ Anzahl der CpGs der Region), ²Mittelwert methylierter Klone von 8 analysierten Klonen (Summe der methylierten Klone/ Anzahl der CpGs der Region).

Die untersuchten Kontrollpersonen zeigten bei Bisulfit-Sequenzierung wie erwartet nur eine extrem schwache Methylierung des IRF-4-Promotors, bei Normalpersonen sind im Mittel nur 0,08 von 8 Klonen methyliert. Melki *et al* (Melki et al. 1999) und Cameron *et al* (Cameron, Baylin et al. 1999) konnten ebenfalls zeigen, dass in normalen Zellen nicht alle CpGs einer CpG-Insel unmethyliert vorliegen, sondern dass zufällig verteilt auch methylierte CpGs in einem sonst methylierungsfreien Kontext auftreten.

Das Methylierungslevel der untersuchten CML-Patienten in chronischer Phase unterschied sich nicht signifikant vom dem der Normalpersonen. Wie bereits in Punkt 4.1.4 diskutiert, ist dieser Versuchsansatz jedoch nicht geeignet, um das Vorliegen von Methylierungsunterschieden

auszuschließen: Die Methylierung der betroffenen T-Zellen kann im untersuchten peripheren Blut des Patienten durch die Untersuchung von 8 Klonen nicht detektiert werden; die IRF-4-Promotor-Methylierung müsste vielmehr an isolierten Zellpopulationen von CML-Patienten untersucht werden.

Im Anschluss an diese Arbeit wurden von der Arbeitsgruppe Reporter-Gen-Untersuchungen durchgeführt, um den Effekt von Methylierung auf die IRF-4-Promotoraktivität direkt nachzuweisen. Dabei wurde die Aktivität des IRF-4-Promotors vor und nach *in vitro* Methylierung anhand der Luciferase-Aktivität bestimmt (Bild 4.1). In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten bewirkte die Methylierung des Promotors eine Reduktion der Aktivität um 85% in SD-1-Zellen und um 92,9% in Jurkat-Zellen. Diese Daten beweisen eine direkte funktionelle Verknüpfung zwischen Methylierung und IRF-4-Promotoraktivität.

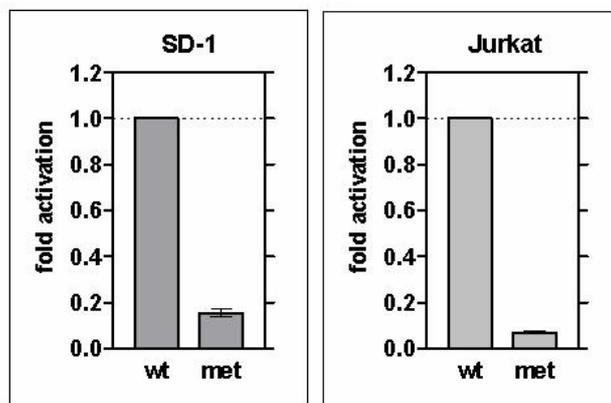


Bild 4.1: Einfluss von *in vitro* Methylierung auf die Aktivität eines IRF-4-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukts (Ortmann, Schmidt *et al*, Publikation in Vorbereitung). Reporter-Gen-Assay mit Wildtyp (wt) und *in vitro* methylierten (met) IRF-4-Reporter-Gen-Konstrukten in SD-1 und Jurkat-Zellen. Die Aktivität des Promotors ist als Vielfaches (fold activation) der Aktivität des unmethylierten Promotors dargestellt.

4.2.3 Veränderte Expression von DNMTs/ MBPs als mögliche Ursache aberranter Methylierung

Die Mechanismen, die der *de novo* Methylierung von Tumorsuppressor-Genen in Tumorzellen zugrunde liegen, sind heute noch unklar. Hypermethylierung aufgrund einer Überexpression von DNMTs gilt jedoch als mögliche Erklärung für die *de novo* Methylierung während der Tumorentstehung und Leukämogenese (Belinsky *et al.* 1996; Melki *et al.* 1998; Issa *et al.* 2001). Mizuno *et al* wiesen kürzlich nach, dass in der AML und in der Blastenphase der CML die drei bekannten DNMTs mehrfach überexprimiert sind und dass die Methylierung von p15^{INK4B} mit der Höhe dieser Überexpression korreliert (Mizuno *et al.* 2001). MBPs binden an methylierte CpGs und behindern damit zum einen direkt die Bindung von Transkriptionsfaktoren (Tate *et al.* 1993), zum anderen rekrutieren sie Enzyme (Jones *et al.* 1998), die den inaktiven Chromatinstatus verstärken.

Die Transkription von DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MBD1, MBD2, MBD4 und MeCP wurde in den verschiedenen Zelllinien verglichen, um einen möglichen Mechanismus für die beobachteten Methylierungsunterschiede des IRF-4-Promotors zu detektieren. Zwischen IRF-4-

positiven und –negativen Zelllinien besteht jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression der untersuchten DNMTs/MBPs. Die Enzyme werden in allen Zelllinien in hohem Level exprimiert. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Daten von Sato *et al.*, die ebenfalls keine Korrelation zwischen dem Methylierungsstatus verschiedener Gene und der Transkription von DNMTs/MBPs in Bronchialkarzinom-Zelllinien fanden (Sato et al. 2002). Da viele Genprodukte neben transkriptionellen durch translationelle oder post-translationelle Mechanismen reguliert werden, müssten weitere Experimente angeschlossen werden, um auch auf dieser Ebene Aktivitätsunterschiede zwischen den Zelllinien auszuschließen. Die fehlenden Transkriptionsunterschiede zwischen IRF-4-positiven und –negativen Zelllinien in dieser Arbeit lassen auch an genspezifische, lokal begrenzte Unterschiede der Methylasenaktivität denken.

4.2.4 Aberrante DNA-Methylierung: Henne oder Ei?

Wie bereits in Punkt 1.3.6 dargelegt, ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt, zu welchem Zeitpunkt Hypermethylierung im Prozess des Abschaltens eines Gens auftritt. Im Anschluss an die hier gewonnenen Daten stellt sich also die weiterführende Frage, ob die Methylierung primäre und alleinige Ursache der IRF-4-Inaktivierung ist, oder ob Faktoren existieren, die die Methylierung erst ausgelöst haben. Vertritt man das Modell der primären Hypermethylierung, so werden als Ursachen eine verstärkte Aktivität der DNMTs, eine fehlerhafte Methylierung durch DNMTs oder Defekte von Demethylasen oder Reparaturenzymen der Methylierung diskutiert. Einige Studien sprechen jedoch dafür, dass Methylierung eher den Endpunkt des Inaktivierungsprozesses darstellt und den inaktiven Status des Gens gleichsam „fixiert“ (Foster et al. 1998; Huschtscha et al. 1998; Bachman et al. 2003). So könnten der Methylierung der Verlust von Aktivatoren

oder die Überexpression von Repressoren der Transkription vorausgehen. Es wäre daher interessant, bereits bekannte Transkriptionsfaktoren, die in der IRF-4-Induktion eine Rolle spielen, hinsichtlich ihrer Expression und Aktivität zu untersuchen:

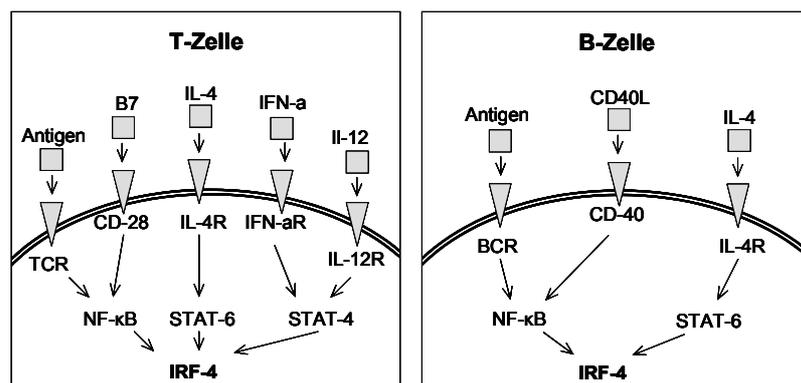


Bild 4.2: IRF-4-Induktion in T- und B-Zellen.

Zahlreiche Signale, welche die Lymphozyten-Aktivierung beeinflussen, induzieren auch IRF-4 (Pernis 2002). TCR, T-Zell-Rezeptor; BCR, B-Zell-Rezeptor; IL-R, Interleukin-Rezeptor; IFN- α R, Interferon- α -Rezeptor.

Von besonderem Interesse wäre sicherlich der Transaktivator c-Rel/ NF- κ B, der bei der Aktivierung von IRF-4 durch Antigenstimulation essentiell ist (Grumont et al. 2000). NF- κ B liegt in nicht stimulierten Zellen gebunden an den Inhibitor I κ B vor, welcher die Translokation

des Transkriptionsfaktors in den Zellkern verhindert. Dieses Beispiel zeigt, dass nicht nur die Expression von Transkriptionsfaktoren gestört sein kann, sondern auch deren Einbindung in eine unter Umständen komplexe Regulationsstruktur untersucht werden muss, um deren Beteiligung an einer inhibierten Genexpression, wie hier IRF-4, auszuschließen (Bild 4.2). Bei Stimulation von B- und T-Zellen mit IL-4 kommt es zur Phosphorylierung von STAT-6 (Hou et al. 1994; Schindler et al. 1994; Kotanides et al. 1996), welches wahrscheinlich an ein GAS-Element im IRF-4-Promotor bindet und IRF-4 induziert. Im Einklang damit steht, dass die IRF-4-Induktion nach IL-4-Exposition bei STAT-6 $-/-$ Mäusen blockiert ist (Pernis 2002). Ein weiterer an der IRF-4-Induktion beteiligter Faktor scheint STAT-4 zu sein, welcher durch Interferon- α - oder IL-12-Stimulation aktiviert wird (Lehtonen et al. 2003).

Sollte Methylierung erst sekundär nach Inaktivierung eines Gens auftreten, so scheint die Methylierung trotzdem für die Aufrechterhaltung der Transkriptionssinhibition essentiell zu sein; vermag doch die Behandlung mit demethylierenden Substanzen die Expression zu reaktivieren, wie auch in dieser Arbeit gezeigt.

4.3 Die Rolle von IRF-4 in der CML

In peripherem Blut von CML-Patienten, vor allem in T-Zellen, ist IRF-4 im Vergleich zu Normalblut signifikant herunterreguliert und steigt bei Patienten, die ein gutes Ansprechen auf IFN- α -Therapie aufweisen, wieder an (Schmidt et al. 2000). Die beobachtete Korrelation zwischen guter Remission nach IFN- α -Therapie und ansteigendem IRF-4 weist auf eine mögliche Beteiligung von IRF-4 in der antileukämischen Wirkungsweise von IFN- α hin. Im Anschluss an diese Arbeit stellt sich daher die Frage, welche Rolle IRF-4 in Pathogenese und Therapie der CML spielen könnte. Wie könnten insbesondere IFN- α -Wirkung und IRF-4 zusammenhängen?

Der Wirkungsmechanismus von IFN- α ist noch nicht vollständig aufgeklärt; dennoch scheinen vor allem immunologische Effekte die Elimination der CML-Zellen zu bedingen: IFN- α erhöht die Zytotoxizität von NK-Zellen (Pfeffer et al. 1998) und induziert CML-spezifische, zytotoxische Lymphozyten, welche gegen BCR-ABL-Bestandteile oder PR-1-Peptide gerichtet sind (Molldrem et al. 1996; 1997; Clark et al. 2001; Burchert et al. 2003).

IRF-4 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Abhängigkeit von Umgebungsfaktoren, wie Bindungspartnern, Kofaktoren und dem Zielpromotor unterschiedlichste Funktionen ausübt. IRF-4 taucht vor allem in zwei großen Zusammenhängen auf: als Onkogen in Lymphozyten (Yamagata et al. 1996; Iida et al. 1997; Saito et al. 1999; Yoshida et al. 1999; Alizadeh et al. 2000; Carbone et al. 2001; Natkunam et al. 2001) und als essentieller Regulator von Immunreaktionen. IRF-4 Knockout-Mäuse (Mittrucker et al. 1997) weisen eine schwere

Immundefizienz und lymphoproliferative Störungen auf. IRF-4 ist für die Entwicklung von B-Zellen (Lu et al. 2003), für die Differenzierung von T-Helferzellen in Th1- oder Th2-Zellen (Lohoff et al. 2002), für die Funktionen aktivierter B- und T-Zellen, und schließlich für die Apoptose von Lymphozyten nach Aktivierung (Fanzo et al. 2003) essentiell. IRF-4 scheint eine Art molekularen Checkpoint darzustellen, an dem die verschiedenen Signale, die auf einen Lymphozyten treffen, integriert und in eine Immunantwort umgesetzt werden oder aber vererben. In Lymphozyten wurden dabei sowohl pro- als auch antiapoptotische Eigenschaften von IRF-4 nachgewiesen (Fanzo et al. 2003; Lohoff et al. 2004).

Die Rolle von IRF-4 als wichtigem Regulator des Immunsystems, der insbesondere auch für die Generierung zytotoxischer und Anti-Tumor-Antworten sowie für die Ausbildung einer Graft-versus-Host-Reaktion durch Lymphozyten erforderlich ist, und die immunologisch bedingten Wirkungsmechanismen von IFN- α zeigen hier also wesentliche Parallelen. Weitere Forschungsergebnisse müssen aufdecken, inwieweit diese Funktionen von IFN- α eventuell über IRF-4 vermittelt werden und inwieweit IRF-4 damit neben der Funktion als Onkogen in Lymphozyten eine Funktion als Tumor-Suppressor im myeloischen System zukommt.

Von besonderem Interesse in der hier untersuchten Fragestellung ist die Tatsache, dass IRF-4 bei CML-Patienten weniger in den eigentlichen Leukämiezellen, sondern vor allem in den T-Zellen (CD3⁺) inaktiviert ist. Obwohl die CML auf der Proliferation myeloischer Zellen beruht, ist die wichtige Rolle von T-Lymphozyten seit langem bekannt (Bocchia et al. 1995; 1996; Posthuma et al. 1999; 2000); unter anderem wird deren Funktion in der Graft-versus-Leukämie-Reaktion ausgenutzt (Fuchs et al. 1995; Kolb et al. 1995; Collins et al. 1997). Es wäre folglich sehr interessant, in CML-Patienten nach Transplantation und mit GvHD die IRF-4-Expression in zytotoxischen Lymphozyten zu untersuchen. Zudem legen aktuelle Daten nahe, dass IRF-4 T-Lymphozyten vor Apoptose schützt (Lohoff et al. 2004). Das Fehlen von IRF-4 könnte damit eine Immunantwort gegen maligne CML-Zellen durch einen verstärkten Zelltod der Lymphozyten attenuieren.

Wie die Inhibition von IRF-4 ursächlich zustande kommt, ist noch nicht bekannt. Man könnte diskutieren, ob die Tumorzellen, beispielsweise durch ein spezifisches Zytokinprofil (Brown et al. 1986; 1987; Estrov et al. 1991), einen hemmenden Einfluss auf die IRF-4-Expression von T-Zellen ausüben. Möglich wäre auch, dass die T-Zellen der CML-Patienten bereits vor Entwicklung der CML eine supprimierte IRF-4-Expression, zum Beispiel aufgrund einer allgemeinen Methylierungsstörung oder aufgrund eines Selektionsvorteils, aufwiesen und damit die Expansion der BCR-ABL-positiven Zellen erst möglich wurde. Der Befund, dass IRF-4 in CML- und anderen hämatopoetischen Zelllinien durch Hypermethylierung herunterreguliert ist und die Bedeutung, die dieses Gen möglicherweise als Tumor-Suppressor in der CML hat, machen es auch therapeutisch interessant. Ein moderater bis signifikanter therapeutischer

Effekt der demethylierenden Substanz Decitabin, der sich durch Kombination mit dem Histondeacetylaseinhibitor TSA noch steigern läßt (Bovenzi et al. 2001; Gagnon et al. 2003; Primeau et al. 2003; Shaker et al. 2003) wurde bereits in mehreren klinischen Studien nachgewiesen, unter anderem in allen Phasen der CML (Sacchi et al. 1999; Kantarjian et al. 2002; Kantarjian, O'Brien et al. 2003) und beim myelodysplastischen Syndrom (Lubbert et al. 2001).

5 Zusammenfassung

Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Gruppe der Interferon-regulatorischen Faktoren (IRF), darunter insbesondere ICSBP und IRF-4, in der Pathogenese der CML eine wichtige Rolle spielt. In peripherem Blut von Patienten mit CML in der chronischen Phase ist die IRF-4-Expression im Vergleich zu Normalblut signifikant herunterreguliert (Schmidt et al. 2000). Eine Therapie mit Interferon- α vermag das IRF-4-Level der Patienten wieder anzuheben und zwischen gutem Ansprechen und hohem IRF-4-Level besteht eine positive Korrelation (Schmidt et al. 2000). Diese Daten könnten auf eine mögliche antileukämische Wirkungsweise von IRF-4 bei Erkrankungen des myeloiden Systems hinweisen.

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der deregulierten IRF-4-Expression in Leukämiezellen untersucht. Die IRF-4-Promotor-Region von hämatopoetischen Zelllinien, CML-Patienten und normalen Spendern als Kontrolle wurde dabei auf genetische und epigenetische Veränderungen untersucht.

Um genetische Aberrationen auszuschließen, wurde der IRF-4-Promotor sequenziert. Dabei wurden keine genetischen Läsionen gefunden, die für die inhibierte IRF-4-Transkription verantwortlich sein könnten. Die detektierten Variationen an Position -1081 (T→C-Substitution), an Position -1068 (A→C-Substitution) und Position -116 (T→C-Substitution) finden sich sowohl in IRF-4-positiven als auch in IRF-4-negativen Zelllinien; die letztgenannte Substitution taucht zudem auch bei CML-Patienten in chronischer Phase und in Normalblut von Kontrollpersonen auf. Diese Basenpaarvariationen sind folglich sehr wahrscheinlich nicht die Ursache für die Expressionsunterschiede und stellen eher Polymorphismen dar. Keine der beschriebenen Sequenzänderungen betrifft eine bekannte Transkriptionsfaktorbindungsstelle (Grossman et al. 1996; Sharma et al. 2002). Die bei CML-Patienten *in vivo* nachgewiesene Induzierbarkeit der IRF-4-Expression (Schmidt et al. 2000) macht reversible Inhibitionsmechanismen ohnehin wahrscheinlicher. Deshalb wurde der IRF-4-Promotor auf aberrante Methylierung untersucht, welche bereits bei einem anderen IRF, IRF-7, nachgewiesen wurde (Lu et al. 2000). Um die Relevanz dieses epigenetischen Mechanismus für die IRF-4-Regulation zu untersuchen, wurden verschiedene Zelllinien mit demethylierenden Substanzen behandelt. Die Inkubation mit 5-Aza-2-deoxycytidin zeigte eine konzentrations- und zeitabhängige Aktivierung der IRF-4-Expression, die auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden konnte. Um den Methylierungsstatus des IRF-4-Promotors zu bestimmen, wurden ein Restriktions-PCR-Assay sowie die Sequenzierung des Promotors nach Bisulfit-Behandlung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die IRF-4-negativen Zelllinien ein signifikant höheres Methylierungslevel aufwiesen als die IRF-4-positiven Zellen und dass die IRF-4-Expression zudem mit dem Methylierungsstatus spezifischer CpGs im Promotor korreliert. Von besonderem Interesse ist dabei die Hypermethylierung einer NF κ B-Bindungsstelle in IRF-4-

negativen Zelllinien. Die Bindung von c-Rel an NF κ B-Elemente des Promotors spielt eine wichtige Rolle in der Induktion von IRF-4 (Grumont et al. 2000; Sharma et al. 2002) und die Methylierung dieses Elements blockiert die Bindung des Transkriptionsfaktors (Bednarik et al. 1991). Ein im Anschluss an diese Arbeit durchgeführter Reporter-Gen-Assay konnte schließlich den inhibierenden Effekt von Methylierung auf den IRF-4-Promotor bestätigen. Die Bisulfit-Sequenzierung von DNA aus peripherem Blut von drei Normalpersonen und drei CML-Patienten in chronischer Phase zeigte keine aberrante Methylierung. Möglicherweise wurden hier jedoch die malignen Zellen im Gesamtblut nicht ausreichend erfasst; hier muss sich die Sequenzierung von sortierten Zellen anschließen.

Eine mögliche und bei verschiedenen malignen Erkrankungen nachgewiesene Ursache (Belinsky et al. 1996; Issa et al. 1997) für aberrante Methylierung ist die Überexpression von DNA-Methyltransferasen (DNMT). Die Expressionsanalyse der DNMTs (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) und Methyl-CpG-Bindungsproteine (MBP) (MBD1, MBD2, MBD4, MeCP) zeigte jedoch keine konsistenten Unterschiede zwischen IRF-4-positiven und –negativen Zelllinien, so dass der Hypermethylierung wahrscheinlich andere Mechanismen zugrunde liegen. Zusammenfassend lassen die erhobenen Daten die Schlussfolgerung zu, dass IRF-4-Promotor-Methylierung die IRF-4-Expression reguliert und dass die aberrante Expression von IRF-4 in verschiedenen Leukämietypen eine Konsequenz einer IRF-4-Promotor-Hypermethylierung sein könnte. Inwieweit dieser Mechanismus *in vivo* wirksam ist, muss, beispielsweise durch Analyse von Subpopulationen aus Patientenproben, noch bestimmt werden.

6 Ausblick: Weiterführende Experimente

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Befund der IRF-4-Fehlregulation in CML-Patienten und des IRF-4-korrelierten Ansprechens auf IFN- α (Schmidt et al. 2000) weist auf einen Zusammenhang zwischen IRF-4 und CML hin, dessen funktionelle Rolle noch beleuchtet werden muss. Auch für den eng verwandten Interferon regulatorischen Faktor ICSBP konnte eine Korrelation zwischen ICSBP-Transkriptionslevel, Prognosescore und Therapieansprechen von CML-Patienten gezeigt werden (Schmidt et al. 2001); darüber hinaus ist seine direkt inhibitorische Wirkung auf die bcr1-abl-induzierte Leukämogenese belegt (Holtschke et al. 1996; Hao et al. 2000; Deng et al. 2001; Burchert et al. 2004). Es zeichnet sich ab, dass IRF-4 und, ausführlicher belegt, ICSBP über mehrere unterschiedliche Mechanismen eine Tumorsuppressorfunktion im myeloischen System ausüben: Ihre Wirkung wird, soweit bereits bekannt, über Proliferationsinhibition und verstärkte Ausdifferenzierung (Tamura et al. 2003), Induktion von Immunreaktionen (Deng et al. 2001) und Apoptose (Gabriele et al. 1999; Fanzo et al. 2003; Burchert et al. 2004) vermittelt (siehe auch 1.2.3).

Es soll nun analysiert werden, ob durch Expression von IRF-4 beziehungsweise ICSBP die Proliferations- und Apoptoserate von CML-Zellen in Zellkultur beeinflusst werden kann und wie die Zellen auf übliche Therapieansätze reagieren. Dazu wurden durch stabile Transfektion Zelllinien generiert, die eines dieser IRFs überexprimieren. Diese Zellen sollen für Apoptose- und Proliferationsassays unter Stimulation mit verschiedenen Chemotherapeutika und zur Analyse der Transkription Apoptose-relevanter Gene eingesetzt werden. Die bisher erfolgten Experimente dienten zunächst der Konzentrationsfindung und lassen noch keine eindeutigen Aussagen zu.

6.1 Stabile Transfektion humaner Zelllinien durch Elektroporation

Zur stabilen Transfektion von Zelllinien kam die Methode der Elektroporation zur Anwendung. Durch kurze Stromschläge wird hier die Zellmembran durchlässig gemacht und Expressionsplasmide mit Resistenzgenen können aufgenommen werden. Als Expressionsplasmide wurden in dieser Arbeit hICSBP in pcR3.1 (Invitrogen, Klonierung von Manuel Schmidt) und hIRF4His in pcDNA3.1+ (Invitrogen) verwendet. Pro Zelllinie wurden drei Ansätze gefahren (Plasmid mit Insert, leerer Vektor und Kontrolle mit dH₂O). Pro Ansatz wurden 1×10^7 Zellen eingesetzt, mit PBS gewaschen, in 600 μ l steriles Elektroporationsmedium (RPMI1640, 10mM Dextrose, 0,1mM DTT) aufgenommen und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Nach Zugabe von 20 μ g Plasmid wurde 10min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 280V und 900 μ F in einem GenePulser II (Biorad, München). Nach einer Inkubation für 10min bei RT wurden die Zellen in 10ml Zellkulturmedium (RPMI1640, 10%FCS, 1% Pen/Strep) für 24h im Brutschrank kultiviert. Um bei der stabilen Transfektion erfolgreich transfizierte Zellen zu selektionieren, wurden die Zellen dann in Selektionsmedium, und zwar Zellkulturmedium mit 0,7-1ng/ml Geneticin (G-418), aufgenommen. Nach zwei bis vier Wochen waren die Kontrollzellen ohne Vektor abgestorben und das G-418 konnte auf 0,5ng/ml reduziert werden.

Um aus dem Gemisch transfizierter Zellen Einzelklone mit besonders starker Expression zu gewinnen, wurden einzelne Zellen separiert und hochgezüchtet. Die Zellkonzentration wurde so berechnet, dass bei der Verteilung des Kulturmediums auf 96well Platten im Durchschnitt nur in jede zweite bis dritte Vertiefung eine einzige Zelle pipettiert wurde. Wells, in denen sich bei der mikroskopischen Kontrolle mehr als eine Zelle befand, wurden ausgeschlossen. Nach Hochzüchten von 10 bis 15 Klonen aus Einzelzellen wurde die IRF-4-Expression durch

PCRs verglichen. Die Expression interessanter Klone wurde außerdem mittels Western-Blotting überprüft. So konnten jeweils mehrere stärker und schwächer exprimierende Klone von K-562+ICSBP, K562+IRF-4 und Jurkat+ICSBP hergestellt werden (Bild 6.1, Bild 6.4).

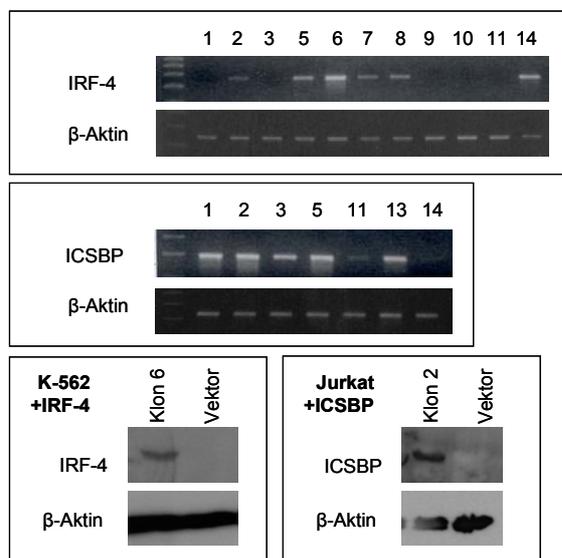


Bild 6.1: IRF-4-PCR verschiedener transfizierter K-562-Klone (oben) bzw. ICSBP-PCR verschiedener transfizierter Jurkat-Klone (unten) mit zugehörigen β -Aktin-Kontrollen.

Einige Klone weisen eine starke, andere eine fehlende IRF-4- bzw. ICSBP-Transkription auf.

K-562: Transfektion mit hIRF4His in pCDNA3.1+.

Jurkat: Transfektion mit hICSBP in pcR3.1

Bild 6.4: IRF-4-Western-Blotting.

Kontrolle der IRF-4-Expression am Beispiel von K-562+IRF-4 Klon 6 (links) bzw. der ICSBP-Expression von Jurkat+ICSBP Klon 2 mit zugehörigen β -Aktin-Kontrollen.

6.2 Durchflusszytometrie und Apoptose-Assay

Das spontane Apoptoseverhalten der mit IRF4 oder ICSBP transfizierten Zellen oder die Apoptose nach Inkubation mit Chemotherapeutika (AraC, VP16) wurde mit Hilfe des Annexin V-FITC (Fluoreszeinisocyanat) Apoptosis Detection Kits (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach) und anschließender Durchflusszytometrie (Becton-Dickinson FACScan mit 488nm Argon-Laser) untersucht.

Der Annexin-Assay beruht auf der Detektion von Phosphatidylserin (PS), welches in einem frühen Apoptosestadium auf die Zellmembran externalisiert wird, durch FITC-markiertes Annexin, welches an PS bindet. Propidiumiodid (PI) wird verwendet, um bereits nekrotische Zellen (FITC- und PI-positiv) abzugrenzen, da PI aus lebenden (FITC- und PI-negativ) und frühapoptotischen Zellen (FITC-positiv, PI-negativ) Zellen aktiv ausgeschleust wird.

Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden diese in 1x Binding Buffer aufgenommen und auf eine Konzentration von 5×10^5 /ml eingestellt. Zu 200 μ l dieser Zellsuspension wurden 5 μ l Annexin V-FITC gegeben und für 10min im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und wieder in 200 μ l 1xbinding buffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 μ l Propidiumiodid wurden die Zellen unmittelbar der Durchflusszytometrie unterzogen. Verwendete Klone: Jurkat+ICSBP Klon2, K562+IRF4 Klon 6, K-562+ICSBP Klon M4 (KlonM4 hergestellt von Manuel Schmidt).

Vorläufige Daten (Bild 6.3) zeigen keine Unterschiede im spontanen programmierten Zelltod zwischen K-562+Vektor und K-562+IRF-4 Klon 6 (2x wiederholt), K+562-Vektor und K-562+ICSBP Klon M4 (2x wiederholt), beziehungsweise zwischen Jurkat+Vektor und Jurkat-ICSBP Klon 2 (4x wiederholt).

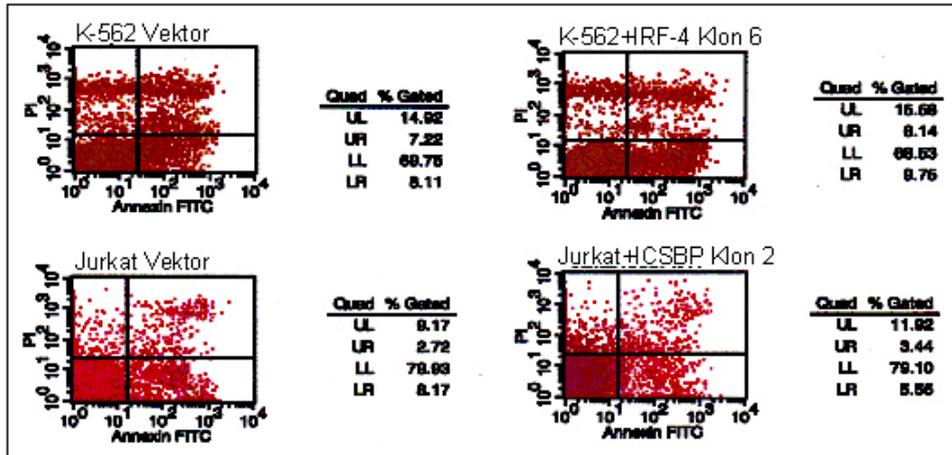


Bild 6.3: Annexin-FACS-Assay. Darstellung präliminärer Ergebnisse für die spontane Apoptose von K-562+IRF-4 Klon 6 (oben) und Jurkat+ICSBP Klon 2 (unten) jeweils im Vergleich zur Vektorkontrolle. Die vorläufigen Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede in der spontanen Apoptoserate von Zellen mit und ohne IRF. Zellen in Apoptose finden sich in Quadranten LR, nekrotische Zellen werden in Quadrant UR abgebildet. Bezeichnung der Felder: UL: upper left, LL: lower left, UR: upper right, LR: lower right

6.2.1 Stimulation mit Chemotherapeutika

Stabil mit IRF-4 oder ICSBP transfizierte Zelllinien (Jurkat, K-562) werden mit Etoposid (VP16) oder AraC (Cytarabin) oder anderen potentiellen Apoptose-induzierenden Substanzen (Fas Ligand) inkubiert und dann zur Bestimmung des Apoptoseverhaltens einem Annexin-Assay unterzogen. Zu den Stimulationsbedingungen mit VP16 und AraC wurden im Rahmen dieser Arbeit Vorversuche zur Konzentrationseinstellung und Inkubationsdauer durchgeführt (Bild 6.4); aus diesen Vorversuchen lassen sich noch keine eindeutigen Aussagen zum Apoptoseverhalten von IRF-positiven versus IRF-negativen Zellen treffen.

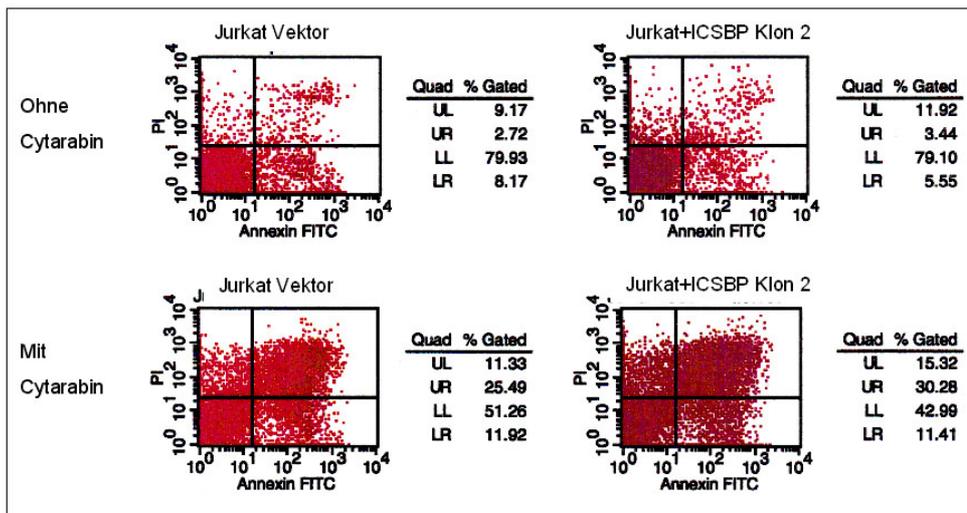


Bild 6.4: Vorversuch: Inkubation transfizierter Jurkat-Zellen mit Cytarabin (AraC) Jeweils 3ml Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen/ml wurden für 20h mit $100 \mu\text{g/ml}$ AraC inkubiert und dann im Annexin-Assay analysiert.

7 Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren (engl.: amino acids)
AK	Antikörper
AKT	Protein Kinase B
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
AzaC	5-Azacytidin
AzadC	5-Aza-2-deoxycytidin
BAD	BCLXL/Bcl-2 associated death promoter
bp	Basenpaar
CBL	Casitas-B-lineage lymphoma protein
CD	Molekül der Differenzierung (engl.: cluster of differentiation)
cDNA	Kopie-DNA (engl.: copy DNA)
CIITA	Transaktivator der MHC Klasse II (engl.: class II transactivator)
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CRKL	CRK-like protein
Da	Dalton
DBD	DNA Bindungsdomäne
ddNTP	Didesoxy-N-Triphosphat (N=Adenosin, Cytosin, Thymin, Guanin)
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
dNTP	desoxy-N-Triphosphat (N=Adenosin, Cytosin, Thymin, Guanin)
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
FAK	focal adhesion kinase
FasL	Fas Ligand
FCS	fötales Kälberserum (engl.: fetal calf sera)
GAF	Interferon- γ aktivierter Faktor (engl.: gamma activated factor)
GAS	Interferon- γ aktivierte Sequenz (engl.: gamma activated sequence)
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
h	Stunden (engl.: hours)

ICS	Interferon-Konsensussequenz (engl.: interferon consensus sequence)
ICSBP	Interferon-Konsensussequenz bindendes Protein (engl.: interferon consensus sequence binding protein)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
ISGF	Interferon stimulierter Gen-Faktor
ISRE	Interferon stimuliertes Response Element
JAK	Janus Kinase
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KMT	Knochenmarktransplantation
l	Liter
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
mC	Methyliertes Cytosin
MEK	MAP kinase kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
min	Minuten (engl.: minutes)
mRNA	Nachrichten-RNA (engl.: messenger RNA)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen (engl.: Natural killer cells)
nt	Nukleotid
OAS	2'5' Oligoadenylatsynthetase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PDGF	engl.: Platelet derived growth factor
PI-3-K	Phosphatidyl-inositol-3-Kinase
ras	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
rpm	Rounds per minute
RT	Reverse Tanscription
s, sec	Sekunden (engl.: seconds)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodium dodecyl sulfate)
SHC	SRC-homology containing protein

SOS	son-of-sevenless
STAT	Signalweiterleiter und Transkriptionsaktivator (engl.: signal transducer and activator of transcription)
SZT	Stammzelltransplantation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetraethylenmethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor (engl.: tumor necrosis factor)
TSA	Trichostatin A
u	Einheit (engl.: unit)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: weight per volume)

8 Literaturverzeichnis

(1978). "Bioassay of 5-Azacytidine for Possible Carcinogenicity (CAS No. 320-67-2)." Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 42: 1-86.

(1994). "Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia." N Engl J Med 330(12): 820-5.

(1997). "Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials: Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group." J Natl Cancer Inst 89(21): 1616-20.

Ahrendt, S. A., Chow, J. T., et al. (1999). "Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer." J Natl Cancer Inst 91(4): 332-9.

Ahuja, N. and Issa, J. P. (2000). "Aging, methylation and cancer." Histol Histopathol 15(3): 835-42.

Ahuja, N., Li, Q., et al. (1998). "Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer." Cancer Res 58(23): 5489-94.

Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., et al. (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." Nature 403(6769): 503-11.

Allan, N. C., Richards, S. M. and Shepherd, P. C. (1995). "UK Medical Research Council randomised, multicentre trial of interferon-alpha n1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. The UK Medical Research Council's Working Parties for Therapeutic Trials in Adult Leukaemia." Lancet 345(8962): 1392-7.

Amaravadi, L. and Klemsz, M. J. (1999). "DNA methylation and chromatin structure regulate PU.1 expression." DNA Cell Biol 18(12): 875-84.

Antequera, F. and Bird, A. (1993). "Number of CpG islands and genes in human and mouse." Proc Natl Acad Sci U S A 90(24): 11995-9.

Bachman, K. E., Park, B. H., et al. (2003). "Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene." Cancer Cell 3(1): 89-95.

Barthe, C., Mahon, F., et al. (2001). "Expression of interferon-alpha (IFN-alpha) receptor 2c at diagnosis is associated with cytogenetic response in IFN-alpha-treated chronic myeloid leukemia." Blood 97(11): 3568-73.

Baylin, S. and Bestor, T. H. (2002). "Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence?" Cancer Cell 1(4): 299-305.

Baylin, S. B., Esteller, M., 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 Herman, J. G. (2000). "DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics." Trends Genet 16(4): 168-74. _00001971 _00001971.

Baylin, S. B., Herman, J. G., et al. (1998). "Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia." Adv Cancer Res 72: 141-96.

Bedi, A., Zehnauer, B. A., et al. (1994). "Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia." Blood 83(8): 2038-44.

- Bednarik, D. P., Duckett, C., et al. (1991).** "DNA CpG methylation inhibits binding of NF-kappa B proteins to the HIV-1 long terminal repeat cognate DNA motifs." *New Biol* 3(10): 969-76.
- Belinsky, S. A., Nikula, K. J., et al. (1996).** "Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 4045-50.
- Ben-Neriah, Y., Daley, G. Q., et al. (1986).** "The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene." *Science* 233(4760): 212-4.
- Ben-Yehuda, D., Krichevsky, S., et al. (1997).** "Molecular follow-up of disease progression and interferon therapy in chronic myelocytic leukemia." *Blood* 90(12): 4918-23.
- Bhatia, R., McCarthy, J. B. and Verfaillie, C. M. (1996).** "Interferon-alpha restores normal beta 1 integrin-mediated inhibition of hematopoietic progenitor proliferation by the marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia." *Blood* 87(9): 3883-91.
- Biernaux, C., Loos, M., et al. (1995).** "Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals." *Blood* 86(8): 3118-22.
- Bird, A. P. (1986).** "CpG-rich islands and the function of DNA methylation." *Nature* 321(6067): 209-13.
- Bocchia, M., Korontsvit, T., et al. (1996).** "Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides." *Blood* 87(9): 3587-92.
- Bocchia, M., Wentworth, P. A., et al. (1995).** "Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules." *Blood* 85(10): 2680-4.
- Bose, S., Deininger, M., et al. (1998).** "The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease." *Blood* 92(9): 3362-7.
- Bovenzi, V. and Momparler, R. L. (2001).** "Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor and their effect on the expression of retinoic acid receptor beta and estrogen receptor alpha genes in breast carcinoma cells." *Cancer Chemother Pharmacol* 48(1): 71-6.
- Bovolenta, C., Driggers, P. H., et al. (1994).** "Molecular interactions between interferon consensus sequence binding protein and members of the interferon regulatory factor family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11): 5046-50.
- Brandeis, M., Frank, D., et al. (1994).** "Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation." *Nature* 371(6496): 435-8.
- Brown, R. D., Yuen, E., et al. (1986).** "Stimulation of persisting colonies in agar cultures by sera from patients with CML and AML." *Blood* 68(1): 37-40.
- Brown, R. D., Yuen, E., et al. (1987).** "Persisting colonies in agar cultures containing serum from patients with CML in blastic transformation." *Leuk Res* 11(6): 545-7.
- Buchdunger, E., Cioffi, C. L., et al. (2000).** "Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 295(1): 139-45.
- Burchert, A., Cai, D., et al. (2004).** "Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP; IRF-8) antagonizes BCR/ABL and down-regulates bcl-2." *Blood* 103(9): 3480-9.
- Burchert, A., Wolff, S., et al. (2003).** "Interferon-alpha, but not the ABL-kinase inhibitor imatinib (STI571), induces expression of myeloblastin and a specific T-cell response in chronic myeloid leukemia." *Blood* 101(1): 259-64.

- Cameron, E. E., Bachman, K. E., et al. (1999).** "Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer." *Nat Genet* 21(1): 103-7.
- Cameron, E. E., Baylin, S. B. and Herman, J. G. (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.
- Carbone, A., Gloghini, A., et al. (2001).** "Expression profile of MUM1/IRF4, BCL-6, and CD138/syndecan-1 defines novel histogenetic subsets of human immunodeficiency virus-related lymphomas." *Blood* 97(3): 744-51.
- Carr, B. I., Reilly, J. G. and Riggs, A. D. (1984).** "5-Azacytidine. Promoting activity for rat hepatocellular carcinoma." *IARC Sci Publ*(56): 409-12.
- Carr, B. I., Reilly, J. G., et al. (1984).** "The tumorigenicity of 5-azacytidine in the male Fischer rat." *Carcinogenesis* 5(12): 1583-90.
- Chen, J. X., Zheng, Y., et al. (1998).** "Carcinogens preferentially bind at methylated CpG in the p53 mutational hot spots." *Cancer Res* 58(10): 2070-5.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987).** "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.
- Chow, W. A., Fang, J. J. and Yee, J. K. (2000).** "The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells." *J Immunol* 164(7): 3512-8.
- Clark, R. E., Dodi, I. A., et al. (2001).** "Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein." *Blood* 98(10): 2887-93.
- Clark, S. J., Harrison, J. and Molloy, P. L. (1997).** "Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation." *Gene* 195(1): 67-71.
- Clark, S. J. and Melki, J. (2002).** "DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party?" *Oncogene* 21(35): 5380-7.
- Collins, R. H., Jr., Shpilberg, O., et al. (1997).** "Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation." *J Clin Oncol* 15(2): 433-44.
- Cornelissen, J. J., Ploemacher, R. E., et al. (1998).** "An in vitro model for cytogenetic conversion in CML. Interferon-alpha preferentially inhibits the outgrowth of malignant stem cells preserved in long-term culture." *J Clin Invest* 102(5): 976-83.
- Cortes, J. E., Talpaz, M. and Kantarjian, H. (1996).** "Chronic myelogenous leukemia: a review." *Am J Med* 100(5): 555-70.
- Costello, J. F., Fruhwald, M. C., et al. (2000).** "Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns." *Nat Genet* 24(2): 132-8.
- Cui, H., Onyango, P., et al. (2002).** "Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2." *Cancer Res* 62(22): 6442-6.
- Dahl, C. and Guldborg, P. (2003).** "DNA methylation analysis techniques." *Biogerontology* 4(4): 233-50.
- Daley, G. Q., Van Etten, R. A. and Baltimore, D. (1990).** "Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome." *Science* 247(4944): 824-30.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. and Stark, G. R. (1994).** "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." *Science* 264(5164): 1415-21.

- Daskalakis, M., Nguyen, T. T., et al. (2002).** "Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment." Blood 100(8): 2957-64.
- Decker, T., Kovarik, P. and Meinke, A. (1997).** "GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression." J Interferon Cytokine Res 17(3): 121-34.
- Delgado, S., Gomez, M., et al. (1998).** "Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes." Embo J 17(8): 2426-35.
- Deng, M. and Daley, G. Q. (2001).** "Expression of interferon consensus sequence binding protein induces potent immunity against BCR/ABL-induced leukemia." Blood 97(11): 3491-7.
- Denissenko, M. F., Chen, J. X., et al. (1997).** "Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene." Proc Natl Acad Sci U S A 94(8): 3893-8.
- Denissenko, M. F., Pao, A., et al. (1998).** "Slow repair of bulky DNA adducts along the nontranscribed strand of the human p53 gene may explain the strand bias of transversion mutations in cancers." Oncogene 16(10): 1241-7.
- Di Croce, L., Raker, V. A., et al. (2002).** "Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor." Science 295(5557): 1079-82.
- Driggers, P. H., Ennist, D. L., et al. (1990).** "An interferon gamma-regulated protein that binds the interferon- inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes." Proc Natl Acad Sci U S A 87(10): 3743-7.
- Druker, B. J., Tamura, S., et al. (1996).** "Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells." Nat Med 2(5): 561-6.
- Eisenbeis, C. F., Singh, H. and Storb, U. (1995).** "Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator." Genes Dev 9(11): 1377-87.
- Escalante, C. R., Yie, J., et al. (1998).** "Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation." Nature 391(6662): 103-6.
- Esteller, M. (2003).** "Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg." Clin Immunol 109(1): 80-8.
- Esteller, M., Fraga, M. F., et al. (2001).** "DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis." Hum Mol Genet 10(26): 3001-7.
- Esteller, M., Fraga, M. F., et al. (2002).** "Cancer epigenetics and methylation." Science 297(5588): 1807-8; discussion 1807-8.
- Esteller, M., Gaidano, G., 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., Garcia-Foncillas, J., 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.
- Esteller, M., Hamilton, S. R., et al. (1999).** "Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia." Cancer Res 59(4): 793-7.

- Estrov, Z., Kurzrock, R., et al. (1991).** "Suppression of chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors: a novel application for inhibitors of IL-1 activity." Blood 78(6): 1476-84.
- Faderl, S., Kantarjian, H. M. and Talpaz, M. (1999).** "Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment." Oncology (Huntingt) 13(2): 169-80; discussion 181, 184.
- Fanzo, J. C., Hu, C. M., et al. (2003).** "Regulation of lymphocyte apoptosis by interferon regulatory factor 4 (IRF-4)." J Exp Med 197(3): 303-14.
- Feltus, F. A., Lee, E. K., et al. (2003).** "Predicting aberrant CpG island methylation." Proc Natl Acad Sci U S A 100(21): 12253-8.
- Ferrara, F. F., Fazi, F., et al. (2001).** "Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia." Cancer Res 61(1): 2-7.
- Fialkow, P. J., Jacobson, R. J. and Papayannopoulou, T. (1977).** "Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage." Am J Med 63(1): 125-30.
- Foster, S. A., Wong, D. J., et al. (1998).** "Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation." Mol Cell Biol 18(4): 1793-801.
- Frommer, M., McDonald, L. E., et al. (1992).** "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." Proc Natl Acad Sci U S A 89(5): 1827-31.
- Fuchs, E. J., Bedi, A., et al. (1995).** "Cytotoxic T cells overcome BCR-ABL-mediated resistance to apoptosis." Cancer Res 55(3): 463-6.
- Fujii, Y., Shimizu, T., et al. (1999).** "Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences." Embo J 18(18): 5028-41.
- Furui, J., Uegaki, K., et al. (1998).** "Solution structure of the IRF-2 DNA-binding domain: a novel subgroup of the winged helix-turn-helix family." Structure 6(4): 491-500.
- Gabriele, L., Phung, J., et al. (1999).** "Regulation of apoptosis in myeloid cells by interferon consensus sequence-binding protein [published erratum appears in J Exp Med 1999 Dec 6;190(11):following 1722]." J Exp Med 190(3): 411-21.
- Gagnon, J., Shaker, S., et al. (2003).** "Interaction of 5-aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide on antineoplastic activity and activation of 14-3-3sigma, E-cadherin and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression in human breast carcinoma cells." Anticancer Drugs 14(3): 193-202.
- Gale, R. P., Hehlmann, R., et al. (1998).** "Survival with bone marrow transplantation versus hydroxyurea or interferon for chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group." Blood 91(5): 1810-9.
- Gale, R. P. and Horowitz, M. M. (1990).** "Graft-versus-leukemia in bone marrow transplantation. The Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry." Bone Marrow Transplant 6 Suppl 1: 94-7.
- Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. (1987).** "CpG islands in vertebrate genomes." J Mol Biol 196(2): 261-82.
- Gerber-Huber, S., May, F. E., et al. (1983).** "In contrast to other *Xenopus* genes the estrogen-inducible vitellogenin genes are expressed when totally methylated." Cell 33(1): 43-51.

- Giles, F. J., Cortes, J. E., et al. (2004).** "Accelerated and blastic phases of chronic myelogenous leukemia." Hematol Oncol Clin North Am 18(3): 753-74, xii.
- Glynne, R., Akkaraju, S., et al. (2000).** "How self-tolerance and the immunosuppressive drug FK506 prevent B-cell mitogenesis." Nature 403(6770): 672-6.
- Goldman, J. M. and Melo, J. V. (2003).** "Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment." N Engl J Med 349(15): 1451-64.
- Gordon, M. Y., Marley, S. B., et al. (1998).** "Treatment with interferon-alpha preferentially reduces the capacity for amplification of granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) from patients with chronic myeloid leukemia but spares normal CFU-GM." J Clin Invest 102(4): 710-5.
- Graff, J. R., Gabrielson, E., et al. (2000).** "Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression." J Biol Chem 275(4): 2727-32.
- Graff, J. R., Herman, J. G., 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.
- Gratwohl, A., Baldomero, H., et al. (2003).** "Hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in Europe." Leukemia 17(5): 941-59.
- Gratwohl, A., Hermans, J., et al. (1998).** "Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation." Lancet 352(9134): 1087-92.
- Greger, V., Passarge, E., et al. (1989).** "Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma." Hum Genet 83(2): 155-8.
- Griffin, J. D., Todd, R. F., 3rd, et al. (1983).** "Differentiation patterns in the blastic phase of chronic myeloid leukemia." Blood 61(1): 85-91.
- Grossman, A., Mittrucker, H. W., et al. (1996).** "Cloning of human lymphocyte-specific interferon regulatory factor (hLSIRF/hIRF4) and mapping of the gene to 6p23-p25." Genomics 37(2): 229-33.
- Groudine, M., Eisenman, R. and Weintraub, H. (1981).** "Chromatin structure of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation." Nature 292(5821): 311-7.
- Grumont, R. J. and Gerondakis, S. (2000).** "Rel induces interferon regulatory factor 4 (IRF-4) expression in lymphocytes. Modulation Of interferon-regulated gene expression by rel/nuclear factor kappa b [In Process Citation]." J Exp Med 191(8): 1281-92.
- Gupta, S., Anthony, A. and Pernis, A. B. (2001).** "Stage-specific modulation of IFN-regulatory factor 4 function by Kruppel-type zinc finger proteins." J Immunol 166(10): 6104-11.
- Gupta, S., Jiang, M., et al. (1999).** "Lineage-specific modulation of interleukin 4 signaling by interferon regulatory factor 4." J Exp Med 190(12): 1837-48.
- Hao, S. X. and Ren, R. (2000).** "Expression of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) is downregulated in Bcr-Abl-induced murine chronic myelogenous leukemia-like disease, and forced coexpression of ICSBP inhibits Bcr-Abl-induced myeloproliferative disorder." Mol Cell Biol 20(4): 1149-61.
- Harris, M. (1982).** "Induction of thymidine kinase in enzyme-deficient Chinese hamster cells." Cell 29(2): 483-92.

- Heisterkamp, N., Stephenson, J. R., et al. (1983).** "Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia." *Nature* 306(5940): 239-42.
- Herman, J. G., Graff, J. R., et al. (1996).** "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9821-6.
- Herman, J. G., Jen, J., et al. (1996).** "Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B." *Cancer Res* 56(4): 722-7.
- Herman, J. G., Merlo, A., et al. (1995).** "Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers." *Cancer Res* 55(20): 4525-30.
- Holtshke, T., Lohler, J., et al. (1996).** "Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene." *Cell* 87(2): 307-17.
- Horowitz, M. M., Gale, R. P., et al. (1990).** "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation." *Blood* 75(3): 555-62.
- Hou, J., Schindler, U., et al. (1994).** "An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat." *Science* 265(5179): 1701-6.
- Huschtscha, L. I., Noble, J. R., et al. (1998).** "Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells." *Cancer Res* 58(16): 3508-12.
- Iida, S., Rao, P. H., et al. (1997).** "Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma." *Nat Genet* 17(2): 226-30.
- Issa, J. P., Ahuja, N., et al. (2001).** "Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis." *Cancer Res* 61(9): 3573-7.
- Issa, J. P., Baylin, S. B. and Herman, J. G. (1997).** "DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications." *Leukemia* 11 Suppl 1: S7-11.
- Jaenisch, R. and Bird, A. (2003).** "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." *Nat Genet* 33 Suppl: 245-54.
- Jones, P. A. and Baylin, S. B. (2002).** "The fundamental role of epigenetic events in cancer." *Nat Rev Genet* 3(6): 415-28.
- Jones, P. A. and Laird, P. W. (1999).** "Cancer epigenetics comes of age." *Nat Genet* 21(2): 163-7.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., et al. (1998).** "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription." *Nat Genet* 19(2): 187-91.
- Kaneto, H., Sasaki, S., et al. (2001).** "Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus." *Gut* 48(3): 372-7.
- Kantarjian, H., Sawyers, C., et al. (2002).** "Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia." *N Engl J Med* 346(9): 645-52.
- Kantarjian, H., Talpaz, M., et al. (2003).** "High-dose Imatinib Mesylate Therapy in Newly Diagnosed Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia." *Blood*.
- Kantarjian, H. M., Dixon, D., et al. (1988).** "Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia." *Cancer* 61(7): 1441-6.
- Kantarjian, H. M., O'Brien, S., et al. (2003).** "Results of decitabine (5-aza-2'deoxyctidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia." *Cancer* 98(3): 522-8.
- Kawakami, K., Brabender, J., et al. (2000).** "Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma." *J Natl Cancer Inst* 92(22): 1805-11.

- Kersting, M., Friedl, C., et al. (2000).** "Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers." *J Clin Oncol* 18(18): 3221-9.
- Koenig Merediz, S. A., Schmidt, M., et al. (2000).** "Cloning of an interferon regulatory factor 2 isoform with different regulatory ability." *Nucleic Acids Res* 28(21): 4219-24.
- Kolb, H. J., Schattenberg, A., et al. (1995).** "Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia." *Blood* 86(5): 2041-50.
- Kondo, Y., Shen, L. and Issa, J. P. (2003).** "Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer." *Mol Cell Biol* 23(1): 206-15.
- Kotanides, H. and Reich, N. C. (1996).** "Interleukin-4-induced STAT6 recognizes and activates a target site in the promoter of the interleukin-4 receptor gene." *J Biol Chem* 271(41): 25555-61.
- Kulaeva, O. I., Draghici, S., et al. (2003).** "Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization." *Oncogene* 22(26): 4118-27.
- Kurzrock, R., Gutterman, J. U. and Talpaz, M. (1988).** "The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias." *N Engl J Med* 319(15): 990-8.
- La Rosee, P., Johnson, K., et al. (2004).** "In vitro efficacy of combined treatment depends on the underlying mechanism of resistance in imatinib-resistant Bcr-Abl-positive cell lines." *Blood* 103(1): 208-15.
- Laird, P. W. (2003).** "The power and the promise of DNA methylation markers." *Nat Rev Cancer* 3(4): 253-66.
- Lehtonen, A., Lund, R., et al. (2003).** "IFN-alpha and IL-12 activate IFN regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-4, and IRF-8 gene expression in human NK and T cells." *Cytokine* 24(3): 81-90.
- Lester, S. C., Korn, N. J. and DeMars, R. (1982).** "Derepression of genes on the human inactive X chromosome: evidence for differences in locus-specific rates of derepression and rates of transfer of active and inactive genes after DNA-mediated transformation." *Somatic Cell Genet* 8(2): 265-84.
- Lewis, J. D., Meehan, R. R., et al. (1992).** "Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA." *Cell* 69(6): 905-14.
- Lohoff, M., Mittrucker, H. W., et al. (2004).** "Enhanced TCR-induced apoptosis in interferon regulatory factor 4-deficient CD4(+) Th cells." *J Exp Med* 200(2): 247-53.
- Lohoff, M., Mittrucker, H. W., et al. (2002).** "Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11808-12.
- Lu, R., Au, W. C., et al. (2000).** "Regulation of the promoter activity of interferon regulatory factor-7 gene. Activation by interferon and silencing by hypermethylation." *J Biol Chem* 275(41): 31805-12.
- Lu, R., Medina, K. L., et al. (2003).** "IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development." *Genes Dev* 17(14): 1703-8.
- Lubbert, M., Wijermans, P., et al. (2001).** "Cytogenetic responses in high-risk myelodysplastic syndrome following low-dose treatment with the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine." *Br J Haematol* 114(2): 349-57.
- Malinen, T., Palotie, A., et al. (1991).** "Acceleration of chronic myeloid leukemia correlates with calcitonin gene hypermethylation." *Blood* 77(11): 2435-40.

- Mamane, Y., Heylbroeck, C., et al. (1999).** "Interferon regulatory factors: the next generation." Gene 237(1): 1-14.
- Marecki, S., Atchison, M. L. and Fenton, M. J. (1999).** "Differential expression and distinct functions of IFN regulatory factor 4 and IFN consensus sequence binding protein in macrophages." J Immunol 163(5): 2713-22.
- Marecki, S. and Fenton, M. J. (2002).** "The role of IRF-4 in transcriptional regulation." J Interferon Cytokine Res 22(1): 121-33.
- Marin, D., Markt, S., et al. (2003).** "Survival of patients with chronic-phase chronic myeloid leukaemia on imatinib after failure on interferon alfa." Lancet 362(9384): 617-9.
- Marmont, A. M., Horowitz, M. M., et al. (1991).** "T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia." Blood 78(8): 2120-30.
- Maruyama, R., Toyooka, S., et al. (2001).** "Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features." Cancer Res 61(24): 8659-63.
- Matsuyama, T., Grossman, A., et al. (1995).** "Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE)." Nucleic Acids Res 23(12): 2127-36.
- McGahon, A., Bissonnette, R., et al. (1994).** "BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death." Blood 83(5): 1179-87.
- McWhirter, J. R. and Wang, J. Y. (1991).** "Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins." Mol Cell Biol 11(3): 1553-65.
- Meehan, R., Lewis, J., et al. (1992).** "Transcriptional repression by methylation of CpG." J Cell Sci Suppl 16: 9-14.
- Meehan, R. R., Lewis, J. D. and Bird, A. P. (1992).** "Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA." Nucleic Acids Res 20(19): 5085-92.
- Meehan, R. R., Lewis, J. D., et al. (1989).** "Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs." Cell 58(3): 499-507.
- Melki, J. R. and Clark, S. J. (2002).** "DNA methylation changes in leukaemia." Semin Cancer Biol 12(5): 347-57.
- Melki, J. R., Vincent, P. C. and Clark, S. J. (1999).** "Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia." Cancer Res 59(15): 3730-40.
- Melki, J. R., Warnecke, P., et al. (1998).** "Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia." Leukemia 12(3): 311-6.
- Mittrucker, H. W., Matsuyama, T., et al. (1997).** "Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function." Science 275(5299): 540-3.
- Mizuno, S., Chijiwa, T., 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.
- Molldrem, J., Dermime, S., et al. (1996).** "Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells." Blood 88(7): 2450-7.

- Moldrem, J. J., Clave, E., et al. (1997).** "Cytotoxic T lymphocytes specific for a nonpolymorphic proteinase 3 peptide preferentially inhibit chronic myeloid leukemia colony-forming units." *Blood* 90(7): 2529-34.
- Momparler, R. L. (2003).** "Cancer epigenetics." *Oncogene* 22(42): 6479-83.
- Monk, M. (1995).** "Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution." *Dev Genet* 17(3): 188-97.
- Muhlethaler-Mottet, A., Di Bernardino, W., et al. (1998).** "Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1." *Immunity* 8(2): 157-66.
- Nakagawa, H., Nuovo, G. J., et al. (2001).** "Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development." *Cancer Res* 61(19): 6991-5.
- Natkunam, Y., Warnke, R. A., et al. (2001).** "Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry." *Mod Pathol* 14(7): 686-94.
- Ng, H. H. and Bird, A. (1999).** "DNA methylation and chromatin modification." *Curr Opin Genet Dev* 9(2): 158-63.
- Nguyen, C. T., Weisenberger, D. J., et al. (2002).** "Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine." *Cancer Res* 62(22): 6456-61.
- Nishiya, N., Yamamoto, K., et al. (2004).** "Identification of a novel GC-rich binding protein that binds to an indispensable element for constitutive IRF-4 promoter activity in B cells." *Mol Immunol* 41(9): 855-61.
- O'Brien, S. G. and Deininger, M. W. (2003).** "Imatinib in patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia." *Semin Hematol* 40(2 Suppl 2): 26-30.
- O'Brien, S. G., Guilhot, F., et al. (2003).** "Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia." *N Engl J Med* 348(11): 994-1004.
- Okano, M., Bell, D. W., et al. (1999).** "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* 99(3): 247-57.
- Palmisano, W. A., Divine, K. K., et al. (2000).** "Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum." *Cancer Res* 60(21): 5954-8.
- Palombella, V. J. and Maniatis, T. (1992).** "Inducible processing of interferon regulatory factor-2." *Mol Cell Biol* 12(8): 3325-36.
- Paz, M. F., Avila, S., et al. (2002).** "Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors." *Cancer Res* 62(15): 4519-24.
- Paz, M. F., Fraga, M. F., et al. (2003).** "A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines." *Cancer Res* 63(5): 1114-21.
- Pernis, A. B. (2002).** "The role of IRF-4 in B and T cell activation and differentiation." *J Interferon Cytokine Res* 22(1): 111-20.
- Petronis, A. (2001).** "Human morbid genetics revisited: relevance of epigenetics." *Trends Genet* 17(3): 142-6.

- Pfeffer, L. M., Dinarello, C. A., et al. (1998).** "Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons." *Cancer Res* 58(12): 2489-99.
- Posthuma, E. F., Falkenburg, J. H., et al. (2000).** "HLA-DR4 is associated with a diminished risk of the development of chronic myeloid leukemia (CML). Chronic Leukemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Registry." *Leukemia* 14(5): 859-62.
- Posthuma, E. F., Falkenburg, J. H., et al. (1999).** "HLA-B8 and HLA-A3 coexpressed with HLA-B8 are associated with a reduced risk of the development of chronic myeloid leukemia. The Chronic Leukemia Working Party of the EBMT." *Blood* 93(11): 3863-5.
- Powell, M. A., Mutch, D. G., et al. (2002).** "Ribosomal DNA methylation in patients with endometrial carcinoma: an independent prognostic marker." *Cancer* 94(11): 2941-52.
- Primeau, M., Gagnon, J. and Momparler, R. L. (2003).** "Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells." *Int J Cancer* 103(2): 177-84.
- Quesnel, B., Guillermin, G., et al. (1998).** "Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression." *Blood* 91(8): 2985-90.
- Ray, D., Bosselut, R., et al. (1992).** "Characterization of Spi-B, a transcription factor related to the putative oncoprotein Spi-1/PU.1." *Mol Cell Biol* 12(10): 4297-304.
- Rhee, I., Jair, K. W., et al. (2000).** "CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1." *Nature* 404(6781): 1003-7.
- Ritter, M., de Kant, E., et al. (1995).** "Detection of DNA methylation in the calcitonin gene in human leukemias using differential polymerase chain reaction." *Leukemia* 9(5): 915-21.
- Robertson, K. D., Ait-Si-Ali, S., et al. (2000).** "DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters." *Nat Genet* 25(3): 338-42.
- Rowley, J. D. (1973).** "Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." *Nature* 243(5405): 290-3.
- Sacchi, S., Kantarjian, H. M., et al. (1999).** "Chronic myelogenous leukemia in nonlymphoid blastic phase: analysis of the results of first salvage therapy with three different treatment approaches for 162 patients." *Cancer* 86(12): 2632-41.
- Saito, T., Yamagata, T., et al. (1999).** "ICSAT overexpression is not sufficient to cause adult T-cell leukemia or multiple myeloma." *Biochem Biophys Res Commun* 260(2): 329-31.
- Sanchez-Céspedes, M., Esteller, M., et al. (1999).** "Molecular detection of neoplastic cells in lymph nodes of metastatic colorectal cancer patients predicts recurrence." *Clin Cancer Res* 5(9): 2450-4.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977).** "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Santi, D. V., Norment, A. and Garrett, C. E. (1984).** "Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(22): 6993-7.
- Sato, M., Horio, Y., et al. (2002).** "The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines." *Oncogene* 21(31): 4822-9.

- Savage, D. G., Szydlo, R. M. and Goldman, J. M. (1997).** "Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period." Br J Haematol 96(1): 111-6.
- Schindler, C., Kashleva, H., et al. (1994).** "STF-IL-4: a novel IL-4-induced signal transducing factor." Embo J 13(6): 1350-6.
- Schmidt, M., Bies, J., et al. (2004).** "The Interferon Regulatory Factor ICSBP/IRF8 in Combination with PU.1 Up-Regulates p15INK4b Tumor Suppressor Expression in Murine Myeloid Cells." Blood.
- Schmidt, M., Hochhaus, A., et al. (2000).** "Expression of interferon regulatory factor 4 in chronic myeloid leukemia: correlation with response to interferon alfa therapy." J Clin Oncol 18(19): 3331-8.
- Schmidt, M., Hochhaus, A., et al. (2001).** "Expression of nuclear transcription factor interferon consensus sequence binding protein in chronic myeloid leukemia correlates with pretreatment risk features and cytogenetic response to interferon-alpha." Blood 97(11): 3648-50.
- Shaker, S., Bernstein, M., et al. (2003).** "Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells." Leuk Res 27(5): 437-44.
- Sharf, R., Meraro, D., et al. (1997).** "Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA." J Biol Chem 272(15): 9785-92.
- Sharma, S., Grandvaux, N., et al. (2002).** "Regulation of IFN regulatory factor 4 expression in human T cell leukemia virus-I-transformed T cells." J Immunol 169(6): 3120-30.
- Shtivelman, E., Lifshitz, B., et al. (1985).** "Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia." Nature 315(6020): 550-4.
- Sidransky, D. (2002).** "Emerging molecular markers of cancer." Nat Rev Cancer 2(3): 210-9.
- Simon, D., Stuhlmann, H., et al. (1983).** "Retrovirus genomes methylated by mammalian but not bacterial methylase are non-infectious." Nature 304(5923): 275-7.
- Singer-Sam, J., Grant, M., et al. (1990).** "Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pcg-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation." Mol Cell Biol 10(9): 4987-9.
- Skorski, T., Kanakaraj, P., et al. (1995).** "Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells." Blood 86(2): 726-36.
- Smiraglia, D. J., Rush, L. J., et al. (2001).** "Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies." Hum Mol Genet 10(13): 1413-9.
- Soengas, M. S., Capodiceci, P., et al. (2001).** "Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma." Nature 409(6817): 207-11.
- Stach, D., Schmitz, O. J., et al. (2003).** "Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels." Nucleic Acids Res 31(2): E2.
- Stoner, G. D., Shimkin, M. B., et al. (1973).** "Test for carcinogenicity of food additives and chemotherapeutic agents by the pulmonary tumor response in strain A mice." Cancer Res 33(12): 3069-85.

- Stryer, L. (1998)** Das kinetische Optimum der enzymatischen Katalyse: Das k_{cat}/K_m -Kriterium. Biochemie. Braunschweig/Wiesbaden, Friedr. Vieweg&Sohn: s.81-95.
- Sullivan Pepe, M., Etzioni, R., et al. (2001)**. "Phases of biomarker development for early detection of cancer." J Natl Cancer Inst 93(14): 1054-61.
- Talpaz, M., Kantarjian, H., et al. (1991)**. "Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. Philadelphia chromosome-positive patients." Ann Intern Med 114(7): 532-8.
- Talpaz, M., Silver, R. T., et al. (2002)**. "Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study." Blood 99(6): 1928-37.
- Tamura, T., Kong, H. J., et al. (2003)**. "ICSBP/IRF-8 inhibits mitogenic activity of p210 Bcr/Abl in differentiating myeloid progenitor cells." Blood 102(13): 4547-54.
- Tanaka, N., Kawakami, T. and Taniguchi, T. (1993)**. "Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system." Mol Cell Biol 13(8): 4531-8.
- Tang, X., Khuri, F. R., et al. (2000)**. "Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer." J Natl Cancer Inst 92(18): 1511-6.
- Taniguchi, T., Lamphier, M. S. and Tanaka, N. (1997)**. "IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis." Biochim Biophys Acta 1333(1): M9-17.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., et al. (2001)**. "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." Annu Rev Immunol 19: 623-55.
- Tate, P. H. and Bird, A. P. (1993)**. "Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression." Curr Opin Genet Dev 3(2): 226-31.
- Teitz, T., Wei, T., et al. (2000)**. "Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN." Nat Med 6(5): 529-35.
- Tommasi, S., Denissenko, M. F. and Pfeifer, G. P. (1997)**. "Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases." Cancer Res 57(21): 4727-30.
- Toyota, M., Kopecky, K. J., et al. (2001)**. "Methylation profiling in acute myeloid leukemia." Blood 97(9): 2823-9.
- Tremolizzo, L., Carboni, G., et al. (2002)**. "An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability." Proc Natl Acad Sci U S A 99(26): 17095-100.
- Uchida, T., Kinoshita, T., et al. (1997)**. "Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes." Blood 90(4): 1403-9.
- van der Stoep, N., Quinten, E., et al. (2004)**. "E47, IRF-4, and PU.1 synergize to induce B-cell-specific activation of the class II transactivator promoter III (CIITA-PIII)." Blood 104(9): 2849-57.
- Veals, S. A., Santa Maria, T. and Levy, D. E. (1993)**. "Two domains of ISGF3 gamma that mediate protein-DNA and protein-protein interactions during transcription factor assembly contribute to DNA-binding specificity." Mol Cell Biol 13(1): 196-206.
- Venolia, L., Gartler, S. M., et al. (1982)**. "Transformation with DNA from 5-azacytidine-reactivated X chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A 79(7): 2352-4.

- Vertino, P. M., Yen, R. W., 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.
- Wada, C., Shionoya, S., et al. (1994).** "Genomic instability of microsatellite repeats and its association with the evolution of chronic myelogenous leukemia." Blood 83(12): 3449-56.
- Wang, J. Y. (1993).** "Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation." Curr Opin Genet Dev 3(1): 35-43.
- Wang, J. Y. (2000).** "Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase." Oncogene 19(49): 5643-50.
- Wiemels, J. L., Smith, R. N., et al. (2001).** "Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A 98(7): 4004-9.
- Wigler, M., Levy, D. and Perucho, M. (1981).** "The somatic replication of DNA methylation." Cell 24(1): 33-40.
- Williams, B. R. (1991).** "Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes." Eur J Biochem 200(1): 1-11.
- Wolfl, S., Schrader, M. and Wittig, B. (1991).** "Lack of correlation between DNA methylation and transcriptional inactivation: the chicken lysozyme gene." Proc Natl Acad Sci U S A 88(1): 271-5.
- Wong, D. J., Paulson, T. G., et al. (2001).** "p16(INK4a) lesions are common, early abnormalities that undergo clonal expansion in Barrett's metaplastic epithelium." Cancer Res 61(22): 8284-9.
- Wong, I. H., Ng, M. H., et al. (2000).** "Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications." Blood 95(6): 1942-9.
- Yamagata, T., Nishida, J., et al. (1996).** "A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSAT/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes." Mol Cell Biol 16(4): 1283-94.
- Yoshida, S., Nakazawa, N., et al. (1999).** "Detection of MUM1/IRF4-IgH fusion in multiple myeloma." Leukemia 13(11): 1812-6.
- Zhu, W. G., Srinivasan, K., et al. (2003).** "Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter." Mol Cell Biol 23(12): 4056-65.

9 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

In Marburg

Alfke, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Battmann, Baum, Beyer, Bertalanffy, Bien, Brilla, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Ebel, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Folz, Fruhstorfer, Gemsa, Görg, Gotthard, Gotzen, Grimm, Griss, Groß, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Hellinger, Herzum, Hesse, Heymanns, Höffken, Höltermann, Hörsch, Hofmann, Jackowski-Dohrmann, Joseph, Jungclas, Kaiser, Kamp-Becker, Kann, Kern, Kim-Berger, Klaus, Klenk, Klose, König, Köppler, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Kuhn, Lammel, Lang, Lange, Lennartz, Leonhardt, Leppek, Lill, Lippert, Löffler, Maier, Maisch, Martin, Mattejat, McGregor, Mennel, Merte, Meyer, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Nies, Niessing, Oertel, Pfab, Ramaswamy, Renz, Röhm, Remschmidt, Richter, Rosenow, Rothmund, Schachtschabel, Schädel-Höpfner, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneyer, Schüffel, Schulte-Körne, Schulz, Schwarz, Seitz, Sekundo, Seyberth, Shiratori, Slenczka, Sommer, Steiniger, Stief, Strassmann, Sturm, Sundermeyer, Suske, Vacha, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner, Walthers, Weide, Weihe, Werner, Westermann, Wilke, von Wichert, Wolf

In Oxford (England)

Davies, Stradling

In Maastricht (Niederlande)

Braat, Crijns, Duijvestijn

In Lausanne (Schweiz)

Cuénoud, de Preux, Morard, Richard

In Montréal (Kanada)

Hamaoui, Saintonge, Spiegelblatt

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Andreas Neubauer danke ich für die Möglichkeit, in seiner Klinik an meiner Dissertation gearbeitet haben zu dürfen, für seine engagierte Betreuung der Arbeit und sein Mentoring in Klinik und Forschung.

Herrn Manuel Schmidt danke ich für die Vergabe des Themas und seine vorbildliche Betreuung. Er war zu jedem Zeitpunkt ein wertvoller Diskussions- und Ansprechpartner; von ihm habe ich die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens gelernt.

Herrn Dr. Andreas Burchert danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen in Labor und Klinik und für die vielen interessanten Diskussionen.

Frau Kathleen Stabla und Frau Michaela Rehn danke ich für Ihre stetige Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima im Labor.

Herrn Erik Ortmann danke ich für seine Verlässlichkeit und Geduld.

Meinen Eltern danke ich für Ihre liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums. Ohne sie wäre mir Vieles nicht möglich gewesen.

