

Abteilung Innere Medizin III  
Universität Ulm  
Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Rheumatologie  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. H. Döhner

**Identifizierung von spezifischen Methylierungsmustern  
in Zelllinien der  
akuten myeloischen Leukämie (AML)**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie der  
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von Heike Ruff aus Ulm/Donau

- 2003 -

# Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	V
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Akute myeloische Leukämie (AML) .....	1
1.1.1 Blutzellen und Hämatopoese .....	1
1.1.2 Einteilung der AML-Subtypen .....	2
1.1.3 Rekurrente chromosomale und strukturelle Aberrationen bei der AML .....	3
1.1.4 Mutationen und Duplikationen bei AML .....	5
1.1.5 Mutationen von Onkogenen .....	5
1.2 Epigenetische Veränderungen .....	7
1.2.1 DNA-Hypermethylierung .....	7
1.2.2 Histon-Deacetylierung .....	11
1.3 Einfluss von zytogenetischen und molekularen Veränderungen auf die Therapie bei AML .....	14
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit .....	16
<b>2. Material und Methoden</b> .....	17
2.1 Material .....	17
2.1.1 Standard-Geräte .....	17
2.1.2 Standard-Chemikalien .....	18
2.1.3 Enzyme .....	19
2.1.4 Kits .....	19
2.1.5 Kulturmedien .....	19
2.1.6 Größenstandards .....	19
2.1.7 Radiochemikalien .....	19
2.1.8 Zelllinien und Zellen .....	20
2.1.9 Software .....	20
2.2 Standard-Lösungen und Standard-Puffer .....	20

	<u>Seite</u>
2.3 Molekularbiologische Standardmethoden .....	23
2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	23
2.3.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	23
2.3.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung in Agarose-Gelen	24
2.3.2 Gel-Elektrophorese von DNA und RNA.....	24
2.3.2.1 Agarose-Gele .....	24
2.3.3 Extraktion von RNA .....	25
2.3.3.1 Trizol <sup>®</sup> -Isolierung .....	25
2.3.3.2 RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) .....	25
2.3.4 Amplifizieren von kleinen RNA-Mengen .....	26
2.4 Zellkultur .....	26
2.4.1 Kultivierung von Zelllinien .....	26
2.4.2 Bestimmung der Zellzahl .....	27
2.4.3 Dauerkulturen .....	27
2.4.4 Selektion von CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	27
2.5 Hybridisierung auf <i>Genefilter</i> GF200-205 (Research Genetics, Huntsville, AL) .....	28
2.5.1 Umschreibung von RNA in cDNA und radioaktive Markierung .....	28
2.5.2 Vorhybridisieren der Filter .....	28
2.5.3 Hybridisierung und Waschschrte .....	29
2.5.4 Exposition und <i>Scannen</i> der Filter .....	29
2.5.5 Entfernen der radioaktiven cDNA .....	29
2.6 Verwendete Genfilter und Software-Programme .....	29
2.6.1 <i>AIDA Array Metrix und AIDA Compare</i> (Raytest).....	30
2.6.2 <i>AIDA Array Compare</i> (Raytest) .....	31
2.6.3 <i>Cluster</i> und <i>TreeView</i> (Eisen) .....	32
2.7 ATP-Messung .....	32
2.8 Western Blot .....	33
2.8.1 Proteingewinnung aus Zelllysaten .....	33
2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gel und Gel-Elektrophorese .....	33
2.8.3 Transfer durch <i>Semidry-Blotting</i> .....	34

	<u>Seite</u>
2.8.4 Amidoschwarz-Färbung .....	34
2.8.5 Antikörper-Markierung der Transfermembran .....	35
2.8.6 Entfernen der Antikörper von der Transfermembran ( <i>Strippen</i> ) .....	35
2.8.7 Antikörper .....	36
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
3.1 Charakterisierung der Zelllinien .....	38
3.2 Ermittlung der optimalen Konzentration und Inkubationszeit von 5'AzaCdr und Trichostatin A zur Behandlung der Zelllinien ....	40
3.2.1 ATPlite <sup>®</sup> -Messungen zur Ermittlung der Inkubationszeit .....	40
3.2.2 Titrationskurve mit Trichostatin A .....	42
3.2.3 Induktion von Apoptose durch 5'AzaCdr, Trichostatin A oder Kombination von 5'AzaCdr/Trichostatin A .....	44
3.2.4 Nachweis von acetyliertem Histon-H4 in Zellen von NB-4 in Abhängigkeit der Behandlung mit HDAC-Inhibitoren .....	45
3.2.4.1 Phenylbutyrat (PB) .....	45
3.2.4.2 Valproinsäure .....	46
3.3 Vergleich des Gen-Expressionsprofils der Zelllinien .....	47
3.4 <i>Microarrays</i> .....	49
3.4.1 <i>Mitogen-activated protein kinase kinase 2</i> (MEK2) .....	51
3.4.2 <i>Checkpoint Suppressor 1</i> (CHES1) .....	53
3.4.3 EphA8 .....	54
3.4.4 Ephrin-B1 .....	55
3.4.5 Gene, deren Expressionsprofil bereits in anderen Tumorarten untersucht wurde .....	55
3.5 Verifizierung der mittels <i>Microarray</i> identifizierten Gene durch Western-Blot-Analysen .....	56
3.5.1 MEK2 .....	56
3.5.2 Anti-EphA8 .....	61
3.5.3 Anti-CHK1 .....	62
Anhang Tabelle 7: Beispiele von Genen mit regulierter Expression .....	63

	<u>Seite</u>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>66</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>77</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>80</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
μCi	μ-Curie
μg	10 <sup>-6</sup> Gramm
μl	10 <sup>-6</sup> Liter
μM	10 <sup>-6</sup> Mol
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Anaphase promoting complex
APML	Akute Promyeloische Leukämie
ATP	Adenosin-Triphosphat
AZA	Azacytidin
Bcl	B-cell CLL/Lymphoma
BRCA	Breast cancer
bp	<i>Basenpaar</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
BUB	Budding unhibited by Benzimidazoles 3
CA	Coaktivator
CBP	zyklisches AMP-Response-Element-Bindungs-Protein
CCNA	Critical care nurses association
CCNE	<i>National Ethical Consultative Committee for the Life and Health Sciences in France</i>
CDC	<i>cell division cycle</i>
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	complementary DNA
CHES	Checkpoint Suppressor
CHK	Checkpoint Suppressor Kinase
CML	Chronisch myeloische Leukämie
Cpm	Counts pro Minute
DAPK	Death associate protein kinase
DCTER	Dexamethason, Cytarabin, Thioguanin, Etoposid, Daunorubicin
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleicacid
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithriolthreitol
ECL	Electro-Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EphA	Ephrin Rezeptor A
ER	Estrogen Rezeptor
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FA	Formamid
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fetal calf serum
FISH	Fluorescence in situ hybridisation
FKHR	Forkhead box
FLT	FMS-related tyrosine kinase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA	GATA-binding protein
GF	Gene filter
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GO	Gemtuzumab ozogamicin
HA	Histon-Acetylase
HBM	Human Bone Marrow
HCl	Salzsäure
HDA	Histon-Deacetylase
HDAC	Histon-Deacetylase-Complex
HRP	Horse-radish-peroxidase
ICSBP	Interferon consensus sequence binding protein
kb	<i>Kilobase</i>
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
LKB	Serine/threonine kinase 11
mA	Milliampere



MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MBP	Methyl-Cytosin-Bindungs-Komplex
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MeCP	Methyl-CpG-Bindungs-Protein
MEK	<i>Mitogen-activated proteion kinase kinase</i>
mM	10 <sup>-3</sup> Mol
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MT	Methyltransferase
MYC	<i>V-MYC avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
P	Phosphor
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCA	<i>Principal components analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDCD	<i>Programmed cell death</i>
PDGF	<i>Plateled-derived growth factor</i>
PE	Polyethylen
RAB	<i>Ras-associated protein</i>
Rb	Retinoblastom
RNA	<i>Ribonucleicacid</i>
RT	Raumtemperatur
sAML	sekundäre AML
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOM	<i>Self organizing maps</i>
SSC	<i>Standard sodiumcitrate</i>
STK	<i>Serine/Threonine protein kinase</i>
TAL	<i>t-cell acutelymphocytic leukemia</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor

TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TSG	Tumorsuppressor-Gen
Tween	Polyethylensorbitan-Monolaurat
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHL	Von Hippel-Lindau Syndrom
WBC	<i>White Blood Cells</i>
WHN	<i>Winged helix nude</i>
XCB	Xylen-Cyanol-Blau

## **1. Einleitung**

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

#### **1.1.1 Blutzellen und Hämatopoese**

Bei der Hämatopoese, der Bildung neuer Blutzellen, differenzieren sich aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks verschiedene spezialisiertere Vorläuferformen, darunter die myeloischen Stammzellen sowie die Vorstufen der Lymphozyten. Bei der Entstehung einer Leukämie unterliegen myeloische Vorläuferzellen nicht mehr der physiologischen Wachstumsregulation, die Kopplung von Differenzierung und Wachstumsstopp ist gestört, und es kommt zur malignen Entartung von unreifen Vorläuferzellen des Blutes. Die Hämatopoese findet beim gesunden Menschen im Knochenmark statt. Während in der Kindheit noch der gesamte Knochenmarkraum an der Hämatopoese beteiligt ist, bilden beim Erwachsenen nur die zentralen Skelettanteile und die proximalen Enden von Humerus und Femur Blutzellen. Gehen den reifenden Zellen im Laufe ihrer Entwicklung bestimmte Zelladhäsionsmoleküle verloren, werden die Zellen in die Blutbahn freigesetzt. Aus einer gemeinsamen Stammzelle entwickeln sich verschiedene Zelllinien der Granulopoese, Erythropoese, Lymphopoese und Megakaryopoese (Abbildung 1). Hämatopoetische Wachstumsfaktoren wirken über spezifische Rezeptoren der Zielzellen auf deren weitere Proliferation und Differenzierung; ebenso können zusätzliche Zytokine stimuliert werden, wodurch - je nach Bedarf - eine bestimmte Zelllinie verstärkt gebildet wird. GM-CSF erhöht beispielsweise die Lebensdauer reifer Neutrophiler.

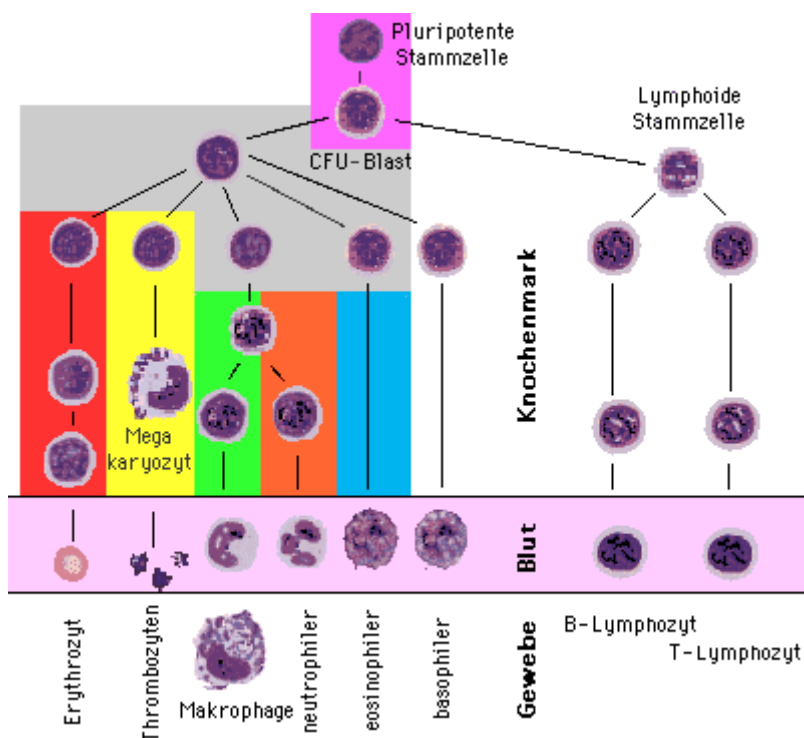


Abbildung 1: Blutzellbildung aus einer pluripotenten Stammzelle

### 1.1.2 Einteilung der AML-Subtypen

AML wird seit 1976 nach der **French/American/British- (FAB) Klassifikation** (modifiziert aus Pfreundschuh M. Hunstein W (1981) Krankenhausarzt 42:206) in acht Subtypen eingeteilt:

- M0** AML ohne Ausreifung
- M1** Akute myeloblastische Leukämie, ohne Ausdifferenzierung
- M2** Akute myeloblastische Leukämie, häufig mit t(8;21) assoziiert, häufig Auerstäbchen nachweisbar
- M3** Akute promyelozytische Leukämie, Promyelozyten häufig mit Auerstäbchen und Granula, Chromosomenanomalie mit t(15;17)
- M4** Akute myelomonozytäre Leukämie, zum Teil Eosinophilie (M4<sub>E0</sub>) und Chromosomenanomalie (inv (16))
- M5** Akute monozytäre Leukämie, häufig extramedulläre Leukämiemanifestation (Chlorome), Beteiligung der Haut und anderer Organe

---

<b>M6</b>	Akute Erythroleukämie
<b>M7</b>	Megakaryozytische Leukämie, meist mit KM-Fibrose

Die Diagnose einer akuten Leukämie erfolgt morphologisch, immunphänotypisch und zytochemisch, wobei die Blasten der Patienten unterschiedliche Differenzierungsmarker aufweisen. Durch Nachweis von spezifischen immunologischen Marker mit monoklonalen Antikörpern, bestimmten Enzymen (Myeloperoxidase, saure Esterase) im Zytoplasma sowie der chromosomalen Analyse (FISH) kann die AML subtypisiert werden. Zu den seltenen Formen von akuter Leukämie gehören die eosinophile Leukämie (M4<sub>Eo</sub>) sowie die akute basophile Leukämie. Die vorherrschenden Zellen sind abnormale Eosinophile mit unreifen Formen, häufig findet sich hier eine inv(16). Bei AML-Erkrankungen wurden spezifische Prognosefaktoren identifiziert, zu denen sowohl strukturelle Chromosomen-Aberrationen als auch andere molekulare Veränderungen gehören.

### **1.1.3 Rekurrente chromosomale und strukturelle Aberrationen bei der AML**

Einer der wichtigsten prognostischen Faktoren bei AML ist der Karyotyp. Im Karyotyp von AML-Patienten finden sich strukturelle Aberrationen wie zum Beispiel Inversionen (inv(16)(p13q22)) (Delaunay et al. 2003) und Translokationen (t(15;17)(q22;q11-12); t(8;21)(q22,q22) oder t(11;19)(q23;p13)) (Cho et al. 2003; Kainz et al. 2002; Knuutila et al. 1994; Steffen et al. 2003). Während durchschnittlich 55 % der AML-Patienten mit abnormalem Karyotyp nur eine einzelne Aberration aufweisen, findet man bei 45 % zwei oder mehrere Veränderungen im Karyotyp. In den FAB-Subgruppen M3 (80 % der Patienten mit nur einer Anomalie) und M6 (25 % mit einer alleinigen Veränderung im Karyotyp) weichen die Werte vom prozentualen Durchschnitt der anderen Subgruppen ab. Translokation t(8;21), t(15;17) und Inversion inv(16) sind mit einer guten Prognose assoziiert (Cho et al. 2003; Delaunay et al. 2003). Eine weitere strukturelle Chromosomen-Aberration ist unter anderen die Translokation t(1;3)(p36;q21), die erstmals 1984 von Moir und Mitarbeitern beschrieben wurde (Moir et al. 1984). Zur

gleichen Zeit wurde erstmalig die Translokation t(1;7)(q10;p10) von Scheres dokumentiert, die in der Hälfte der Fälle als Einzelaberration vorkommt (Scheres et al. 1985). Auch der lange Arm von Chromosom 11 ist beteiligt an Translokationen bei AML-Erkrankungen (Li et al. 2002; Nigro et al. 2003; Vendrame-Goloni et al. 2003). Die häufigste chromosomale Veränderung bei Kindern mit AML-Subtyp M7 ist die Translokation t(1;22), die mit einer sehr schlechten Prognose verknüpft ist. Veränderungen am langen Arm von Chromosom 3 wurden als Inversion inv(3)(q21q26) und Translokation t(3;3)(q21;q26) beschrieben, die häufig sekundäre Aberrationen wie Monosomie 7 aufweisen. Eine Auswahl von primären Aberrationen bei AML sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Primäre Aberrationen bei AML-Patienten

<b>Aberration</b>	<b>FAB-Klassifikation</b>
t(1 ;7)(q10 ;q10)	M4
t(3 ;5)(q21-25 ;q31-35)	M6
t(3 ;21)(q26 ;q22)	keine Einteilung
t(6 ;9)(p23 ;q34)	M2 ; M4
t(6 ;11)(q27 ;q23)	M4 ; M5
t(8 ;21)(q22,q22)	M2 mit Auerstäbchen
t(9;11)	unklar
t(10 ;11)(p11-15 ;q13-23)	M5
Inv(16)(p13q22)	M4
t(15;17)	M3

Bei 35 - 50 % der AML-Patienten werden keine chromosomalen Aberrationen festgestellt (Mrozek et al. 2001). Da diese Patienten mit normalem Karyotyp eine heterogene Gruppe mit intermediärem Behandlungserfolg repräsentieren (Slovak et al. 2000), müssen außer den strukturellen Chromosomenaberrationen noch andere molekulare Veränderungen wie zum Beispiel Mutationen als prognostische Faktoren eine wichtige Rolle spielen (Schnittger et al. 2000).

### **1.1.4 Mutationen und Duplikationen bei AML**

Die AML ist eine heterogene Erkrankung, charakterisiert durch spezifische und unspezifische genetische Defekte. Klinische Untersuchungen haben bislang gezeigt, dass zytogenetische Veränderungen wichtige prognostische Informationen tragen, die Therapieerfolge bei identischen zytogenetischen Profilen aber durchaus variieren. Zu diesen genetischen Veränderungen gehört die Mutation des FLT3-(FMS-like tyrosine kinase) Gens, das auf Chromosom 13q12 lokalisiert ist (Lyman et al. 1998). FLT3 gehört zur Familie der Tyrosin-Rezeptor-Kinasen und induziert über Autophosphorylierung der FLT3-Proteine intrazelluläre Signalkaskaden, die in der Differenzierung von Stammzellen und der Proliferation involviert sind (McKenna et al. 2000). Sowohl Punktmutation von Asp835 (Yamamoto et al. 2001) als auch Tandem-Duplikation (FLT3 ITD; internal tandem duplication) im FLT3-Gen (Kottaridis et al. 2001) wurden bei AML-Patienten beschrieben, die dadurch mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Fröhling et al. 2002). Darüber hinaus wurde die Mutation (Tandem-Duplikation) im MLL-Gen (11q23) bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp als spezifischer Prognosefaktor mit ungünstiger Prognose beschrieben (Döhner et al. 2002). Zu den genetischen Veränderungen bei AML-Erkrankungen gehören aber auch Translokationen, in die Onkogene oder Transkriptionsfaktoren involviert sein können, ebenso wie die Aktivierung von Signal-Transduktions-Kaskaden oder Veränderungen in Wachstumsfaktor-Rezeptoren.

### **1.1.5 Mutationen von Onkogenen**

Unter Protoonkogenen versteht man eine Gruppe von Genen, die als physiologische Regulatoren der Zellproliferation und Zelldifferenzierung aktiviert werden. Protoonkogene werden in fünf Hauptgruppen unterschieden. Manche Protoonkogene kodieren Wachstumsfaktoren, andere kodieren Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder spezielle, hochaffine Zelloberflächenrezeptoren. Prozesse wie Punktmutationen, chromosomale Translokationen und Genamplifikationen können dazu führen, dass Protoonkogene zu Onkogenen

transformiert werden, wobei die Umstrukturierung eines Allels bereits ausreicht, um eine tumorigene Wirkung freizusetzen. Die größte Klasse der Onkogene kodiert intrazelluläre Signalübermittlungsträger. Bei der Translokation t(15;17) bei APL (Akute Promyelozytenleukämie, M3) wird das Retin-Säure-Gen (*RAR $\alpha$* ) von Chromosom 17 an das *PML*-Gen von Chromosom 15 transloziert. Wird Retin-Säure an eine Liganden-Domäne gebunden, bindet *RAR $\alpha$*  als Transkriptionsfaktor spezifische DNA-Sequenzen und aktiviert dadurch die Transkription benachbarter Gene. Auch das Produkt des *PML*-Gens zeigt Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors. Expression des *PML-RAR $\alpha$* -Onkogens blockiert die Funktion der Proteine *PML* und *RAR $\alpha$* . Die Behandlung der Zellen mit ATRA (All-Trans-Retinolsäure) führt über die Aufhebung der blockierten Transkription und Differenzierung zu einer signifikanten Verbesserung der Remissionsraten und des krankheitsfreien Überlebens von Patienten mit APL (Wickremasinghe et al. 2000). Das *CBF $\alpha$* -Gen auf Chromosom 21 wird bei der Translokation t(8;21) zum *ETO*-Gen von Chromosom 8 transloziert. Das Produkt aus AML1/ETO hemmt die Aktivierung von *CBF* und resultiert in der malignen Transformation. Das *bcr-abl*-Onkogen gehört zu onkogenen Tyrosinkinase, die sich auf der Innenseite der Membran befinden. *Abl* lagert sich bei der Translokation t(9;22) an das *bcr*-Gen an und bildet damit ein Fusionsprotein mit erhöhter Tyrosinkinase-Aktivität, das zu beschleunigter Zellteilung führt (Kurzrock et al. 1988). Werden diese Onkogene also aktiviert, so wird das Onkogenprodukt überexprimiert, seine Enzymaktivität erhöht, und es ändert seine Position in der Zelle. Nukleäre Transkriptionsfaktoren gehören zu den Protoonkogenprodukten und wirken unmittelbar auf den Zellkern ein. Außerdem findet man diese als Bestandteile des Cyclin-Netzwerks, den zellzyklussteuernden Kinaseinhibitoren. Außer der gestörten Zellzyklus-Regulation spielen auch Veränderungen in anderen zellulären Prozessen in der Tumorgenese eine wichtige Rolle: aberrante Signaltransduktion, Störung der Apoptose, der DNA-Reparatur sowie Wirkstoff-Resistenz. Mutationen im *ras*-Gen sind häufig nachweisbar bei Patienten mit AML. Der *ras-Pathway*, in dem extrazelluläre Liganden mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen interagieren, gehört zu den Signal-Transduktions-Kaskaden (Appelbaum et al. 2001). Im normalen Signal-Transduktions-*Pathway* werden extrazelluläre Signale in intrazelluläre Reaktionen umgewandelt (Proliferation, Differenzierung und Apoptose). Diese Rezeptoren der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen dimerisieren, werden aktiviert, auto-phosphorylieren



und phosphorylieren daraufhin *Grb-2*, ein Adaptor-Protein. Das an *Grb-2* gebundene SOS, ein Guanin-Nukleotid-Austausch-Protein, wirkt unterstützend in der Konformationsänderung von *ras*-GDP zu *ras*-GTP, wodurch *ras* aktiviert wird. Die Aktivierung von *ras* löst weitere Kaskaden aus: *ras* aktiviert die Serin/Threonin-Kinase *raf*, die daraufhin die MAP/ERK-Kaskade aktiviert. Aber auch *Rac* und *Rho* werden durch *ras* aktiviert, wodurch die Struktur des Zytoskeletts beeinflusst werden kann. Über die Aktivierung von Cyclin-abhängigen-Kinasen (CDK) beeinflusst *ras* direkt, über *raf* oder über *myc*, den Zellzyklus. Darüber hinaus spielt *ras* eine Rolle (inhibierend) bei der Apoptose, indem es über die Aktivierung der PI-3-Kinase c-Akt aktiviert, welches eine Funktion im Schutz vor Apoptose erfüllt (Grader-Beck et al. 2003). Bei AML-Erkrankungen kommt es häufig zu Störungen in diesen Kaskaden, ausgelöst durch unkontrollierte Aktivierung von *Downstream*-Komponenten, die unerwünschte Signale für Proliferation und Apoptose auslösen (Hirai 2003). Mutationen in Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (*Fms*, *Flt-3*, *Kit*) (Mizuki et al. 2000; Mizuki et al. 2003), *N-ras*, *K-ras* und *H-ras* (Flotho et al. 1999) sowie Mutationen im *NF-1*-Gen (Birnbaum et al. 2000; Bollag et al. 1996; Lu et al. 2003) wurden bereits in AML-Erkrankungen beschrieben. Aberrante Aktivierung des *Jak/Stat-Pathways* wurde sowohl in lymphatischen als auch myeloischen Leukämien mit t(9;12) nachgewiesen (Carron et al. 2000; Cools et al. 1999). Nicht immer sind Mutation oder Deletion Ursache für aberrante Genaktivierung. Auch epigenetische Mechanismen wie Hypermethylierung und Histon-Deacetylierung führen zur Inaktivierung von Genen.

## 1.2 Epigenetische Veränderungen

### 1.2.1 DNA-Hypermethylierung

Während die CpG-Dinukleotide evolutionsbedingt fortschreitend im eukaryotischen Genom dezimiert wurden, sind die verbliebenen CpGs beim Menschen hochfrequent methyliert (Bestor et al. 1996). Kleine (0,5 bis einige kb) DNA-Abschnitte, sogenannte „CpG islands“, sind vor Methylierung „geschützt“ und befinden sich in den proximalen Promoter-Regionen bei ca. 40 – 50 % aller

menschlichen Gene in unmethyliertem Zustand (Ng et al. 1999a). Diese fehlende Methylierung kann eine Vorbedingung für aktive Transkription sein. Nur Promoter-Regionen von ausgeschalteten Allelen bei bestimmten autosomalen Genen sowie bei mehrfach inaktivierten Genen von inaktiven X-Chromosomen bei Frauen sind vollständig methyliert (Surani 1998).

Wie bereits oben erwähnt, können Gene durch Deletion, Mutation oder epigenetische Mechanismen inaktiviert sein. Zu diesen epigenetischen Mechanismen gehört die Geninaktivierung durch Hypermethylierung (Abbildung 2a und b). Es wurde kürzlich gezeigt, dass Gene, die durch Hypermethylierung inaktiviert waren, durch das Cytidin-Analog 5'-aza-2'-deoxycytidine (5'AzaCdr) wieder reaktiviert werden konnten (Esteller et al. 2002). 5'AzaCdr ist ein Analog von Deoxycytidine mit einem Nitrogen-Atom, welches das Kohlenstoff-Atom in Position 5 des heterozyklischen Rings ersetzt. Wird 5'AzaCdr in zelluläre DNA eingebracht, kommt es zur Hypermethylierung von synthetisierter zellulärer DNA. Bereits im Jahr 1968 wurde in Untersuchungen eine Korrelation zwischen inhibierter DNA-Methylierung und einem antileukämischen Effekt gezeigt (Sorm et al. 1968). 5'AzaCdr verursacht eine Inhibierung der DNA-Methyltransferase und führt somit zur Hypomethylierung neu synthetisierter DNA. Wenn reaktivierte Gene die Funktion von Tumorsuppressor-Genen (TSG) aufweisen, können Zellen wieder einen kontrollierten Zellzyklus erreichen. So wurde gezeigt, dass sowohl das Calcitonin-Gen als auch  $p15^{INK4B}$  bei MDS durch 5'AzaCdr re-induziert werden können (Herman et al. 1996). In letzter Zeit wurden immer mehr TSG entdeckt, deren physiologisch unmethylierte Promoter-*CpG-Islands* bei malignen Tumoren methyliert sind (Tabelle 2). Diese Methylierung spielt eine Schlüsselrolle als epigenetisch bedingter Genfunktionsverlust, der ebenso bedeutend in der Tumorgenese ist wie Mutationen in kodierenden Bereichen. Ein Beispiel dafür ist das  $p16^{INK4A}$  Gen, das den cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor Cdk4 reguliert. Dieser Inhibitor ist bedeutend im *CyclinD-Rb-Pathway*, wo er das Retinoblastom- (*Rb*)-Protein in seiner aktiven, unphosphorylierten Form stabilisiert (Sherr 1996).

Tabelle 2: Hypermethylierung und Gen-Inaktivierung in Promoter-*CpG-Islands* bei verschiedenen Krebserkrankungen

Gen	Funktion	Tumor Art	Ref.
<b>TSGs mutiert</b>			
p16 <sup>INK4A</sup>	Kinase-Inhibitor (cyclinabhängig)	Lymphome	(Baylin et al. 1998)
E-Cadherin	Epithelzell-Adhäsion	Mamma, Thymus, u.a.	(Graff et al. 1998)
VHL	Fördert Angiogenese	Niere	(Herman et al. 1994)
BRCA1	Repariert DNA-Schäden	Brust, Ovarien	(Esteller et al. 2000a)
hMLH1	Repariert DNA- Ungleichgewicht	Colon, Magen- Darm	(Leung et al. 1999)
LKB1	Serin-Threonin-Kinase	Colon, Brust	(Esteller et al. 2000b)
<b>Andere Gene</b>			
p15 <sup>INK4B</sup>	Cyclinabhängiger Kinase- Inhibitor	AML	(Batova et al. 1997)
ER	Rezeptor für östrogen-induzierte Transkription	Brust, Colon, Leukämien	(Issa et al. 1997)
TIMP3	Inhibitor von Metallo-Gewebe- Proteasen	Colon, Niere, Hirn	(Bachman et al. 2003)
DAPK1	Kinase-Mediator für Interferon- induzierte Apoptose	B-Zell- Lymphome, Lunge	(Katzenellenbogen et al. 1999)

Abbildung 2: Methylierungs- und Chromatinmuster in menschlichen Zellen

a)

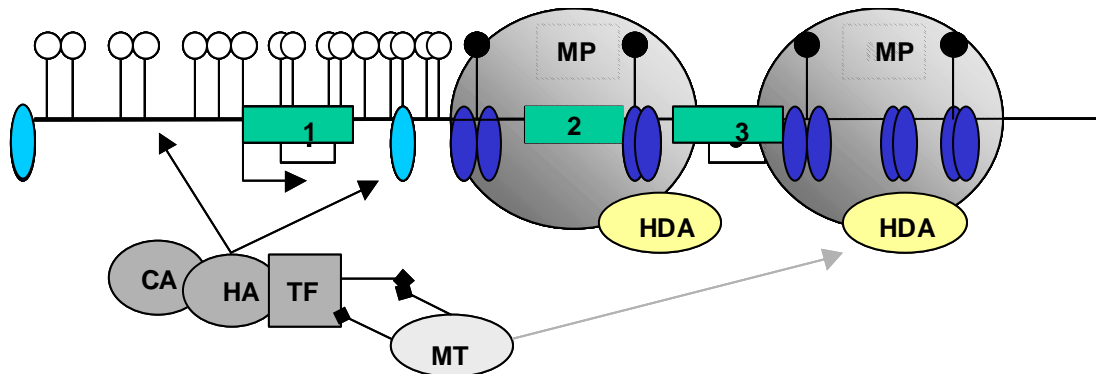


Abbildung 2a):

Normale Zelle; typische Konfiguration der Promoter-Region eines aktiv transkribierten 3-Exon-Gens (Kästchen 1, 2 und 3) mit unmethyliertem *CpG-Island* (weiße Kreise). In der CpG-reichen Region ist der Abschnitt vor Methylierung geschützt, während CpG-reduzierte *Downstream*-Bereiche stark methyliert sind (schwarze Kreise). Die Chromatin-Anordnung ist transkriptionsbegünstigt und weist große Abstände zwischen den Nucleosomen mit acetylierten Histonen auf (hellblaue Ovale). Dagegen sind die regelmäßigen Abstände der *Non-Island*-Bereiche charakterisiert durch kompakte Nucleosomen mit de-acetylierten Histonen (blaue Ovale). Typische Transkriptionskomplexe bestehend aus Histon-Acetylase (HA), Co-Aktivatoren (CA) und basalen Transkriptionsfaktoren (TF) haben ungehinderten Zugang zu dem *CpG-Island*, interagieren aber nicht mit DNA-Methyltransferasen (MT). Auf methylierte *Downstream*-Regionen haben Transkriptionskomplexe im Gegensatz zu den Methyltransferasen keinen Einfluss. Diese Bereiche besitzen Protein-Komplexe (Methyl-cytosin-bindende Proteine; MP) und Histon-De-Acetylasen (HDA).

b)

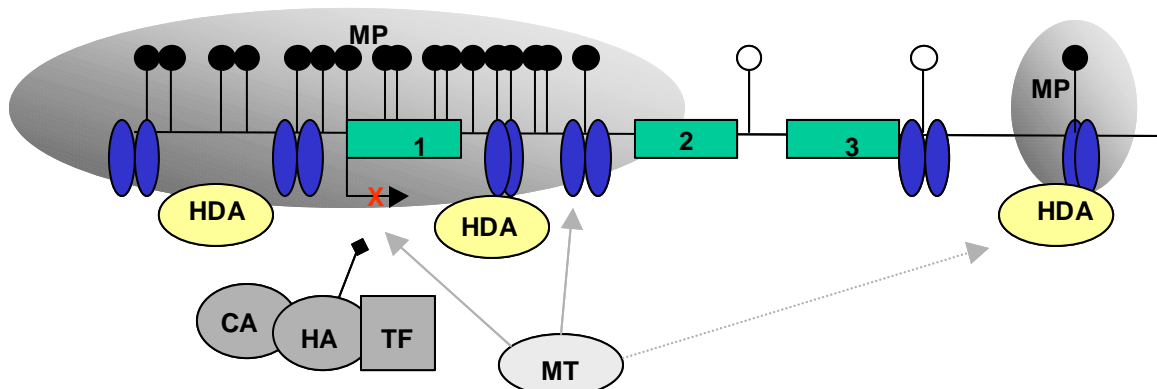


Abbildung 2b):

Tumorzelle; aberrante Methylierung mit Hypermethylierung im *CpG-Island* mit Einfluss von Methyltransferasen und Nucleosomen mit Histon-De-Acetylasen; Anordnung der Nucleosomen häufiger und kompakt. Die methylierten *CpGs* interagieren hier mit MP-Komplexen und Histon-De-Acetylasen, während der Transkriptionskomplex abgekoppelt ist. Im *Downstream*-Bereich findet sich die typische Hypomethylierung des Krebszellen-Genoms in abgeschwächtem Austausch mit Methyltransferasen sowie geringerer Zahl von Nucleosomen und wenigen MP-HDA-Komplexen. Das Gen ist transkriptionell ausgeschaltet (rotes X am Transkriptionsstartpunkt).

## 1.2.2 Histon-Deacetylierung

Neben den drei genannten Möglichkeiten der Gen-Inaktivierung wurde ein Transkriptionsrepressor-Komplex gefunden (Abbildung 3a und b), der Gene durch Histon-Deacetylierung ausschaltet, hauptsächlich durch Histon-H4-Deacetylierung. Dieser Komplex setzt sich aus einem Methyl-CpG-bindenden Protein (MP; *MeCP1* oder *MeCP2*) und einem Co-Repressor-Komplex zusammen, der sich wiederum aus *mSin3A* und Histon-De-Acetylasen (HA; HDACs) aufbaut (Bird et al. 2002). *mSin3A* interagiert mit verschiedenen Polypeptiden, wovon wenigstens zwei, p50 und p55, mit HDAC1 in Verbindung stehen. Adrian Bird und seine Gruppe konnten zeigen, dass *MeCP2* das Verbindungsglied zwischen den zwei Mechanismen der Gen-Regulierung ist, die lange Zeit als voneinander unabhängige, epigenetische Mechanismen angesehen wurden (Bird et al. 2002). Abhängig vom Methylierungsgrad bindet das *MeCP2* dicht an die Chromosomen, wobei nur Bereiche mit dem *MeCP2*-Protein (TRD) mit dem *mSin3A*/HDAC1-Komplex interagieren. Trichostatin A, ein Deacetylase-Inhibitor, kann diese transkriptionelle Repression wieder aufheben. Dies zeigt, dass Histon-Deacetylierung eine weitere wichtige Rolle bei inaktivierten Genen spielt. Inzwischen konnte eine Korrelation zwischen De-Methylierung und Histon-Deacetylierung nachgewiesen werden (Cameron et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass Trichostatin A allein nicht ausreicht, um bestimmte Gene zu reaktivieren (zum Beispiel *p15<sup>INK4B</sup>*, *p16<sup>INK4A</sup>*), während eine geringe zusätzliche Gabe von 5'AzaCdr zu einer Re-Expression der Gene führt. Ein synergistischer Effekt zwischen DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung wird hierdurch bestätigt, wobei CpG-Island-Methylierung in den Promoter-Regionen das Ausschalten von Genen dominanter verursacht. In den vergangenen Jahren wurde die potentielle Antitumor-Wirkung von Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC) und DNA-Methyltransferase(DNMT)-Inhibitoren intensiv untersucht (Vigushin et al. 2002; Zhu et al. 2001). HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A, Natriumphénylbutyrat, Valproinsäure oder andere hemmen HDACs, was zu einer vermehrten Histon-Acetylierung führt. Histon-Acetylierung induziert die Expression verschiedener Gene, die eine Rolle in der Differenzierung, der Proliferation und der Apoptose von Zellen spielt. HDAC-Inhibitor-induzierte Apoptose wurde bereits in verschiedenen

---

Tumorarten beschrieben (Bernhard et al. 1999; Medina et al. 1997). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind trotz einer Reihe von Erklärungsansätzen noch nicht genau bekannt (Glick et al. 1999; Huang et al. 1999). Eine Ursache könnte die auflockernde Wirkung der Histon-Acetylierung auf die Chromatinstruktur sein, wodurch die DNA für Apoptose-Endonukleasen zugänglicher wird (Lee et al. 1996; Sealy et al. 1978). Über neu synthetisierte Proteine, die in der durch HDAC-Inhibitor induzierten Apoptose involviert sind, wurde ebenfalls berichtet (Glick et al. 1999; Medina et al. 1997). Durch HDAC-Inhibitoren modulierte Genexpression von Genen wie *c-myc* und *p21* werden mit HDAC-Inhibitor-induzierter-Apoptose in verschiedenen Untersuchungen in Relation gebracht (Gray et al. 1999; Koyama et al. 2000; Sowa et al. 1999). Verschiedene Untersuchungen lassen auf eine funktionelle Verbindung zwischen HDAC-Inhibitor-induzierter Histonacetylierung und DNA-Methyltransferase-Inhibitor-induzierter unmethylierter DNA schließen (Jones et al. 1998; Ng et al. 1999b; Wade et al. 1999). *MeCP2*, ein Methyl-CpG-bindendes Protein, bildet einen Komplex mit HDAC und beeinflusst so die Chromatinstruktur und Gen-Regulierung (Nan et al. 1998). Studien haben eine direkte physikalische Verbindung zwischen HDAC-Enzymen und *Dnmt1* (DNA-Methyltransferase1) bestätigt (Robertson et al. 2000; Rountree et al. 2000). Eine neue, vielversprechende Therapiestrategie ist somit die Kombination von HDAC-Inhibitoren und demethylierenden Wirkstoffen (Zhu et al. 2003), die bei Leukämien und verschiedenen anderen Tumorerkrankungen (Lunge, Mamma, Kolon) sehr effektiv und synergistisch zur Induktion von Apoptose, Differenzierung und/oder Zellwachstumshemmung führen könnten (Cameron et al. 1999).

Abbildung 3: Transkriptionskomplex im Bereich von *Promoter-CpG-Islands*

a)

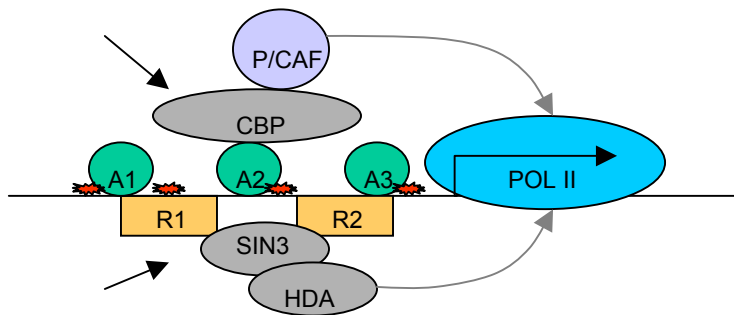


Abbildung 3a):

Transkriptionskomplex im Bereich der *Promoter-CpG-Islands*;

Interaktionen zwischen aktivierenden und hemmenden Transkriptionskomplexen eines normalen, unmethylierten *Promoter-CpG-Island* (*CpG* als rote Sternchen) mit transkriptionsbereitem Gen (schwarzer Pfeil innerhalb des Polymerase-II-Kreises). Transkriptionsfaktoren (direkt: A1, A2 und A3; indirekt: mit histon- oder anderen Protein-Acetylase-Aktivatoren; *CBP* = cyclisches AMP-Response-Element-Bindungs-Protein; *P/CAF* = p300/CBP-assoziiertes Faktor) und Repressionsfaktoren (direkt: R1 und R2; indirekt: Sin3 und Histondeacetylase=HDA) sind in ihrer aktiven Form an die Promoterregion gebunden. Zelluläre Signale (schwarze Pfeile) beeinflussen den Transkriptionsstatus, insbesondere den Acetylierungsstatus der Histone und anderer Proteine.

3b)

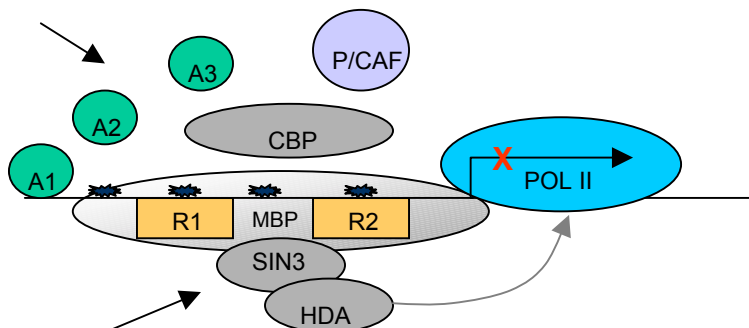


Abbildung 3b):

Transkriptionskomplex im Bereich der *Promoter-CpG-Islands*;

Aberrant hypermethyliertes *Promoter-CpG-Island* einer Krebszelle (methylierte *CpGs* als schwarze Sternchen); der Transkriptionskomplex scheint zerstreut und hat keinen Einfluss auf die DNA, während ein neuer Repressor-Komplex in Addition eines Methyl-cytosin-Bindungs-Komplexes (MBP) ganz nah an der DNA gebunden ist. Das Gen wird ausgeschaltet (rotes X am POL-II-Komplex), da der Überschuss an HDA im Repressor-Komplex sowie die Methylierung das Mitwirken von Acetylasen verhindert, was eine vermehrte De-Acetylierung des Chromatins zur Folge hat. In diesem Beispiel würde ein Histon-De-Acetylase-Inhibitor wie Trichostatin A keinen Einfluss auf die Reaktivierung der Gen-Expression haben, solange nicht eine De-Methylierung einen Zugriff auf den Aktivierungskomplex ermöglicht und somit die Acetylase-Aktivität erhöhen könnte.

### 1.3 Einfluss von zytogenetischen und molekularen Veränderungen auf die Therapie bei AML

Therapiemöglichkeiten für AML-Patienten umfassen (Poly-)Chemotherapie (IC), autologe Stammzelltransplantation (ASCT) (Burnett et al. 2002) oder allogene Stammzelltransplantation (Harousseau et al. 1997; Suciú et al. 2003). Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass das Alter der Patienten, die Leukozytenzahl (WBC) bei Diagnosestellung, die klinische Zuordnung (*de novo* AML oder *sAML*) sowie spezifische zytogenetische Aberrationen und das Ansprechen auf die erste Induktionstherapie zu den wichtigsten prognostischen Faktoren gehören. Zytogenetische und molekulargenetische Aberrationen kennzeichnen die verschiedenen Altersstufen der Patienten: AML bei Kindern und Jugendlichen, AML bei Erwachsenen und sekundäre AML. Patienten mit Aberrationen wie t(8;21), inv(16) und t(15;17) haben Studien zufolge eine bessere Prognose (Cho et al. 2003). Im Gegensatz dazu werden zytogenetische Aberrationen wie -7, 7q-, -5, 5q- oder ein komplexer Karyotyp mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Dastugue et al. 1995; Grimwade et al. 2001; Lancet et al. 2000; List et al. 2001; Rowley et al. 1982; Slovak et al. 2000; Willman 2001). Moderne Therapieprotokolle wie beispielsweise die AML-HD98A-Studien von Döhner und Kollegen beziehen diese prognostischen Faktoren bereits in die Therapiestrategie mit ein (Döhner et al. AML-HD98A-Studie). Zur Erforschung der Heterogenität der akuten Leukämien und deren Risikoeinteilung wurden Genexpressions-Profile mit der *Microarray*-Technologie erstellt. Ein weiteres Ziel dieser Profile ist die Studie über Wirkung und/oder Resistenz verschiedener Wirkstoffe bei AML-Patienten. In verschiedenen Publikationen wurden Genexpressions-Profile sowohl mit cDNA- als auch mit Oligonukleotid-*Microarrays* beschrieben (Armstrong et al. 2002; Debernardi et al. 2003; Golub et al. 1999; Okutsu et al. 2002; Ramaswamy et al. 2002; Schoch et al. 2002; Staunton et al. 2001), um Parameter über Zytogenetik, biologische Kovariablen und Therapieerfolg zu charakterisieren. Ergebnisse und Schlussfolgerungen solcher Untersuchungen sind abhängig von der Fragestellung, dem Patienten-*Pool* und der zugrundeliegenden Auswertungsmethode. So können Profile erstellt werden, die eine Patientengruppe nach gleichen Expressionsmustern klassifizieren oder Gene bezüglich spezifischer biologischer Parameter zuordnen (Ramaswamy und



Golub 2002). In einer Studie zur Abgrenzung von AML und ALL verwendeten Golub und Mitarbeiter als Auswertungsmethode der *Arrays self-organizing maps* (SOM) (Golub et al. 1999). Weitere Methoden zur Auswertung generierter Daten von *Microchip*-Untersuchungen sind Hierarchisches *Clustern* (Eisen et al), PCA (*principal component analysis*) und *k-means-Clustering*. Um spezifische Aussagen über bekannte Parameter zu machen, werden in *supervised Clustering*-Analysen verschiedene Algorithmen in die Auswertung integriert (Ben-Hur et al. 2002). Diese Methode setzt allerdings den Einsatz von leistungsstarken, parallel arbeitenden Computern voraus. Untersuchungen von Qian und Mitarbeitern mit Oligonukleotid-*Arrays* beschreiben die *Clustereinteilung* von 14 t-AML-Patienten in zwei Gruppen biologischer Parameter (Qian et al. 2002). Die erste Gruppe dieses Gen-Expressionsprofils zeigt erhöhte Expression bestimmter Gene (in Zellzyklus oder Zellwachstum involvierte Gene: *CDC2*, *BUB1*, *CCNA2*, *CCNE2*, *MYC*) sowie Expressionsverlust vom *ICSBP*-Gen (*Interferon consensus sequence binding protein*) bei Patienten mit komplexem Karyotyp unter Beteiligung von 5q-. Die zweite Einteilung betrifft Patienten mit normalem Karyotyp oder -7q, t(3;3) und t(3;11). Alle Patienten zeigten verminderte Expression von Transkriptionsregulatoren (*EKLF*, *GATA1*, *TAL1*) sowie eine Überexpression von *Bcl2* und *FLT-3*. Zum Einsatz kommende Wirkstoffe in der Therapie von AML-Erkrankungen umfassen Dexamethasone, Cytarabin, Thioguanine, Etoposid und Daunorubicin (DCTER) (Woods et al. 1993; Woods et al. 1996) oder bekannte Wirkstoffe in neuer Zusammensetzung wie Daunorubicin mit Cytarabin (Cortes et al. 2001; Cortes et al. 2003), ATRA (All-trans-Retinolsäure) und andere (Emerson et al. 2000; Jaeckle et al. 2001). Topoisomerase-I-Inhibitoren wie DE-310 (Inoue 2002), OSI211 (Emerson et al. 2000), Topotecan (Cortes et al. 2003), Clofarabine (Kantarjian et al. 2003) und Cyclosporin (Tsimberidou et al. 2003), Gemtuzumab ozogamicin (GO) (Zwaan et al. 2003), FLT-3 (Levis et al. 2002). Nukleosid-Analoga wie Decitabine (de Lima et al. 2003; El-Osta et al. 2003) kommen als methylierungsspezifische Wirkstoffe (Pedersen-Bjergaard et al. 2002; Willman 2001) oder angiogenese-spezifische Wirkstoffe zum Einsatz. Decitabine ist wirksam als hypomethylierender Wirkstoff bei MDS, AML und CML (Kantarjian et al. 1997a; Kantarjian et al. 1997b). In einer Studie von Silverman wurden Behandlungserfolge von Azacytidine (AZA) mit supportiven Maßnahmen verglichen, wobei AZA bessere Erfolge erzielt, da mehr Patienten auf AZA

ansprechen, die Transformationszeit kürzer und die Lebensqualität der Patienten höher ist (Silverman et al. 2002).

#### 1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

In myeloischen Neoplasien wurde sowohl Hypermethylierung von bestimmten Tumorsuppressor-Genen (TSG) als auch aberrante Histonacetylierung beobachtet (Ren et al. 2002; Xia et al. 2003). 5'AzaCdr (demethylierender Wirkstoff) und Trichostatin A (Histondeacetylase-Inhibitor) sind in der Lage, durch Hypermethylierung beziehungsweise Histon-Deacetylierung ausgeschaltete Gene zu reinduzieren. Um die Effizienz der beiden Medikamente 5'Aza und Trichostatin A bei AML-Erkrankungen zu untersuchen, werden AML-Zelllinien nach Behandlung mit beiden Substanzen allein sowie in Kombination untersucht. Zur Identifizierung der durch Hypermethylierung und/oder Hypoacetylierung ausgeschalteten Transkripte werden *Microarrays* verwendet. Der Schwerpunkt der Untersuchungen wurde auf folgende Fragestellungen gelegt:

1. Welche signifikanten Unterschiede werden im Vergleich des Expressionsprofils der unbehandelten AML-Linien mit dem Expressionsmuster von CD34<sup>+</sup>-Zellen und Zellen aus gesundem Knochenmark ermittelt?
2. Lässt sich ein charakteristisches, erkrankungsspezifisches Expressionsmuster von inaktivierten Genen aus dem Vergleich von behandelten mit unbehandelten AML-Zelllinien definieren? Lassen sich mit Hilfe des erstellten Profils eventuell Patienten vorselektieren, die von dieser antineoplastischen Behandlungstherapie profitieren?
3. Lassen sich die in den Array-Untersuchungen detektierten, durch De-Methylierung oder Histondeacetylase-Inhibitor reaktivierten Gene, die eine potentielle Rolle bei Zellproliferation und Zelldifferenzierung spielen, sowie mögliche TSG durch Untersuchungen auf Protein-Ebene verifizieren? Sind die betroffenen Gene selbst inaktiviert oder werden diese im Verlauf von Signal-Kaskaden durch andere inaktivierten Gene beeinflusst?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Standard-Geräte

Automatic Environmental Speed Vac SC 110	Savant, Minnesota, USA
Clean-Air, Type DLF BSS6	Biohazard, Göttingen
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Shelton, USA
FACS	Becton Dickinson, Heidelberg
Horizontal Electrophoresis System, Horizon 11.14	GIBCO BRL, Eggenstein
Hybridisierofen Mini 10	Hybaid, Franklin, USA
Kodak Kassetten	Fuji, Düsseldorf
Kühlzentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Lumat	Berthold, Bad Wildbad
Magnetrührer IKAMAG RET	Janke & Kunkel, Staufen
Multipipette	Eppendorf, Engelsdorf
Olympus CK2 Mikroskop	Zeiss, Jena
PhosphImager	Raytest, München
Photo-System Eagle Eye II	Stratagene, Heidelberg
Pipetten Reference	Eppendorf, Engelsdorf
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Pack P25	Biometria, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Engelsdorf
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
Vortexer VF2	Janke & Kunkel IKA, Staufen
Waage, Sartorius Universal	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	MGW, Lauda
Water-Jacketed Incubator	Forma Scientific, Ohio, USA

---

Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Engelsdorf
Zentrifuge, Minifuge T	Heraeus, Osterode
AutoMACS	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach

## 2.1.2 Standard-Chemikalien

Agar	DIFCO, Detroit, USA
Agarose	SIGMA, Deisenhofen
Aqua ad injectabile	Braun, Melsungen
5'Aza-2'-Deoxycytidine	SIGMA, Deisenhofen
dNTP Mix, 20mM	GIBCO, Eggenstein
DTT, 0,1M	Life Technologies, Karlsruhe
ECL	Amersham, Buckinghamshire, England
EDTA	SIGMA, Deisenhofen
First Strand Buffer (5x)	Life Technologies, Karlsruhe
Formamid	SIGMA, Deisenhofen
Human Cot-1 DNA	Life Technologies, Karlsruhe
Microhyb Hybridisierungslösung	Research Genetics, Huntsville, AL
PBS, 10x, steril	GIBCO, Eggenstein
Sodium 4-PB (Phenylbutyrat)	Calbiochem, Darmstadt
Poly dA (1µg/µl)	Research Genetics, Huntsville, AL
Poly dT (1µg/µl)	Research Genetics, Huntsville, AL
Reverse Transkriptase	Life Technologies, Karlsruhe
SDS	SIGMA, Deisenhofen
Trichostatin A ( <i>Streptomyces sp.</i> )	Calbiochem, Darmstadt
Trypan Blau	Seromed, Berlin
Tween 20	SIGMA, Deisenhofen
Valproinsäure	Calbiochem, Darmstadt

### 2.1.3 Enzyme

DNase I, RNase frei

Boehringer, Mannheim

### 2.1.4 Kits

ATPlite<sup>®</sup>-M

Packard Bioscience, Meriden, USA

RNeasy Total RNA Kit

Qiagen, Hilden

PCR Purification Kit

Qiagen, Hilden

Atlas SMART Probe Amplification Kit

Clontech, Palo Alto, CA, USA

CycleTest Plus DNA Reagent Kit

Becton Dickinson, Heidelberg

### 2.1.5 Kulturmedien

Ampicillin Sodium Salt

SIGMA, Deisenhofen

FCS, Fetales Bovine Serum

Serva, Heidelberg

L-Glutamine

Biowhittaker, Verviers, Belgien

RPMI 1640 Medium, ohne Glutamine, 1x

Seromed, Berlin

Trypsin-EDTA, 10x

GIBCO, Eggenstein

### 2.1.6 Gößenstandards

1kb DNA ladder

GIBCO, Eggenstein

100bp DNA ladder

GIBCO, Eggenstein

### 2.1.7 Radiochemikalien

<sup>33</sup>P- $\alpha$ -dCTP

Hartmann, Braunschweig

<sup>32</sup>P-  $\alpha$  -dCTP

Amersham, Buckinghamshire, England

## 2.1.8 Zelllinien und Zellen

	Bezeichnung	Medium	Zusätze	Teilungsrate	Optimale Zelldichte
<b>Kasumi-1</b>	AML	RPMI 1640	FCS 10 %	48 – 72 Stunden	1,5 x 10 <sup>6</sup> /ml
<b>HL-60</b>	AML, CML	RPMI 1640	FCS 10 %	25 Stunden	1 x 10 <sup>6</sup> /ml
<b>K562</b>	Blastenkrise	RPMI 1640	FCS 10 %	30 – 40 Stunden	1,5 x 10 <sup>6</sup> /ml
<b>NB-4</b>	APML	RPMI 1640	FCS 10 %	40 – 48 Stunden	1,5 x 10 <sup>6</sup> /ml
<b>CMK</b>	AML	RPMI 1640	FCS 10 %	40 – 50 Stunden	1,5 x 10 <sup>6</sup> /ml
<b>OCI-5</b>	AML	RPMI 1640	FCS 20 %	30 – 50 Stunden	2,5 x 10 <sup>6</sup> /ml
<b>LAMA-84</b>	Blastenkrise	RPMI 1640	FCS 10 %	50 Stunden	2 x 10 <sup>6</sup> /ml

Peripheres Blut von gesunden Probanden

CD34<sup>+</sup>-Zellen

*Total bone marrow (human bone marrow)*

## 2.1.9 Software

Pathways	Research Genetics, Huntsville, AL
Aida	Raytest, München
Cluster	Eisen, Stanford, USA ( <a href="http://www.resgen.com">http://www.resgen.com</a> )
Treeview	Eisen, Stanford, USA ( <a href="http://www.resgen.com">http://www.resgen.com</a> )

## 2.2 Standard-Lösungen und Standard-Puffer

DNA- Probenpuffer für Agarose-

Gele (1x):

50 % Glycerin

0,5 % Bromphenol Blau

0,5 % XCB

---

5x RNA-Ladepuffer:	Bromphenol Blau EDTA 500 mM, pH 8,0 37 % Formaldehyd 10 % Glycerol Formamid 10 x FA-Puffer
10x FA-Gelpuffer:	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
Trenngel (12 %)	30 % Acrylamidmix 1,5 M Tris (pH 8,8) 10 % SDS 10 % Ammoniumpersulfat 0,04 % TEMED
Sammelgel (5 %)	30 % Acrylamidmix 1 M Tris (pH 6,8) 10 % SDS 10 % Ammoniumpersulfat 0,1 % TEMED
TBE – Puffer (1x):	2,25 mM Tris-Borat 1 mM EDTA; pH 8,0
TE – Puffer (1x):	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA; pH 8,0
Waschpuffer für <i>MultiSortMACS</i>	1 x PBS 2 mM EDTA

---

Laufpuffer für <i>MultiSortMACS</i>	1 x PBS 2 mM EDTA 0,5 % BSA; pH 7,2 Entgasen mit Sterilfilter
Coomassie-Färbelösung	0,25 % Brilliant Blau 45 % Methanol 10 % Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	45 % Methanol 10 % Essigsäure
Laemmli-Puffer (4x)	2000 mM Tris HCl ; pH 6,8 400 mM DTT 8 % SDS 0,4 % Bromphenol Blau 40 % Glycerin
Lysis-Puffer	50 mM Tris Base; pH 7,4 25 mM EDTA; pH 8,0 650 mM NaCl 5 % Triton X 100
RNA-Probenpuffer (1x)	20 % Urea 0,3 % Bromphenol Blau 0,3 % XCB 67% Formamid
TBE-Puffer (1x)	2,25 mM Tris-Borat 1 mM EDTA ; pH 8,0



Transferpuffer zum *Semidry Blotting* :

1 x Anoden I-Puffer	30 mM Tris Base; pH 10,4 20 % Methanol
1 x Anoden II-Puffer	300 mM Tris Base; pH 10,4 20 % Methanol
1 x Kathoden-Puffer	25 mM Tris Base; pH 9,7 20 % Methanol 40 mM 6-Aminohexansäure
Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer (5x)	125 mM Tris Base; pH 8,3 1,25 M Glycin 0,5 % SDS

## 2.3 Molekularbiologische Standardmethoden

### 2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

#### 2.3.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Durch Messung der Extinktion bei 260 nm kann die Konzentration der Nukleinsäure im Spektralphotometer bestimmt werden (Sambrook et al. 1989). Eine einfache optische Dichte ( $OD_{260nm} = 1$ ) entspricht der Konzentration von 40 µg/ml RNA beziehungsweise von 50 µg/ml DNA.

Der Quotient aus der gemessenen Extinktion  $E_{260nm}/E_{280nm}$  ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung und soll zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

$$\text{conc} = OD_{260} \quad \times \quad \frac{50 \mu\text{g} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000 \mu\text{l}}$$

### 2.3.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung in Agarose-Gelen

Die Konzentration sehr geringer Mengen von Nukleinsäuren kann spektralphotometrisch nicht erfasst, jedoch im Vergleich mit Standard-DNA-Lösungen in Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gelen geschätzt werden. Das 1636 bp-Fragment der 1 kb DNA-Ladder (GIBCO, Eggenstein) enthält genau 100 ng DNA/ $\mu$ l.

## 2.3.2 Gel-Elektrophorese von DNA und RNA

### 2.3.2.1 Agarose-Gele

Durch Anlegen einer konstanten Stromstärke können DNA- und RNA-Fragmente in nichtdenaturierenden Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt werden (Sambrook et al. 1989). Abhängig von der zu erwartenden Fragmentgröße kann der Anteil an Agarose von 0,5 - 3 % variiert werden. Nachdem das Gel in Gelkammern gegossen wurde, erfolgt das Einbringen der Proben (DNA/RNA) in die Geltaschen. Bei RNA-Proben werden vier Teile RNA-Probe mit einem Teil 5 x RNA-Ladepuffer gemischt, 3 - 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Der Laufpuffer (DNA/RNA) wird in die Kammer mit dem Gel gegeben. Die Stromstärke kann zwischen 50 und 150 mV gewählt werden, je nach Größe des Gels und unter Berücksichtigung der Gelkonzentration.

Zusammensetzung RNA-Gel: 1,2% Agarose  
Formaldehyd  
Runningbuffer (10 x)  
HCHO-Formaldehyd

Zusammensetzung DNA-Gel: 0,5-3% Agarose  
1 x TBE-Puffer

Durch Anfärbung der Fragmente mit Ethidiumbromid können diese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

## 2.3.3 Extraktion von RNA

### 2.3.3.1 Trizol<sup>®</sup>-Isolierung

Für die Isolierung von DNA und RNA werden die Zellen ( $1 \times 10^7 - 5 \times 10^7$ ) mit 1 x PBS gewaschen, pelletiert und in entsprechendem Volumen Trizol<sup>®</sup> (GIBCO, Eggenstein) resuspendiert (pro  $5 \times 10^6$  Zellen je 1ml Trizol<sup>®</sup>). Nach Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur werden pro Milliliter Trizol<sup>®</sup> 0,2 ml Chloroform zugegeben, gemischt und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Trennung der Phasen wird 15 Minuten bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Die RNA in der oberen wässrigen Phase wird in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Protein und DNA verbleiben in der organischen Phase. Pro Milliliter Trizol erfolgt die Zugabe von je 0,5 ml Isopropylalkohol. Nach Mischen und Inkubieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur wird 10 Minuten bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert, wodurch die RNA pelletiert wird. Nach Entfernen des Überstands wird mit 75 % Ethanol gewaschen. Die Qualität der RNA-Proben kann anschließend mit einem denaturierenden, formamidhaltigen Agarose–Gel geprüft werden.

### 2.3.3.2 RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden)

Zur RNA-Isolierung werden die Zellen ( $1 \times 10^7$  in Lyse-Puffer (RLN, Qiagen) aufgenommen. Durch Zentrifugation werden die Kerne getrennt. Die Bindung der RNA an die Membran der Säulen kann durch Zugabe von Lyse-Puffer (RLT, Qiagen) und Ethanol optimiert werden. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (RW1 und RPE, Qiagen) wird die RNA mit RNase-freiem Wasser aus der Säule eluiert. Die RNA kann in einer Konzentration von 1 µg/µl bei –70 °C in kleinen Aliquots gelagert werden.

### 2.3.4 Amplifizieren von kleinen RNA-Mengen

Da die Ausbeute an RNA oft durch eine begrenzte Anzahl an Zellen limitiert ist, kann die RNA-Menge amplifiziert werden. Bereits 0,2 µg RNA reichen bei der Verwendung des Atlas *SMART-Probe-Amplification-Kit* (Clontech) aus, um die erforderliche Menge für *Array*-Hybridisierungen zu erhalten. Am 5'-Ende der RNA wird der *SMART-CDS-Primer* angehängt. Erreicht die Reverse Transkriptase (RT) das 3'-Ende der mRNA, werden Oligonukleotide (Deoxycytidin) angehängt. Das SMART-II-Oligonukleotid mit einer Oligo(G)-Sequenz am 3'-Ende bindet an die Deoxycytidin-Sequenz. Das Enzym RT repliziert weiter bis zum Ende des Oligonukleotids. Die resultierende cDNA (Einzelstrang) enthält nun Sequenzen, die zum SMART-Oligonukleotid komplementär sind. Die cDNA kann mittels PCR amplifiziert werden, wobei die optimale Zyklenzahl ermittelt werden muss. Alle RNA-Proben wurden laut Protokoll des Herstellers amplifiziert.

## 2.4 Zellkultur

### 2.4.1 Kultivierung von Zelllinien

Sowohl Suspensions- als auch adhärente Zelllinien werden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % im Inkubator kultiviert. Während Suspensionszelllinien zwei- bis dreimal wöchentlich mit frischem Medium versorgt werden, müssen beim Mediumwechsel der adhärenen Zelllinien die Zellen von der Plastikoberfläche des Kulturgefäßes mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (GIBCO, Eggenstein) gelöst werden. Anschließend können die abgelösten Zellen mit PBS (1 x) gewaschen werden, um das Trypsin zu entfernen. Die Zellen werden anteilig in frischem Medium resuspendiert und danach in neue Kulturflaschen gegeben.

Die Suspensionszelllinien zeigen ein Wachstumsoptimum, das von Zelllinie zu Zelllinie leicht variieren kann. Je nach Dichte werden entsprechende Anteile mit neuem Medium versetzt. Additiv wird das Medium mit 1 % L-Glutamin (Biowhittaker) und 1 % Antibiotic/Antimykotic-Lösung sowie mit inaktiviertem FCS (fötales Kälberserum) versetzt. Die Inaktivierung erfolgt durch eine Temperatur von 56 °C für 30 Minuten. Zur Behandlung der Zellen mit 5'AzaCdr wird 5'AzaCdr

in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zu den Zelllinien gegeben und jeweils unterschiedlich lang inkubiert.

## 2.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Durch Zugabe des Farbstoffes Trypan-Blau (Seromed, Berlin; Verdünnung 1 : 10) werden Zelltrümmer und tote Zellen blau markiert, sodass nicht gefärbte Zellen über eine definierte Fläche einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt werden können. Durch Umrechnung der Zellzahl lässt sich die Zellkonzentration bestimmen.

## 2.4.3 Dauerkulturen

Maximal  $1 \times 10^6$  Zellen werden im Verhältnis 80 : 20 mit DMSO versetzt und als Dauerkultur in flüssigem Stickstoff gelagert. Um Dauerkulturen zu rekultivieren, werden sie kurz angetaut und in 37 °C warmes Medium überführt. Um DMSO zu entfernen, werden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und anschließend in frischem Medium resuspendiert.

## 2.4.4 Selektion von CD34<sup>+</sup>-Zellen

CD34<sup>+</sup>-Zellen lassen sich mit Hilfe des *CD34<sup>+</sup>-MultiSort Kit* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) aus peripherem Blut isolieren. Die CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen werden mit *CD34<sup>+</sup>-MultiSort MicroBeads* markiert und im magnetischen Feld der MACS<sup>®</sup>-Säulen im MACS<sup>®</sup>-Separator angereichert. Nach einer Dichtegradient-Zentrifugation (Ficoll-Paque) werden  $2 \times 10^8$  mononukleäre Zellen in PBS gewaschen und in 600  $\mu\text{l}$  Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  *FcR-Blocking Reagent* (um unspezifische Bindung oder FC-Rezeptor-Bindung der *MicroBeads* an *non-target-cells* zu unterbinden) werden die Zellen mit 200  $\mu\text{l}$  der *CD34<sup>+</sup>-MultiSort MicroBeads* 30 Minuten bei 6 - 12° C inkubiert. Die

---

Zellen werden anschließend gewaschen, zentrifugiert und in einem Volumen von 500 µl Puffer resuspendiert und magnetisch separiert.

## **2.5 Hybridisierung auf *Genefilter* GF200-205 (Research Genetics, Huntsville, AL)**

### **2.5.1 Umschreibung von RNA in cDNA und radioaktive Markierung**

5 µg Proben-RNA werden bei 95 °C fünf Minuten denaturiert und mit *Oligo-dT-Primern* hybridisiert. Anschließend wird die RNA mit Reverser Transkriptase unter Zugabe von DTT (1M), dNTP's (dATP, dGTP, dTTP, 20 mM) und entsprechendem Puffer bei 37 °C für 90 Minuten in cDNA umgeschrieben. Durch gleichzeitige Zugabe von <sup>33</sup>P-α-dCTP (10 mCi/ml) kann die cDNA radioaktiv markiert werden. Nach Aufreinigen der markierten Probe wird deren Aktivität im *Scintillation-Counter* in *Counts per Minute (CpM)* gemessen. Die Probe wird im Wasserbad bei 96 °C für drei Minuten denaturiert und anschließend zu den bereits vorhybridisierten Filtern gegeben.

### **2.5.2 Vorhybridisieren der Filter**

Die Membranen müssen so in die Hybridisierflaschen (Hybaid) gegeben werden, dass die Seite mit der DNA in das Flascheninnere zeigt. Die Filter dürfen sich nicht überlappen, und Blasen zwischen Glas und Membran sind zu vermeiden. Pro Flasche werden 5 ml Hybridierungslösung zugegeben und als *Blocking-Reagenzien* additiv je 5 µg Human Cot-1 DNA (Life Technologies) und *Poly dA-Primer* (Research Genetics) zugegeben. Erst nach einer Vorhybridisierung bei 42 °C und 10 Umdrehungen pro Minute für 120 Minuten im Hybridisierungssofen wird die markierte Probe zugegeben.

### **2.5.3 Hybridisierung und Waschschr**

Nach Zugabe der markierten cDNA wird bei 42 °C und 10 Umdrehungen pro Minute über Nacht hybridisiert. Danach erfolgen zwei Waschschr für jeweils 30 Minuten bei 55 °C im Hybridisierungssofen. Die Waschlösung für die erste Waschung enthält 2 x SSC, 1 % SDS, während Waschlösung 2 aus 0,5 x SSC und 1 % SDS zusammengesetzt ist. Nach dem Waschen dürfen die Membranen zu keiner Zeit trocknen und müssen daher in Folie verpackt werden.

### **2.5.4 Exposition und Scannen der Filter**

Die Exposition der Filter erfolgt entweder durch Auflegen von Kodak-Filmen oder auf Phospho-Platten für 24 - 120 Stunden (in Abhängigkeit der Radioaktivität). Die entwickelten Filme beziehungsweise Phospho-Platten werden eingescannt und anschließend mit den entsprechenden Software-Programmen ausgewertet.

### **2.5.5 Entfernen der radioaktiven cDNA**

Zur Wiederverwertung muss die gebundene cDNA entfernt werden. Mit 0,5 % SDS-Lösung kann die cDNA von den Filtern bei 55 °C im Hybridisierungssofen für eine Stunde gewaschen werden. Danach können die Membranen in Folie verschweißt bei 4 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert werden.

## **2.6 Verwendete Genfilter und Software-Programme**

Zur Auswertung der hybridisierten Filter werden spezielle Software-Programme (*Pathways 3.1*<sup>®</sup> und *AIDA*<sup>®</sup>) zum Lokalisieren und Quantifizieren der Intensitäten verwendet. Das speziell für *Genefilter*<sup>®</sup> der Firma Research Genetics (Huntsville, AL) entwickelte Analyseprogramm ermöglicht die exakte Zuordnung der einzelnen Punkte und darüber hinaus den Vergleich der ermittelten Intensitäten. Additiv wird

das Software-Programm der Firma Raytest zur Analyse der Rohdaten eingesetzt, kommt aber in der vorliegenden Arbeit nicht in die Auswertung.

Die Membranen sind aufgeteilt in zwei große Bereiche, Feld eins und Feld zwei. Jedes Feld ist unterteilt in acht Gitter, die von rechts nach links mit A bis H benannt sind. Jedes der Gitter ist in zwölf Spalten und dreißig Reihen unterteilt. Kontroll-DNA-Punkte sind jeweils in der rechten Spalte eines jeden Gitters enthalten, die zur genauen Positionierung dienen (Abbildung 4). Jeder Punkt enthält 0,5 ng DNA eines cDNA-Klons. Diese werden vom Hersteller isoliert, sequenziert und verifiziert. Laut Hersteller kann in etwa 1 % der Punkte herstellungstechnisch bedingt weniger DNA enthalten sein oder sogar komplett fehlen. Ein Katalog der *gespotteten* Gene auf den jeweiligen Membranen ist als *ftp-File* auf der Homepage des Herstellers abrufbar (<http://www.resgen.com>).

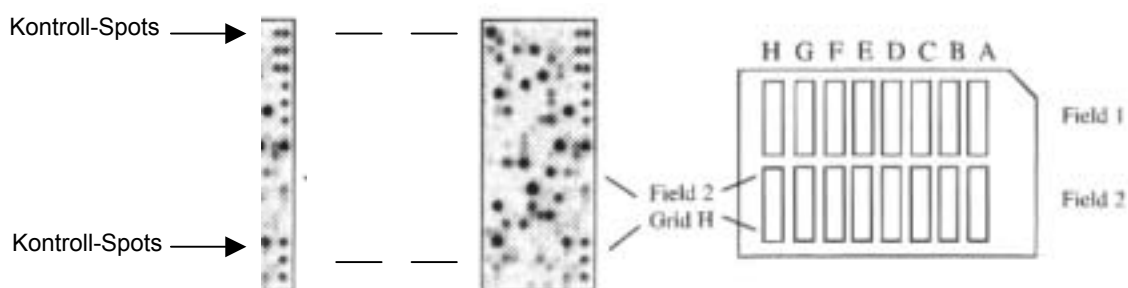


Abbildung 4: *GeneFilter* (Research Genetics)

### 2.6.1 *AIDA Array Matrix* und *AIDA Compare* (Raytest)

*AIDA ARRAY Matrix* ermöglicht das Evaluieren quantitativer und qualitativer Daten verschiedener *Microchip*-Experimente. Namenslisten der DNA-Punkte auf den Membranen können importiert, Muster definiert und Algorithmen für optimale automatische Positionierung der zu messenden Punkte berücksichtigt werden. Im *AIDA Image Software* Programm werden die jeweiligen *Templates* (Gitternetz-Schablone) an den *eingescannten* Membranen ausgerichtet, damit eine Übereinstimmung eines Punktes auf der Membran zu den zugehörigen definierten Punkten aus den Listen gewährleistet ist. Unter Einstellung der exakten



Anzahl von Feldern, Spalten und Reihen wird ein spezifisches Gitternetz erstellt und an den Kontroll-DNA-Punkten positioniert. Die Definition der Kontroll-Punkte, Leerwert-Punkte (Negativ-Kontrollen) sowie Positiv-Kontroll-Punkte ermöglicht das Generieren eines spezifischen *Templates*. Die Intensitäten der Punkte werden integriert und in einer Ergebnis-Tabelle angezeigt. Dieser Ausrichtungsprozess kann durch drei Parameter modifiziert werden. Der Durchmesser des Feldes, das in die Berechnung mit einbezogen wird (*Diameter*) sowie der Hintergrund (*Background*) der Membran müssen definiert werden. Alle Punkte, die unterhalb dieses Wertes liegen, werden aus der Analyse ausgeschlossen. Außerdem wird die Entfernung der Fläche bestimmt, die maximal vom Punkt abweicht und mit einberechnet wird (*Mobility*). Das Programm prüft nun, ob alle Positiv-Kontroll-Punkte Maximalwerte haben, Punkte mit der gleichen DNA gleiche Intensitäten und Leerwert-Punkte einen Minimalwert aufweisen. Das Programm positioniert nun alle Punkte im Bereich ihres Maximums. Gelingt dies nicht, wird vom Programm die optimale Position berechnet. Um den Hintergrund zu berücksichtigen, werden verschiedene Hintergrundpunkte ausgewählt und interpoliert (*weighted background dots*).

Um Ergebnisse zweier Arrays vergleichbar zu machen, müssen die individuellen Ergebnisse normalisiert werden. Nach der Integration (Integral oder Integral minus Hintergrund) hat jeder Wert eines Punktes Bezug sowohl zum Mittelwert aller Punkte als auch zu individuell ausgewählten Punkten.

### **2.6.2 AIDA Array Compare**

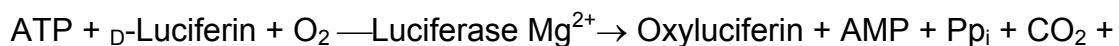
Grundlage für *AIDA Array Compare* sind die gewonnenen Daten aus *AIDA Array Matrix*. Nachdem die zu vergleichenden *Arrays* in das Programm geladen sind, stehen verschiedene mathematische Operationen für den Abgleich zur Verfügung. In dieser Arbeit werden die Daten mit korrigiertem Hintergrund integriert. Die Werte werden als Summe, Differenz, Produkt oder Ratio in einer Tabelle angezeigt, die exportiert werden kann. Die lineare Korrelation der beiden *Arrays* sowie die Linien plus und minus einer Standardabweichung werden im Korrelation-Fenster gezeigt.

### 2.6.3 Cluster und TreeView (Eisen)

Nur Gene mit einer zweifach höheren Intensität als der gemessene Hintergrund werden als Rohdaten im Median normalisiert und so jeder Filter mit *Cluster* und *Treeview-Software* analysiert. Nur die so ermittelten Gene werden in der Analyse des hierarchischen *Clusters* berücksichtigt. Nachdem die Gene in *Cluster* zusammengefasst werden, können diese *Cluster* im *TreeView*-Programm graphisch dargestellt werden.

## 2.7 ATP-Messung

Zur Bestimmung der Zellproliferations- und Viabilitätsrate werden mit dem *ATPLite™-M-Kit* (Packard, Dreieich) intrazelluläre ATP-Werte gemessen. Adenosin-Tri-Phosphat ist präsent in allen metabolisch aktiven Zellen und degradiert sehr schnell in nekrotisierenden oder apoptotischen Zellen. Reagiert ATP mit der Luciferase und D-Luciferin, so wird Licht produziert, das im Luminometer gemessen werden kann und proportional der ATP-Konzentration ist.



### Licht

Die Zellen werden in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  in 96er Loch-Platten in 100  $\mu\text{l}$  Medium pro Loch bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Lyse-Puffer (50  $\mu\text{l}$ /Loch) wird nach Anleitung laut Hersteller zu den Zellen gegeben, die bei Raumtemperatur fünf Minuten lang geschüttelt werden müssen. In *ATPLite-M*-Puffer gelöste Luciferase wird anschließend dazugegeben und bei Raumtemperatur für fünf Minuten geschüttelt. Innerhalb der nächsten fünf Stunden müssen die ATP-Werte im *LumiCount™-Luminometer* (Lumat) gemessen werden.

## 2.8 Western Blot

Proteine werden aus Zelllysaten gewonnen, die anschließend in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Der Transfer von Proteinen aus einem SDS-Trenngel auf eine Transfermembran (Millipore) wird mit der "Semidry-Blot"-Kammer von Hölzel durchgeführt. Zum Nachweis der gebundenen Proteine auf der Membran wird diese Amidoschwarz gefärbt. Zur spezifischen Detektion einzelner Proteine wird die Membran mit Antikörpern inkubiert. Der erste Antikörper ist proteinspezifisch und wird mit einem zweiten, HRP- (*Horse-Radish-Peroxidase*) gekoppelten Antikörper inkubiert. ECL-Lösung dient als Detektionsreagenz und lässt die durch Chemilumineszenz übermittelten Signale auf Hyperfilm-ECL (Amersham, Braunschweig) sichtbar werden. Membranen lassen sich nach Entfernen der Antikörper wiederverwenden.

### 2.8.1 Proteingewinnung aus Zelllysaten

In PBS gewaschene Zellen werden zur Lyse in 1 x SDS Gel Probenpuffer (Laemmli) resuspendiert und auf 95 °C 10 Minuten lang erhitzt. Bleibt das Lysat zähflüssig, wird es für 15 Minuten bei –80 °C tiefgekühlt und erneut erhitzt. Dieser Temperaturwechsel verursacht Brüche der genomischen DNA, wodurch das Lysat dünnflüssiger wird.

### 2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gel und Gel-Elektrophorese

Abhängig von der gewünschten Auftrennung wird das Trenngel mit 5 – 20 % PAA (Polyacrylamid) gegossen und mit 300 µl Butanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgt vertikal für 30 Minuten. Nach Entfernen des Butanols wird das Sammelgel auf das Trenngel aufgetragen und ebenfalls für 30 Minuten vertikal polymerisiert. Nach dem Einbringen der Proteinproben in 1 x SDS Gel-Probenpuffer lässt man die Proben zunächst bei 80 Volt in 1 x Tris-Glycerin-Elektrophoresepuffer für kurze Zeit „einlaufen“, um dann die Stromspannung bei 30 Volt konstant über Nacht anzulegen.

### 2.8.3 Transfer durch *Semidry-Blotting*

Gel und Transfermembran legt man zwischen Chromatographie-Papiere (Schleicher + Schuell; 3 mm), die zuvor mit Transferpuffer getränkt werden. Luftblasen sind zu vermeiden, da sie den Stromfluss und somit den Transfer behindern.

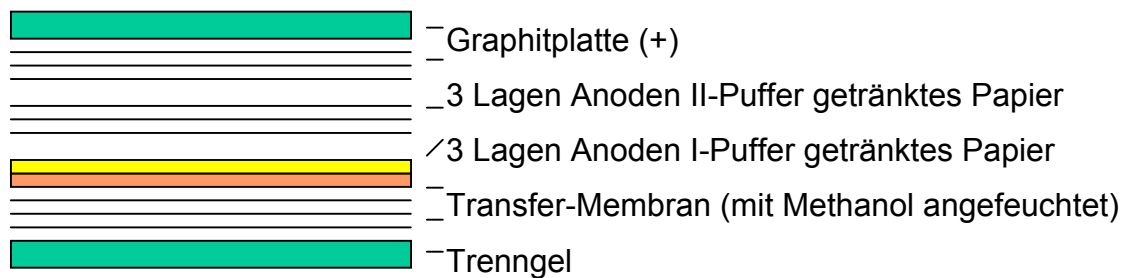


Abbildung 5: Schéma des *Semidry Blottings*

2 x 3 Lagen Chromatographie-Papiere werden mit Anoden-Puffer getränkt und auf die Anoden-Graphit-Platte gelegt. Die mit Methanol angefeuchtete Transfermembran wird mit Anoden-Puffer getränkt und auf die Chromatographie-Papiere gelegt. Anschließend wird das in Kathodenpuffer getränkte SDS-Trenngel aufgelegt. Zwischen Trenngel und Kathoden-Graphit-Platte werden drei in Kathoden-Puffer getränkte Chromatographie-Papiere gebracht (Abbildung 5). Nach Transfer durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 200 mA für eine Stunde kann die trockene Membran bis zur Antikörper-Markierung bei Raumtemperatur gelagert werden.

### 2.8.4 Amidoschwarz-Färbung

Die Färbung zum Nachweis der transferierten Proteine erfolgt für fünf Minuten in einer *Amidoblack*-Lösung. Für die Entfärbung der Membran wird *Amidoblack-Destain*-Lösung verwendet.

### 2.8.5 Antikörper-Markierung der Transfermembran

Zum Blocken wird die Membran zunächst mit Milchproteinen beschichtet und für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt, um die unspezifische Hintergrund-Markierung der Antikörper zu reduzieren. Proteinspezifische Antikörper werden mit 1 x PBS, 0,05 % Tween 1 : 100 bis 1 : 10000 verdünnt. Die erforderliche Konzentration, Inkubationszeit und optimale Inkubationstemperatur müssen ausgetestet werden. Um eine gleichmäßige Durchmischung des Puffers zu gewährleisten, wird auf einem Schüttler bei 4 °C zwei Stunden inkubiert. Der Antikörper wird entfernt und kann bei 4 °C für zwei Monate zur Wiederverwendung gelagert werden. Es folgen zwei Waschschrte mit 1 x PBS, 0,05 % Tween für je 15 Minuten. Der zweite, HRP-gekoppelte Antikörper wird 1 : 5000 bis 1 : 10000 verdünnt, zur Membran gegeben und ebenfalls zwei Stunden unter Schütteln inkubiert. Nach Entfernen des zweiten Antikörpers wird erneut zweimal mit 1 x PBS, 0,05 % Tween je 15 Minuten gewaschen. Die Membran wird anschließend in ein ECL-Bad getaucht und in Seran-Folie gepackt. Nach Auflegen des Hyperfilms-ECL (Amersham, Braunschweig) können die durch Chemilumineszenz übertragenen Signale nach erforderlicher Expositionszeit detektiert werden.

### 2.8.6 Entfernen der Antikörper von der Transfermembran (*Strippen*)

Western-Blot-Membrane lassen sich mehrmals verwenden, nachdem die Antikörper von der Transfermembran durch *Strippen* entfernt wurden. Die trockene Membran wird kurz in einem Methanol-Bad angefeuchtet und anschließend für 30 Minuten in *Western-Strip*-Lösung (1 x) bei 65 °C im Hybridisierungssofen rotiert. Danach wird die Membran mit 1 x PBS, 0,05 % Tween gespült und kann erneut zur Markierung verwendet werden.

## 2.8.7 Antikörper

Tabelle 3.1: Erst- und Zweit-Antikörper verschiedener Gene für Western-Blot-Untersuchungen.

<b>Gen</b>	<b>1.Antikörper</b> (Hersteller)	<b>2.Antikörper</b>	<b>Größe</b> <b>Protein</b> (kD)	<b>Verdünnung</b> Antikörper1/2
Actin	Actin (Santa Cruz)	Anti- <i>goat</i>	45	(1:500)/(1:5000)
EphA8	EphA8 (Santa Cruz)	Anti- <i>goat</i>	120	(1:250)/(1:5000)
Checkpoint suppressor 1	CHK1 (Cell Signaling)	Anti- <i>rabbit</i>	56	(1:250)/(1:5000)
	Phospho-CHK1 (Cell Signaling)	Anti- <i>rabbit</i>	56	(1:250)/(1:5000)
MEK- <i>Pathway</i>	MEK1/2 (BD Pharmingen)	Anti- <i>rabbit</i>	45/46	(1:500)/(1:5000)
MEK- <i>Pathway</i>	Phospho-MEK1/2 (Cell Signaling)	Anti- <i>rabbit</i>	45/46	(1:500)/(1:5000)
MEK- <i>Pathway</i>	P38 (Cell Signaling)	Anti- <i>rabbit</i>	38	(1:500)/(1:5000)
MEK- <i>Pathway</i>	Phospho-p38 (Cell Signaling)	Anti- <i>goat</i>	38	(1:500)/(1:5000)
MEK- <i>Pathway</i>	P90rsk (Cell Signaling)	Anti- <i>rabbit</i>	90	(1:500)/(1:5000)
MEK- <i>Pathway</i>	PP2A (Santa Cruz)	Anti- <i>goat</i>	36	(1:500)/(1:5000)
MEK- <i>Pathway</i>	P44/42 (CellSignaling)	Anti- <i>rabbit</i>	44/42	(1:500)/(1:5000)
MEK- <i>Pathway</i>	Phospho-ELK1 (Cell Signaling)	Anti- <i>rabbit</i>	62	(1:500)/(1:5000)
MEK- <i>Pathway</i>	Phospho-raf (Cell Signaling)	Anti- <i>rabbit</i>	74	(1:500)/(1:5000)
Histon-H4	Histon-H4	Anti- <i>rabbit</i>	10	(1:1000)/(1:5000)

Tabelle 3.2: Die Zelllinien wurden mit einem spezifischen MEK-Inhibitor (U0126, Calbiochem, San Diego) und einer Negativ-Kontrolle für U0126 (U0124, Calbiochem, San Diego) vorbehandelt und nach 18, 24 und 48 Stunden Inkubation Proteine isoliert.

<b>Positiv/Negativ-Kontrolle MEK1/2</b>	<b>Bezeichnung (Hersteller)</b>	<b>Konzentration</b>
MEK Inhibitor	U0126 (Calbiochem, San Diego)	20 $\mu$ M
Negativkontrolle MEK Inhibitor	U0124 (Calbiochem, San Diego)	30 $\mu$ M

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Zelllinien

Die Einteilung der untersuchten Zelllinien in FAB-Subtypen ist in der Tabelle 4 zusammengefasst. Während HL-60 und Kasumi-1 Zelllinien vom Subtyp M2 sind, handelt es sich bei NB-4 um eine AML FAB M3 (Tabelle 4). OCI-AML 5 repräsentiert die FAB-Klasse M4, und CMK wird als akute megakaryozytische Leukämie zum Subtyp M7 gezählt. Zum Vergleich wurde auch LAMA-84 mit den Merkmalen der chronisch myeloischen Leukämie im Blastenschub untersucht. Diese Linie ist zudem *bcr-abl* positiv.

Tabelle 4: Charakterisierung der untersuchten Zelllinien nach FAB-Klassifikation

Zelllinie	FAB-Typ	Genom-Typ	Aberrationen
CMK	Akute megakaryozytische Leukämie-M7	Hypo-tetraploider Karyotyp mit Polyploidie (8%)	-X, -Y, -2, -3, +5, -6, -6, -8, +11, -15, -15, +16, -17, -19, +21, +22, +7-11mar, add(1)(q31), add(1)(p36), add(3)(q11), del(3)(p14)x2-3, add(5)(q11), add(5)(q13), dup(8)(q11q21), add(8)(q13-21), del(8)(q11), del(9)(p21)x2, add(9)(q11)x2, del(10)(q22q24), der(11;17)(q10;q10), der(11)dup(11)(p13p15)t(5;11)(q11;p15)x1-2, del(11)(q23), add(12)(p13)x2, add(17)(p1?), add(18)(q23)x2-3, add(19)(p13), der(20)t(1;20)(q2?5;q1?2)x2, add(22)(q13);
HL-60	Akute myeloische Leukämie-M2	Hypo-tetraploider Karyotyp mit hypo-	-X, -X, -8, -8, -16, -17, -17, +18, +22, +2mar, ins(1;8)(p?31;q24hsr)x2, der(5)t(5;17)(q11;q11)x2,



		diploiden Nebenformen und Polyploidie (1,5%); 82- 88<4n>XX	add(6)(q27)x2, der(9)del(9)(p13)t(9;14)(q?22;q?22) x2, der(14)t(9;14)(q?22;q?22)x2, der(15)t(16;17)(q22;q22)x1-2, add(18)(q21); Nebenform mit -2, - 5, -15, del(11)(q23.1q23.2)
Kasumi-1	Akute myeloische Leukämie-M2	Hypo- diploider Karyotyp; 45<2n>X	t(8;21)(q22;q22) ETO-AML- Fusions-Gen, -Y, -9, -13, -16, +3mar, t(8;21)(q22;q22) der(9)t(9;?)(p22;?), der(15)t(?9;15)(?q11;?p11)
LAMA-84	Chronisch myeloische Leukämie in Blastenkrise	Hyper- triploider Karyotyp mit Polyploidie (3,6%); 73/74(69- 77)<3n>XX	-X, +1, -2, +5, +6, +8, +13, -14, +17, +17, -18, +22, +mar, del(7)(p15), der(9)t(9;22)(q34;q11)x2, i(11q), add(13)(q33), del(17)(p12), der(22)t(9;22)(q34;q11)x4
NB-4	Akute promyeloische Leukämie-M3	Hyper- triploider Karyotyp mit Polyploidie (3%); 78(71- 81)<3n>XX	PML-RARA-Fusionsgen t(15;17)(q22;q11-12.1), -X, +2, +6, +7, +7, +11, +12, +13, +14, +17, - 19, +20, +4mar, der(8)t(8;?)(q24;?), der(11)t(11;?)(?;?), der(12)t(12;?)(p11;?), 14p+, der(19)t(10;19)(p21.1;p13.3)x2
OCI-AML5	Akute myeloische Leukämie-M4	Hyper- diploider Karyotyp; 48(44-48) <2n>XY	+1, +8, der(1)t(1;19)(p13;p13)

## 3.2 Ermittlung der optimalen Konzentration und Inkubationszeit von 5'AzaCdr und Trichostatin A zur Behandlung der Zelllinien

### 3.2.1 ATPlite®-Messungen zur Ermittlung der Inkubationszeit

Sowohl bei unbehandelten als auch mit 5'AzaCdr (5 µM) behandelten Zellen wurden nach zwei bis sechs Tagen die ATP-Werte gemessen. Beim Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zeigt sich, dass bei HL 60 und NB-4 bereits nach zwei Tagen die intrazellulären ATP-Leveln deutlich abnehmen. Zellen von CMK und LAMA-84 sterben spontan, daher waren keine Messungen möglich. Bei den anderen Zelllinien hat das Medikament auch nach sechs Tagen Inkubation keinen Einfluss auf die ATP-Werte (siehe Abbildung 6a-e).

Abbildung 6a)

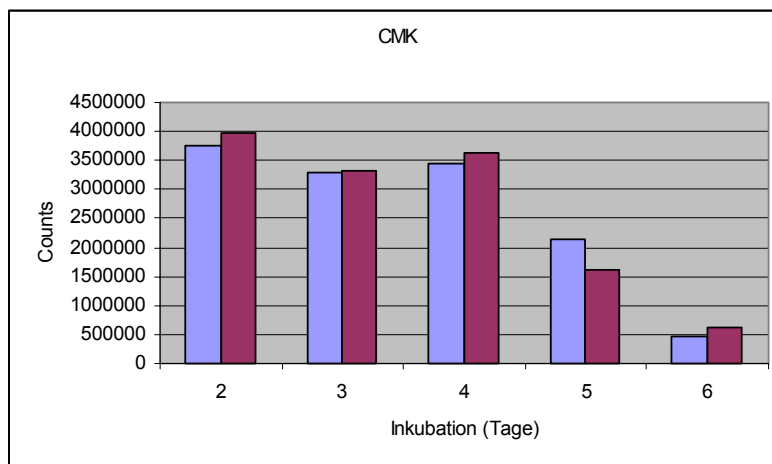


Abbildung 6b)

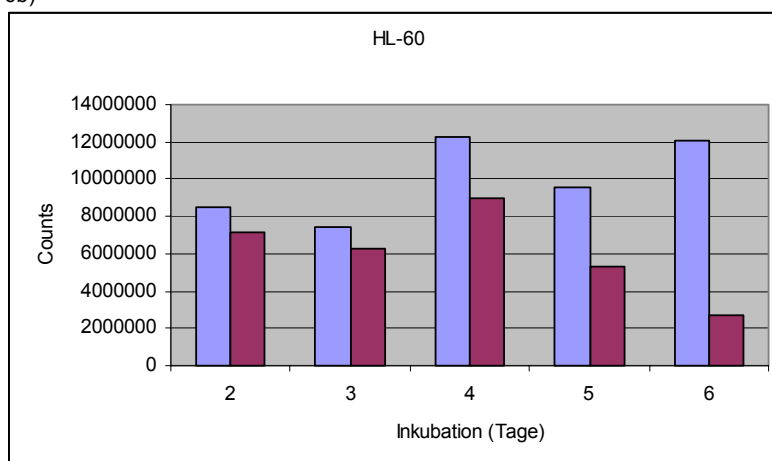


Abbildung 6c)

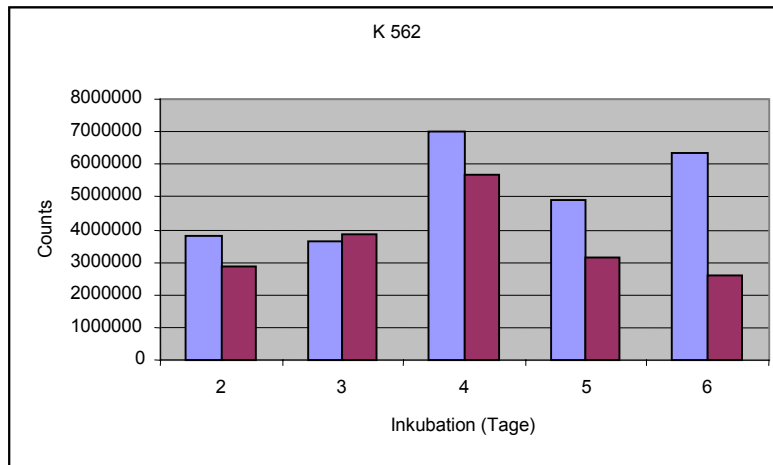


Abbildung 6d)

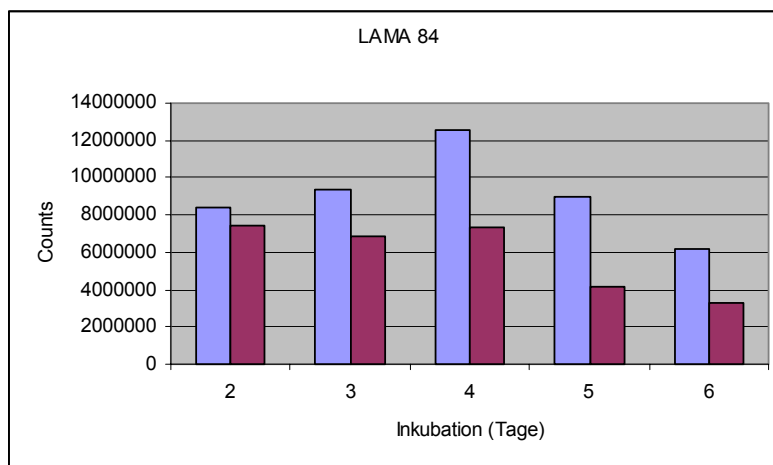


Abbildung 6e)

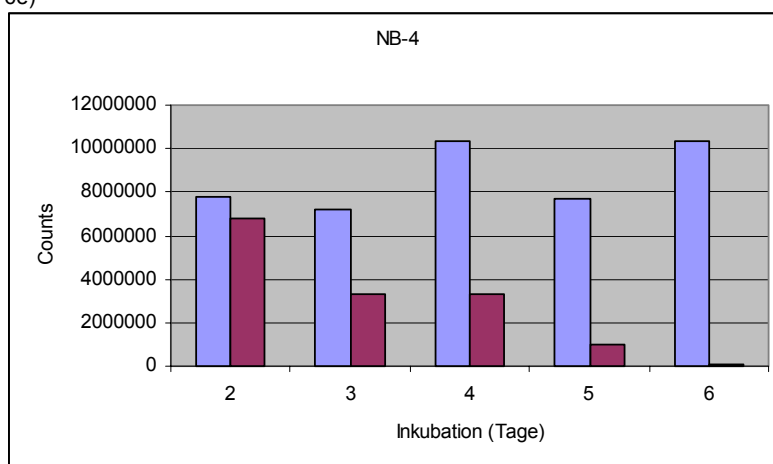


Abbildung 6 a-e): ATP-lite-Messungen bei den verschiedenen Zelllinien (CMK, HL-60, K562, LAMA-84 und NB-4) in Abhängigkeit der Inkubationszeit (2-6 Tage) mit 5'AzaCdr (5  $\mu$ M); Unbehandelt: Blau, Behandelt: Rot. Counts = Anzahl der gemessenen ‚Lichtblitze‘.

Alle Zelllinien wurden für die Untersuchungen mit dem Wirkstoff über jeweils drei Tage behandelt, bevor RNA beziehungsweise Protein isoliert wurde.

### 3.2.2 Titrationskurve mit Trichostatin A

Um den Einfluss von Trichostatin A bei den verschiedenen Zelllinien auf das Wachstumsverhalten zu untersuchen, ermittelten wir ebenfalls eine Titrationskurve. Vier verschiedene Zelllinien (Kasumi-1, NB-4, K-562 und HL-60) wurden mit Trichostatin A in Konzentrationen von 1 nM bis 1  $\mu$ M über 48 Stunden inkubiert. Bei drei der vier Zelllinien sieht man eine deutliche Reduktion des intrazellulären ATP bei einer Trichostatin A-Konzentration von 500 nM. Die K-562 Zellen zeigen veränderte ATP-Level erst bei einer Zugabe des Medikaments in einer Konzentration von 1  $\mu$ M (siehe Abbildung 7 a-d). Die zu untersuchenden Zelllinien wurden in dem im Folgenden beschriebenen Versuch mit Trichostatin A in einer Konzentration von 500 nM über ein bis drei Tage behandelt.

Abbildung 7a)

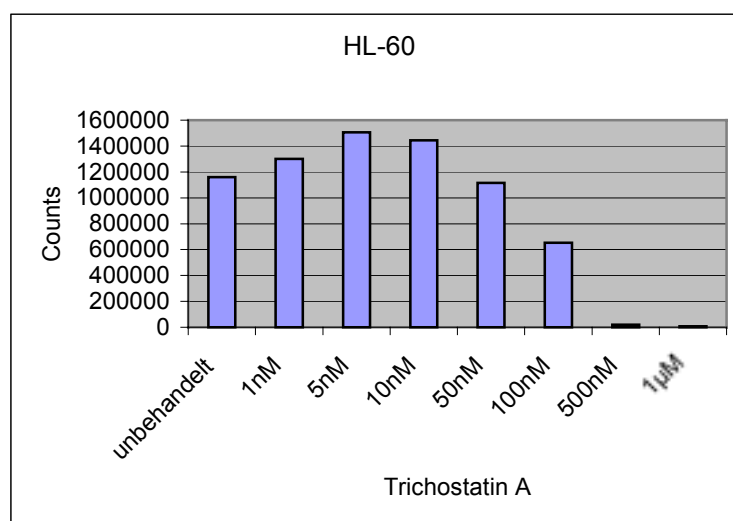


Abbildung 7b)

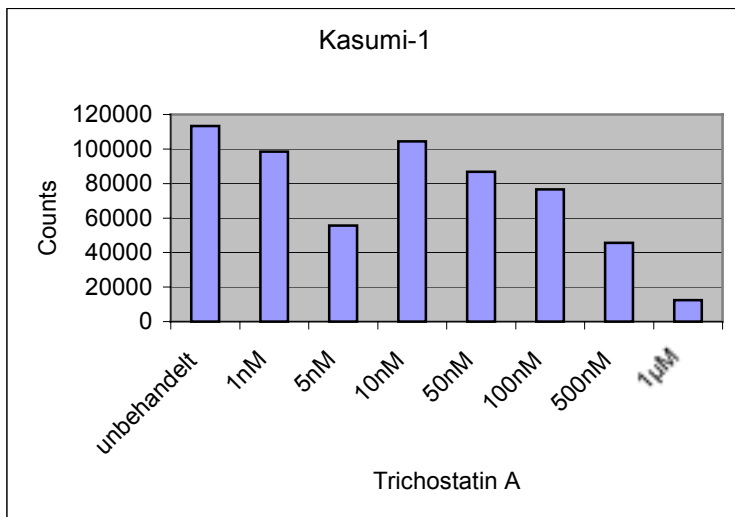


Abbildung 7c)

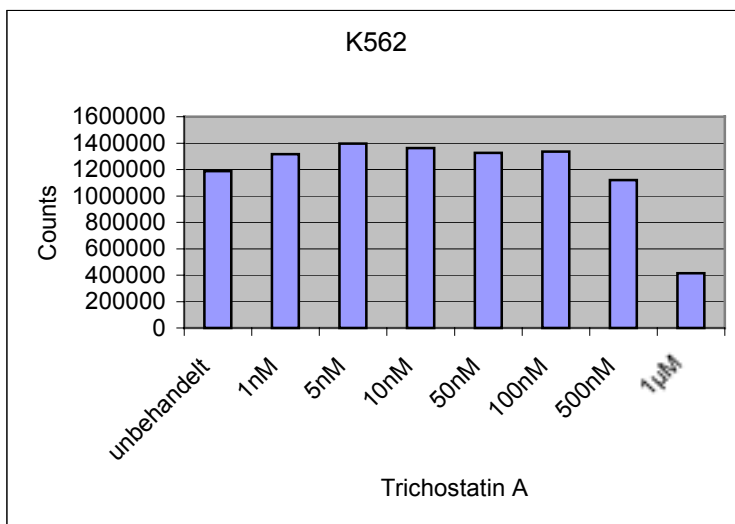


Abbildung 7d)

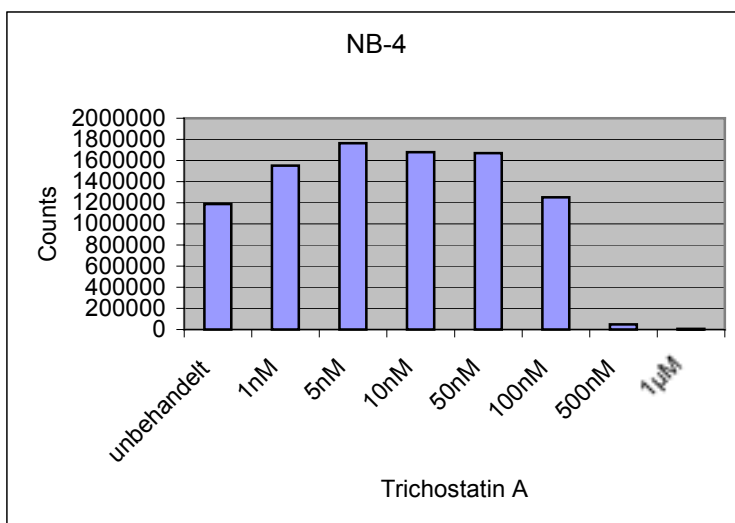
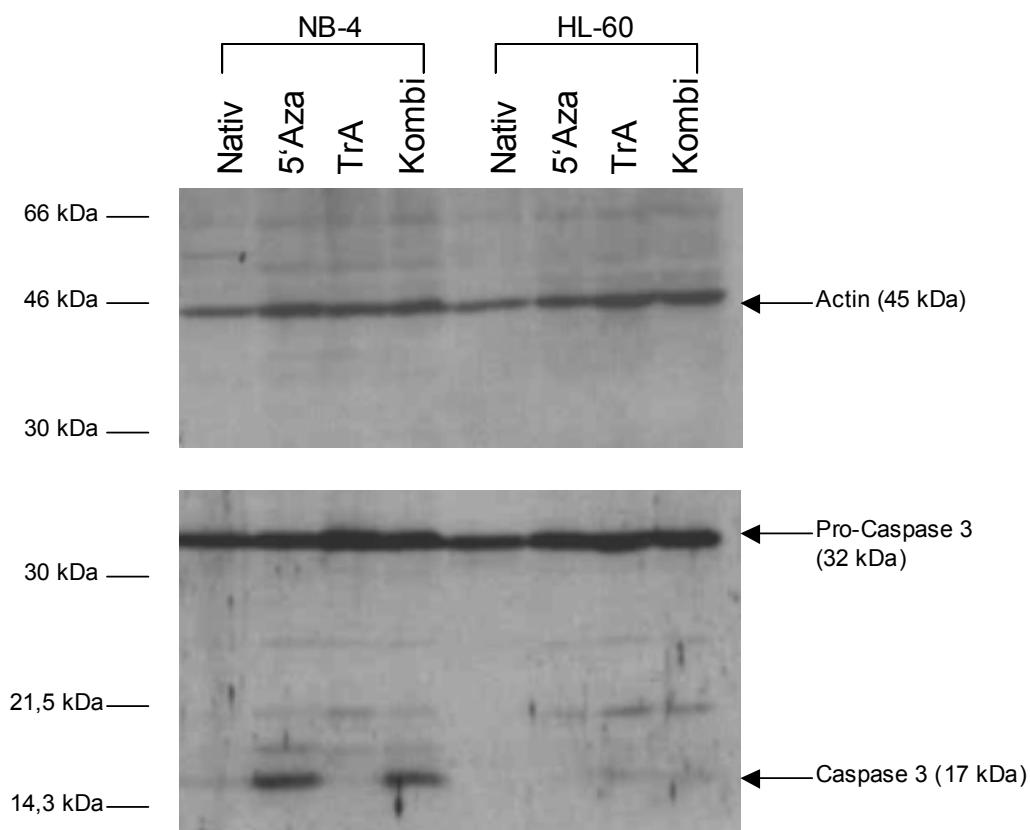


Abbildung 7 a-d): ATP-lite-Messungen der verschiedenen Zelllinien (HL-60, K-562, Kasumi-1 und NB-4) unbehandelt und nach Zugabe von Trichostatin A in Abhängigkeit der Konzentration (1 nM bis 1 µM); Inkubationszeit: 48 Stunden. *Counts* = Anzahl der gemessenen ‚Lichtblitze‘.

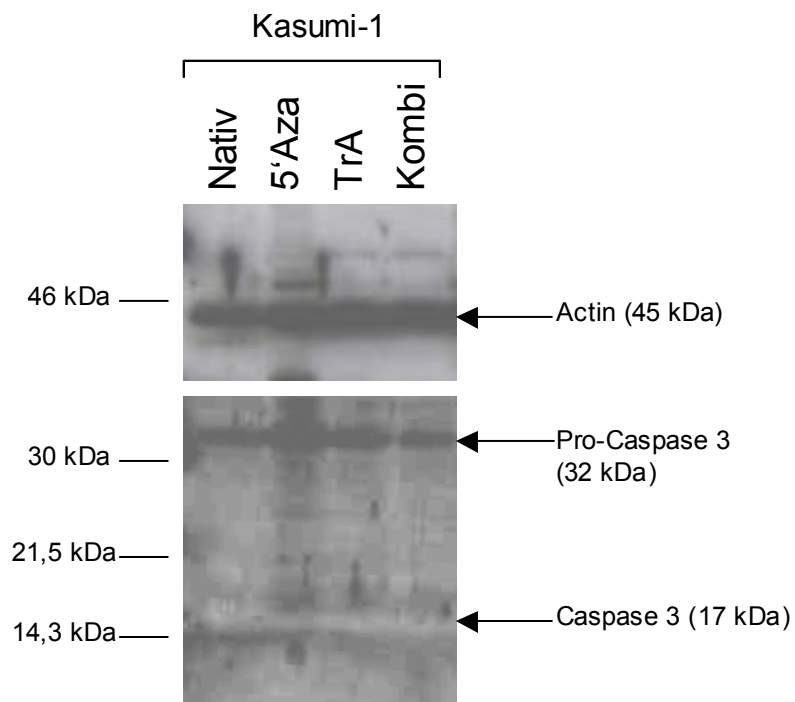
### 3.2.3 Induktion von Apoptose durch 5'AzaCdr, Trichostatin A oder Kombination von 5'AzaCdr/Trichostatin A

In den Zellen von NB-4 konnte eine erhöhte Caspase-3-Aufspaltung nachgewiesen werden (Abbildung 8a+8b). Durch den Antikörper wird Pro-Caspase 3 (32 kDa) und aktivierte Caspase 3 (17 kDa) nachweisbar. Das heißt, dass in diesen Zellen durch 5'AzaCdr eine Apoptose induziert wird. In den Zellen von Kasumi-1 und HL-60 zeigt die Behandlung mit 5'AzaCdr und Trichostatin A keinen Einfluss auf die Caspase-Aktivität (Abbildung 8a+8b).



**Abbildung 8a:**

Western Blot mit HL-60 und NB-4. Unbehandelt, behandelt mit 5'AzaCdr und Trichostatin A sowie Kombination von 5'AzaCdr und Trichostatin A ; Erst-Antikörper: Pro-Caspase 3 (1:250), 32 kDa, Caspase 3 (17 kDa), Actin (45 kDa); Bei NB-4 deutet der Nachweis von Caspase 3 bei behandelten Zellen auf eine induzierte Apoptose hin.



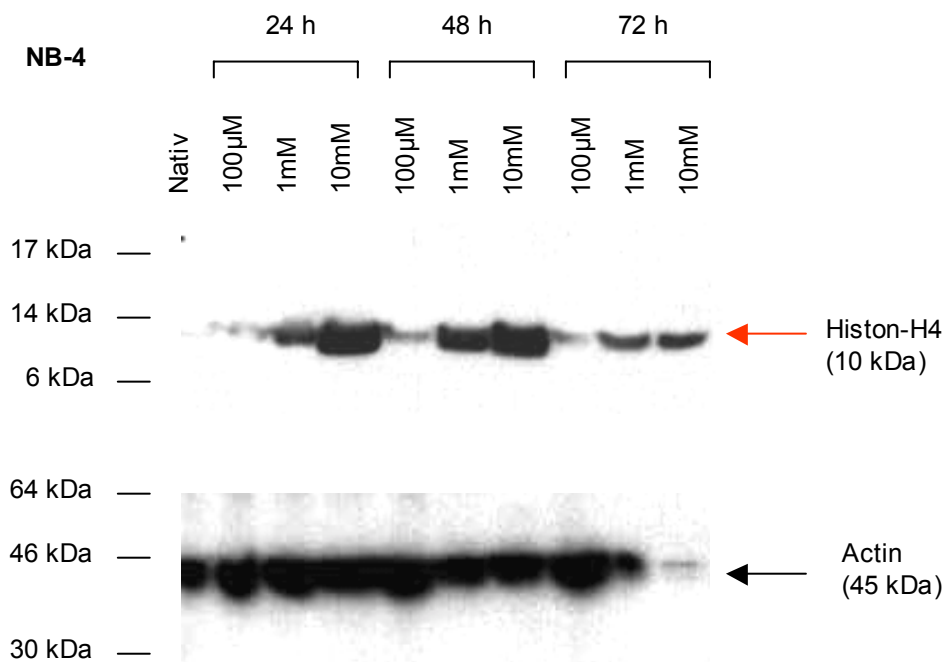
**Abbildung 8b:**

Western Blot mit Zellen von Kasumi-1. Unbehandelt, behandelt mit 5'AzaCdr und Trichostatin A sowie Kombination von 5'AzaCdr und Trichostatin A ; Erst-Antikörper: Pro-Caspase 3 (1:250), 32 kDa, Caspase 3 (17 kDa), Actin (45 kDa); Bei Kasumi-1 wird Caspase 3 auch nach Behandlung der Zellen nicht detektiert.

### 3.2.4 Nachweis von acetyliertem Histon-H4 in Zellen von NB-4 in Abhängigkeit der Behandlung mit HDAC-Inhibitoren

#### 3.2.4.1 Phenylbutyrat (PB)

Mit zunehmender Konzentration des Histondeacetylase-Inhibitors Phenylbutyrat (100  $\mu$ M bis 10 mM) wird Histon H4 stärker acetyliert. In den unbehandelten Zellen wird H4 nicht acetyliert (Abbildung 9). Die stärkste Acetylierung wird detektiert bei Inkubation der Zellen mit PB in einer Konzentration von 10 mM nach 48 Stunden, danach nimmt die Acetylierung ab.



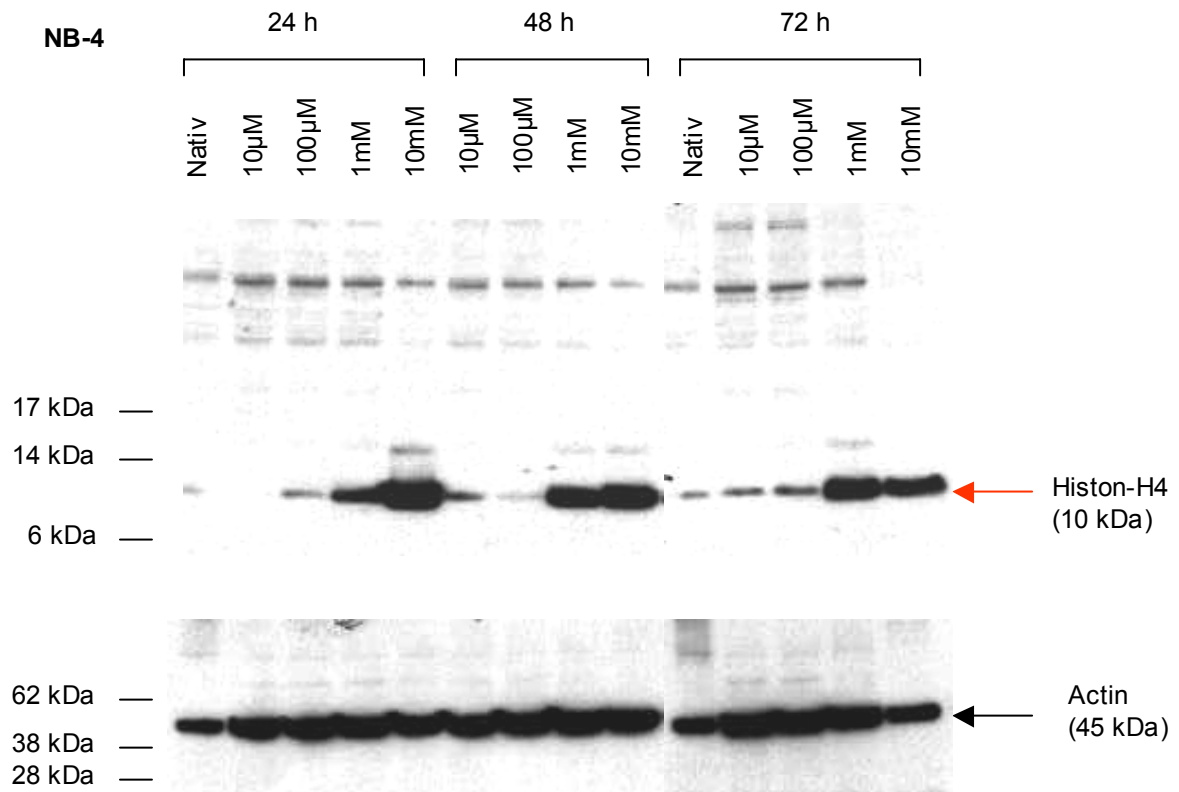
**Abbildung 9:**

Western Blot mit Zellen von NB-4. Unbehandelt, behandelt mit Phenylbutyrat (100μM/1mM/10mM) über 24, 48 und 72 Stunden. Erst-Antikörper: Anti-Histon-H4 (1:1000), 10 kDa; Zweit-Antikörper: Anti-*rabbit* (1:5000); bei NB-4 wird Histon-H4 nach Behandlung mit Phenylbutyrat in einer Konzentration von 1 mM stärker acetyliert. Nachweis der gleichmäßigen Proteinbeladung auf der Membran mit Anti-Actin (45 kDa; Verdünnung 1:500).

### 3.2.4.2 Valproinsäure

Histon-H4 wird nach 48 Stunden Behandlung mit Valproinsäure in einer Konzentration von 10 mM stärksten acetyliert. In den nativen Zellen kann keine Acetylierung von Histon-H4 nachgewiesen werden (Abbildung 10). Bei einer Inkubation über 48 Stunden nimmt die Acetylierung wieder ab.





**Abbildung 10:**

Western Blot mit Zellen von NB-4. Unbehandelt, behandelt mit Valproinsäure (10 μM/100 μM/1 mM/10 mM) über 24, 48 und 72 Stunden. Erst-Antikörper: Anti-Histon-H4 (1:1000), 10 kDa; Zweit-Antikörper: Anti-rabbit (1:5000); bei NB-4 wird Histon-H4 nach Behandlung mit Valproinsäure in einer Konzentration von 10 mM am stärksten. Nachweis der gleichmäßigen Proteinbeladung auf der Membran mit Anti-Actin (45 kDa; Verdünnung 1:500).

### 3.3 Vergleich des Gen-Expressionsprofils der Zelllinien

Von jeder Zelllinie wurde RNA sowohl in unbehandelter Form als auch mit 5'AzaCdr und/oder Trichostatin A auf *Microchip*-Ebene untersucht und einem Vergleich unterzogen. Zum einen wurden Ergebnisse der Zelllinien selbst in unbehandelter und behandelter Form verglichen, um die Wirkung der Medikamente allein oder in Kombination auf die Genexpression zu evaluieren. Des weiteren wurden Ergebnisse der unbehandelten Formen der Zelllinien untereinander sowie Werte der jeweils gleich behandelten Zellen ermittelt und

verglichen. So konnten Gene, deren Expression in den verschiedenen Zelllinien gleichsam verändert war, als auch Subtyp-spezifische Gene gefunden werden. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der Zelllinien mit den Hybridisierungsergebnissen der CD34<sup>+</sup>-Zellen sowie den Ergebnissen der Zellen aus gesundem menschlichen Knochenmark (*Human Bone Marrow* = HBM) verglichen. Ist ein Gen im Knochenmark und in CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert, nicht aber in der untersuchten Zelllinie selbst, kann dieses Gen möglicherweise deletiert sein. Die Kombinationen aus den Vergleichen der exprimierten Gene und deren mögliche Bedeutung sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5:

Kombinationen des Expressionsstatus eines Gens in den untersuchten Zelllinien und dessen mögliche Bedeutung

CD34+	HBM	Zellen nativ	Zellen mit 5'Aza	Zellen mit TrA	Bedeutung	Gruppe
-	-	+	-	-	Onkogen ; proliferationsassoziiert, regulierbar	A
- (+)	-	+	+	+	Tumor- bzw proliferationsassoziiert, nicht regulierbar	B
- (+)	+	-	+	-	Differenzierung; durch Methylierung reguliert	C
-	+	-	+	+	Differenzierung; durch Methylierung/Deacetylierung reguliert;	D
-	+	-	-	+	Differenzierung; durch Deacetylierung reguliert	E
+	+	-	+	-	downreguliert; durch Methylierung induzierbar	F
+	+	-	+	+	downreguliert; durch Methylierung/Deacetylierung induzierbar	G
+	+	-	-	+	downreguliert; durch Deacetylierung induzierbar	H

Bei Genen, die nur in der unbehandelten Zelllinie exprimiert sind (Gruppe A), handelt es sich um proliferationsassoziierte Gene oder möglicherweise um Onkogene. Beispiele für diese Gene sind in Tabelle 6 ersichtlich. Gene aus der Gruppe B sind weder in HBM noch in CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert, jedoch in allen Formen der Zelllinie (behandelt/unbehandelt). Hierbei handelt es sich um Gene,

die proliferations- oder tumorassoziiert sein können, in denen die Inkubation mit 5'AzaCdr oder Trichostatin A aber keine Wirkung zeigt. Diese Gene werden also nicht durch Methylierung oder Deacetylierung reguliert. Durch Methylierung regulierte Gene, die durch 5'AzaCdr reexprimiert werden konnten, werden der Gruppe C zugeordnet. Zur Gruppe E gehören alle Gene, die durch aberrante Histon-Acetylierung reguliert werden. Gene, die sowohl durch 5'AzaCdr als auch durch Trichostatin A wieder exprimiert wurden, finden sich in Gruppe D.

### 3.4 *Microarrays*

Jede RNA-Probe (1 – 3 µg) wurde radioaktiv markiert und vor der Hybridisierung deren spezifische Aktivität gemessen. Proben unter 100000 cpm (*counts per minute*) wurden verworfen. Als Isotop wurde  $^{33}\text{P}$ - $\alpha$ -dCTP verwendet, da der Hintergrund bei Arrays nach Hybridisierung der markierten Proben wesentlich sauberer und homogener war als bei Proben, die mit  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -dCTP markiert wurden. Nach Hybridisierung, Exposition und dem Entwickeln wurden alle Filme eingescannt und auf eine einheitliche Bildgröße mit einer Auflösung von 400 dpi normiert. Die so bearbeiteten *Tiff-Files* wurden im *AIDA Image Analyzer*-Softwareprogramm (Raytest, München) geladen und die entsprechenden *Templates* der sechs verschiedenen Filter exakt an den Kontrollpunkten orientiert aufgelegt (siehe Material und Methoden). Die Signalintensität der einzelnen Punkte wurde integriert und der Wert des Hintergrundes subtrahiert. Die so ermittelten Intensitäten werden als *Excel*-Daten exportiert. Vergleicht man zwei Membranen miteinander, so erhält man die Differenzen der *Spot*-Intensitäten, wobei etwa 50 - 80 % der angegebenen Unterschiede nach Kontrolle der angegebenen Punkte nicht verifiziert werden konnten. Da die Distanz des Zentrums von einem Punkt zum nächsten nur 750 Mikrons beträgt, kommt es zu Einstrahlungen starker Signale in alle direkt benachbarten Spots (Abbildung 11). Auch unterschiedliche Hintergrundlevel durch Verunreinigungen auf den Filtern führen zu falschen Signalen. Diese Werte mussten aus der Bewertung ausgeschlossen werden.

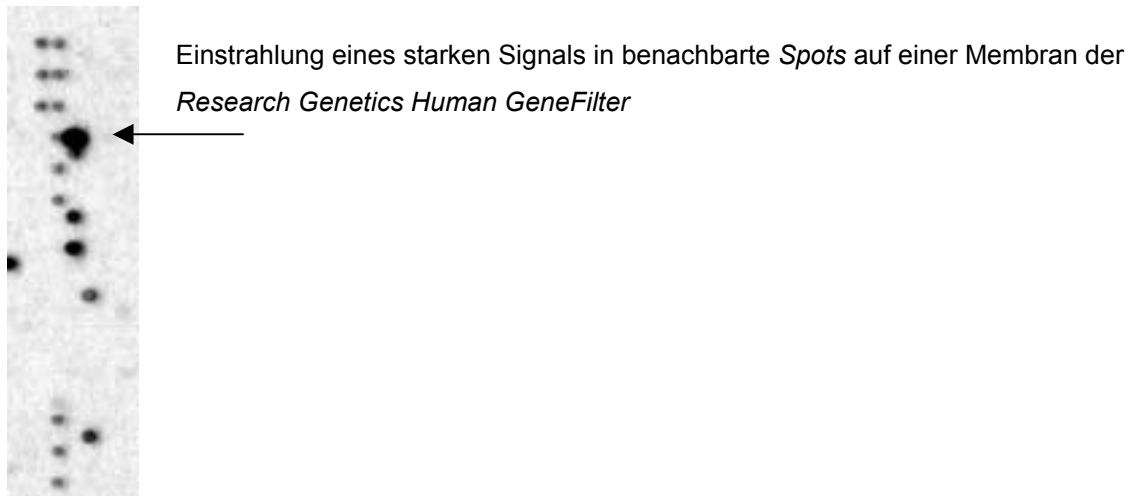


Abbildung 11:  
Signale von hochexprimierten Genen überlagern Umgebungspunkte

Die Rohdaten der unterschiedlich exprimierten Gene nach Kontrolle und Abzug der falsch-positiven Signale sind für jede untersuchte Zelllinie im Anhang (CD-ROM) aufgeführt. Im Vergleich Knochenmark (gesund) / HL-60 (nativ) beispielsweise konnten 218 Gene mit Expressionsunterschieden detektiert werden, die alle in nativen Zellen von HL-60 *downreguliert* sind. Nach Behandlung mit 5'AzaCdr waren 165 Gene unterschiedlich exprimiert verglichen mit nativen Zellen. Von diesen Genen waren 97 Prozent in den behandelten Zellen hochreguliert. Nach Inkubation der Zellen mit Trichostatin A wurden 57 hochregulierte Gene und zwei *downregulierte* Gene ermittelt. Bei NB-4 sind 286 Gene in den nativen Zellen (im Vergleich zu HBM) *downreguliert* und 3 Gene hochreguliert. Nach Behandlung mit 5'AzaCdr konnten 38 hochregulierte und 8 downregulierte Gene detektiert werden. Beispiele für Gene, die in CD34<sup>+</sup> und HBM exprimiert, in nativen Zelllinien jedoch ausgeschaltet sind und sich durch Demethylierung und/oder Acetylierung reinduzieren lassen, sind der Tabelle 6 (Gruppen F, G und H) zu entnehmen.

Tabelle 6:

Beispiel für Gene mit veränderter Expression durch Behandlung mit 5'AzaCdr und/oder Trichostatin A

Gen	Gruppe	Zelllinie	Gen-Locus
Checkpoint Suppressor 1	F	NB-4	14q24.3-q31
EphA8	F	CMK HL-60 Kasumi-1	Chromosom 1
Programmed cell death 2	Mögl. deletiert	CMK Kasumi-1 LAMA-84 NB-4	6
Mitogen activated protein kinase kinase 2 (MEK2)	A	NB-4	7q32
Prefoldin 5	Mögl. deletiert	NB-4 LAMA-84	Chromosom 12
Ephrin B1	F	HL-60 NB-4	3q21-q23

Eine Auswahl mit Beispielen für veränderte Expressionen bei verschiedenen Genen, die in der Regulierung zellulärer Prozesse eine Rolle spielen, ist in Tabelle 7 (siehe Anhang) zusammengestellt. Das Expressionsprofil von MEK2, CHES1, EphA8 und Ephrin B1 wird im folgenden vorgestellt. Diese Gene spielen alle eine Rolle in Zellwachstum oder Zelldifferenzierung.

### 3.4.1 *Mitogen-activated protein kinase kinase 2 (MEK2)*

MEK2 gehört zu mitogen-aktivierten Proteinkinasen und reguliert im Signaltransduktionsnetz außer Differenzierung und Proliferation auch den Zelltod.

Aberrante Aktivierung des mitogen-aktivierten Protein-Kinase-*Pathways* (MAPK) führt zu Zellen, die nicht dem programmierten Zelltod unterliegen und in der Lage sind, autonom zu wachsen. Weder in den CD34<sup>+</sup>-Zellen noch in den Knochenmarkzellen ist das Gen MEK2 exprimiert. MEK2-Expression wurde in den nativen Zellen von LAMA84, CMK und NB-4 (schwach) nachgewiesen. Durch De-Methylierung mit 5'AzaCdr kann es zur verminderten Expression von MEK2 in den Zellen von CMK, NB-4 und LAMA84 kommen. Bei HL-60 und Kasumi-1 bleibt der Expressionsstatus von MEK2 durch De-Methylierung beziehungsweise Inhibition der Histon-Deacetylierung unverändert. Bei OCI-5 kommt es durch Zugabe von 5'AzaCdr zur Re-Expression von MEK2, was auf eine unterschiedliche Regulation des Gens in den verschiedenen AML-Linien hindeutet (Tabelle 7; Abbildung 12.1). Auffällig ist hier die signifikante *Down*regulierung in den Zellen mit megakaryozytärer Differenzierungsstörung (AML M7).

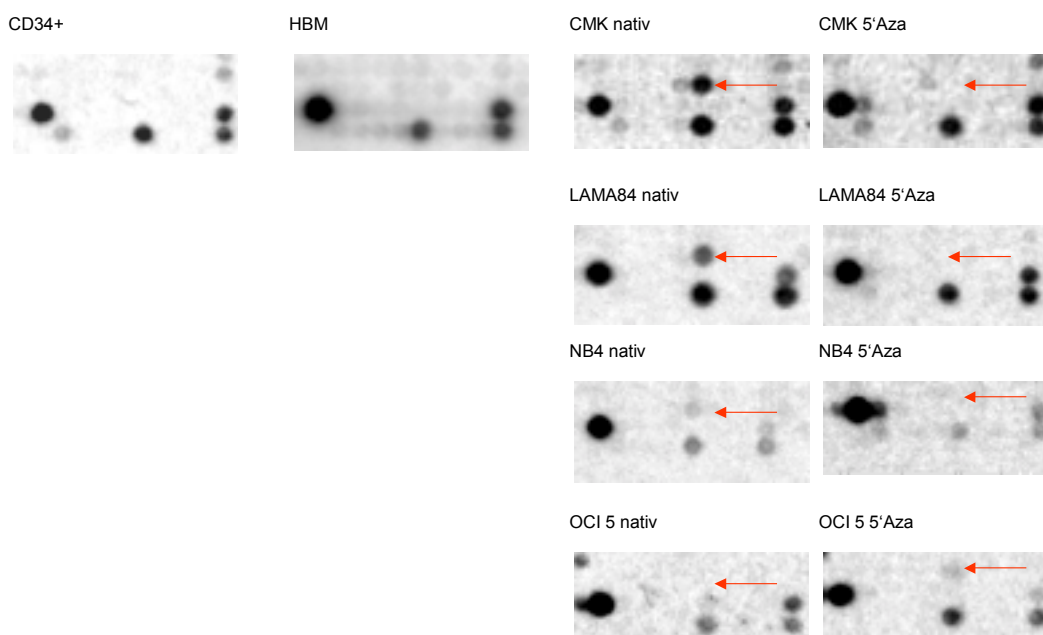


Abbildung 12.1:

Signale von MEK2 bei CD34<sup>+</sup>, Knochenmark (Human Bone Marrow), LAMA84, CMK und NB-4 (nativ und mit 5'AzaCdr oder Trichostatin A behandelt). In den unbehandelten Formen der Zelllinien CMK, LAMA84 und NB-4 wird MEK2 exprimiert.

### 3.4.2 Checkpoint Suppressor 1 (CHES1)

Als Suppressor für Mutationen im  $G_2$ -Checkpoint-Pathway ist CHES1 in der Lage, den  $G_2$ -Checkpoint nach DNA-Schäden wieder herzustellen. Bei den Zellen von Kasumi-1, CMK und NB-4 konnte gezeigt werden, dass durch De-Methylierung die Expression von Checkpoint Suppressor 1 (CHES1) erhöht wird (Tabelle 7; Abbildung 12.2). Bei HL-60, OCI-5 und LAMA-84 dagegen hat die Behandlung mit 5'AzaCdr keinen Einfluss auf die Expression von CHES1.

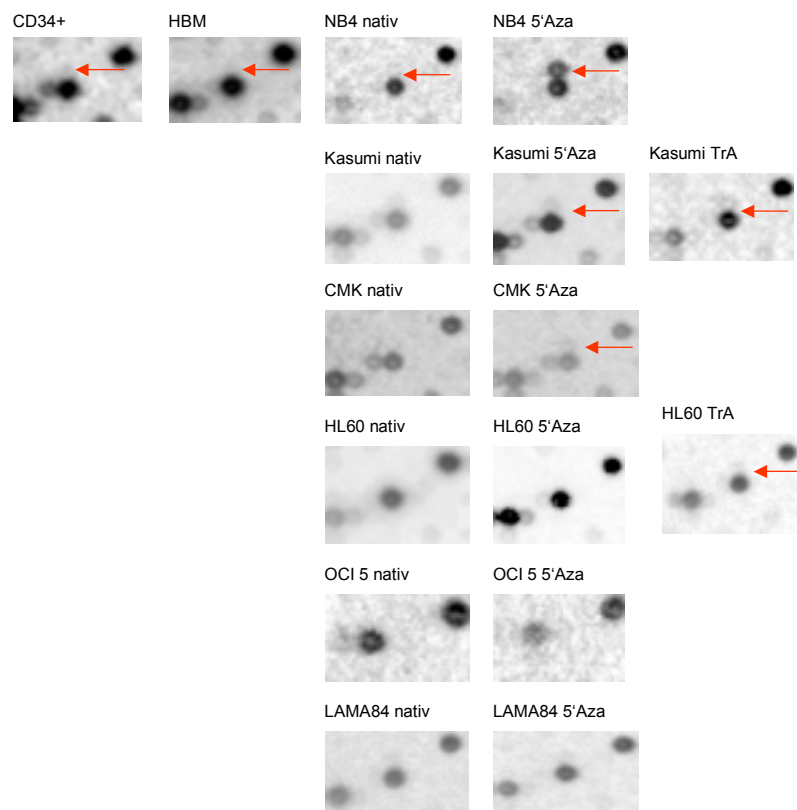


Abbildung 12.2.:

Signale von CHES1 bei CD34<sup>+</sup>, Knochenmark (HBM), NB-4, Kasumi-1, CMK, HL-60, OCI-5 und LAMA-84. Erhöhte Expression von CHES1 in den mit 5'AzaCdr behandelten Zelllinien NB-4, Kasumi-1 und CMK sowie in den mit Trichostatin A behandelten Zellen (HL-60 und Kasumi-1).

### 3.4.3 EphA8

Ephrin-Rezeptoren kontrollieren als wichtige Bestandteile der Signal-Transduktionskaskade Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen indem sie inhibierend den *ERK/MAP-Kinase-Pathway* regulieren. Das Gen EphA8 ist sowohl in CD34<sup>+</sup>-Zellen als auch in Knochenmarkzellen exprimiert. Ebenso findet sich eine starke Expression bei CMK. NB-4, OCI-5 und Lama84 zeigen praktisch keine Expression von EphA8. Auch nach Behandlung mit 5'AzaCdr bleibt die Genexpression sehr gering. Durch De-Methylierung und Inhibition der Histon-Deacetylierung wird EphA8 in RNA bei HL-60 und Kasumi-1 hochreguliert (Tabelle 7; Abbildung 12.3).

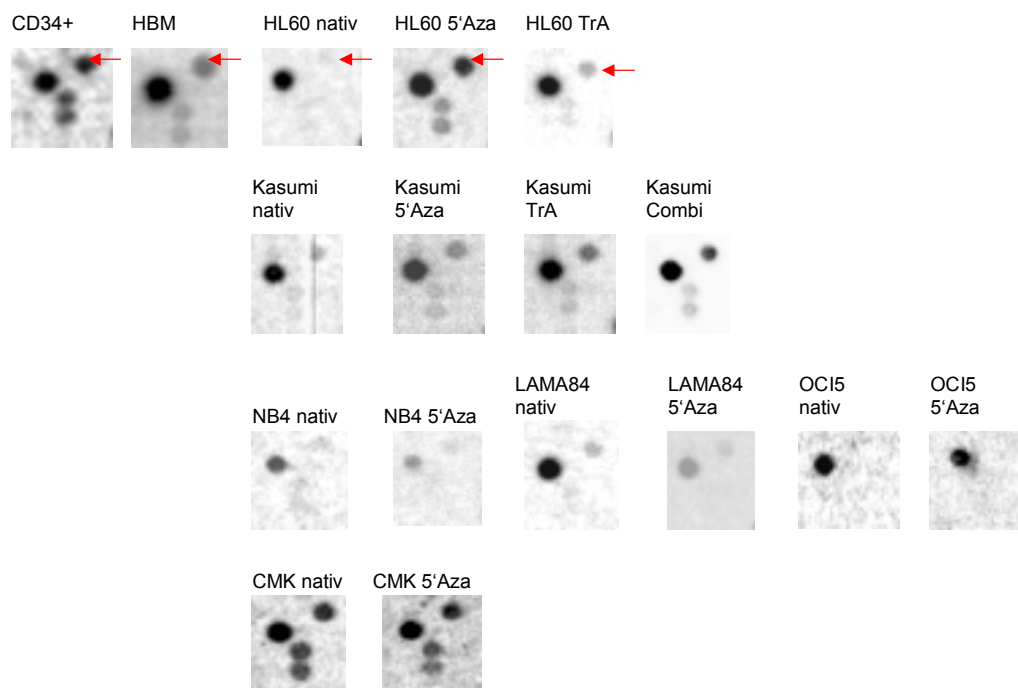


Abbildung 12.3:

Signale von EphA8 bei CD34<sup>+</sup>, Knochenmark (HBM), NB-4, Kasumi-1, CMK, HL-60, OCI-5 und LAMA84. Erhöhte Expression von EphA8 in CD34<sup>+</sup>-Zellen und *Human Bone Marrow*-Zellen sowie in den mit 5'AzaCdr und Trichostatin A behandelten Zelllinien HL-60 und Kasumi-1. Die EphA8-Expression ist in den Zellen von LAMA-84, NB-4 und OCI-5 vermindert. In den Zellen von CMK wird EphA8 gleich stark wie in CD34<sup>+</sup> und HBM exprimiert.



### 3.4.4 Ephrin-B1

Ephrin-B1 ist in den Zellen aller untersuchten Linien außer OCI-5 *downreguliert*. Bei NB-4 und Kasumi-1 wird Ephrin-B1 durch De-Methylierung re-exprimiert. Zugabe von 5'AzaCdr führt zu keiner veränderten Expression von Ephrin-B1 bei OCI-5, CMK, LAMA-84 und HL-60. Durch Trichostatin A wird die Expression von Ephrin-B1 in den Zellen von Kasumi-1 erhöht. Bei HL-60 Zellen wird ausschließlich durch Inhibition der Histon-Deacetylierung ein Effekt auf die Genexpression von Ephrin-B1 nachgewiesen (Tabelle 7).

### 3.4.5 Gene, deren Expressionsprofil bereits in anderen Tumorarten untersucht wurden

*Glutathione S-transferase M4* wurde bereits bei Lungenkarzinom mit bis zu zehnfach erhöhter Expression dokumentiert (siehe Diskussion). In allen Zelllinien ist das Gen inaktiviert. In den Zellen von HL-60, OCI-5 und LAMA-84 wird das Gen durch De-Methylierung reaktiviert. In den Zellen von HL-60 wird das Gen schwach durch Behandlung mit Trichostatin A re-induziert (siehe Tabelle 8). In den Zellen von CMK und Kasumi-1 wird das Gen normal exprimiert. In den Zellen von NB-4 wird das Gen RAB7 durch De-Methylierung wieder exprimiert. Bei HL-60 wird RAB7 durch Behandlung mit Trichostatin A praktisch nicht reinduziert (siehe Tabelle 8). Durch Behandlung der Zellen mit Trichostatin A und durch De-Methylierung wird das Gen RAB5B bei HL-60 und Kasumi-1 re-exprimiert (siehe Tabelle 8). Nach Behandlung mit Trichostatin A wird eine Expression des Gens RAB2 bei HL-60 induziert (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Gemessene Signalwerte (Integral minus Hintergrund) von verschiedenen Genen in den Zellen von HBM (gesundes Knochenmark), CD34<sup>+</sup>, CMK, HL-60, Kasumi-1, LAMA-84, NB-4 und OCI-5; unbehandelt (nativ) und behandelt mit 5'AzaCdr (5 µM) oder Trichostatin A (500 nM).

	Kasumi-1				NB-4			
	HBM	cd34	nativ	5'Aza	TrA	Combi	nativ	5'Aza
glutathione S-transferase M4	56.7	173.3	53.9	93.9	88.6	91.7	7.7	5
RAB7	37.7	29.1	13.7	24.7	25.5	10.4	2.7	28.5
RAB5B	111.2	130	39.5	109.6	62.2	99.8	18.8	7.1
RAB2	30.6	63.6	9.9	13.9	27	13.5	8.8	5.3

	CMK		OCI-5		LAMA-84		HL-60		
	nativ	5'Aza	nativ	5'Aza	nativ	5'Aza	nativ	5'Aza	TrA
glutathione S-transferase M4	53.4	38	-1.5	73.8	15.7	58.2	8.1	71.2	32.1
RAB7	3.8	8.9	4.1	8.6	6.2	4.5	6.2	8.4	24.2
RAB5B	58.3	29	14.2	38.2	25.3	19	10.3	148.2	99.1
RAB2	49.8	36.9	6.6	3.5	12.4	9.7	7.7	17.8	24.9

### 3.5 Verifizierung der mittels *Microarray* identifizierten Gene durch Western Blot-Analysen

Aus den Ergebnissen der *Microchip*-Untersuchungen wurde eine Auswahl von Genen getroffen, die auf Proteinebene (Western Blot) untersucht wurden. Folgende Gene, die eine wichtige Rolle in der Regulierung von Zelldifferenzierung und Zellproliferation spielen, wurden proteinspezifisch untersucht: MEK2, EphA8 und CHK1.

#### 3.5.1 MEK2

In den behandelten und unbehandelten Zellen von HL-60 und NB-4 wurden die Proteine Actin, p-*raf* (phosphoryliert), MEK1, ERK1/2 (unphosphoryliert), ERK2 (phosphoryliert) und RSK1 nachgewiesen. Bei HL-60 ist die Expression von MEK2 in den behandelten Zellen geringer als in den unbehandelten Zellen. MEK kann durch MEK-Inhibitoren gehemmt werden, wodurch die Phosphorylierung *downstream* blockiert wird. Nach Behandlung der Zellen mit U0126 (MEK-

Inhibitor) wird die Bildung von p42 in der phosphorylierten Form der HL-60 Zellen durch den MEK-Inhibitor gehemmt (Abbildung 13b). Phosphoryliertes ERK1 (p42) wird in den behandelten Zellen von HL-60 ebenfalls schwächer exprimiert als in den unbehandelten Zellen (Abbildung 14b). MEK2 wurde bei NB-4 als 46 kDa großes Protein in den nativen Zellen und in den mit Trichostatin A behandelten Zellen exprimiert, nicht aber in den mit 5'AzaCdr behandelten Zellen (Abbildung 14a). In den Zellen von Kasumi-1 wird MEK2 (unphosphoryliert) mit einer Größe von 46 kDa nur in den nativen Zellen detektiert (Abbildung 14a). Die Proteine MEK1 und pp2A werden nicht exprimiert. Phosphoryliertes ERK1/2 findet sich in nativen Zellen nicht, erst nach De-Methylierung und Inhibition der Histon-Deacetylase wird das Protein mit einer Größe von 44/42 kDa im Western Blot detektiert (Abbildung 14b). Das Protein *p-raf* (phosphoryliert) ist mit einer Größe von 74 kDa schwach nachweisbar in unbehandelten Zellen und wird nach Zugabe von 5'AzaCdr sowie Trichostatin A hochreguliert (Abbildung 15a). MEK2 (unphosphoryliert) wird schwächer exprimiert als MEK1 (unphosphoryliert), wobei das Protein MEK1 in den behandelten Zellen stärker exprimiert wird. 5'AzaCdr und Trichostatin A haben keinen Einfluss auf die Expression von ERK1/2 (unphosphoryliert). Nach Behandlung der Zellen mit 5'AzaCdr und Trichostatin A Der Antikörper bindet stärker an ERK1/2 und RSK1 in behandelten Zellen als an die Proteinen der nativen Zellen. Eine schwache spezifische Bindung des Antikörpers Phospho-MEK1/2 konnte in nativen Zellen bei LAMA-84 gezeigt werden (Abbildung 16), in CMK wurde phosphoryliertes p42/p44 nachgewiesen. p38 wurde in den nativen Zellen von HL-60 als 38 kDa großes Protein detektiert. Auch bei den Zellen von CMK wird Anti-p38 spezifisch gebunden. P38 wurde dagegen in den Zelllinien LAMA-84 und NB-4 nicht exprimiert. Die phosphorylierte Form des Proteins *raf* konnte in den Zelllinien von CMK, LAMA-84, NB-4 und HL-60 mit einer Größe von 74 kDa detektiert werden. Phosphoryliertes PP2A und das Protein p-ELK (phosphoryliert) waren bei keiner der untersuchten Zelllinien nachweisbar (keine Abbildungen).

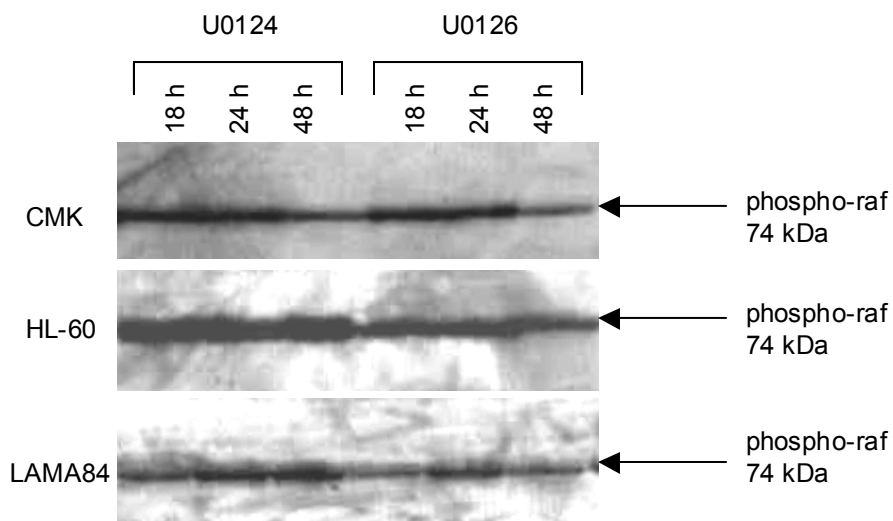


Abbildung 13a)

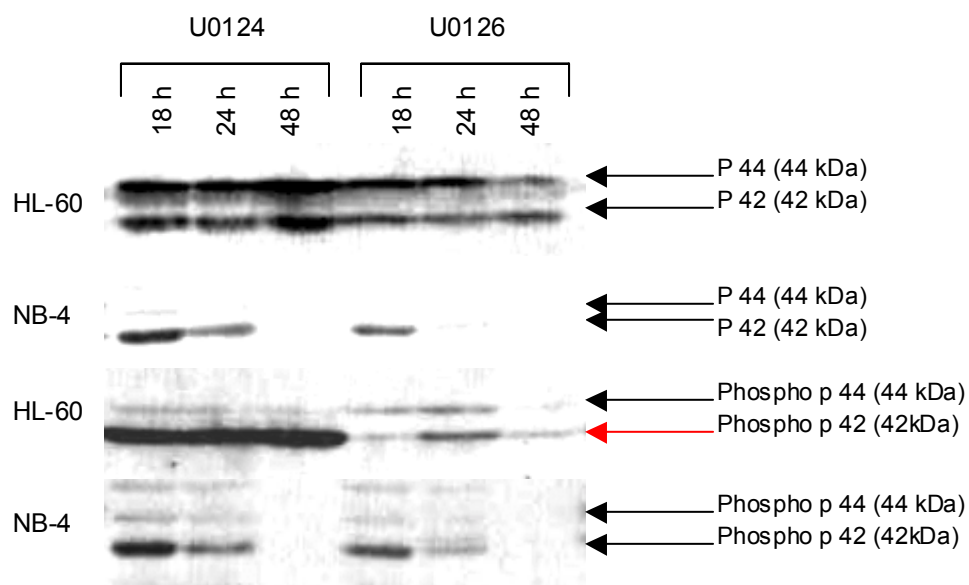


Abbildung 13b)

Abbildungen 13a+b):

Western Blots mit unbehandelten Zellen und Zellen (CMK, HL-60, LAMA-84, NB-4) nach Inkubation mit U0126 (MEK-Inhibitor) und U0124 (Negativ-Kontrolle); Abbildung 13a: Erst-Antikörper: Phospho-*raf* (74 kDa); Abbildung 13b: P44/42 (44/42 kDa); Phospho-p44/42 (44/42 kDa).

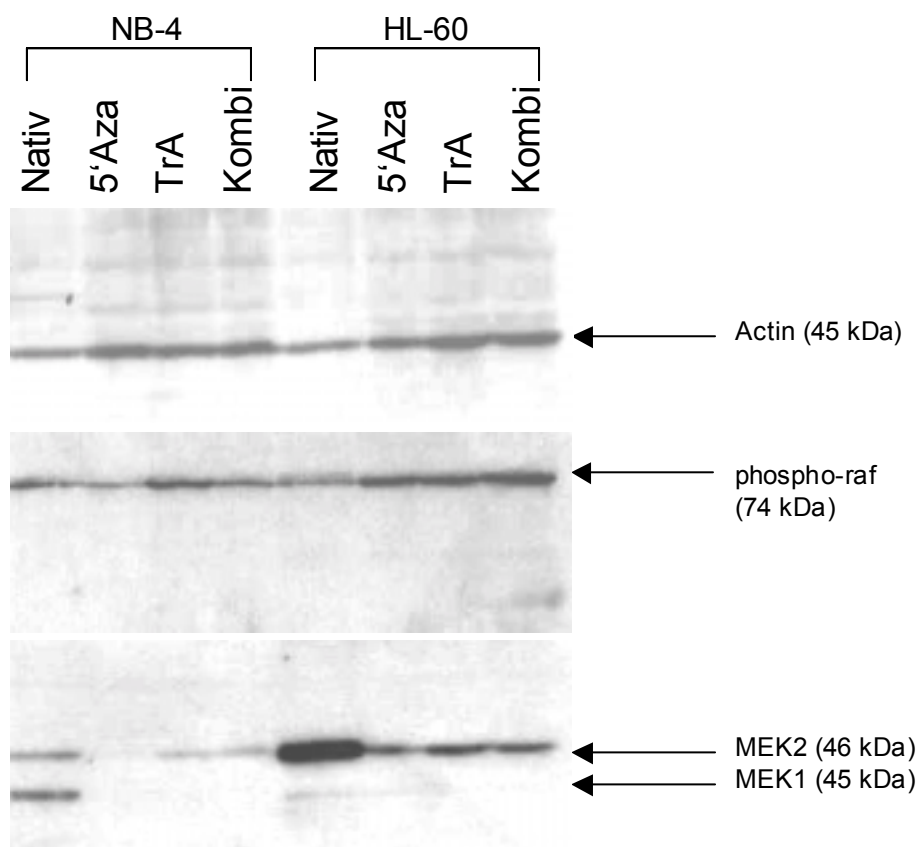


Abbildung 14a)

Western Blot mit unbehandelten Zellen und Zellen nach Inkubation mit 5 μM 5'AzaCdr, 500 nM Trichostatin A und Kombination von 5'AzaCdr und Trichostatin A von NB-4 und HL-60; Erst-Antikörper: Actin (45 kDa); MEK 1 (45 kDa); MEK 2 (46 kDa); Phospho-raf (74 kDa).

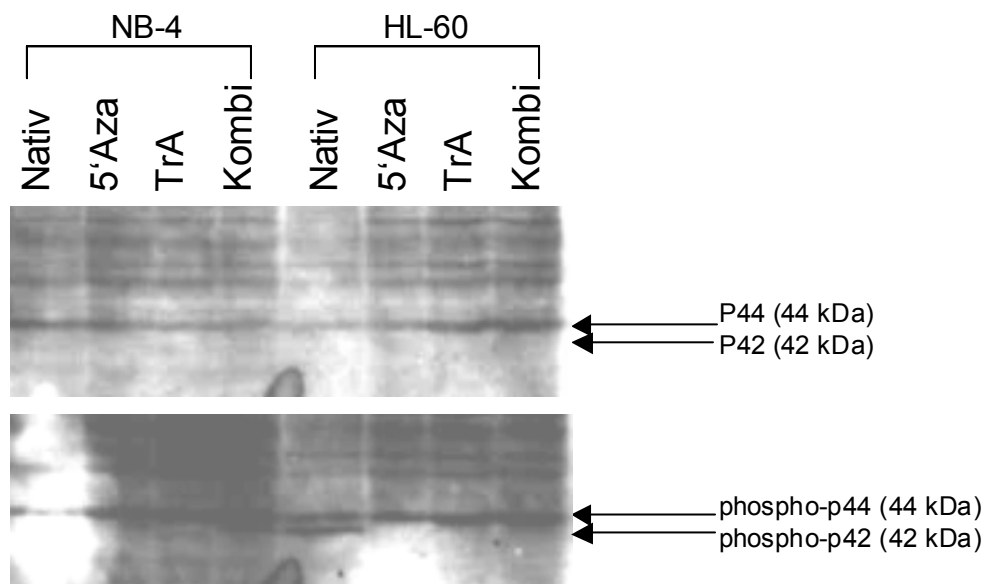


Abbildung 14b)

Western Blot mit unbehandelten Zellen und Zellen nach Inkubation mit 5 μM 5'AzaCdr, 500 nM Trichostatin A und Kombination von 5'AzaCdr und Trichostatin A von NB-4 und HL-60; Erst-Antikörper: Phospho-p44/42 (44/42 kDa); p44/42 (44/42 kDa).

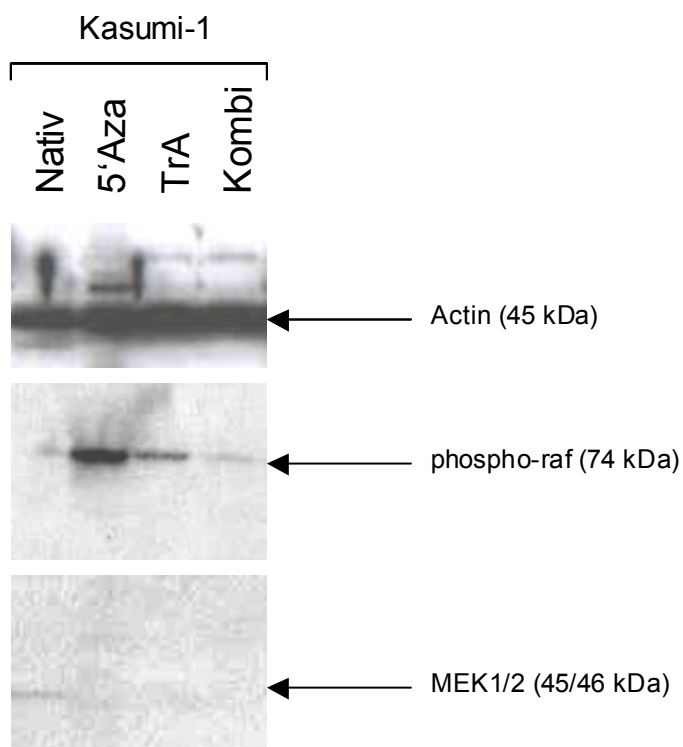


Abbildung 15a)

Western Blot mit unbehandelten Zellen und Zellen nach Inkubation mit 5  $\mu$ M 5'AzaCdr und 500 nM Trichostatin A von Kasumi-1; Erst-Antikörper: Actin (45 kDa); MEK 1 (45 kDa); MEK 2 (46 kDa); Phospho-*raf* (74 kDa).

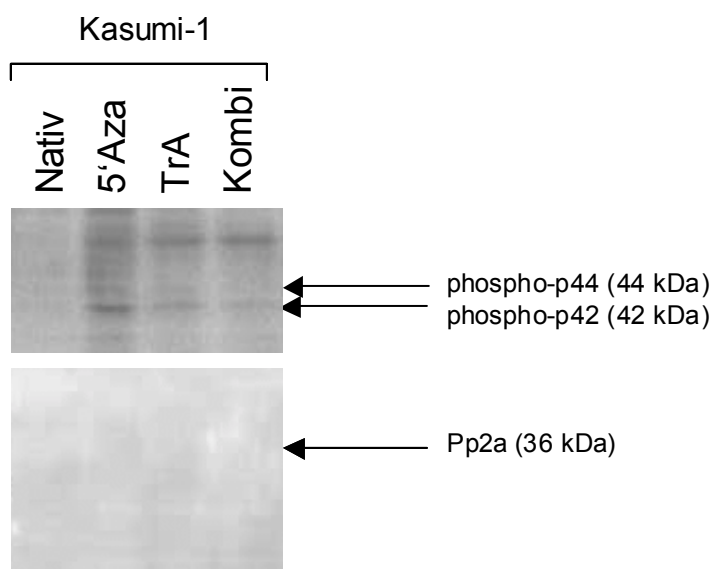


Abbildung 15b)

Western Blot mit unbehandelten Zellen und Zellen nach Inkubation mit 5  $\mu$ M 5'AzaCdr und 500 nM Trichostatin A von Kasumi-1; Erst-Antikörper: Phospho-p44/42 (44/42 kDa); Phospho-pp2A (36 kDa).

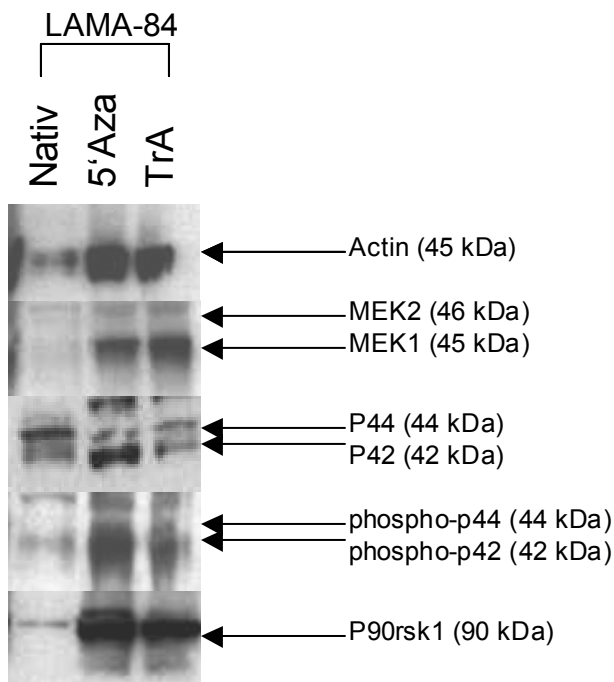


Abbildung 16:

Western Blot mit unbehandelten Zellen und Zellen nach Inkubation mit 5  $\mu$ M 5'AzaCdr und 500 nM Trichostatin A von LAMA-84; Erst-Antikörper: Actin (45 kDa); MEK 1 (45 kDa); MEK 2 (46 kDa); P44/42 (44/42 kDa); Phospho-p44/42 (44/42 kDa); P90rsk (90 kDa).

### 3.5.2 Anti-EphA8

Der Antikörper (120 kDa) für EphA8 bindet sowohl bei HL-60, Kasumi-1 als auch NB-4 nur in den mit 5'AzaCdr und Trichostatin A behandelten Zellen (Abbildung 17: Spur 2 und 3, 5 und 6, 8 und 9). Für Kasumi-1 und HL-60 werden die Ergebnisse aus der *Array*-Analyse im Western Blot bestätigt, während bei NB-4 keine Signale auf den Membranen zu detektieren sind.

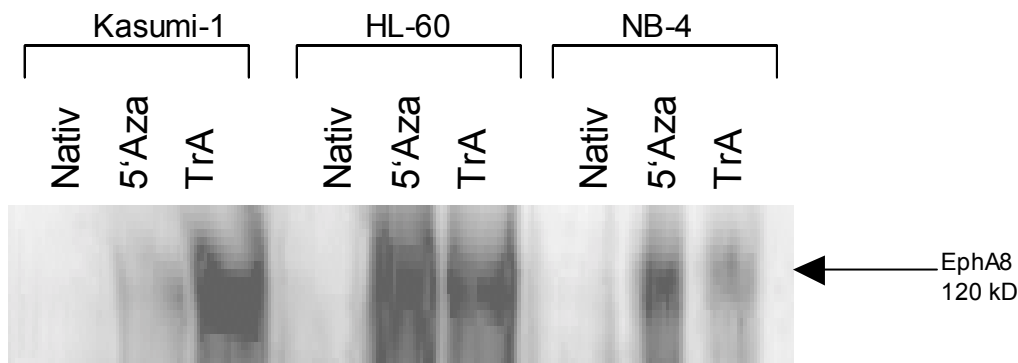


Abbildung 17:

Western Blot mit Kasumi-1, HL60 und NB-4. Unbehandelt, behandelt mit 5'AzaCdr (5  $\mu$ M) und Trichostatin A (500 nM); Erst-Antikörper: EphA8 (1:250), 120 kDa; Zweit-Antikörper: Anti-goat (1:5000); EphA8 wird in allen untersuchten Zelllinien erst nach Behandlung mit 5'AzaCdr und Trichostatin A exprimiert.

### 3.5.3 Anti-CHK1

Bei den behandelten und unbehandelten Zelllinien CMK (keine Abbildung), LAMA-84 (keine Abbildung) wie auch bei CD34<sup>+</sup>-Zellen bindet der CHK1-Antikörper nicht, während bei Kasumi-1 (Abbildung 18) das Protein mit einer Größe von 56 kDa detektierbar ist. Bei den Zellen der NB-4-Zelllinie und HL-60 bindet der Antikörper an die Proteine der behandelten Zellen (Abbildung 18), wohingegen die Bindung an die Proteine der unbehandelten Zellen schwächer ist (Abbildung 18).

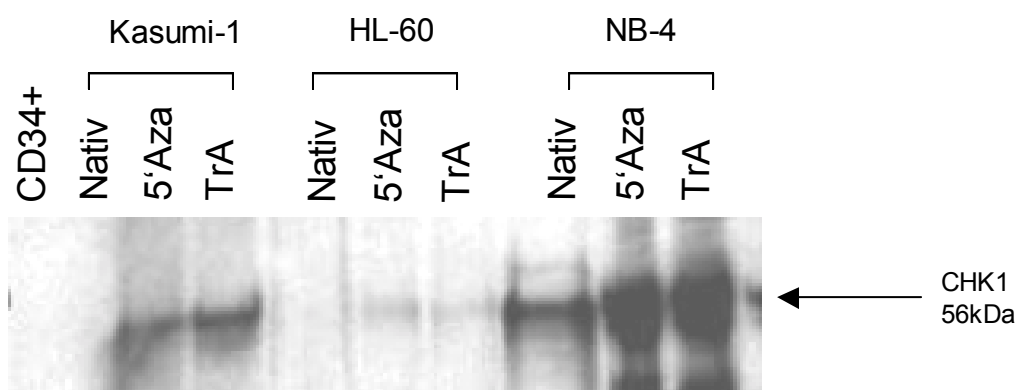


Abbildung 18:

Western Blot mit Kasumi-1, HL-60 und NB-4. Unbehandelt, behandelt mit 5'AzaCdr (5  $\mu$ M) und Trichostatin A (500 nM); Erst-Antikörper: CHK-1 (1:250), 56 kDa; Zweit-Antikörper: Anti-rabbit (1:5000); Spur 1: CD34<sup>+</sup>; CHK-1 wird in den Zelllinien Kasumi-1 und HL-60 erst nach Behandlung mit 5'AzaCdr und Trichostatin A aktiviert. In den Zellen von NB-4 wird CHK-1 nach Behandlung mit 5'AzaCdr und Trichostatin A verstärkt exprimiert.



Tabelle 7 : Auswahl verschiedener Gene mit verändertem Gen-Expressionsprofil nach *Microarray*-Untersuchungen; Gesundes Knochenmark (TBM), CD34<sup>+</sup>, Kasumi-1 unbehandelt und Kasumi-1 nach Behandlung mit 5'AzaCdR (5 µM) und Trichostatin A (500 nM).

Name	ID	TBM	cd34	Kasumi nativ	Kasumi 5'Aza	Kasumi TrA	Kasumi Combi
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	N36174	63.7	141.3	23.7	80.5	30	113.5
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6	R41981	120	118.8	40	101.8	100.7	72.6
adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit	AA630776	153.6	157.7	54.3	133.8	168.8	2.3
anaphase-promoting complex subunit 7	T67474	147.6	175.4	56.2	132.4	50.6	117.3
BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)	H09065	36.6	74.4	12	22.2	12.3	33.1
CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	R37937	91.3	61.5	4.8	8.8	86.6	4.8
checkpoint suppressor 1	H84982	34.1	28.4	13.3	28.7	30.5	18.2
checkpoint with forkhead and ring finger domains	AA286905	54.8	103.6	14.4	20	14.5	36.3
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	H09055	11.6	4	0.5	1.2	38.8	0.4
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	N39452	117.2	10.9	35.9	105.3	37.6	96.2
E2F transcription factor 1	AA424950	136.9	144.8	46.1	114.9	72.2	83.6
EphA8	N90703	50.6	111	18.9	37.2	53.4	14.7
eukaryotic translation initiation factor 5	AA669443	81.4	92.9	30.1	89	28.2	0.5
FAT tumor suppressor (Drosophila) homolog 2	H10939	115.1	117.1	45.1	108.7	49.3	31.3
G protein pathway suppressor 1	AA521025	76.1	57.7	18.5	36.6	24.9	21.1
glutathione S-transferase M4	AA486669	56.7	173.3	53.9	93.9	88.6	91.7
histone acetyltransferase	AA598797	14.4	38.7	2.9	1.9	54.5	0.7
leukemia associated gene 1, candidate tumor suppressor frequently deleted in B-melan-A	AA425755	17.6	106.5	4.8	10.2	55.9	1.8
metastasis-associated 1-like 1	N32199	57.7	73.8	20.6	62.5	21	70.6
metastasis-associated 1-like 1	AA478965	37.3	54.6	5.2	6.9	71.4	2
methionine aminopeptidase; eIF-2-associated p67	R51346	83.6	100.7	6.7	7.9	6.3	16.5
mitogen-activated protein kinase kinase 2	AA425826	7.6	-6.3	-0.8	-2.6	0.8	115.8
myelin gene expression factor 2	H96671	32	39.9	-0.6	0.5	141	0
peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	H05580	107.5	129	37.6	106.8	39.6	112
pim-1 oncogene	AA424952	122.6	14	12.6	-0.4	11	-0.2
prefoldin 5	AA446453	41.1	155.7	18.5	43.8	34.9	34.1
PRO1900 protein	AA454566	191.9	48.3	4.7	143.4	17	134.5
protein kinase C, beta 1	AA479102	54.6	109.4	25.1	62	69.6	64.3
putative tumor suppressor	R44982	22.3	48.4	2.6	5.9	18.5	2.9
RAB2, member RAS oncogene family-like	AA401972	30.6	63.6	9.9	13.9	27	13.5
RAB5B, member RAS oncogene family	R06712	111.2	130	39.5	109.6	62.2	99.8
RAB7, member RAS oncogene family	AA496780	37.7	29.1	13.7	24.7	25.5	10.4
ras homolog gene family, member A	AA426324	80.8	120.6	40.7	112	57.2	58
serine/threonine kinase 18	AA732873	100.9	111.4	26.4	72.3	32	80.3
SRY (sex-determining region Y)-box 22	AA866160	104.7	28.4	29.6	74.2	37.2	86
suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma, matriptase, epithin)	AA489246	28.4	76.1	12.9	23	13.3	10.9
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily B	AA478436	22.2	-5	13.1	25.4	68	33.6
TRF2-interacting telomeric RAP1 protein	W43028	48.1	11.2	8.2	0.9	77.7	-0.1
tumor susceptibility gene 101	AA670215	53.2	69.6	20.4	39.7	20	46.4

Tabelle 7 : Auswahl verschiedener Gene mit verändertem Gen-Expressionsprofil nach *Microarray*-Untersuchungen; Gesundes Knochenmark (TBM), CD34<sup>+</sup>, NB-4 und HL-60 unbehandelt und nach Behandlung mit 5'AzaCdR (5 µM) und Trichostatin A (500 nM).

Name	ID	TBM	cd34	NB4 nativ	NB4 5'Aza	HL60 nativ	HL60 5'Aza	HL60 TrA
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	N36174	63.7	141.3	13.5	6.6	23.6	48	52.1
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6	R41981	120	118.8	10.2	9.2	31.4	129.2	142.6
adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit	AA630776	153.6	157.7	1.3	50.6	186.3	145.9	160.4
anaphase-promoting complex subunit 7	T67474	147.6	175.4	14.9	9.2	26.5	128.2	121.5
BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)	H09065	36.6	74.4	4.3	6.6	6.1	11.7	21.1
CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	R37937	91.3	61.5	18.3	15.8	4.2	39.7	11.8
checkpoint suppressor 1	H84982	34.1	28.4	5.5	31.8	10	9.8	33.6
checkpoint with forkhead and ring finger domains	AA286905	54.8	103.6	6.3	5.7	6.5	13.4	34.3
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	H09055	11.6	4	0.6	0.8	1.8	-7.6	4.2
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	N39452	117.2	10.9	131.7	13.8	16.8	26.6	73.8
E2F transcription factor 1	AA424950	136.9	144.8	11.3	8	15.9	106	114.1
EphA8	N90703	50.6	111	6.7	4.7	6	46.7	30.5
eukaryotic translation initiation factor 5	AA669443	81.4	92.9	3.5	12	45	63.8	70.9
FAT tumor suppressor (Drosophila) homolog 2	H10939	115.1	117.1	3.2	16.4	109.7	104.7	108.8
G protein pathway suppressor 1	AA521025	76.1	57.7	3.5	4.6	20.4	34.2	57.2
glutathione S-transferase M4	AA486669	56.7	173.3	7.7	5	8.1	71.2	32.1
histone acetyltransferase	AA598797	14.4	38.7	1.7	0.9	-0.4	1.2	12.3
leukemia associated gene 1, candidate tumor suppressor frequently deleted in B-cell	AA425755	17.6	106.5	2.8	1.9	1.1	10.1	3.9
melan-A	N32199	57.7	73.8	7.9	11.1	23.4	41.7	37.4
metastasis-associated 1-like 1	AA478965	37.3	54.6	7.5	2.2	3.7	8	29.7
methionine aminopeptidase; eIF-2-associated p67	R51346	83.6	100.7	6.1	6.7	8.7	98.8	52.3
mitogen-activated protein kinase kinase 2	AA425826	7.6	-6.3	16.5	0.4	-3.6	0.6	1.3
myelin gene expression factor 2	H96671	32	39.9	5.7	2.5	7.8	5.9	21.3
peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	H05580	107.5	129	10.5	5.7	18.1	93.5	78.2
pim-1 oncogene	AA424952	122.6	14	139.2	12	14.4	27.3	120.9
prefoldin 5	AA446453	41.1	155.7	11	6	9.9	11.6	16.3
PRO1900 protein	AA454566	191.9	48.3	11.6	60.3	2.8	6.4	7.3
protein kinase C, beta 1	AA479102	54.6	109.4	20.6	74.4	12.5	20	36.3
putative tumor suppressor	R44982	22.3	48.4	7.8	6.3	6.2	0.6	9.5
RAB2, member RAS oncogene family-like	AA401972	30.6	63.6	8.8	5.3	7.7	17.8	24.9
RAB5B, member RAS oncogene family	R06712	111.2	130	18.8	7.1	10.3	148.2	99.1
RAB7, member RAS oncogene family	AA496780	37.7	29.1	2.7	28.5	6.2	8.4	24.2
ras homolog gene family, member A	AA426324	80.8	120.6	87.6	9.7	4.9	18.4	101.1
serine/threonine kinase 18	AA732873	100.9	111.4	10.7	8.7	12	22.9	65.3
SRY (sex-determining region Y)-box 22	AA866160	104.7	28.4	175.4	8.8	4.2	129.4	62.5
suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma, matriptase, epithin)	AA489246	28.4	76.1	5.9	2.7	7.2	8	12.3
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily 1	AA478436	22.2	-5	19.6	5.1	5.6	21.3	89.2
TRF2-interacting telomeric RAP1 protein	W43028	48.1	11.2	0.8	0.7	0.7	32.5	36.5
tumor susceptibility gene 101	AA670215	53.2	69.6	5.8	7.2	16	39.1	39.7

Tabelle 7 : Auswahl verschiedener Gene mit verändertem Gen-Expressionsprofil nach *Microarray*-Untersuchungen; Gesundes Knochenmark (TBM), CD34<sup>+</sup>, CMK, OCI-5 und LAMA-84 unbehandelt und nach Behandlung mit 5'AzaCdR (5 µM) und Trichostatin A (500 nM).

Name	ID	TBM	cd34	CMK nativ	CMK 5'Aza	OCI5 nativ	OCI5 5'Aza	LAMA84 nativ	LAMA84 5'Aza
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	N36174	63.7	141.3	64.7	45	27.3	15.8	22.5	19.8
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6	R41981	120	118.8	23.1	50	32.5	37.2	34.5	38.1
adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit	AA630776	153.6	157.7	157.7	46.8	130.7	-1.4	4	71.7
anaphase-promoting complex subunit 7	T67474	147.6	175.4	68.6	55.8	-1.9	22.1	13.3	6.5
BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-term	H09065	36.6	74.4	31.2	11.7	-2.8	0.4	7	6.5
CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with	R37937	91.3	61.5	30.2	18.8	33.8	23.5	13.3	14.4
checkpoint suppressor 1	H84982	34.1	28.4	8.5	15.9	9.8	1.3	13	14.6
checkpoint with forkhead and ring finger domains	AA286905	54.8	103.6	46.1	20.8	3.4	-2.4	11.6	7.9
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	H09055	11.6	4	16.1	2.2	-6.7	-15.5	0	1
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	N39452	117.2	10.9	131.7	37.9	64.3	54.4	36.2	33.2
E2F transcription factor 1	AA424950	136.9	144.8	59	31.2	9.3	29.1	24	18.5
EphA8	N90703	50.6	111	42.2	22.9	1.6	0.8	5.4	7
eukaryotic translation initiation factor 5	AA669443	81.4	92.9	92.9	30.7	12.3	0.8	2.3	17.2
FAT tumor suppressor (Drosophila) homolog 2	H10939	115.1	117.1	117.1	46.1	43.2	2.1	14.5	41.1
G protein pathway suppressor 1	AA521025	76.1	57.7	25.3	14.9	0.5	5.7	20.9	14.9
glutathione S-transferase M4	AA486669	56.7	173.3	53.4	38	-1.5	73.8	15.7	58.2
histone acetyltransferase	AA598797	14.4	38.7	38.7	-1.1	-6.6	-4.8	0.7	1.1
leukemia associated gene 1, candidate tumor supp	AA425755	17.6	106.5	106.5	13.5	-1.3	-8.5	5.3	5
melan-A	N32199	57.7	73.8	73.8	42	3.9	14.4	9.3	10.9
metastasis-associated 1-like 1	AA478965	37.3	54.6	54.6	6.5	10.1	-1.7	2.3	13.6
methionine aminopeptidase; eIF-2-associated p67	R51346	83.6	100.7	43.9	39.8	8.4	4.9	2.5	0.6
mitogen-activated protein kinase kinase 2	AA425826	7.6	-6.3	75.8	-0.9	-0.2	28.1	50.9	0.2
myelin gene expression factor 2	H96671	32	39.9	36.1	29.4	3.8	-1.3	0.5	39.3
peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	H05580	107.5	129	69.7	42.5	2.7	151.8	32.2	28.5
pim-1 oncogene	AA424952	122.6	14	49.4	3	-5.3	-12.2	1.6	3.7
prefoldin 5	AA446453	41.1	155.7	55.2	42.8	1.2	0.1	8.8	7.9
PRO1900 protein	AA454566	191.9	48.3	38.8	59.2	182.9	2.2	101.8	94.8
protein kinase C, beta 1	AA479102	54.6	109.4	40.4	45.2	36.6	36.2	16.9	25
putative tumor suppressor	R44982	22.3	48.4	18.6	7.3	-1.5	-6.8	9.8	5
RAB2, member RAS oncogene family-like	AA401972	30.6	63.6	49.8	36.9	6.6	3.5	12.4	9.7
RAB5B, member RAS oncogene family	R06712	111.2	130	130	29	14.2	38.2	25.3	19
RAB7, member RAS oncogene family	AA496780	37.7	29.1	3.8	8.9	4.1	8.6	6.2	4.5
ras homolog gene family, member A	AA426324	80.8	120.6	64.2	22.1	69.5	7.4	17.3	11.1
serine/threonine kinase 18	AA732873	100.9	111.4	51.6	29.2	24.3	21.9	32.8	26.1
SRY (sex-determining region Y)-box 22	AA866160	104.7	28.4	175.4	46.4	8.1	-8.8	10.2	16.5
suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)	AA489246	28.4	76.1	46.7	20.4	1	1.3	6.4	4.4
SWI/SNF related, matrix associated, actin depend	AA478436	22.2	-5	5.5	4.2	184.8	180.8	8.5	7.4
TRF2-interacting telomeric RAP1 protein	W43028	48.1	11.2	45.7	3.2	31.2	4.1	-1	20.3
tumor susceptibility gene 101	AA670215	53.2	69.6	69.6	31.1	7.6	-1.6	10.4	10.3

## 4. Diskussion

Die *Microarray*-Methodik erlaubt die gleichzeitige Expressionsanalyse von mehreren tausend Genen. Profile über Genexpressionen wurden bereits zur Einteilung von Lymphomen auf Basis der cDNA-*Microchips* erstellt (Alizadeh et al. 2000). Auch Leukämien, Melanome und Brustkrebs-Tumore wurden mittels *Microarray*-Technik untersucht, um tumorspezifische Expressionsprofile zu charakterisieren (Golub et al. 1999; Su et al. 2000). Die zwischenzeitlich entwickelten Methoden der *Microarray*-Untersuchungen erlauben die molekulare Einteilung von Tumorarten und geben weiterführende Informationen über die potentielle Wirkung und Effekte der demethylierenden Wirkstoffe (Wei et al. 2003). Es kommen sowohl fluoreszenz-markierte als auch radioaktivmarkierte Proben als *Screening* der DNA-Hypermethylierung und Gen-Inaktivierung bei Krebszellen zum Einsatz. Die Kombination von Fragmentation durch methylen-sensitive Restriktionsenzyme (Tompa et al. 2002) beziehungsweise durch methylierungsspezifische PCR (Gitan et al. 2002) mit der *High-density-Array*-Methode bietet eine weitere Möglichkeit zum *Screenen* des Methylierungsstatus des Genoms (Garinis et al. 2002). Die biologische Relevanz solcher *Array*-Daten muss trotz Berücksichtigung variabler, *arrayspezifischer* Fehlerquellen sowie statistisch relevanter Analysen (Cluster, SAM, POM und andere in Abhängigkeit des Versuchsaufbaus) durch weitere Methoden wie Northern Blot, Western Blot und PCR bestätigt werden. Die Durchführung der *Microarray*-Analyse wird durch spezielle Probleme kompliziert. Durch die unmittelbare Nähe der benachbarten Spots auf einer Membran kommt es zur Überstrahlung eines starken Signals in die Umgebungs-*Spots* (siehe Abbildung 11), die in der vorliegenden Studie aus der Bewertung genommen wurden. Da nur Aussagen über das Vorhandensein oder Fehlen der Genexpression getroffen wurden, konnte in der vorliegenden Analyse unter Berücksichtigung des Hintergrundes und der Integration der Signalintensitäten auf eine weitere statistische Bearbeitung verzichtet werden. Das Ergebnis dieser Arbeit gibt einen Überblick über das zelllinienspezifische Expressionsmuster einer Vielzahl von Genen. Darüber hinaus erlaubt dieser Überblick die Auswahl tumorspezifischer Biomarker der CpG-Hypermethylierung, die zum einen weitere Untersuchungen zu deren möglicher Rolle in der Evaluierung der Tumorprogression ermöglichen und zum anderen mit

Expressionsmustern von AML-Patienten abgeglichen werden können. Auf Basis der identifizierten regulierten Gene können dann spezielle *AML-Microchips* generiert werden, die als *Screening*-Verfahren bei AML-Patienten eingesetzt werden. So können primäre Proben von AML-Patienten beziehungsweise MDS-Patienten gescreent werden und/oder möglicherweise Aussagen über potentielle Wirkungen bestimmter Substanzen (zum Beispiel 5'AzaCdr und Analoge) gemacht werden.

In verschiedenen Untersuchungen wurden *CpG*-Regionen als Mutationsort innerhalb der Keimbahn beschrieben (Cooper et al. 1988) und darüber hinaus als Ursprungsort von inaktivierender Mutation bei TSG bestätigt (Fearon et al. 1992; Rideout et al. 1990). Sowohl DNA-Hypomethylierung (Schmutte et al. 1996; Lapeyre et al. 1979; Pogribny et al. 1995; Wainfan et al. 1992) als auch regionale Hypermethylierung wurde bereits in Krebszellen beschrieben (Bird et al. 1995; Baylin et al. 1986; Baylin et al. 1987; Baylin et al. 1998; de Bustros et al. 1988). Da Methylierung beispielsweise durch Behandlung mit 5'AzaCdr reversibel ist (Gonzalzo et al. 1998), wird 5'AzaCdr zwar in klinischen Studien eingesetzt, dessen Toxizität erfordert jedoch die Entwicklung neuer Medikamente mit demethylierender Wirkung und möglichst geringer Nebenwirkungen für die Patienten (Creusot et al. 1982; Kantarjian et al. 1997; Momparler et al. 1997; Silverman et al. 1993; Wijermans et al. 2000).

Durch die Behandlung von Krebszellen *in vitro* mit 5'AzaCdr konnten inaktivierte Gene wie p16<sup>INK4a</sup> re-exprimiert werden (Gonzalzo et al. 1998). Methyltransferasen werden durch 5'AzaCdr inhibiert und Gene demethyliert, wodurch Zellen wieder Wachstumskontrolle erlangen (TSG) (Herman et al. 1994; Little et al. 1995) beziehungsweise Gene ihre Funktionen wiedergewinnen, die für das Zellwachstum wichtig sind (*Mismatch-repair*-Gene oder Methyltransferasen) (Esteller et al. 1999b, Kane et al. 1997). Zu diesen TSG gehören BRCA1 (Baldwin et al. 2000; Mancini et al. 1998), hMLH1 (Bevilacqua et al. 2000; Cunningham et al. 1998; Esteller et al. 1999a), E-cadherin (Corn et al. 2000), RB (Stirzaker et al. 1997), p16<sup>INK4a</sup> (Gazzeri et al. 1998), von Hippel Lindau (Brauch et al. 2000) und APC (Hiltunen et al. 1997). Nicht nur TSG spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Neoplasien. Werden Gene durch Hypermethylierung inaktiviert, deren Funktion direkt oder indirekt in der Regulierung zellulärer Prozesse involviert ist (hMLH1, *gluthationine S-transferase P1*, MDR1 und andere), so führt

dieser Funktionsverlust ebenfalls zur Prädisposition in der Krebsentstehung (Esteller et al. 1999a). Viele dieser Gene oder deren Rolle in Krebserkrankungen sind noch nicht bekannt und erfordern ein *Screening* des Genoms im Vergleich von Tumorzellen mit gesundem Gewebe zur Identifizierung hypermethylierter Gene. Die Untersuchungen der behandelten und unbehandelten Zelllinien sowie den Zellen aus gesundem Knochenmark auf *Microarray*-Ebene in der vorliegenden Arbeit zeigen sowohl Expressionsunterschiede spezifisch für die Zelllinien als auch Gemeinsamkeiten in der Expression verschiedener Gene. So konnten Gene im Rahmen dieser Untersuchung detektiert werden, die durch 5'AzaCdr demethyliert und reaktiviert wurden. Zu diesen Genen gehört beispielsweise das *Checkpoint-Suppressor*-Gen CHES1 und das Ephrin-Rezeptor-Gen EphA8 sowie MEK2.

CHES1 ist lokalisiert auf 14q24.3-q31 und agiert als Suppressor für Mutationen im *G<sub>2</sub>-Checkpoint-Pathway* (*mec1-1*, *rad9Δ*, *rad52*) nach DNA-Schäden wie UV-Bestrahlung. Werden diese Mutanten durch CHES1 unterdrückt, steigt die Lebensdauer um ein Vielfaches (Pati et al. 1997). CHES1 ist in der Lage, den *G<sub>2</sub>-Checkpoint* wiederherzustellen. CHES1 weist Ähnlichkeit in der Sequenz und phylogenetischen Analyse zu den Genen HTLF, FKHR und WHN auf. HTLF bindet an den Retrovirus Typ1 der T-Zell-Leukämie und gehört zu der Familie der Fork Head/Winged Helix Proteine (Li et al. 2003). In den hier dargestellten *Array*-Auswertungen wurde das Gen *Checkpoint with forkhead and ring finger domains* in allen untersuchten Zelllinien inaktiviert nachgewiesen. Das Gen CHES1 wird in CD34<sup>+</sup>-Zellen und in gesunden Knochenmarkzellen exprimiert, nicht aber in den Zellen von CMK, NB-4 und Kasumi-1. Durch De-Methylierung gewinnt das Gen seine Aktivität wieder. Durch inhibierte Histon-Deacetylierung wird CHES1 in den Zellen von Kasumi-1 und HL-60 reaktiviert. Beide Zelllinien gehören zur FAB-Gruppe M2, was darauf hindeutet, dass dieses Gen Subtyp-spezifisch aberrant reguliert ist.

Gene der Protein-Tyrosin-Kinasen gehören zur größten Familie der Onkogene. Als wichtige Bestandteile der Signaltransduktionskaskade kontrollieren sie Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen. Innerhalb dieser Familie stellen Ephrin-Kinasen die größte Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen dar. Ihre Funktion in der Embryonalentwicklung wurde bereits intensiv untersucht. Darüber hinaus wird aktuell untersucht, welche Rolle die Dysregulierung dieser Kinasen in

der Tumorentwicklung spielt (Dodelet et al. 2000). Ephrin-Rezeptoren können bidirektional als Liganden agieren, ebenso wie Ephrin-Liganden als Rezeptoren fungieren können. Ephrin-Rezeptoren regulieren (inhibierend) den *ERK/MAP-Kinase-Pathway* (Kullander et al. 2002). Stimulation endogener EphA-Kinasen führt zur Inhibition von *Ras/MAP*-Kaskaden und zur gedämpften Aktivierung von MAPK über Rezeptoren für PDGF (*Platelet-derived growth factor*), EGF (*Epidermal growth factor*) und VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (Miao et al. 2001). In Untersuchungen bei Brustkrebs- und Melanom-Gewebe wurde ein Zusammenhang zwischen Ephrin-Rezeptor-Protein-Kinasen (einschließlich deren Liganden) und Tumorigenität bestätigt. Die Assoziation zwischen der Expression von Ephrin-B1 und einer schlechten Prognose bei Osteosarkomen wurde in einer Arbeit bereits gezeigt (Varelias et al. 2002). Die Expression von Ephrin-B1 konnte in dieser Arbeit in den Zellen von HL-60, NB-4 und LAMA84 auf RNA- und Protein-Ebene detektiert werden. Diese erhöhte Expression bestätigt zwar frühere Untersuchungen in anderen Krebserkrankungen, jedoch kann ursächlich eine Hypermethylierung ausgeschlossen werden, da sich nach Behandlung mit 5'AzaCdr die Expression nicht ändert. Weitere Daten deuten darauf hin, dass Eph-Rezeptoren die Tumorentwicklung inhibieren können. So konnte bereits 2002 von Brantley und seiner Gruppe nach Behandlung mit EphA2-Fc und EphA3-Fc eine Verminderung der Zellproliferation, der Tumorgröße sowie der Gefäßdichte im Tumorgewebe von Pankreas-Karzinom und Mamma-Adenokarzinom gezeigt werden (Brantley et al. 2002). EphA8 ist lokalisiert auf Chromosom 1 und wird in den Zellen von HL-60, NB-4, LAMA-84 und Kasumi-1 in der vorliegenden Arbeit nicht exprimiert. EphA8 wird in den Zellen von Kasumi-1 und HL-60 erst durch De-Methylierung und Inhibierung der Histon-Deacetylase exprimiert. Das Fehlen der regulierenden Funktion von EphA8 in den nativen Zelllinien unterstreicht die wichtige Rolle der Ephrin-Rezeptoren in der Tumorentwicklung, da durch aberrant regulierte Eph-Rezeptor-Kinasen die Ras/Map-Kaskade nicht inhibiert wird, was zur Dysregulierung des Zellzyklus führen kann.

*MAPK-Pathways* sind Signalübertragungssysteme, die extrazelluläre Signale (Hormone, Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren) in zelluläre Antworten umwandeln (Elion 1998; Garrington et al. 1999). Drei Klassen von Kinasen gehören zu den Bestandteilen der MAPK-Signalkaskaden: MAP-Kinasen (ERK, *extracellular signal-regulated kinase*), MAPK-Kinasen (MEK, *MAPK/ERK kinase*)

und MAPKK-Kinasen (*MEK kinase, raf*s). Im *ERK-Pathway* interagieren Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, (hämatopoetische) Wachstumsfaktor-Rezeptoren und (heterotrimere) G-Protein-gebundene Rezeptoren mit extrazellulären Signalen, die in zellspezifische Aktionen innerhalb der Proliferation und Differenzierung der Zelle umgewandelt werden: Über das Protein *ras* wird die Aktivität von MAPKKK (*Raf*) stimuliert, welches wiederum MAPKK (MEK) aktiviert. MEK aktiviert daraufhin MAPK (ERK) (Abbildung 21b). Durch ERK1/2 werden verschiedene Proteine (*Sos, Rak, Elk-1, Ets-1, C-Myc, Phospholipase A2, Sap1a, Tal, STATs, EGF-Rezeptor, p90rskS6 kinase*) phosphoryliert, die in ihrer Funktion für die Steuerung von Metabolismus, Chromatin-Anordnung, Zytoskelett-Proteinen und einigen Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind (Abbildung 21a).

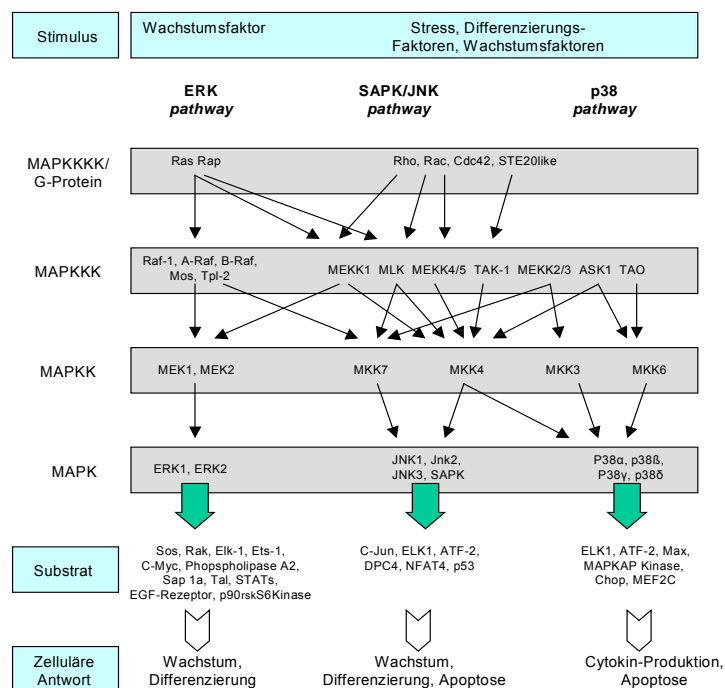


Abbildung 21a: *MEK-Pathway*; die klassische *Ras/MAP*-Kaskade wird gebildet aus MAPKKK, MAPKK und MAPK. Eine Vielzahl extrazellulärer Signale aktiviert MAPKKK, die ihrerseits eine oder mehrere MAPKK phosphoryliert und aktiviert. Diese phosphorylieren wiederum spezifische MAPK. Aktivierte MAK phosphorylieren und aktivieren verschiedene Substrate im Zytoplasma und Zellkern, unter anderem auch Transkriptionsfaktoren. Diese Substrate kontrollieren die zelluläre Antwort wie Apoptose, Proliferation und Differenzierung.



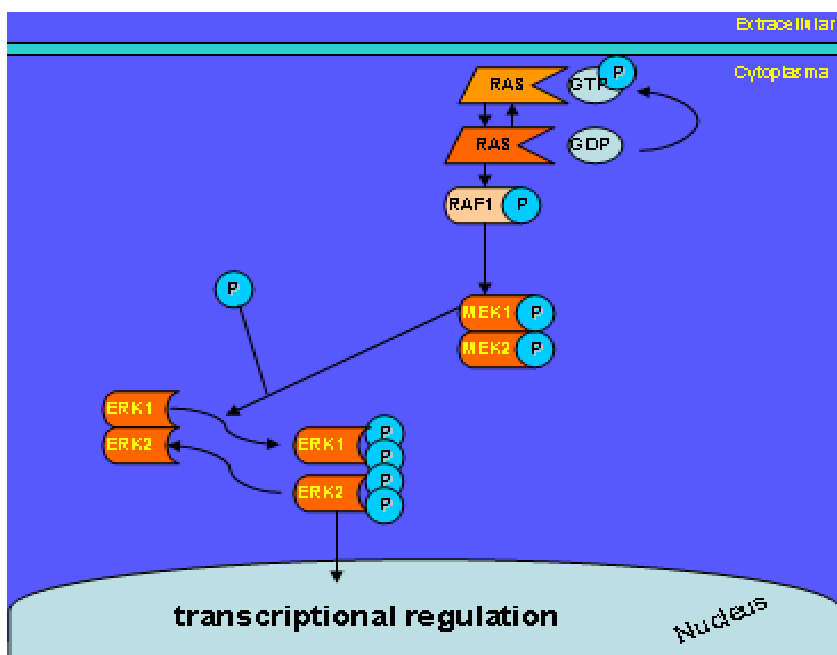


Abbildung 21b: Die Rolle von MEK2 (*mitogen-activated protein kinase kinase 2*) im *ras-Pathway*: MEK2 phosphoryliert und aktiviert ERK 2, wodurch die Transkription aktiviert wird.

Eine wichtige Bedeutung in der Ursache der Tumorentstehung hat die veränderte Expression oder Funktion von Genen, die eine Rolle in Zellwachstum und Zelldifferenzierung spielen. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind das Kernstück eines Signaltransduktionsnetzwerks, die Differenzierung, Proliferation und Zelltod regulieren. Das aktivierte Gen MEK2, lokalisiert auf 7q32 (Abbildung 21c), konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene in den Zelllinien nachgewiesen werden.

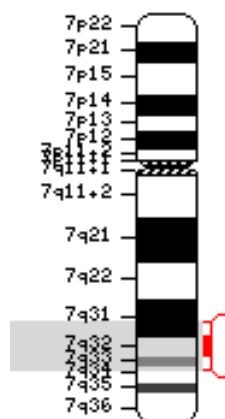


Abbildung 21c: MEK2 ist lokalisiert auf Chromosom 7q.

Aberrante Aktivierung des Protein-Kinase-*Pathways* (MAPK) führt zu Zellen, die nicht dem programmierten Zelltod unterliegen und in der Lage sind, autonom zu wachsen. Die genetischen Veränderungen sind vielfältig und reichen von *ras*-Mutationen (Hunter 1997) bis zu überexprimierten Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Lewis et al. 1998). Aktivierung von *Upstream*-Kinasen, Inaktivierung von Phosphatasen sowie Überexpression von ERK1/2 (MAPK) führt in den meisten Fällen von AML zu MAPK-Aktivierung (Kim et al. 1999). Dysregulierung der *ras*-Signaltransduktion wurde bereits im malignen Wachstum von menschlichen Krebszellen, unter anderem auch bei myeloischen Leukämien nachgewiesen (Clark et al. 1995). Als Alternative zu den konventionellen, wahrscheinlich weitaus toxischeren Chemotherapien eröffnen diese Kinase-*Pathways* neue therapeutische Möglichkeiten zur Entwicklung antitumorale Substanzen in Form von spezifischen Enzyminhibitoren. Verschiedene Inhibitoren wurden bereits klinischen Prüfungen unterzogen (Adjei et al. 2000; Hilger et al. 2002; Zujewski et al. 2000), beziehungsweise deren Auswirkung molekularbiologisch untersucht (Reuter et al. 2000, Milella et al. 2001; Miranda et al. 2002). Reuter und seine Gruppe konnten zeigen, dass HL-60 eine *N-Ras codon 61* Mutation aufweist (Morgan et al. 2001) und MEK1/2 und ERK1/2 aktiviert werden. Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren (FTI-277, FPT-3, U0126, PD098059 und anderen) führte zur Hemmung von Viabilität, Wachstum und Koloniebildung der Zellen. In unseren Untersuchungen wird MEK1/2 und ERK1/2 auf Protein-Ebene aktiviert. ERK1 wird mit und ohne Inhibition durch U0126 in diesen Zellen phosphoryliert, im Gegensatz zu ERK2, das nach MEK-Inhibition bei HL-60-Zellen deutlich geringer

exprimiert wird. Bei NB-4 wurde in den Untersuchungen von Reuter und seiner Gruppe keine *Ras*-Mutation nachgewiesen und sowohl MEK als auch ERK aktiviert. Auch in unseren Versuchen wird MEK und ERK aktiviert. Durch Demethylierung wird die Expression von MEK2 in NB-4, CMK und LAMA-84 ausgeschaltet. Das Protein MEK2 wird bei HL-60, NB-4 und Kasumi-1 nur in den nativen Zellen nachgewiesen. Bei LAMA-84 wird in den behandelten Zellen mehr Protein nachgewiesen als in den nativen Zellen. In den Zellen von NB-4 konnte außerdem gezeigt werden, dass Inhibition von MEK durch U0126 keinen Einfluss auf den ERK-*Pathway* hat. Bei Reuter zeigte die Behandlung mit den Inhibitoren unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellen. So wurde für U0126 und FTP-3 eine Apoptose-Induktion nachgewiesen, während FTI-277 zwar einen G<sub>2</sub>/M-Block, jedoch keine Apoptose induziert. Dies deutet auf verschiedene Aktivierungsmechanismen hin (Prendergast 2000). Kasumi-1 enthält eine *Codon 12 K-Ras* Mutation (Morgan et al. 2001). *Ras* wird nicht aktiviert, während MEK und ERK (schwach) aktiviert werden. In den vorliegenden Versuchen konnte MEK2 nur in der inaktiven, unphosphorylierten Form nachgewiesen werden. ERK1 und die *raf*-Kinase wurden ebenfalls nicht aktiviert. ERK2 wird erst nach Demethylierung und Behandlung mit Trichostatin A exprimiert. LAMA-84-Zellen weisen eine *bcr-abl*-Mutation auf, wobei keine *Ras*, MEK oder ERK-Aktivierung nachgewiesen wurde (Morgan et al. 2001). Im Gegensatz zu diesem Ergebnis wird in der vorliegenden Untersuchung sowohl MEK1/2 als auch ERK1/2 bei LAMA-84 exprimiert. In allen untersuchten Zelllinien wurde in der ERK-Kaskade PP2a und Elk nicht nachgewiesen. Die Kinasen p90rsk und p-*raf* liegen in allen Zellen in phosphorylierter Form vor. P38 konnte außer bei LAMA-84 und NB-4 in allen Zellen nachgewiesen werden. *Ras*- oder *Rap*-Proteinkinasen aktivieren *Raf*-Kinasen, die wiederum MEK1 und MEK2 phosphorylieren. Bei CMK und LAMA-84 konnte keine Unterbrechung im ERK-*Pathway* nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Hypermethylierungsmechanismen nicht auf MEK2 selbst wirken, sondern andere *Upstream*-Gene dysregulieren, die daraufhin MEK2 *downregulieren*. Es gilt herauszufinden, ob möglicherweise EphA8 als potentieller Regulator von MEK2 identifiziert werden kann.

Ein weiteres detektiertes Gen der Array-Analyse ist PDCD2 (*Programmed cell death, ligand 2*), das auf der chromosomalen Bande 9p24.2 lokalisiert ist und in allen menschlichen Geweben exprimiert wird (Kawakami et al. 1995). Es gehört

mit anderen Genen wie TBP und PSMB1 (*proteasomal C5 subunit*) zum *TATA binding protein* (TBP), das durch Chromatin und DNA-Methylierung induzierte Geninaktivierung aufhebt (Harland et al. 2002). Eine weitere Funktion von PDCD2 ist die Suppression von HCF-1 (*host cell factor-1*), das Zellen nach temperaturbedingter Mutation in der G1-Phase blockiert (Scarr et al. 2002). In allen untersuchten Zelllinien in dieser Studie war PDCD2 nicht exprimiert und konnte durch De-Methylierung und Inhibition der Histon-Deacetylase nicht reaktiviert werden. Das deutet auf eine mögliche Deletion des Genortes hin, was bisher noch nicht untersucht wurde. BCL6, ein Gen auf 3q27, das häufig verändert ist in Lymphomen (vor allem *Large-cell B-cell-type*), reguliert repressiv PDCD2. Dysreguliertes BCL6 führt zur *Downregulierung* von PDCD2, reduzierter Apoptose und zur Anhäufung von BCL6-enthaltenden Lymphomzellen (Baron et al. 2002). Eine Reihe weiterer Gene mit regulierter Expression konnte detektiert werden, deren erhöhter Expressionsstatus bereits mit anderen Tumorarten in Verbindung gebracht wird. *Glutathione S-transferase M4* wird in allen Zelllinien nicht exprimiert. In NB-4, HL-60 und LAMA-84 wird das Gen durch De-Methylierung re-exprimiert. In den Zellen von HL-60 wird *Glutathione S-transferase M4* zusätzlich durch Behandlung mit Trichostatin A exprimiert (siehe Tabelle 7). Obwohl *Glutathione S-transferase M4* in der vorliegenden Arbeit nicht in den AML-Zelllinien überexprimiert ist, konnte in einer Studie von Chen und Kollegen in Zellen aus Lungenkarzinomen eine 1,4- bis 10,6fach höhere Expression von *Glutathione S-transferase M4* detektiert werden (Chen et al. 2002). *Glutathione S-transferase M1* (GSTM1) wurde bei 83 % der Kindern mit AML Subtyp M3 und bei 72 % mit Subtyp M4 mit erhöhter Expression nachgewiesen, während für *Glutathione S-transferase T1* keine signifikanten Veränderungen der Expression nachgewiesen wurden (Davies et al. 2000). Dies lässt darauf schließen, dass *Glutathione S-transferase M4* in Tumoren dysreguliert sein kann, wobei die Expression je nach Subtyp unterschiedlich ist und verschiedene Aktivierungsmechanismen zugrunde liegen. Zur Familie der GTP-Bindungsproteine zählt eine Vielzahl von *ras*-Proteinen und *ras*-Onkoproteinen. *Rab*-Proteine aus der *Ras*-Superfamilie sind kleine GTPasen, die im sekretorischen und endozytischen *Pathway* im intrazellulären Vesikeltransport involviert sind. Bereits 1993 wurde gezeigt, dass das RAB2-Protein in mononukleären Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Neoplasien häufig

überexprimiert ist (Culine et al. 1994; Culine et al. 1993). RAB5A und RAB7 wurden mit einer 6fach höheren Expression in Schilddrüsenadenomen beschrieben (Croizet-Berger et al. 2002). RAB2 wird in den untersuchten Zelllinien nicht stärker exprimiert als im gesunden Knochenmark. Nur bei den Zellen von CMK wird das Protein der *ras*-Familie hochreguliert. Behandlung mit Trichostatin A oder 5'AzaCdr hat keinen Einfluss auf die Expression des Gens RAB2 in den untersuchten Zelllinien (siehe Tabelle 7). Durch De-Methylierung sowie durch Behandlung mit Trichostatin A wird das Gen RAB5B bei HL-60 und durch inhibierte Histon-Deacetylase bei Kasumi-1 hochreguliert (siehe Tabelle 7). Auch das RAB5A-Gen wurde von Liu und Mitarbeitern als Protein beschrieben, das eine wichtige Rolle in Invasion und Differenzierung von Tumorzellen aus Lungen-Adenokarzinomen spielt (Liu et al. 2002). Erst kürzlich wurde die Akkumulation von RAB5-positiven Endosomen an *Connexin43* (Cx43) nachgewiesen, ausgelöst durch das Pestizid Lindane (Mograbai et al. 2003). Lindane induziert gleichzeitig die Phosphorylierung des Tumorsuppressor-Gens Cx43 sowie die Aktivierung der Kinase ERK. In den Zellen von NB-4 wird die Expression des Gens RAB7 durch De-Methylierung induziert. Bei HL-60 wird RAB7 nur durch Behandlung mit Trichostatin A geringfügig re-induziert (siehe Tabelle 7). Aberrante RAB-Protein-Expression spielt eine wichtige Rolle im *MAPK/ERK-Pathway*; die zugrundeliegenden Mechanismen müssen zukünftig noch genauer untersucht werden. Neben Mutation und Deletion sind epigenetische Phänomene wie die Hypermethylierung von CpG-Dinukleotiden im Promoterbereich von Genen als ein weiterer Mechanismus der Geninaktivierung bekannt. Spezifische Muster von aberrant methylierten Genen konnten in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der *Microarray*-Technologie von sechs verschiedenen malignen myeloischen Zelllinien (CMK, NB-4, Kasumi-1, LAMA-84, OCI-5 und HL-60) identifiziert werden, die unphysiologischerweise durch Methylierung und/oder Histon-Acetylierung inaktiviert sind. Die am häufigsten regulierten Gene sind involviert im Zellzyklus (beispielsweise MEK2, EphA8, CHES1 und AP3d1); durch Re-Expression (durch 5'AzaCdr und/oder Trichostatin A) können deren korrespondierende Zellen wieder Zellzykluskontrolle erlangen. 5'AzaCdr induziert abhängig von der Zelllinie sowohl Differenzierung als auch Apoptose, wobei bestimmte, in der Wachstumsregulierung involvierte *Pathways* der AML-Linien identifiziert werden konnten (*Ras/MAPK/ERK-Pathway*).

In der vorliegenden Arbeit konnten nicht nur Gen-Expressionsprofile von AML-Linien mittels *Microarray*-Technik generiert werden, sondern auch ein Datenpool als potentielle Grundlage für weitere molekularbiologische Charakterisierungen verschiedener Leukämien. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnten Subtyp-relevante Biomarker identifiziert werden, die die Grundlage für die Entwicklung spezieller *AML-Microchips* darstellen, und somit ein sinnvolles Patienten-*Screening* in Form von Vorselektion bezüglich dem Ansprechen auf bestimmte Behandlungsstrategien möglich machen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen-Expressionsprofil von verschiedenen akuten myeloischen Zelllinien untersucht und Profile von unbehandelten Zelllinien im Vergleich mit gesundem menschlichen Knochenmark, CD34<sup>+</sup>-Zellen sowie AML-Linien nach Behandlung mit einem DNA-Methyltransferase-Inhibitor (5'-Aza-2'-Deoxycytidin) und einem Histondeacetylase-Inhibitor (Trichostatin A) verglichen. Die optimale Konzentration der Wirkstoffe sowie die entsprechende Inkubationsdauer wurden mit ATP-Messungen ermittelt. Die extrahierte RNA wurde in einzelnen Fällen amplifiziert und anschließend radioaktiv markiert. Nach Hybridisierung der entsprechenden Proben auf *Microarrays* erfolgten die qualitativen und quantitativen Analysen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die *Microarray*-Methodik prinzipiell als Untersuchungsmethode ein umfassendes Profil der Gen-Expression erlaubt und bestimmte Gene mit verändertem Expressionsstatus detektiert werden können. Die am häufigsten betroffenen Gene spielen eine zentrale Rolle im Zellzyklus, in der Chromatinanordnung sowie dem Metabolismus und der Transkription der Zelle (MEK2, CHES1, EphA8, PDCD2, SWI/SNF, Prefoldin5, AP3d1, RAB7 und andere). Mittels antikörperspezifischen Western-Blot-Untersuchungen konnte an einigen ausgewählten Genen (MEK2, CHES1, EphA8) gezeigt werden, dass die mittels *Microchip*-Analyse auf RNA-Ebene angezeigte Expression auch auf Proteinebene übertragbar ist. MEK2 gehört zum *Ras/MAPK/ERK-Pathway* und wird weder in CD34<sup>+</sup>-Zellen noch im gesunden Knochenmark exprimiert. MEK2 phosphoryliert und aktiviert ERK, welches Transkriptionsfaktoren, Metabolismus und die Chromatinanordnung der Zelle steuert. In CMK, NB-4 und LAMA-84 konnte eine Expression des Gens nachgewiesen werden, die durch Demethylierung (5'AzaCdr) reversibel *down-reguliert* wird. Bei Kasumi-1 und HL-60 (beide AML-Subtyp M2) unterscheidet sich der Expressionslevel von MEK2 nicht von dem gesunder Zellen, so dass davon auszugehen ist, dass MEK2 zumindest hier keine Rolle bei der epigenetischen Regulation spielt. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser *Downregulierung* von MEK2 ist noch unklar. Aufgrund der erhobenen Daten ist jedoch naheliegend, dass ein Gen *upstream* von MEK2 im *ras-Pathway* durch De-Methylierung aktiviert wird und infolgedessen sekundär MEK2 inhibiert. Als weiteres Gen, welches bei mehreren myeloischen Neoplasien durch epigenetische Mechanismen reguliert

wird, konnte EphA8 identifiziert werden. EphA8 gehört zur Familie der Ephrin-Rezeptoren, die inhibierend die *ras/MAP*-Kaskade regulieren. Eine Assoziation zwischen Ephrin-Rezeptor-Kinasen und Tumorigenität liegt somit nahe, da EphA8 in den vorliegend untersuchten Linien (außer bei CMK) nicht exprimiert ist und sich durch 5'AzaCdr re-induzieren lässt. Bereits in anderen Tumorarten (Mammakarzinom, Melanom, Osteosarkom) wurden Relationen zwischen Ephrin-Rezeptor-Kinasen (und deren Liganden) und Tumorentwicklung dokumentiert. Es wäre gut möglich, dass EphA8 einer der *Upstream*-Regulatoren von MEK2 ist. Ein weiteres detektiertes Gen ist CHES1, das in CMK, NB-4 und Kasumi-1 nicht exprimiert wird und durch De-Methylierung re-induzierbar ist. Das Gen spielt eine zentrale Rolle im Zellzyklus, da es im gesundem Knochenmark und in CD34<sup>+</sup>-Zellen als Suppressor für Mutationen im *G<sub>2</sub>-Checkpoint-Pathway* (*mec1-1*, *rad9Δ*, *rad52*) agiert und in der Lage ist, den *G<sub>2</sub>-Checkpoint* wiederherzustellen. Die re-induzierte Expression des Gens bei Kasumi-1 und HL-60 (beide FAB-Gruppe M2) durch inhibierte Histon-Deacetylierung zeigt hier, dass CHES1 eine Rolle in der epigenetischen Regulation spielt. AP3d1 (*adaptor-related protein complex 3 delta 1 subunit*) scheint mit dem Golgi-Apparat assoziiert zu sein und ist in CD34<sup>+</sup>-Zellen und gesundem Knochenmark stark exprimiert, jedoch in NB-4 und Kasumi-1 *downreguliert*. Das lässt darauf schließen, dass das Fehlen dieses Gens in die Pathophysiologie der Leukämogenese involviert ist. Obwohl die Ergebnisse der *Array*-Untersuchungen auch auf Protein-Ebene bestätigt werden konnten, können die Werte nicht ohne Überprüfung durch andere Untersuchungsmethoden übernommen werden. Abhängig von den Signalintensitäten wurden durchschnittlich 60 % der Signale als falsch-positiv ermittelt und aus der Bewertung herausgenommen. Hinzu kommen *Spots*, die herstellungsbedingt keine cDNA enthalten. Nach Prüfung der *Array*-Ergebnisse durch visuelle Kontrolle der *Microchips* und Bestätigung durch andere Methoden können Daten aus den vorliegenden Untersuchungen eine wichtige klinische Bedeutung haben, indem sie in *Screening*verfahren eingesetzt werden können. Die ermittelten Gene mit AML-spezifisch reguliertem Expressionsprofil beziehungsweise die Gene, die nach Behandlung mit DNA-Methyltransferase-Inhibitor und/oder Histon-deacetylase-Inhibitor re-induzierbar sind, können auf *Microchips* *gespottet* werden, um so Patienten vorzuselektieren, die von einer Behandlung mit diesen



Wirkstoffen profitieren. Außerdem lassen sich *Arrays* mit Genen generieren, die mit Prognosefaktoren assoziiert sind.

**A**

**Adjei** AA, Erlichman C, Davis JN. A phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor SCH66336: Evidence for biological and clinical activity. *Cancer Res* 2000; 60(18):71-7.

**Alizadeh** AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Staudt LM, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403(6769):503-11.

**Appelbaum** FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE. Acute Myeloid Leukemia. *Hematology* 2001; 2001(1):62-86.

**Armstrong** SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, Korsmeyer SJ. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002; 30(1):41-7.

**B**

**Bachman** KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB, Kinzler KW, Vogelstein B. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 2003; 3(1):89-95.

**Baldwin** RL, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, Karlan BY. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: A Population-based Study. *Cancer Res* 2000; 60(19):5329-33.

**Baron** BW, Anastasi J, Thirman MJ, Furukawa Y, Fears S, Kim DC, Simone F, Birkenbach M, Montag A, Sadhu A, Zeleznik-Le N, McKeithan TW. The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene is a target of BCL6 repression: Implications for a role of BCL6 in the down-regulation of apoptosis. *PNAS* 2002; 99(5):2860-5.

**Batova** A, Diccianni MB, Yu JC, Nobori T, Link MP, Pullen J, Yu AL. Frequent and selective methylation of p15 and deletion of both p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1997; 57(5):832-6.

**Baylin** SB, Fearon ER, Vogelstein B, de Bustros A, Sharkis SJ, Burke PJ, Staal SP, Nelkin BD. Hypermethylation of the 5' region of the calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies. *Blood* 1987; 70(4):12-7).

**Baylin** SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 1998; 72(141-96).

**Baylin SB**, Hoppener JW, de Bustros A, Steenbergh PH, Lips CJ, Nelkin BD. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res* 1986; 46(29):17-22).

**Ben-Hur A**, Elisseeff A, Guyon I. A stability based method for discovering structure in clustered data. *Pac Symp Biocomput* 2002:6-17.

**Bernhard D**, Ausserlechner MJ, Tonko M, Loffler M, Hartmann BL, Csordas A, Kofler R. Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts. *Faseb J* 1999; 13(14):1991-2001.

**Bestor TH**, Tycko B. Creation of genomic methylation patterns. *Nat Genet* 1996; 12(4):363-7.

**Bevilacqua RA**, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000; 87(2):200-3.

**Bird A**, Tate P, Nan X, Campoy J, Meehan R, Cross S, Tweedie S, Charlton J, Macleod D. Studies of DNA methylation in animals. *J Cell Sci Suppl* 1995; 19(37-9).

**Bird AW**, Yu DY, Pray-Grant MG, Qiu Q, Harmon KE, Megee PC, Grant PA, Smith MM, Christman MF. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* 2002; 419(6905):411-5.

**Birnbaum RA**, O'Marcaigh A, Wardak Z, Zhang YY, Dranoff G, Jacks T, Clapp DW, Shannon KM. Nf1 and Gmcsf interact in myeloid leukemogenesis. *Mol Cell* 2000; 5(1):189-95.

**Bollag G**, Clapp DW, Shih S, Adler F, Zhang YY, Thompson P, Lange BJ, Freedman MH, McCormick F, Jacks T, Shannon K. Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nat Genet* 1996; 12(2):144-8.

**Brantley DM**, Cheng N, Thompson EJ, Lin Q, Brekken RA, Thorpe PE, Muraoka RS, Cerretti DP, Pozzi A, Jackson D, Lin C, Chen J. Soluble Eph A receptors inhibit tumor angiogenesis and progression in vivo. *Oncogene* 2002; 21(46):7011-26.

**Brauch H**, Weirich G, Brieger J, Glavac D, Rodl H, Eichinger M, Feuerer M, Weidt E, Puranakitstha C, Neuhaus C, Pomer S, Brenner W, Schirmacher P, Storkel S, Rotter M, Masera A, Gugeler N, Decker HJ. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res* 2000; 60(7):1942-8.

**Burnett AK**, Wheatley K, Goldstone AH, Stevens RF, Hann IM, Rees JH, Harrison G. The value of allogeneic bone marrow transplant in patients with acute myeloid leukaemia at differing risk of relapse: results of the UK MRC AML 10 trial. *Br J Haematol* 2002; 118(2):385-400.

**C**

**Cameron** EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999; 21(1):103-7.

**Carron** C, Cormier F, Janin A, Lacronique V, Giovannini M, Daniel MT, Bernard O, Ghysdael J. TEL-JAK2 transgenic mice develop T-cell leukemia. *Blood* 2000; 95(12):3891-9.

**Chen** G, Gharib TG, Huang C-C, Thomas DG, Shedden KA, Taylor JMG, Kardia SLR, Misek DE, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: Identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8(7):2298-305.

**Cho** EK, Bang SM, Ahn JY, Yoo SM, Park PW, Seo YH, Shin DB, Lee JH. Prognostic value of AML 1/ETO fusion transcripts in patients with acute myelogenous leukemia. *Korean J Intern Med* 2003; 18(1):13-20.

**Clark** GJ, Der C. Ras proto-oncogene activation in human malignancy. Humana Press 1995:17-52.

**Cools** J, Peeters P, Voet T, Avenir A, Mecucci C, Grandchamp B, Marynen P. Genomic organization of human JAK2 and mutation analysis of its JH2-domain in leukemia. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 85(3-4):260-6.

**Cooper** DN, Youssoufian H. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet* 1988; 78(151-5).

**Corn** PG, Smith BD, Ruckdeschel ES, Douglas D, Baylin SB, Herman JG. E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia. *Clin Cancer Res* 2000; 6(11):4243-8.

**Cortes** J, Estey E, O'Brien S, Giles F, Shen Y, Koller C, Beran M, Thomas D, Keating M, Kantarjian H. High-dose liposomal daunorubicin and high-dose cytarabine combination in patients with refractory or relapsed acute myelogenous leukemia. *Cancer* 2001; 92(1):7-14.

**Cortes** J, Kantarjian H, Albitar M, Thomas D, Faderl S, Koller C, Garcia-Manero G, Giles F, Andreeff M, O'Brien S, Keating M, Estey E. A randomized trial of liposomal daunorubicin and cytarabine versus liposomal daunorubicin and topotecan with or without thalidomide as initial therapy for patients with poor prognosis acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2003; 97(5):1234-41.

**Creusot** F, Acs G, Christman JK. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'deoxyctidine. *J Biol Chem* 1982; 257(2041-8).

**Croizet-Berger** K, Daumerie C, Couvreur M, Courtoy PJ, van den Hove M-F. The endocytic catalysts, Rab5a and Rab7, are tandem regulators of thyroid hormone production. *PNAS* 2002; 99(12):8277-82.

**Culine** S, Honore N, Closson V, Droz JP, Extra JM, Marty M, Tavitian A, Olofsson B. A small GTP-binding protein is frequently overexpressed in peripheral blood mononuclear cells from patients with solid tumours. *Eur J Cancer* 1994; 30A(5):670-4.

**Culine** S, Honore N, Closson V, Lang P, Bertoglio J, Tavitian A, Olofsson B. A possible role for the Ras-related Rab2 protein in the immunological events associated with hematological malignancies. *Nouv Rev Fr Hematol* 1993; 35(1):41-4.

**Cunningham** JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58(15):3455-60.

## D

**Dastugue** N, Payen C, Lafage-Pochitaloff M, Bernard P, Leroux D, Huguet-Rigal F, Stoppa AM, Marit G, Molina L, Michallet M, et al. Prognostic significance of karyotype in de novo adult acute myeloid leukemia. The BGMT group. *Leukemia* 1995; 9(9):1491-8.

**Davies** SM, Robison LL, Buckley JD, Radloff GA, Ross JA, Perentesis JP. Glutathione S-Transferase Polymorphisms in Children with Myeloid Leukemia: A Children's Cancer Group Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(6):563-6.

**De Bustros** A, Nelkin BD, Silverman A, Ehrlich G, Poiesz B, Baylin SB. The short arm of chromosome 11 is a 'hot spot' for hypermethylation in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(5693-7).

**De Lima** M, Ravandi F, Shahjahan M, Andersson B, Couriel D, Donato M, Khouri I, Gajewski J, van Besien K, Champlin R, Giralt S, Kantarjian H. Long-term follow-up of a phase I study of high-dose decitabine, busulfan, and cyclophosphamide plus allogeneic transplantation for the treatment of patients with leukemias. *Cancer* 2003; 97(5):1242-7.

**Debernardi** S, Lillington DM, Chaplin T, Tomlinson S, Amess J, Rohatiner A, Lister TA, Young BD. Genome-wide analysis of acute myeloid leukemia with normal karyotype reveals a unique pattern of homeobox gene expression distinct from those with translocation-mediated fusion events. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37(2):149-58.

**Delaunay** J, Vey N, Leblanc T, Fenaux P, Rigal-Huguet F, Witz F, Lamy T, Auvrignon A, Blaise D, Pigneux A, Mugneret F, Bastard C, Dastugue N, Van Den Akker J, Fiere D, Reiffers J, Castaigne S, Leverger G, Harousseau JL, Dombret H.

Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2003; 102(2):462-9.

**Dodelet** VC, Pasquale EB. Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene* 2000; 19(49):5614-9.

**Döhner** K, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk RF, Dohner H. Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 2002; 20(15):3254-61.

## E

**Elion** EA. Routing MAP kinase cascades. *Science* 1998; 281(5383):1625-6.

**Ei-Osta** A, Lubbert M, Wijermans PW, Licht T, Jones PA. On the use of DNA methylation inhibitors and the reversal of transcriptional silencing. *Blood* 2003; 101(4):1656-7.

**Emerson** DL, Bendele R, Brown E, Chiang S, Desjardins JP, Dihel LC, Gill SC, Hamilton M, LeRay JD, Moon-McDermott L, Moynihan K, Richardson FC, Tomkinson B, Luzzio MJ, Baccanari D. Antitumor Efficacy, Pharmacokinetics, and Biodistribution of NX 211: A low-clearance liposomal formulation of lurtotecan. *Clin Cancer Res* 2000; 6(7):2903-12.

**Esteller** M, Catusus L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol* 1999a; 155(5):1767-72.

**Esteller** M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999b; 59(4):793-7.

**Esteller** M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000a; 92(7):564-9.

**Esteller** M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2000b; 60(9):2368-71.

## F

**Fearon** ER, Jones PA. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J* 1992; 6(2783-90).

**Flotho C**, Valcamonica S, Mach-Pascual S, Schmahl G, Corral L, Ritterbach J, Hasle H, Arico M, Biondi A, Niemeyer CM. RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia* 1999; 13(1):32-7.

**Fröhling S**, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002; 100(13):4372-80.

## G

**Garinis GA**, Menounos PG, Spanakis NE, Papadopoulos K, Karavitis G, Parassi I, Christeli E, Patrinos GP, Manolis EN, Peros G. Hypermethylation-associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas. *J Pathol* 2002; 198(4):442-9.

**Garrington TP**, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999; 11(211-8).

**Gazzeri S**, Gouyer V, Vour'ch C, Brambilla C, Brambilla E. Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene* 1998; 16(4):497-504.

**Gitan RS**, Shi H, Chen C-M, Yan PS, Huang TH-M. Methylation-specific oligonucleotide microarray: A new potential for high-throughput methylation analysis. *Genome Res.* 2002; 12(1):158-64.

**Glick RD**, Swendeman SL, Coffey DC, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM, La Quaglia MP. Hybrid polar histone deacetylase inhibitor induces apoptosis and CD95/CD95 ligand expression in human neuroblastoma. *Cancer Res* 1999; 59(17):4392-9.

**Golub TR**, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286(5439):531-7.

**Gonzalgo ML**, Hayashida T, Bender CM, Pao MM, Tsai YC, Gonzales FA, Nguyen TT, Jones PA. The role of DNA methylation in expression of the p19/p16 locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Res* 1998; 58(1245-52).

**Grader-Beck T**, van Puijenbroek AA, Nadler LM, Boussiotis VA. cAMP inhibits both Ras and Rap1 activation in primary human T lymphocytes, but only Ras inhibition correlates with blockade of cell cycle progression. *Blood* 2003; 101(3):998-1006.

**Graff JR**, Greenberg VE, Herman JG, Westra WH, Boghaert ER, Ain KB, Saji M, Zeiger MA, Zimmer SG, Baylin SB. Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58(10):2063-6.

**Gray** SG, Yakovleva T, Hartmann W, Tally M, Bakalkin G, Ekstrom TJ. IGF-II enhances trichostatin A-induced TGFbeta1 and p21(Waf1,Cip1, sdi1) expression in Hep3B cells. *Exp Cell Res* 1999; 253(2):618-28.

**Grimwade** D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001; 98(5):1312-20.

## H

**Harland** L, Crombie R, Anson S, deBoer J, Ioannou PA, Antoniou M. Transcriptional regulation of the human TATA binding protein gene. *Genomics* 2002; 79(4): 479-82.

**Harousseau** J-L, Cahn J-Y, Pignon B, Witz F, Milpied N, Delain M, Lioure B, Lamy T, Desablens B, Guilhot F, Caillot D, Abgrall J-F, Francois S, Briere J, Guyotat D, Casassus P, Audhuy B, Tellier Z, Hurteloup P, Herve P. Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 1997; 90(8):2978-86.

**Herman** JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res* 1996; 56(4):722-7.

**Herman** JG, Latif F, Weng Y. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(9700-4).

**Hilger** RA, Scheulen ME, Strumberg D. The Ras-Raf-MEK-ERK Pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 2002; 23(511-8).

**Hiltunen** MO, Koistinaho J, Alhonen L, Myohanen S, Marin S, Kosma VM, Paakkonen M, Janne J. Hypermethylation of the WT1 and calcitonin gene promoter regions at chromosome 11p in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997; 76(9):1124-30.

**Hirai** H. Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33(4):153-60.

**Huang** H, Reed CP, Zhang JS, Shridhar V, Wang L, Smith DI. Carboxypeptidase A3 (CPA3): a novel gene highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of prostate epithelial cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59(12):2981-8.

**Hunter** T. Oncoprotein networks. *Cell* 1997; 88(333-46).



## I, J

**Inoue** K. Drug delivery systems for cancer chemotherapy. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2002; 103(2):224-8.

**Issa** JP, Baylin SB, Herman JG. DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia* 1997; 11(Suppl 1):S7-11.

**Jaeckle** KA, Phuphanich S, Bent MJ, Aiken R, Batchelor T, Campbell T, Fulton D, Gilbert M, Heros D, Rogers L, O'Day SJ, Akerley W, Allen J, Baidas S, Gertler SZ, Greenberg HS, LaFollette S, Lesser G, Mason W, Recht L, Wong E, Chamberlain MC, Cohn A, Glantz MJ, Gutheil JC, Maria B, Moots P, New P, Russell C, Shapiro W, Swinnen L, Howell SB. Intrathecal treatment of neoplastic meningitis due to breast cancer with a slow-release formulation of cytarabine. *Br J Cancer* 2001;84(2): 157-63.

**Jones** PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19(2):187-91.

## K

**Kainz** B, Heintel D, Marculescu R, Schwarzingler I, Sperr W, Le T, Weltermann A, Fonatsch C, Haas OA, Mannhalter C, Lechner K, Jaeger U. Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). *Hematol J* 2002; 3(6):283-9.

**Kane** MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57(808-11).

**Kantarjian** HM, Gandhi V, Cortes J, Verstovsek S, Du M, Garcia-Manero G, Giles F, Faderl S, O'Brien S, Jeha S, Davis J, Shaked Z, Craig A, Keating M, Plunkett W, Freireich EJ. Phase II clinical and pharmacology study of clofarabine in patients with refractory or relapsed acute leukemia. *Blood* 2003:2003-03-0925.

**Kantarjian** HM, O'Brien SM, Estey E, Giralt S, Beran M, Rios MB, Keating M, de Vos D, Talpaz M. Decitabine studies in chronic and acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 1997a; 11(Suppl 1):S35-6.

**Kantarjian** HM, O'Brien SM, Keating M, Beran M, Estey E, Giralt S. Results of decitabine therapy in the accelerated and blastic phases of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1997b; 11(1617-20).

**Katzenellenbogen** RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood* 1999; 93(12):4347-53.

**Kawakami** T, Furukawa Y, Sudo K, Saito H, Takami S, Takahashi E, Nakamura Y. Isolation and mapping of a human gene (PDCD2) that is highly homologous to Rp8, a rat gene associated with programmed cell death. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71(1):41-3.

**Kim** SC, Hahn JS, Min YH, Yoo NC, Ko YW, Lee WJ. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias : combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. *Blood* 1999; 93(3893-9).

**Knuutila** S, Majander P, Ruutu T. 8;21 and 15;17 translocations: abnormalities in a single cell lineage in acute myeloid leukemia. *Acta Haematol* 1994; 92(2):88-90.

**Kottaridis** PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98(6):1752-9.

**Koyama** Y, Adachi M, Sekiya M, Takekawa M, Imai K. Histone deacetylase inhibitors suppress IL-2-mediated gene expression prior to induction of apoptosis. *Blood* 2000; 96(4):1490-5.

**Kullander** K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(7):475-86.

**Kurzrock** R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 1988; 319(15):990-8.

## L

**Lancet** JE, Willman CL, Bennett JM. Acute myelogenous leukemia and aging. Clinical interactions. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000; 14(1):251-67.

**Lapeyre** JN, Becker FF. 5-Methylcytosine content of nuclear DNA during chemical hepatocarcinogenesis and in carcinomas which result. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 87(698-705).

**Lee** E, Furukubo T, Miyabe T, Yamauchi A, Kariya K. Involvement of histone hyperacetylation in triggering DNA fragmentation of rat thymocytes undergoing apoptosis. *FEBS Lett* 1996; 395(2-3):183-7.

**Leung** SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59(1):159-64.

**Levis M**, Allebach J, Tse K-F, Zheng R, Baldwin BR, Smith BD, Jones-Bolin S, Ruggeri B, Dionne C, Small D. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 2002; 99(11):3885-91.

**Lewis TS**, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 1998; 74(49-139).

**Li S**, Zhang L, Kern WF, Andrade D, Forsberg JE, Bates FR, Mulvihill JJ. Identification of t(15;17) and a segmental duplication of chromosome 11q23 in a patient with acute myeloblastic leukemia M2. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 138(2):149-52.

**Li SR**, Dorudi S, Bustin SA. Identification of differentially expressed genes associated with colorectal cancer liver metastasis. *Eur Surg Res* 2003; 35(4):327-36.

**List AF**, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, Dorr R, Karanes C, Hynes HE, Doroshow JH, Shurafa M, Appelbaum FR. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001; 98(12):3212-20.

**Little M**, Wainwright B. Methylation and p16: suppressing the suppressor. *Nat Med* 1995; 1(633-4).

**Liu FL**, Li Y, Gao LH, Fu SB, Li P. [Studies of the cellular biological function of expression change of RAB5A gene in human lung adenocarcinoma GLC-82 and SPC-al]. *Yi Chuan Xue Bao* 2002; 29(12):1043-7.

**Lu D**, Nounou R, Beran M, Estey E, Manshoury T, Kantarjian H, Keating MJ, Albitar M. The prognostic significance of bone marrow levels of neurofibromatosis-1 protein and ras oncogene mutations in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2003; 97(2):441-9.

**Lyman SD**, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998; 91(4):1101-34.

## **M**

**Mancini DN**, Rodenhiser DI, Ainsworth PJ, O'Malley FP, Singh SM, Xing W, Archer TK. CpG methylation within the 5' regulatory region of the BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site. *Oncogene* 1998; 16(9):1161-9.

**McKenna HJ**, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, Peschon JJ. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 2000; 95(11):3489-97.

**Medina V**, Edmonds B, Young GP, James R, Appleton S, Zalewski PD. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A

(inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res* 1997; 57(17):3697-707.

**Miao H**, Wei BR, Peehl DM, Li Q, Alexandrou T, Schelling JR, Rhim JS, Sedor JR, Burnett E, Wang B. Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 2001; 3(5):527-30.

**Milella M**, Kornblau SM, Estrov Z, Carter BZ, Lapillone H, Harris D, Konopleva M, Zhao S, Estay E, Andreeff M. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2001; 108(8):51-9.

**Miranda MB**, McGuire TF, Johnson DE. Importance of MEK1/2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines. *Leukemia* 2002; 16(6):683-92.

**Mizuki M**, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, Gruning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Buchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H. FIt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 2000; 96(12):3907-14.

**Mizuki M**, Schwable J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, Steffen B, Matsumura I, Kanakura Y, Bohmer FD, Muller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific FIt3 mutations. *Blood* 2003; 101(8):3164-73.

**Mograbi B**, Corcelle E, Defamie N, Samson M, Nebout M, Segretain D, Fenichel P, Pointis G. Aberrant Connexin 43 endocytosis by the carcinogen Lindane involves activation of the ERK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Carcinogenesis* 2003; 24(4):931.

**Moir DJ**, Jones PA, Pearson J, Duncan JR, Cook P, Buckle VJ. A new translocation, t(1;3) (p36;q21), in myelodysplastic disorders. *Blood* 1984; 64(2):553-5.

**Momparler RL**, Bouffard DY, Momparler LF, Dionne J, Belanger K, Ayoub J. Pilot-phase I-II study on 5-aza-2'deoxyctidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anticancer Drugs* 1997; 8(3):358-68.

**Morgan MA**, Dolp O, Reuter CWM. Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling. *Blood* 2001; 97(6):1823-34.

**Mrozek K**, Heinonen K, Bloomfield CD. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14(1):19-47.

**N**

**Nan X**, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393(6683):386-9.

**Ng MH**, Wong IH, Lo KW. DNA methylation changes and multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1999a; 34(5-6):463-72.

**Ng HH**, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 1999b; 23(1):58-61.

**Nigro LL**, Bottino D, Panarello C, Morerio C, Mirabile E, Rapella AM, Cataldo AD, Schiliro G. Prognostic impact of t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia* 2003; 17(3):636.

**O, P**

**Okutsu J**, Nakamura Y. Gene expression analysis of AML cells using cDNA microarray. *Rinsho Ketsueki* 2002; 43(5):319-22.

**Pati D**, Keller C, Groudine M, Plon SE. Reconstitution of a MEC1-independent checkpoint in yeast by expression of a novel human fork head cDNA. *Mol Cell Biol* 1997; 17(6):3037-46.

**Pedersen-Bjergaard J**, Andersen MK, Christiansen DH, Nerlov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99(6):1909-12.

**Pogribny IP**, Basnakian AG, Miller BJ, Lopatina NG, Poirier LA, James SJ. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. *Cancer Res* 1995; 55(Jun 15):1894-901.

**Prendergast GC**. Farnesyltransferase inhibitors: antineoplastic mechanism and clinical prospects. *Curr Opin Cell Biol* 2000; (12)166-73.

**Q, R**

**Qian Z**, Fernald AA, Godley LA, Larson RA, Le Beau MM. Expression profiling of CD34+ hematopoietic stem/ progenitor cells reveals distinct subtypes of therapy-related acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(23):14925-30.

**Ramaswamy S**, Golub TR. DNA Microarrays in Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2002; 20(7):1932-41.

**Ren L**, Du H, Zhu Q, Shi Y, Chen H, Wu S. The re-expression of p15(INK4B) gene in leukemia cells induced by in vitro DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2002; 41(11):762-5.

**Reuter** CW, Morgan MA, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 2000; 96(5):1655-69.

**Rideout** WM, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 1990; 249(1288-90).

**Robertson** KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 2000; 25(3):338-42.

**Rountree** MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000; 25(3):269-77.

**Rowley** JD, Alimena G, Garson OM, Hagemeijer A, Mitelman F, Prigogina EL. A collaborative study of the relationship of the morphological type of acute nonlymphocytic leukemia with patient age and karyotype. *Blood* 1982; 59(5):1013-22.

## S

**Sambrook** J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press: 1989.

**Scarr** RB, Sharp PA. PDCD2 is a negative regulator of HCF-1 (C1). *Oncogene* 2002; 21(34):5245-54.

**Scheres** JM, Hustinx TW, Geraedts JP, Leeksa CH, Meltzer PS. Translocation 1;7 in hematologic disorders: a brief review of 22 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 18(3):207-13.

**Schmutte** C, Yang AS, Nguyen TT, Beart RW, Jones PA. Mechanisms for the involvement of DNA-methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996; 56(2375-81).

**Schnittger** S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Buchner T, Wormann B, Hiddemann W, Griesinger F. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 2000; 14(5):796-804.

**Schoch** C, Kohlmann A, Schnittger S, Brors B, Dugas M, Mergenthaler S, Kern W, Hiddemann W, Eils R, Haferlach T. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(15):10008-13.

**Sealy** L, Chalkley R. DNA associated with hyperacetylated histone is preferentially digested by DNase I. *Nucleic Acids Res* 1978; 5(6):1863-76.

**Sherr** CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274(5293):1672-7.

**Silverman** LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA, Holland JF. Randomized controlled trial of Azacitidine in patients with the Myelodysplastic Syndrome: A study of the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2002; 20(10):2429-40.

**Silverman** LR, Holland JF, Weinberg RS, Alter BP, Davis RB, Ellison RR. Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1993; 7(Suppl 1):21-9.

**Slovak** ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study. *Blood* 2000; 96(13):4075-83.

**Sorm** F, Vesely J. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma* 1968; 15(4):339-43.

**Sowa** Y, Orita T, Hiranabe-Minamikawa S, Nakano K, Mizuno T, Nomura H, Sakai T. Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 886(195-9).

**Staunton** JE, Slonim DK, Collier HA, Tamayo P, Angelo MJ, Park J, Scherf U, Lee JK, Reinhold WO, Weinstein JN, Mesirov JP, Lander ES, Golub TR. Chemosensitivity prediction by transcriptional profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(19):10787-92.

**Steffen** B, Serve H, Berdel WE, Agrawal S, Linggi B, Buchner T, Hiebert SW, Muller-Tidow C. Specific protein redirection as a transcriptional therapy approach for t(8;21) leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 20(20).

**Stirzaker** C, Millar DS, Paul CL, Warnecke PM, Harrison J, Vincent PC, Frommer M, Clark SJ. Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res* 1997; 57(11):2229-37.

**Su** YA, Bittner ML, Chen Y, Tao L, Jiang Y, Zhang Y, Stephan DA, Trent JM. Identification of tumor-suppressor genes using human melanoma cell lines UACC903, UACC903(+6), and SRS3 by comparison of expression profiles. *Mol Carcinog* 2000; 28(2):119-27.

**Suciu** S, Mandelli F, de Witte T, Zittoun R, Gallo E, Labar B, De Rosa G, Belhabri A, Giustolisi R, Delarue R, Liso V, Mirto S, Leone G, Bourhis J-H, Fioritoni G, Jehn U, Amadori S, Fazi P, Hagemeijer A, Willemze R. Allogeneic compared to autologous stem cell transplantation in the treatment of patients < 46 years old with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention to treat analysis of the EORTC/GIMEMA AML-10 trial. *Blood* 2003:2002-12-3714.

**Surani MA.** Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell* 1998; 93(3):309-12.

## T

**Tompa R, McCallum CM, Delrow J, Henikoff JG, van Steensel B, Henikoff S.** Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of Chromomethylase3. *Curr Biol* 2002; 12(1):65-8.

**Tsimberidou A, Estey E, Cortes J, Thomas D, Faderl S, Verstovsek S, Garcia-Manero G, Keating M, Albitar M, O'Brien S, Kantarjian H, Giles F.** Gemtuzumab, fludarabine, cytarabine, and cyclosporine in patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2003; 97(6):1481-7.

## V, W

**Varelias A, Koblar SA, Cowled PA, Carter CD, Clayer M.** Human osteosarcoma expresses specific ephrin profiles: implications for tumorigenicity and prognosis. *Cancer* 2002; 95(4):862-9.

**Vendrame-Goloni CB, Varella-Garcia M, Carvalho-Salles AB, Ruiz MA, Junior OR, Fett-Conte AC.** Translocation (11;19)(q23;p13.3) associated with a novel t(5;16) (q13;q22) in a patient with acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 141(1):71-4.

**Vigushin DM, Coombes RC.** Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs* 2002; 13(1):1-13.

**Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP.** Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23(1):62-6.

**Wainfan E, Poirier LA.** Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 1992; 52(2071s-7s).

**Wei SH, Brown R, Huang TH.** Aberrant DNA methylation in ovarian cancer: is there an epigenetic predisposition to drug response? *Ann N Y Acad Sci* 2003; 983(243-50).

**Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV.** Molecular basis of leukaemia and lymphoma. In: JG Drew Provan, editor, translator and editor *Molecular Haematology*: Blackwell Science 2000; 25-41.

**Wijermans PW, Lübbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M.** Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* 2000; 18(956-62).

**Willman CL.** Targeted AML therapy: new biologic paradigms and therapeutic opportunities. *Leukemia* 2001; 15(4):690-4.



**Woods** WG, Kobrinsky N, Buckley J, Neudorf S, Sanders J, Miller L, Barnard D, Benjamin D, DeSwarte J, Kalousek D, et al. Intensively timed induction therapy followed by autologous or allogeneic bone marrow transplantation for children with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome: a Childrens Cancer Group pilot study. *J Clin Oncol* 1993; 11(8):1448-57.

**Woods** WG, Kobrinsky N, Buckley JD, Lee JW, Sanders J, Neudorf S, Gold S, Barnard DR, DeSwarte J, Dusenbery K, Kalousek D, Arthur DC, Lange BJ. Timed-sequential induction therapy improves postremission outcome in acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 1996; 87(12):4979-89.

## **X, Y, Z**

**Xia** ZB, Anderson M, Diaz MO, Zeleznik-Le NJ. MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 26(26).

**Yamamoto** Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97(8):2434-9.

**Zhu** WG, Lakshmanan RR, Beal MD, Otterson GA. DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res* 2001; 61(4):1327-33.

**Zhu** WG, Otterson GA. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2003; 3(3):187-99.

**Zwaan** CM, Reinhardt D, Corbacioglu S, van Wering ER, Bokkerink JPM, Tissing WJE, Samuelsson U, Feingold J, Creutzig U, Kaspers GJL. Gemtuzumab ozogamicin: first clinical experiences in children with relapsed/refractory acute myeloid leukemia treated on compassionate-use basis. *Blood* 2003; 101(10):3868-71.

**Zujewski** J, Horak ID, Bol CJ. Phase I and Pharmacokinetic study of farnesyl protein R115777 in advanced cancertransferase inhibitor. *J Clin Oncol* 2000; 18(927-41).