

UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION DES HUMANEN TUMORMARKERGENS *PRAME*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



seit 1558

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen
Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologe Tino Schenk
geboren am 29.11.1978 in Salzwedel

Jena, im Juli 2007

Gutachter:

1. _____

2. _____

3. _____

Tag des Rigorosums:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	- 1 -
1. EINLEITUNG	- 2 -
1.1 Die Akute Myeloische Leukämie (AML)	- 2 -
1.2 Tumorimmunologie und Tumorantigene	- 3 -
1.2.1 Erkennung von Tumoren durch das Immunsystem	- 3 -
1.2.2 Tumorantigene	- 5 -
1.3 Epigenetik	- 7 -
1.3.1 Histon Acetylierung	- 7 -
1.3.2 DNA-Methylierung	- 9 -
1.4 PRAME	- 18 -
1.4.1 PRAME-Expression und die Auswirkung auf den klinischen Verlauf einiger Krebsarten	- 18 -
1.4.3 Funktion des PRAME-Proteins	- 21 -
1.4.4 PRAME und seine klinische Anwendbarkeit	- 24 -
1.5 Fragestellung / Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	- 26 -
2 MATERIAL UND METHODEN	- 27 -
2.1 Material	- 27 -
2.1.1 Geräte und Laborausstattung	- 27 -
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	- 27 -
2.1.3 Chemikalien	- 28 -
2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien	- 29 -
2.1.5 Nukleinsäuren	- 30 -
2.1.6 Enzyme und Kits	- 32 -
2.1.7 Software	- 32 -
2.1.9 Zelllinien	- 33 -
2.1.10 Patientenproben und Kontrollen	- 33 -
2.2 Methoden	- 34 -
2.2.1 Zellkultur	- 34 -
2.2.2 RNA Extraktion	- 35 -
2.2.3 cDNA Synthese	- 35 -
2.2.4 DNA Extraktion	- 36 -
2.2.5 Quantifizierung von DNA und RNA	- 36 -
2.2.6 Agarosegelelektrophorese	- 36 -
2.2.7 Inkubation mit 5-Aza-dC, TSA und VPA	- 37 -
2.2.8 Quantitative Real time PCR	- 37 -

2.2.9 Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung	- 39 -
2.2.10 Klonierung	- 41 -
2.2.11 Dual-Luciferase Reporter Assay (DLR)	- 44 -
2.2.12 Überexpression von <i>PRAME</i> in CaSki-Zellen	- 46 -
2.2.13 Verringerung des <i>PRAME</i> -Levels in HeLa-Zellen durch short interfering RNAs (siRNA)	- 47 -
2.2.14 <i>In silico</i> Analysen des <i>PRAME</i> -Gens	- 47 -
2.2.15 Relative Quantifizierung der <i>PRAME</i> -Transkriptvarianten	- 48 -
2.2.16 Methylierungsanalyse mittels methylation-specific-PCR (MSP)	- 48 -
3. ERGEBNISSE	- 49 -
3.1 <i>PRAME</i>-Expression in Zelllinien, Patienten- und Kontrollproben	- 49 -
3.2 Analyse des <i>PRAME</i>-Gens und seiner Transkripte	- 51 -
3.2.1 Das <i>PRAME</i> -Gen	- 51 -
3.2.2 <i>PRAME</i> -Promotorregion – Transkriptvarianten, Promotorelemente und Transkriptionsfaktoren	- 52 -
3.2.3 Identifizierung CpG-reicher Regionen zur Vorhersage von CpG-Inseln	- 53 -
3.3 Erhöhung der <i>PRAME</i>-Expression nach Inhibition der DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung	- 54 -
3.3.1 5-Aza-dC erhöht die <i>PRAME</i> -Expression in HeLa- und CaSki-Zellen	- 54 -
3.3.2 Trichostatin A (TSA) erhöht die <i>PRAME</i> -Expression in CaSki-Zellen	- 54 -
3.4 DNA-Methylierungsanalyse mittels methylation-specific-PCR	- 55 -
3.5 DNA-Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung	- 56 -
3.6 Behandlung von humanen Zellkulturen mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-dC) führt zur Hypomethylierung der DNA der <i>PRAME</i>-Promotor und 5'-Region.	- 58 -
3.7 DNA-Methylierung inhibiert die Aktivität der für die Transkription von <i>PRAME</i> notwendigen Promotorbereiche	- 59 -
3.7.1 Aktivität der Fragmente in HeLa	- 59 -
3.7.2 Aktivität der Fragmente in CaSki	- 60 -
3.7.3 Aktivität von Sssl-methylierten Fragmenten in HeLa-Zellen	- 61 -
3.8 Überexpression von <i>PRAME</i> in CaSki-Zellen führt nicht zu einer veränderten Expression ausgewählter Gene	- 61 -
3.9 Verringerung des <i>PRAME</i>-mRNA-Levels in HeLa-Zellen durch short interfering RNA (siRNA)	- 62 -

4. DISKUSSION	- 64 -
4.1 Diskussion der Methoden und Ergebnisse	- 64 -
<i>PRAME</i> -exprimierende Proben besitzen ein <i>PRAME</i> -mRNA-Level ähnlich dem in Testis, wohingegen <i>PRAME</i> -negative Proben ein dem in Blut ähnliches <i>PRAME</i> -mRNA-Level aufweisen.	- 64 -
<i>In silico</i> Untersuchungen lassen eine DNA-Methylierungs-abhängige Regulation des <i>PRAME</i> -Gens und seiner stromabwärts liegenden Nachbargene vermuten.	- 65 -
DNA-Hypomethylierung und Histon-Acetylierung induzieren <i>PRAME</i> -Expression.	- 66 -
<i>PRAME</i> -Expression korreliert mit der Hypomethylierung spezifischer CpG-Dinukleotide in der <i>PRAME</i> -Promotor und 5'-Region.	- 68 -
<i>In vitro</i> -Methylierung des <i>PRAME</i> -Promotors inhibiert dessen Aktivität.	- 72 -
Überexpression von <i>PRAME</i> in CaSki-Zellen und Verringerung des <i>PRAME</i> -mRNA-Niveaus in HeLa-Zellen durch short interfering RNA (siRNA).	- 73 -
4.2 Schlussfolgerungen	- 75 -
5. AUSBLICK	- 78 -
LITERATURVERZEICHNIS	- 79 -
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
DANKSAGUNG	VII
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	VIII
LEBENS LAUF	IX
PUBLIKATIONEN	X
ANHANG	XI

ZUSAMMENFASSUNG

Das *preferentially expressed antigen of melanoma* (PRAME) ist in einer Vielzahl humaner Neoplasien aberrant exprimiert. Da es natürlicherweise vor allem in den Geweben des Testis vorkommt, gehört es zur Gruppe der Cancer/Testis-Antigene. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern dieser Gruppe, ist PRAME auch in leukämischen Zellen, vor allem in der akuten myeloischen Leukämie (AML), exprimiert. Es stellt daher einen wichtigen Marker für Diagnose und Monitoring vieler maligner Erkrankungen, insbesondere der AML, dar. Die Präsentation von PRAME-Antigenen auf der Oberfläche von Tumorzellen macht es zusätzlich zu einem interessanten Kandidaten für Tumor-Immuntherapie-Ansätze. PRAME-Expression korreliert in mehreren Tumorarten mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Metastasen und einem schlechten klinischen Verlauf der Krankheit. Diese Korrelation lässt die Vermutung zu, dass PRAME eine kausale Rolle in der Tumorentwicklung spielt. Unterstützt wird dies durch die Feststellung, dass PRAME einen dominanten Repressor des Retinsäure- Rezeptor-Signalweges darstellt und somit eine onkogene Funktion besitzt.

Aufgrund der großen Relevanz der aberranten PRAME-Expression in humanen Neoplasien, wurde in dieser Arbeit die Regulation des *PRAME*-Gens näher untersucht. Dazu wurde die aktive *PRAME*-Promotor und 5'-Region des Gens bestimmt und eine detaillierte Analyse des Methylierungsstatus dieser, in Korrelation mit der *PRAME*-Expression durchgeführt. Hierfür wurden Proben aus dem Knochenmark oder peripherem Blut an AML-erkrankter Patienten und gesunder Kontrollpersonen sowie verschiedenen, aus soliden und hämatologischen Neoplasien stammenden, Zelllinien verwendet. Des Weiteren wurde der Einfluss des *PRAME*-mRNA-Levels auf die Expression bestimmter Apoptose- und *multi drug resistance* (MDR)-assoziierter Gene evaluiert.

Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass *PRAME*-Expression direkt abhängig vom Methylierungsstatus spezifischer CpG-Dinukleotide in einer sehr CpG-reichen Region 165bp stomaufwärts und 365bp stomabwärts vom ersten Transkriptionsstartpunkt des *PRAME*-Gens ist. Die aberrante Hypomethylierung spezifischer CpG-Stellen dieser Region führt dabei in allen untersuchten Neoplasien zur Expression des *PRAME*-Gens. Wie die Induzierbarkeit durch den Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A zeigt, unterliegt die Regulation des *PRAME*-Gens vielschichtigen epigenetischen Mechanismen. Ein Einfluss von PRAME auf die Expression bestimmter Apoptose- und (MDR)-assoziierter Gene konnte hier nicht festgestellt werden.

1. EINLEITUNG

1.1 Die Akute Myeloische Leukämie (AML)

Leukämien sind eine heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen der hämatopoetischen Stamm- und Vorläufer-Zellen des Knochenmarks. Sie sind durch eine deutliche Erhöhung der Leukozytenzahl, Ausschwemmung leukämischer Blasten in das Blut und Verdrängung der normalen Hämatopoese charakterisiert. Die leukämischen Blasten einer Leukämie sind monoklonalen Ursprungs und stammen daher alle von einer in einer bestimmten frühen Differenzierungsphase transformierten Vorläuferzelle ab. Am Prozess der Transformation (Leukemogenese) einer Vorläuferzelle können multiple genetische und epigenetische Veränderungen beteiligt sein. Je nach Verlauf der Krankheit werden Leukämien als chronisch oder akut, und je nach betroffenem Zelltyp als lymphatisch oder myeloisch, bezeichnet. Man unterscheidet daher grundsätzlich vier Leukämietypen: Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL), die Chronische Myeloische Leukämie (CML), die Akute Lymphatische Leukämie (ALL) und die Akute Myeloische Leukämie (AML).

Akute Leukämien beginnen, im Gegensatz zu chronischen Leukämien, meist relativ plötzlich und sind durch einen raschen Verlauf gekennzeichnet in welchem die normalen Blutzellen von den sich schnell vermehrenden leukämischen Vorläuferzellen verdrängt werden. Die AML ist durch einen Block in der myeloischen Differenzierung in der Hämatopoese charakterisiert [FIALKOW *et al.* 1987]. Dies führt zu einer Anhäufung von proliferierenden myeloischen Vorläuferzellen, in Knochenmark und peripherem Blut, welche nicht in der Lage sind zu funktionierenden Blutzellen auszdifferenzieren. Diese Blasten verdrängen die funktionellen, ausdifferenzierten Blutzellen was zur klinischen Manifestierung der Leukämie führt [HOELZER & SEIPEL 1998]. Man unterscheidet zwischen der neu erworbenen primären AML und der sekundären AML, welche u. a. durch die Behandlung anderer Neoplasien durch alkylierende Substanzen, wie Cyclophosphamid, Topoisomerase II Blocker, wie Etoposid, oder ionisierende Strahlung entstehen kann [PUI *et al.* 1998; SCANDURA *et al.* 2002]. Andere prädisponierende Faktoren für eine sekundäre Leukämie sind genetische Veränderungen wie Trisomie 21 oder die Fanconi-Anämie [FERTI *et al.* 1996]. Die primäre AML wird vorwiegend durch erworbene Mutationen und chromosomale Rearrangements, wie Chromosomen-Translokationen und deren resultierende Fusionsproteine, hervorgerufen.

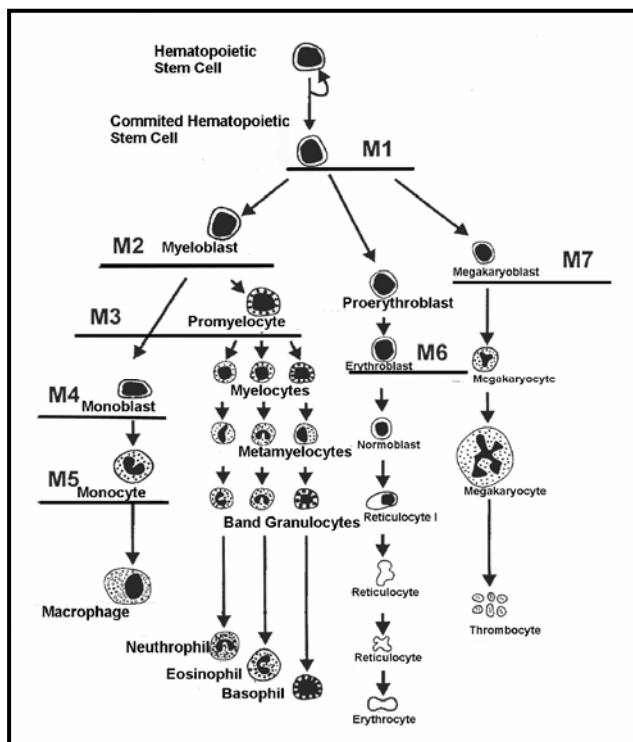


Abbildung 1.1: FAB-Klassifikation der AML. Der prozentuale Anteil an der Gesamtmenge von AML-Erkrankungen und häufige zytogenetische Aberrationen sind in Klammern angegeben.

M0: Undifferenziert (2-3%), **M1:** AML ohne Granulierung (20%), **M2:** AML ohne Granulierung (25-30%; t(8:21)), **M3:** Promyelozytäre Leukämie (APL) (5-15%;t(15;17) & t(11;17)), **M4:** Akute myelomonozytäre Leukämie (20-25%; inv(16), del(7q)), **M5:** Akute monozytäre Leukämie (M5a undifferenziert, M5b differenziert) (20-25%; t(9;11)), **M6:** Akute erythrozytäre Leukämie (5%; del(7q)), **M7:** Akute megakaryoblastische Leukämie (1-2%)

Zurzeit existieren verschiedene Klassifikationen der AML. Die gebräuchlichste Einteilung erfolgt nach der FAB-Klassifikation (French-American-British) basierend auf morphologischen, zytochemischen und differenzierungsspezifischen Charakteristika [BENNETT *et al.* 1976]. Akute myeloische Leukämien werden hier in 8 FAB-Subgruppen (M0 bis M7) eingeordnet (Abbildung 1.1). Zusätzlich zur FAB-Klassifikation wurden bestimmte chromosomale Veränderungen, wie Translokationen, bestimmten AML Subtypen, Phasen des Krankheitsverlaufs und Prognosen zugeordnet [HARRIS *et al.* 1999].

1.2 Tumorimmunologie und Tumorantigene

1.2.1 Erkennung von Tumoren durch das Immunsystem

Im Rahmen der Entstehung von Neoplasien kommt es zu einer veränderten Expression von Proteinen und somit Peptiden/Antigenen, die vom Immunsystem, insbesondere von T-Zellen, als fremd erkannt werden können (Abbildung 1.2) [BURNET 1970]. Solche tumorassoziierten Antigene (TAA) können sowohl Ziel der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort sein [WANG *et al.* 2004; FILACI *et al.* 2006; WATANABE *et al.* 2006].

Als Effektorzellen der angeborenen Immunität fungieren dabei u. a. Natürliche Killerzellen und Makrophagen [WHITESIDE & HERBERMAN 1995; GODFREY 2000; JAKOBISIAK 2003].

Als Effektorzellen der adaptiven Immunität fungieren vor allem die CD8⁺ T-Zellen [SMYTH 2001]. Diese können Tumor-Peptide, welche auf MHC I-Molekülen präsentiert werden, direkt auf der Tumorzelle („direct priming“) oder auf Antigen-präsentierenden Zellen („cross priming“) erkennen [OCHSENBEIN 2001; QUATAN 2004].

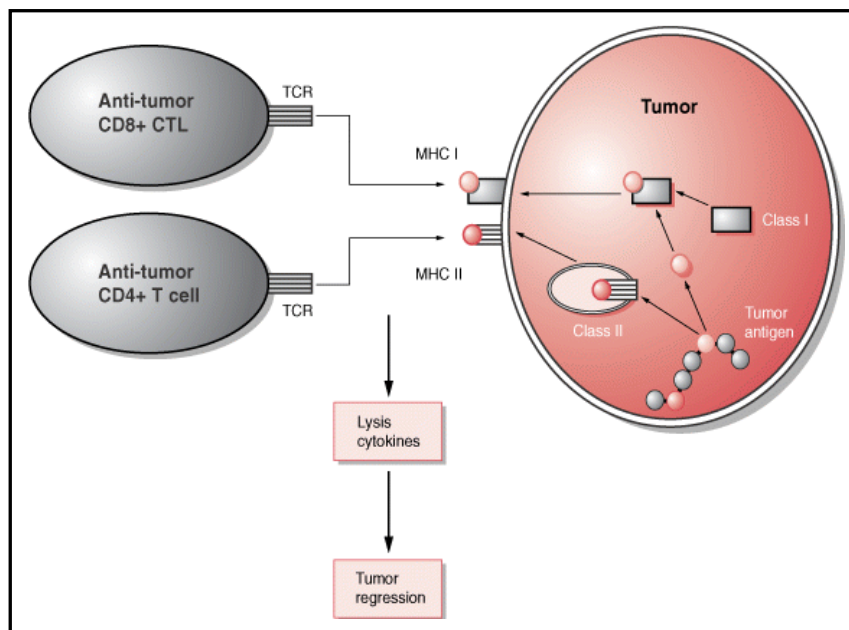


Abbildung 1.2: T-Zell-Erkennung von Tumorantigenen [aus Cancer Medicine]. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimieren genomisch kodierte, polymorphe T-Zell-Rezeptoren, welche auf MHC-Klasse II bzw. I präsentierte, von Tumor-Proteinen/Antigenen stammende Peptide erkennen. Eine Erkennung von Tumorzellen durch Tumor-spezifische T-Zellen kann zur Lyse der Tumorzellen und damit zur Reduzierung des Tumors führen.

Die Tumor-Peptide entstammen von Tumor-Proteinen/Antigenen, welche im Proteosom gespalten, ATP-abhängig über das TAP-Transportsystem in das zytoplasmatische Retikulum gebracht, mit dem MHC I-Molekül verbunden und schließlich präsentiert wurden. Die Präsentation für die Effektorzellen findet in den lymphatischen Organen statt. Die spezifische Interaktion des T-Zell-Rezeptors (TCR) einer CD8⁺ T-Zelle mit dem Antigen auf der Oberfläche der Tumorzelle oder der Antigen-präsentierenden Zelle bewirkt die Aktivierung eines naiven Lymphozyten, seine klonale Expansion, Proliferation und schließlich Transformation in einen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), welcher fähig ist maligne Zellen im peripheren Gewebe zu lysieren (Abbildung 1.2). Als

Effektormechanismen der CTL dienen dabei die Sekretion von Perforin, Interferon- γ , TNF, GM-CSF und FasL sowie freigesetzte, enzymatische Proteasen [BARTH 1991]. CD4+ T-Lymphozyten spielen in der Tumorummunologie ebenfalls eine Rolle, indem sie beim „cross-priming“ die Antigen-präsentierenden Zellen unterstützen oder gar ersetzen [GREENBERG 1991; OSSENDORP 1998]. Die von ihnen erkannten Epitope müssen von MHC-Klasse II-Molekülen, deren Expression in verschiedenen Neoplasien sehr variiert, präsentiert werden (Abbildung 1.2).

Trotz dieser Mechanismen findet in vielen Fällen keine effektive Immunabwehr gegen Tumoren statt. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsversuche, wie z. B. die Suppression der Effektorzellen durch regulatorische T-Zellen [CHEN *et al.* 2005] oder das Fehlen von kostimulatorischen Molekülen [KOYAMA *et al.* 1998], die für die klonale Expansion der CTL nötig sind. Aber auch der Verlust oder das Fehlen der Expression von MHC I-Molekülen oder des Antigens durch die Tumorzellen [GARRIDO *et al.* 1997], wodurch sie kein Ziel mehr für zytotoxische T-Zellen darstellen, ist eine Möglichkeit wie der Tumor der Immunüberwachung entgehen kann.

Da jedoch viele Tumoren tumorassoziierte Antigene (TAA) exprimieren und präsentieren, können diese als Basis für viele immuntherapeutische Ansätze, deren Ziel es ist durch Potenzierung der natürlich vorkommenden Immunantwort Tumorzellen gezielt zu zerstören, dienen.

1.2.2 Tumorantigene

Ein modellhaftes, ideales TAA ist für den Malignom spezifisch, enthält Aminosäuresequenzen die von MHC-Komplexen gebunden und präsentiert werden, wird durch T-Zellen erkannt, unterliegt keinen Expressionsschwankungen und induziert idealer Weise eine spontane, hochfrequente, zelluläre Immunantwort [VONDERHEIDE 2002].

Die Identifizierung des ersten, durch CD8+ T-Zellen erkannten, TAA, MAGE-1, gelang beim malignen Melanom mit Hilfe des "T lymphocyte epitope cloning", auch "autologous typing" genannt [VAN DER BRUGGEN 1991]. Bei diesem Verfahren erfolgt die Identifizierung der TAA über die Analyse von cDNA Bibliotheken, welche aus Tumor-Gewebe gewonnen werden. Diese Bibliotheken werden in Zielzellen mit definierter MHC-Expression transfiziert und mittels tumorspezifischer (autologer) T-Zelllinien gescreent. Die meisten Tumorantigene wurden mittels dieser Technik charakterisiert [BOON *et al.* 1997].

TAA können, nach ihren Merkmalen, in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Es gibt Differenzierungsantigene, überexprimierte Antigene, tumor-spezifische Mutations-Antigene, virale Antigene und Cancer/Testis-Antigene [BOON 1997; COULIE 1999; RENKVIST 2001]. Differenzierungsantigene werden sowohl im Tumor, als auch im normalen Gewebe, aus welchem der Tumor entstanden ist exprimiert. Beispiele sind die Melanom-assoziierte Tyrosinase und die *tyrosinase related* Proteine TRP-1 und -2, welche an der Melaninbiosynthese beteiligt, das *prostate specific antigen* (PSA) und das embryonale *carcinoembryonic antigen* (CEA) [LITVINOV *et al.* 1994 & 1997; VAN DEN EYNDE & BOON 1997; STEPHAN *et al.* 1999; COULIE *et al.* 1999]. Überexprimierte Antigene werden im Vergleich zu gesundem Gewebe im Tumor, gleichen histologischen Ursprungs, verstärkt exprimiert. Ihre Überexpression im Tumor kann zu einer Immunreaktion führen [NOVELLINO *et al.* 2005]. Zu Vertretern dieser Gruppe von TAA gehören Proteine wie Her2/neu, hTert, MUC1, p53, survivin und WT1. Mutations-Antigene sind tumorspezifische Antigene, welche durch Punktmutationen, z. B. des Onkogens RAS oder des Tumorsuppressorgens p53 oder Translokationen, wie dem Fusionsprotein BCR/ABL in chronisch myeloischen Leukämie, entstehen [BOON & VAN DER BRUGGEN 1996]. Virale Antigene stammen von onkoviralen Proteinen, die von Viren exprimiert werden, die in der Lage sind eine maligne Transformation von humanen Zellen zu verursachen [COULIE *et al.* 1999]. Solche Viren sind z. B. HPV (insbesondere Typ 16 und 18) beim Zervixkarzinom, HTLV-1 bei Leukämien und Lymphomen, EBV beim Burkitt-Lymphom und HHV-8 beim Kaposi-Sarkom. Auch gegen TAA dieser Viren konnten CD8-T-Zell-Anworten nachgewiesen werden [KHANNA & BURROWS 2000; RUDOLF *et al.* 2001; WILKINSON *et al.* 2002]. Cancer/Testis-Antigene (CTA) werden vorwiegend in Tumor- und Testis-Gewebe, in manchen Fällen auch in Plazenta, exprimiert. Ihre Expression in Testis- und Plazentagewebe führt zu keiner Autoimmunreaktion, da dort keine MHC- Klasse I- und II-Moleküle exprimiert werden [JASSIM *et al.* 1989]. Aufgrund ihrer spezifischen, lokalen Expression stellen sie besonders gute Ziele für eine Immuntherapie dar. Wichtige Vertreter dieser Gruppe von Antigenen sind die Mitglieder der MAGE-, BAGE und GAGE-Familie, sowie LAGE, NY-ESO-1, OY-TES-1 und PRAME [BOON & VAN DER BRUGGEN 1996; IKEDA *et al.* 1997; SCANLAN *et al.* 1998; WANG & ROSENBERG 1999 und OLD 2001].

Die Regulation der Expression vieler CTA ist bisher ungeklärt. Einige jedoch unterliegen epigenetischen Regulationsmechanismen [DE SMET *et al.* 1999].

1.3 Epigenetik

Die Epigenetik umfasst alle mitotisch und meiotisch vererbaren Mechanismen der Genexpressionsänderung von Zellen, denen keine Änderungen der DNA-Sequenz zugrunde liegen, sondern Prozesse, die außerhalb (epi, griechisch) der konventionellen Genetik begründet sind. Epigenetische Mechanismen sind u. a. die Modifikationen der Histone, durch Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Ubiquitinylierung oder Poly(ADP)-Ribosylierung als auch die Methylierung des 5'-Rests von Cytosin-Basen der DNA (Abbildung 1.3) [STRAHL 2000]. Diese epigenetischen Prozesse spielen bei zahlreichen physiologischen Prozessen, wie der Inaktivierung des X-Chromosoms, dem genomischen Imprinting, der Entwicklung des Embryos und dem Schutz vor intragenomischen Parasiten, aber auch beim Alterungsprozess und bei malignen Erkrankungen eine wichtige Rolle [MONK 1995]. So besitzen viele Krebszellen einen aberranten Epigenotyp, welcher zu einer falschen Genexpression und dem malignen Phänotyp führt.

1.3.1 Histon Acetylierung

Die Histon-Acetylierung findet an den Lysin-Resten der terminalen, flexiblen Histon-Domänen statt. Die Histone H2B (K5, K12, K15, K20), H3 (K9, K14, K18, K23) und H4 (K5, K8, K12, K16) können an jeweils vier, das Histon H2B (K5, K9) an zwei Lysin-Resten acetyliert werden [STERNER & BERGER 2000]. Die Acetylierung wird durch verschiedene Histon-Acetyl-Transferasen (HAT), die meist in größeren Proteinkomplexen vorliegen, vermittelt. Durch die Acetylierung der Lysinreste wird deren positive Ladung neutralisiert und somit die Wechselwirkung zwischen den Histonen und der negativ geladenen DNA geschwächt [FLETCHER & HANSEN 1996; WORKMAN & KINGSTON 1998]. Die dadurch gelockerte Struktur des Chromatins erleichtert Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren, den Zugang zur DNA, was einen essentiellen Schritt zur transkriptionellen Aktivierung von Genen darstellt (Abbildung 1.3) [LEE *et al.* 1993; ROTH *et al.* 2001]. Manche Proteine erkennen spezifisch acetyliertes Lysin und werden somit direkt durch die Histon-Acetylierung rekrutiert. Interessanter Weise befinden sich unter diesen Proteinen auch mehrere HAT. Dies impliziert ein mögliches Modell, wie Histon-Acetylierung über Replikation und Mitose als stabile Markierung, dem „*Histon-Code*“, aufrechterhalten werden könnte [BERGER 2002].

Gegenspieler der HAT sind die Histon-Deacetylasen (HDAC). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie katalysieren die Deacetylierung der N-terminalen Lysinreste was zu einer verschlossenen Chromatinstruktur, dem lösen von Transkriptionsfaktoren und somit zu einer nachfolgenden Blockade der Transkription führt (Abbildung 1.3). Eine Vielzahl heterogener Substanzen ist in der Lage, HDAC zu binden und durch die Blockade ihrer enzymatischen Aktivität eine Hyperacetylierung von Histonen zu vermitteln. Zwei dieser Substanzen, welche als Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC-I) bezeichnet werden, wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet: Trichostatin A (TSA) und Valproinsäure (VPA). Die Hydroxaminsäure TSA ist ein aus *Streptomyces platensis* gewonnenes, fungistatisches Antibiotikum, welches die Aktivität der HDAC reversibel hemmt [TSUJI *et al.* 1976; YOSHIDA *et al.* 1990]. VPA ist eine kurzkettige Fettsäure, welche das Wachstum von Primärtumoren und Metastasen supprimieren und eine Redifferenzierung von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* hervorrufen kann [PHIEL *et al.* 2001; GÖTTLICHER *et al.* 2001; BLAHETA *et al.* 2002].

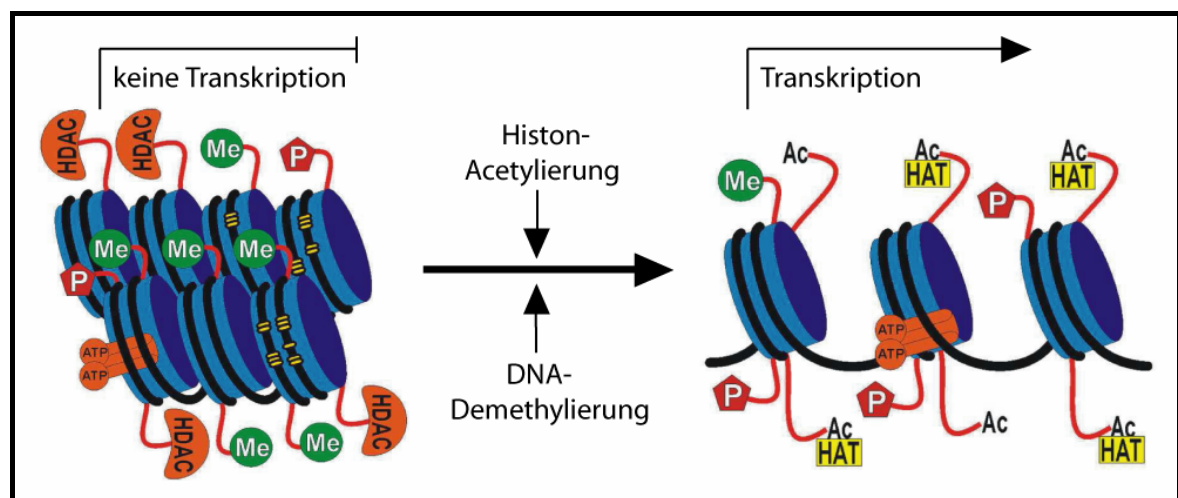


Abbildung 1.3: Chromatinmodifikationen. Posttranslationale Modifikationen an Histonproteinen durch Methylierungs- (Me), Phosphorylierungs- (P) oder Acetylierungsvorgänge (Ac) führen zu einer Veränderung der Nucleosomenstruktur. DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung induzieren eine kompakte Chromatinkonfiguration und transkriptionelle Repression. Histonacetylierung und DNA-Demethylierung relaxieren das Chromatin und erlauben transkriptionelle Aktivierung. HDAC = Histon-Deacetylase; HAT = Histon-Acetyltransferase

Störungen im Zusammenspiel von HAT und HDAC stehen auf vielfältige Weise mit der Entwicklung von Tumoren in Verbindung [MAHLKNECHT & HOELZER 2000; URNOV *et al.* 2000; TIMMERMANN *et al.* 2001]. So konnten in verschiedenen Tumortypen Mutationen

oder Translokationen der beiden HAT CBP und p300 gefunden werden [GILES *et al.* 1998]. Mehrere Fusionsproteine, welche durch Chromosomen-Translokationen entstehen, wie AML1-ETO oder Laz3/BCL6, interagieren mit HDACs und können so zur fehlgeleiteten Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen [DHORDAIN *et al.* 1998; WANG *et al.* 1999].

1.3.2 DNA-Methylierung

Der evolutionär sehr alte und weit verbreitete Prozess der DNA-Methylierung ist bereits bei Prokaryonten zu finden [NOYER-WEIDNER 1993]. Methylierung ist die einzige bekannte post-synthetische Veränderung der DNA. Bei Säugetieren versteht man unter DNA-Methylierung die kovalente Bindung eines Methylrestes an das Kohlenstoffatom fünf des Pyrimidinrings der Base Cytosin. Die Cytosin-Methylierung erfolgt in Vertebraten vorwiegend symmetrisch an beiden DNA-Strängen eines CpG- (Cytosin-Phosphat-Guanin) Palindroms [GRUENBAUM *et al.* 1982]. In vereinzelt Fällen kann aber auch nur ein Cytosin eines CpG-Palindroms methyliert sein. Solche CpGs bezeichnet man als „*hemi*-methyliert“. Es gibt auch Berichte über Methylierung in C^mpNpG oder C^mC(A/T)GG Sequenzen, jedoch scheint auch dies die Ausnahme zu sein [CLARK *et al.* 1995; FRANCHINA & KAY 2000; MALONE *et al.* 2001]. Durch die Methylierung der DNA gewinnt das Genom immens an Informationsgehalt. So gibt es bei geschätzten 50 Millionen CpG-Stellen $2^{50.000.000}$ mögliche Kombinationsmöglichkeiten von methylierten und unmethylierten CpGs.

1.3.2.1 Vorkommen und Verteilung von CpG-Dinukleotiden im menschlichen Genom

Im menschlichen Genom sind etwa 70 bis 80 Prozent der CpG-Dinukleotide (CpGs) methyliert, was etwa drei Prozent aller Cytosine im Genom entspricht [EHRlich *et al.* 1982]. Die meisten davon befinden sich in den sehr CpG-reichen Sequenzen der perizentromeren Regionen, dem inaktivierten X-Chromosom der Frau und in Genen, welche dem „*Imprinting*“ unterliegen. [YODER 1997]. Desweiteren kommt es bei pathologischen Veränderungen oft zu einer Hypermethylierung von CpG-Inseln.

Im Laufe der Evolution hat sich der Anteil an CpGs in den Genomen deutlich reduziert. So liegt die Häufigkeit des Dinukleotides CpG etwa 10-20fach unter dem Erwartungswert von 1/16 [LAIRD 1996; ANTEGUERA & BIRD 1993 a; ANTEGUERA & BIRD 1993 b]. Dies ist vor allem darin Begründet, dass eine hydrolytische Deaminierung von

methyliertem Cytosin (5-mC) zu Thymin etwa zwei bis drei Mal häufiger auftritt als eine Deaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil (Abbildung 1.4). Zudem kann die entstehende G:U-Fehlpaarung im Gegensatz zur G:T-Fehlpaarung durch das Enzym Uracil-DNA-Glycosylase erkannt und repariert werden [COULONDRE *et al.* 1978; LINDAHL 1982]. Zusätzlich erhöht CpG-Methylierung die Empfindlichkeit der DNA gegenüber Noxen wie UV-Licht [TOMMASI *et al.* 1997] und Karzinogenen wie Benzpyren [DENISSENKO *et al.* 1997; CHEN *et al.* 1998]. Dies alles führt zu einer deutlich erhöhten Mutationsfrequenz von 5-mC gegenüber anderen Nukleotiden und damit zur so genannten „CpG-suppression“.

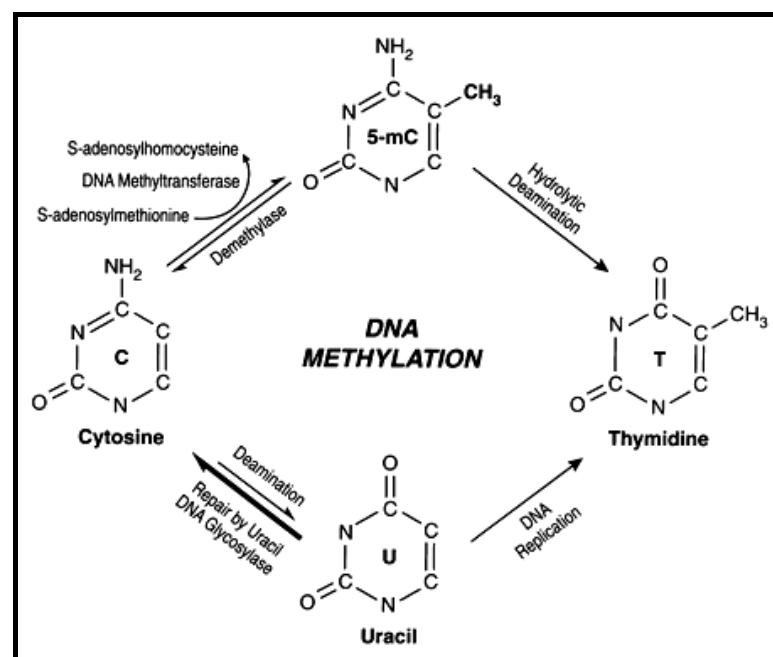


Abbildung 1.4: Transitionen von Cytosin. Durch eine DNA-Methyltransferase (DNMT) wird eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf Cytosin übertragen, und es entsteht 5-Methylcytosin und S-Adenosylhomocystein (SAH). 5-Methylcytosin kann durch hydrolytische Desaminierung in Thymin umgewandelt werden. Die Umwandlung von Cytosin zu Thymin kann auch über die Desaminierung von Cytosin zu Uracil geschehen, welches in einer nachfolgenden DNA-Replikation als Thymin gelesen wird.

Über das gesamte Genom von Säugertieren verteilt finden sich, vorwiegend in den 5'-Regionen von Genen, DNA-Bereiche mit deutlich erhöhter CpG-Häufigkeit. Diese sogenannten CpG-Inseln haben eine Länge von 0,2 bis 5kb und machen etwa 1 bis 2% des gesamten Genoms aus [ANTEGUERA & BIRD 1993 a; BIRD 1986; CROSS 1994]. Sie wurden von GARDINER-GARDEN & FROMMER 1987, als ein Bereich mit einer Länge von mehr als 200bp, einem GC-Gehalt von über 50% und einem Verhältnis der beobachteten zur

erwarteten CpG-Häufigkeit von mindestens 0,6 definiert. Da diese Kriterien aber auch viele repetitive *Alu*-Elemente erfüllen, wurden stringenter Parameter für die Definition von CpG-Inseln eingeführt: Länge ≥ 500 bp, GC-Gehalt $\geq 55\%$ und beobachtete/erwartete CpG-Häufigkeit $\geq 0,65$ [TAKAI & JONES 2002; WANG & LEUNG 2004]. CpG-Inseln liegen normalerweise unmethyliert vor und unterliegen somit nicht der oben beschriebenen „CpG-suppression“ [BAYLIN *et al.* 1998]. Der Grund dafür liegt vermutlich in ihrer Lage in den 5'-Regionen von Genen, wo sie durch die Bindung bestimmter Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Sp1, und eine aktive Transkription vor Methylierung geschützt sind [CLARK & MELKI 2002].

1.3.2.2 Etablierung und Aufrechterhaltung des DNA-Methylierungsmusters

Der Prozess der DNA-Methylierung wird postreplikativ durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert. Dabei wird eine Methylgruppe vom Methyl donor S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf das fünfte Kohlenstoffatom des Pyrimidinrings der Base Cytosin in einem CpG transferiert, wobei 5-Methylcytosin und S-Adenosylhomocystin (SAH) entstehen (Abbildung 1.4) [BESTOR 2000]. Beim Menschen sind bisher fünf verschiedene DNMT bekannt: DNMT1, 2, 3A, 3B, 3L [BESTOR 2000]. Die einzelnen Funktionen der DNMT sind noch nicht vollständig geklärt. Da DNMT1 eine deutlich erhöhte Affinität zu *hemi*-methylierter DNA, gegenüber unmethylierter DNA, besitzt, gilt sie als Erhaltungs-Methyltransferase, welche für die Übertragung des Methylierungsmusters auf den Tochterstrang nach der DNA-Replikation verantwortlich ist [PRADHAN *et al.* 1999; HERMANN *et al.* 2004a]. Für rekombinantes DNMT2 Protein konnte *in vitro* und *in vivo* eine schwache enzymatische Aktivität gezeigt werden, jedoch ist die biologische Funktion dieses Enzyms weiterhin unbekannt [HERMANN *et al.* 2003; LIU *et al.* 2003; HERMANN *et al.* 2004b]. DNMT3A und DNMT3B sind vermutlich *de novo* Methyltransferasen und somit für die Etablierung eines korrekten Methylierungsmusters zuständig [OKANO *et al.* 1998; OKANO *et al.* 1999]. Für DNMT3L konnte bisher keine eigene Methyltransferaseaktivität nachgewiesen werden, jedoch zeigte DNMT3L in Mausmodellen eine stimulierende Wirkung auf DNMT3A und DNMT3B [CHEDIN *et al.* 2002; HATA *et al.* 2002]. Die Etablierung und Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters durch DNMT ist von elementarer Bedeutung. Dies verdeutlichen Versuche mit DNMT-defizienten Mäusen, welche bereits während der Embryogenese letale Entwicklungsstörungen zeigten [LI *et al.* 1992; LI *et al.* 1993]. Auch in humanen Tumorzellen konnte gezeigt werden dass die

Stilllegung der beiden DNMT 1 und 3B zu einer Hypomethylierung der DNA vieler bekannter Tumor Suppressor Gene (TSG) führt [RHEE *et al.* 2002; PAZ *et al.* 2003].

Noch weniger als über die Mechanismen der Methylierung der DNA ist über die Mechanismen der Demethylierung bekannt. Ein anerkannter Prozess welcher zu Hypomethylierung führt ist die passive Demethylierung durch Reduktion der Methyltransferase-Aktivität [ADAMS *et al.* 1990]. Da in einigen Fällen eine vollständige Demethylierung von DNA-Bereichen innerhalb weniger Stunden beobachtet werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass auch Mechanismen zur aktiven Demethylierung existieren [WOLFFE *et al.* 1999]. So kann 5-Methylcytosin durch Cytosin ausgetauscht werden indem es durch 5-Methylcytosin-DNA-Glykosylase vom Phosphodiester-Rückgrat der DNA abgespalten und anschließend mittels DNA-Reparaturmechanismen durch Cytosin ersetzt wird [RAZIN *et al.* 1986; JOST *et al.* 1995]. Einen weiteren möglichen Mechanismus zur aktiven Demethylierung stellt die Abspaltung der Methylgruppe durch Hydrolyse dar. Es konnte gezeigt werden, dass das klonierte Enzym 5-Methylcytosin-Demethylase 5-Methylcytosin zu Cytosin und Methanol hydrolysieren kann [BHATTACHARYA *et al.* 1999; RAMCHANDANI *et al.* 1999]. Inwiefern dieser Prozess allerdings *in vivo* stattfindet ist fraglich.

1.3.2.3 DNA-Methylierung und Genexpression

DNA-Methylierung und Genexpression korrelieren in den allermeisten Fällen invers zu einander (Abbildung 1.3). Starke Methylierung führt meist zur Inhibition der Transkription eines Gens. Hierfür sind zwei verantwortliche Mechanismen bekannt. Zum einen inhibiert Methylierung die Bindung vieler Transkriptionsfaktoren, wie AP-2, CREB, E2F oder NF- κ B, an deren Konsensussequenzen der DNA [RAZIN & RIGGS 1980; SINGAL *et al.* 1999; ATTWOOD *et al.* 2002]. Zum anderen kann eine starke Methylierung im Bereich von CpG-Inseln zur Rekrutierung von Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD)-Proteinen führen, welche methylierungsspezifisch an DNA binden und mit Histon-modifizierenden Proteinen, wie Histon-Deacetylasen (HDAC), interagieren können [FRAGA *et al.* 2003; KLOSE *et al.* 2005; JONES *et al.* 1998; NG *et al.* 2000]. Durch die resultierende Deacetylierung, durch die HDAC, kommt es zu einer lokalen Chromatinkondensation was zur Unzugänglichkeit des betroffenen Promotors für die Transkriptionsmaschinerie und somit zur Stilllegung des betroffenen Gens führt [NAN *et al.* 1998; TAZI & BIRD 1990; JAENISCH & Bird *et al.* 2003]. Zur Familie der MBD-Proteine zählen fünf Mitglieder:

MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 und Methyl-CpG-bindendes Protein 2 (MeCP2) [HENDRICH & BIRD 1998] Auch die Methyltransferase DNMT1 bindet an ihrem N-terminalen Ende HDAC und andere Co-Repressoren der Transkription, so dass hier DNA-Methylierung und die Herstellung eines inaktiven Chromatinstatus parallel ablaufen [ROBERTSON *et al.* 2000].

Nicht vollständig geklärt ist die Frage, an welcher Stelle die DNA-Methylierung und die folgende Chromatininaktivierung in den Prozess der Stilllegung eines Gens einzuordnen sind. Es ist nicht völlig klar ob DNA-Methylierung als erster Schritt und somit Ursache der Stilllegung eines Gens oder als Folge und Endpunkt von Transkriptionshemmung zu sehen ist [BAYLIN & BESTOR *et al.* 2002; CLARK *et al.* 2002]. Eine fortlaufende Transkription scheint die 5'-Region eines Gens vor Methylierung zu schützen. Dies konnte u. a. für das CTA MAGE-A1 gezeigt werden [DE SMET *et al.* 2004]. Bei menschlichen Mammaepithelzellen im Selektionsprozess konnte gezeigt werden, dass zunächst die Expression von p16^{INK4} supprimiert und dann erst die Promoter-Hypermethylierung einsetzt [FOSTER *et al.* 1998; HUSCHTSCHA *et al.* 1998]. Auch in diesem Fall konnte durch eine Behandlung mit hypomethylierenden Agenzien die Expression des Gens wieder reaktiviert werden. Methylierung scheint hier also als sekundäres Element der Stilllegung eines Gens zu fungieren um den inaktiven Status aufrechtzuerhalten [BACHMAN *et al.* 2003]. Allgemein scheint die epigenetische Regulation ein dynamischer Prozess zu sein, der die Transkription eines Gens graduell und in mehreren Schritten reguliert. Dabei besteht eine intensive, sich selbst verstärkende Rückkopplung zwischen dem „CpG-Methylierungs-Code“ und dem „Histon-Code“ [JAENISCH & Bird *et al.* 2003].

1.3.2.4 Funktionen der DNA-Methylierung und der folgenden Chromatininaktivierung

Die Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung spielt eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen. So können z. B. durch die methylierungsgesteuerte Aktivierung und Deaktivierung von Genen während der Embryogenese Zellen, die genetisch identisch sind, unterschiedliche Expressionsmuster ausbilden und sich so zu verschiedenen Zellen und Geweben differenzieren [LI *et al.* 2002]. Auch bei der Allel-spezifischen Expression, dem so genannten „*Imprinting*“ spielt DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle. Durch die Methylierung so genannter „differentially methylated regions“ (DMR) wird eines von zwei Allelen, entweder das

mütterliche oder das väterliche, abgeschaltet, so dass das betreffende Gen nur von einem Allel exprimiert werden kann [MANN *et al.* 2000; REIK & WALTER 2001; ROBERTSON *et al.* 2005]. Die vollständige Methylierung eines der beiden weiblichen X-Chromosomen, in der frühen Embryonalentwicklung, führt zu dessen Kondensation, der Ausbildung des lichtmikroskopisch sichtbaren Barr-Körperchens und sehr stark eingeschränkter Genaktivität [AVNER & HEARD 2001]. Neben diesen Funktionen wird vermutet, dass DNA-Methylierung im Säuger genom auch dem Schutz vor parasitärer autonomer DNA, wie Transposons und Retroviren dient [YODER *et al.* 1997; O'NEILL *et al.* 1998]. Durch die transkriptionshemmende Wirkung wird die Aktivierung solcher Elemente inhibiert. Zudem führt die Mutationsanfälligkeit von 5-mC zu Thymin zu einer dauerhaften Inaktivierung der parasitären Elemente.

1.3.2.5 DNA-Methylierung und Krankheit

In vielen Tumorzellen, ist sowohl eine globale Hypomethylierung als auch eine Regionenspezifische Hypermethylierung zu finden [GAMA-SOSA *et al.* 1983; JONES 1996; JONES & BAYLIN 2002; FEINBERG & TYCKO 2004]. Die Mechanismen die zu diesem Zustand führen sind, wie die Frage ob eine direkte Verbindung zwischen ihnen besteht, weitgehend ungeklärt. Der Grad der Methylierung des Genoms, als auch der Grad anderer epigenetischer und genetischer Defekte, nimmt mit dem Alter stetig zu [ISSA *et al.* 1994; AHUJA *et al.* 1998; ISSA *et al.* 2001; WAKI *et al.* 2003; LEHMANN *et al.* 2005].

Der globale Methylierungsgrad ist in Krebszellen gegenüber normalen Zellen sehr stark reduziert [EHRlich 2002]. Diese globale Hypomethylierung erfolgt vorwiegend in den normalerweise stark methylierten perizentromären Bereichen der Chromosomen und umfasst etwa 20-60% der CpG-Stellen [ESTELLER & FRAGA 2001]. Eine Abnahme der Methylierung in diesen Sattelitensequenzen führt zu DNA-Brüchen, homologer Rekombination und der Reaktivierung von repetitiven, parasitären DNA-Sequenzen. Dies führt zu genomischer Instabilität und Tumorentstehung [FEINBERG & TYCKO 2004]. Bei einigen Krebsarten konnte eine Korrelation zwischen der Abnahme der Methylierung und dem Grad der Erkrankung gezeigt werden [FEINBERG & VOGELSTEIN. 1983; QU *et al.* 1999]. Die Hypomethylierung führt hier zur Expression von Genen, welche in normalen Zellen durch Hypermethylierung inaktiviert sind [KANEDA *et al.* 2004]. Diese sind vor allem Proto-Onkogene und Gene, welche dem *Imprinting* unterliegen. Proto-Onkogene haben oft wichtige Funktionen bei der Steuerung der Zellteilung. Durch ihre aberrante

Aktivierung wird die Zellproliferation verstärkt und sie werden zu Onkogenen. Der Verlust des *Imprinting* („*loss of imprinting*“ (LOI)) durch Hypomethylierung kann zur biallelischen Expression der betroffenen Gene führen, und so zur Entstehung von Tumoren beitragen [RAINIER *et al.* 1993; HOLM *et al.* 2005].

Aberrante Hypermethylierung wird in unterschiedlichen Ausmaßen in so gut wie allen humanen Tumoren gefunden. Sie erfolgt vorwiegend in CpG-Inseln. Die Geninaktivierung durch Hypermethylierung von Promotorregionen ist mindestens genauso häufig wie die Inaktivierung durch Mutationen oder Deletionen [JONES *et al.* 2002]. Globale Analysen der Methylierung in Tumorzellen zeigten, dass durchschnittlich rund 600 der 45.000 CpG-Inseln in malignen Zellen aberrant methyliert sind [SMIRAGLIA *et al.* 2001]. Dabei handelt es sich oft um die Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen (TSG). Die Proteine dieser Gene haben u. a. Funktionen in der Signaltransduktion (RASSF1, LKB1/STK11), der Zelladhäsion (CDH1, CDH13), der DNA-Reparatur (MLH1, O6-MGMT, MGMT), der Differenzierung (RAR β), der Zellzykluskontrolle (P53, RB, P16INK4a, P15INK4b, P14ARF) und der Apoptose (DAPK, Caspase-8, APAF-1). Ihre Inaktivierung führt oft zu unkontrolliertem Zellwachstum [HERMAN *et al.* 1995; DELGADO *et al.* 1998; TANG *et al.* 2000; TEITZ *et al.* 2000; SOENGAS *et al.* 2001; JONES & BAYLIN 2002; ESTELLER 2005]. Hypermethylierung kann zu einem vollständigen Verlust von Genaktivität führen, welcher funktionell einem „*loss of heterozygosity*“ (LOH) entspricht [KNUDSON 2000]. Für einige Neoplasien, wie Leukämien und Lymphome, konnte gezeigt werden, dass sie spezifische Methylierungsmuster besitzen [ISSA *et al.* 1997; TOYOTA *et al.* 2001; MELKI & CLARK *et al.* 2002]. Zur Ursache der aberranten Hypermethylierung gibt es mehrere Hypothesen. So konnten in mehreren Neoplasien, u. a. in der AML und CML, erhöhte Level der bekannten DNA-Methyltransferasen festgestellt werden [MELKI *et al.* 1998]. In der AML wurde zudem eine positive Korrelation zwischen dem DNMT1-Level und der Hypermethylierung von p15^{INK4b} festgestellt [MIZUNO *et al.* 2001]. Dazu passend konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von DNMT1 in transfizierten Zellen nach einigen Zellpassagen zur Methylierung vorher unmethylierter CpG-Inseln in Promotorregionen führt [VERTINO *et al.* 1996]. Allerdings scheint das Ausschalten von DNMT1 alleine die aberrante Hypermethylierung nicht verhindern zu können, so dass vermutlich auch die *de novo* Methyltransferasen oder andere Methyltransferasen in diese Prozesse eingebunden sind [RHEE *et al.* 2000]. Auch die Frage warum spezifische CpG-Inseln in bestimmten Tumoren hypermethyliert vorliegen, kann

nur hypothetisch beantwortet werden. Vermutlich ist die Hypermethylierung bestimmter Gene als evolutionärer Prozess zu verstehen, in welchem die Herunterregulierung der Expression bestimmter Gene der Tumorzelle einen selektiven Vorteil geboten hat. Unterstützt wird dieses Konzept durch die Feststellung, dass in einem Tumortyp oft die gleichen Gene entweder durch Mutation oder durch Hypermethylierung betroffen sind. Die epigenetische Regulierung bietet der Zelle dabei einen weiteren Vorteil da diese reversibel ist. So eine Reversibilität der Promotor-Methylierung in Anpassung an veränderte Umweltbedingungen, wie sie beispielsweise bei der Metastasierung auftreten, konnte beim E-Cadherin-Promotor in Primärtumoren versus Metastasen gezeigt werden [GRAFF *et al.* 2000] Ein weiterer Grund für die unterschiedliche Hypermethylierung von Promotoren könnte die unterschiedliche Empfänglichkeit von CpG-Inseln für Methylierung sein. So konnten Feltus und Mitarbeiter, 2003, zeigen, dass man in DNMT1 überexprimierenden Zellen methylierungs-empfindliche und methylierungs-resistente CpG-Inseln unterscheiden kann. Sie postulierten zudem, dass diese Empfänglichkeit auf der DNA-Sequenz beruht und somit voraussagbar ist. In embryonalen Stammzellen konnte beobachtet werden, dass bestimmte Sequenzen durch protektive Faktoren, wie SP1-Elemente, vor Methylierung geschützt werden [BRANDEIS *et al.* 1994]. Die Bindungsstellen für solche Elemente könnten, beispielsweise durch Mutationen, in Tumorzellen verloren gegangen sein, was zur Hypermethylierung der Sequenzen führt. Eine andere Theorie für die Erklärung differentieller Methylierung geht davon aus, dass repetitive Sequenzen, wie ALUs, als Ausgangspunkte für DNA-Methylierung dienen und somit die Hypermethylierung bestimmter Regionen vom Vorhandensein solcher abhängig ist [GRAFF *et al.* 1997]. Ein weiteres Konzept zur Steuerung von DNA-Methylierung entdeckten Di Croce und Mitarbeiter, 2002. Sie konnten zeigen, dass das Onkogen PML-RAR DNA-Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen zur Promotorregion von Tumorsuppressorgenen rekrutieren kann und somit diese dauerhaft epigenetisch supprimiert. Solche Studien legen die Theorie nahe, dass den meisten epigenetischen Fehlregulationen in Tumorzellen primäre genetische Läsionen vorausgehen.

1.3.2.6 Bedeutung der DNA-Methylierung für Diagnostik, Prognose und Therapie

Aufgrund ihres frühen Auftretens während der Tumorgenese und ihrer Reversibilität stellen epigenetische Veränderungen vielversprechende diagnostische, prognostische und therapeutische Ziele dar.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass aberrante Methylierung sehr früh in der Tumorgenese und sogar in vielen prämaligen Läsionen, wie z. B. dem metaplastischen Bronchialepithel von Rauchern, auftritt was eine frühe Diagnose ermöglicht [BELINSKY *et al.* 1996; KERSTING *et al.* 2000]. Auch von Tumoren freigesetzte, spezifisch methylierte DNA im freien Blutstrom ermöglicht eine gute Diagnose und sogar eine Klassifizierung von Tumoren mittels methylierungsspezifischer PCR Methoden [KAWAKAMI *et al.* 2000; SIDRANSKY 2002].

Auch Verknüpfungen zwischen Methylierungsstatus und Prognose sowie Ansprechen auf Therapie sind bekannt. So korreliert beispielsweise die Methylierung von p15^{INK4b} beim myelodysplastischen Syndrom (MDS), AML und ALL mit einer schlechten Prognose [UCHIDA *et al.* 1997; QUESNEL *et al.* 1998; WONG *et al.* 2000]. Die Hypermethylierung des DNA-Reparatur-Gens *MGMT* (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) ist dagegen ein Marker für gutes Ansprechen auf bestimmte Chemotherapeutika. Die Inaktivierung des Reparaturgens führt vermutlich zu einer verschlechterten DNA-Reparatur und damit zu einer höheren Effektivität der Chemotherapeutika [ESTELLER *et al.* 2002].

Die Reversibilität von aberranter DNA-Methylierung bietet einen vielversprechenden Angriffspunkt für DNA-hypomethylierende Agenzien. Solche Agenzien, wie die Cytidin-Analoga 5-Azacytidin (5-Aza-C) und dessen Analogon 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-dC), zeigten bereits in mehreren Studien mit hämatopoetischen Neoplasien bessere Wirkungen als die etablierten Standardtherapien [ISSA *et al.* 2004; DE VOS & VAN OVERVELD 2005]. Als Nukleosid-Analoga werden sie in die DNA eingebaut und bilden stabile Komplexe mit der DNMT1. In Folge können diese inkorporierten Basen, durch ihren Stickstoffrest an der 5' Position des Pyrimidiring, nicht methyliert werden und übertragen die fehlende Information, nach der Replikation, auf den Tochterstrang. Außerdem führt die Bindung der DNMT1 zu einer reduzierten Methyltransferase-Aktivität, was zusätzlich zu einer verringerten DNA-Methylierung beiträgt. Sehr vielversprechend ist auch die zusätzliche Behandlung mit HDAC-I, wie Trichostatin A, welche zu synergistischen Effekten und einer noch stärkeren Anregung der Genexpression, u. a. von Tumorsuppressorgenen, führt [CAMERON *et al.* 1999; SHAKER *et al.* 2003]. TSA und andere Deacetylaseinhibitoren inhibieren die Aktivität von Histon-Deacetylasen, wodurch es zu verstärkter Histon-Acetylierung, Chromatinrelaxierung und erhöhter Genexpression kommt. Ein anderer vielversprechender Ansatz ist die Möglichkeit „epigenetische

Medikamente“ als Sensitizer einer gezielten Therapie einzusetzen. Da solche Medikamente jedoch völlig unspezifisch wirken, können sie bei längerer Anwendung aufgrund der Hypomethylierung zu genomischer Instabilität und somit zu Nebenwirkungen, wie der Ausbildung anderer Neoplasien, führen [EDEN *et al.* 2003; GAUDET *et al.* 2003].

1.4 PRAME

Das *preferentially expressed antigen of melanoma* (PRAME) wurde 1997 von Ikeda und Mitarbeitern, mit Hilfe des "T lymphocyte epitope cloning", als ein von einem spezifischen autologen zytotoxischen T-Lymphozyten-Klon (CTL-17) auf Melanomzellen (MEL.B) eines rezidivierten Patienten erkanntes Antigen (LB33-E) identifiziert. Ikeda und Mitarbeiter stellten weiterhin fest, dass *PRAME* in einer Vielzahl von Tumoren bestimmter Tumortypen stark überexprimiert wird (Tabelle 1.1). Expression in vergleichbarer Stärke konnte dagegen in gesunden Menschen nur in den Geweben von Testis, Endometrium, Ovarien und Nebennieren gefunden werden, wobei die Expression in Testis durchschnittlich mehr als 10mal höher als in den anderen Geweben ist (Tabelle 1.1). Das *PRAME* kodierende Gen (*PRAME*) befindet sich auf Chromosom 22 in der Bande q11.22 (Abbildung 3.1). Es bildet fünf bekannte Transkriptvarianten welche alle den gleichen offenen Leserahmen besitzen und somit alle für das gleiche, ca. 58 kDa schwere, Protein kodieren (Abbildung 3.3 & 3.4).

1.4.1 *PRAME*-Expression und die Auswirkung auf den klinischen Verlauf einiger Krebsarten

Die Expression des *PRAME*-Gens wurde von mehreren Gruppen in den verschiedensten Geweben und Tumorarten untersucht (Tabelle 1.1). Sehr häufig wird es z. B. in Primärläsionen (88%) und Metastasen (95%) von Melanomen überexprimiert [IKEDA *et al.* 1997]. In gesundem Hautgewebe oder benignen Läsionen ist es aber nie zu finden, was die Vermutung zulässt dass *PRAME* in die Transformation von Melanozyten involviert sein könnte [HAQQ, 2005]. Außer in Melanomen ist *PRAME* auch in vielen weiteren Krebsarten, wie Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, Brustkarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Kopf- und Halskarzinomen, Hodgkin Lymphomen, Sarkomen, Wilms-Tumoren und Medulloblastomen überexprimiert [Tabelle 1.1, IKEDA *et al.* 1997; NEUMANN *et al.* 1998; VAN'T VEER *et al.* 2002; LI *et al.* 2002; BOON *et al.* 2003; WILLENBROCK *et al.* 2006]. Aufgrund der Beschränkung der hohen *PRAME*-Expression

auf Tumor- und Testis-Gewebe wird *PRAME* der Gruppe der Cancer/Testis-Antigene (CTA) zugeordnet (Abschnitt 1.1.2).

Tabelle 1.1: *PRAME*-Expression in Tumoren und normalen Geweben [nach Epping *et al.* 2006].

Gewebetyp	Prozent	Referenz
Melanom		
Primärläsion	88	[IKEDA <i>et al.</i> 1997]
Metastase	95	[IKEDA <i>et al.</i> 1997]
Mammakarzinom	27	[Ikeda <i>et al.</i> 1997; VAN'T VEER <i>et al.</i> 2002]
Lungenkarzinom		
Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom		
Adenokarzinom	46	[IKEDA <i>et al.</i> 1997]
Plattenepithelkarzinom	78	[IKEDA <i>et al.</i> 1997]
Leukämie		
ALL	17-42	[IKEDA <i>et al.</i> 1997; VAN BAREN <i>et al.</i> 1998; STEINBACH <i>et al.</i> 2002; PAYDAS <i>et al.</i> 2005]
AML	30-64	[IKEDA <i>et al.</i> 1997; VAN BAREN <i>et al.</i> 1998; STEINBACH <i>et al.</i> 2001; GREINER <i>et al.</i> 2004; PAYDAS <i>et al.</i> 2005]
CML		
Fortgeschrittene akute megakaryoblastische Leukämie bei Patienten mit Down Syndrom	n.b.	[RADICH <i>et al.</i> 2006]
Hodkin Lymphom	n.b.	[McElwaine <i>et al.</i> 2004]
Medulloblastom	30-74	[BOON <i>et al.</i> 2003]
Neuroblastom		
Primärläsion	93	[OBERTHUER <i>et al.</i> 2004]
Fortgeschrittenes Stadium	100	[OBERTHUER <i>et al.</i> 2004]
Kopf- und Halskarzinom	39	[IKEDA <i>et al.</i> 1997]
Nierenzellkarzinom	41	[IKEDA <i>et al.</i> 1997,4]
Wilms-Tumor	n.b.	[LI <i>et al.</i> 2002]
Sarkom	39	[IKEDA <i>et al.</i> 1997]
Multiples Myelom	n.b.	[PELLAT-DECEUNYNCK <i>et al.</i> 2000]
Normale Gewebe		
Testis		[IKEDA <i>et al.</i> 1997]
Endometrium		[IKEDA <i>et al.</i> 1997]
Ovarien		[IKEDA <i>et al.</i> 1997]
Nebenniere		[IKEDA <i>et al.</i> 1997]
Knochenmark / CD34+ Vorläuferzellen		[STEINBACH <i>et al.</i> 2001]

Eine Besonderheit von *PRAME* ist, dass es, im Gegensatz zu anderen CTA, wie etwa Mitgliedern der Genfamilien MAGE, BAGE und GAGE, auch in leukämischen Zellen, und insbesondere in AML zu finden ist [IKEDA *et al.* 1997; VAN BAREN *et al.* 1998;

CHAMBOST *et al.* 2001; STEINBACH *et al.* 2002a; STEINBACH *et al.* 2002b; GREINER *et al.* 2004; PAYDAS *et al.* 2005]. So konnte u. a. von Steinbach und Mitarbeitern, 2001, eine erhöhte *PRAME*-Expression in 62% aller Proben (n=31) von Kindern mit neu diagnostizierter AML nachgewiesen werden. Außer in Testis, Endometrium, Ovarien und Nebennieren fanden Steinbach und Mitarbeiter, 2001, jedoch auch *PRAME*-Expression in CD34+ Vorläuferzellen aus Knochenmark (Tabelle 1.1) [STEINBACH *et al.* 2002a].

Auch in Neuroblastomen wird *PRAME*, ähnlich wie in Melanomen, extrem häufig exprimiert [OBERTHUER *et al.* 2004]. So konnten Oberthuer und Mitarbeiter, 2004, in 93% aller Patienten mit einem primären Tumor und 100% der Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsverlauf *PRAME* detektieren. Die *PRAME*-Expression korrelierte dabei in diesen Tumoren hochsignifikant mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, einem höheren Alter der Patienten und einem schlechten klinischen Verlauf der Krankheit. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine umfassende, Microarray-basierte Studie, in welcher Proben von Patienten mit Mammakarzinom, welche therapiert werden konnten, mit Proben von Patienten welche nicht therapiert werden konnten verglichen wurden. Auch hier korrelierte die *PRAME*-Expression mit einem schlechten klinischen Verlauf und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Metastasen [VAN'T VEER *et al.* 2002]. Bei einem Vergleich der Gensignaturen der chronischen, akzelerierten und akuten Phase („Blasten-Krise“) in chronischen myeloischen Leukämien (CML) zeigte sich, dass in der frühen akzelerierten Phase, vor der Anhäufung von leukämischen Blasten, ein verändertes Genexpressionsmuster erscheint. Hierbei kommt es, neben Veränderungen wie der Deregulation des WNT/ β -catenin Signalwegs und einer Herunterregulierung von Jun B und Fos auch zur verstärkten Expression von *PRAME*, was ein weiteres Indiz dafür sein könnte, dass *PRAME* in Zell-transformierende Mechanismen involviert ist [RADICH *et al.* 2006].

Einen weiteren möglichen Beleg dafür stellt auch die Feststellung dar, dass *PRAME* im Verlauf der akuten megakaryoblastischen Leukämie (FAB-Typ M7 Abbildung 1.1) bei Patienten mit Down Syndrom heraufreguliert wird [MCELWAIN *et al.* 2004]. Es konnte hier gezeigt werden, dass Patienten mit *progressive acute megakaryoblastic leukemia* (AMKL) im Gegensatz zu Patienten mit *transient myeloproliferative syndrome* (TMD), welches eine Vorstufe der AMKL darstellt, ein stark erhöhtes *PRAME*-mRNA-Level aufwiesen. Auch in diesen beiden Fällen, der CML und AML M7 in Patienten mit Down

Syndrom, korrelierte die Expression des *PRAME*-Gens mit einer erhöhten Sterblichkeit der Patienten.

1.4.3 Funktion des PRAME-Proteins

Die Korrelation der *PRAME*-Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einem schlechten Krankheitsverlauf in vielen Tumoren lässt die Vermutung zu, dass *PRAME* eine kausale Rolle in der Tumorentwicklung spielt. Unterstützt wird dies durch die Feststellung dass in Tumorzellpopulationen, welche *PRAME*-exprimieren, auch in Anwesenheit von spezifischen CTL gegen *PRAME* die *PRAME*-Expression bestehen bleibt [IKEDA *et al.* 1997]. Diese Tumorzellpopulationen scheinen also den Verlust von Zellen durch die CTL durch einen selektiven Vorteil den die *PRAME*-Expression mit sich bringt ausgleichen zu können. Unterstützend dazu konnte durch Goellner und Mitarbeiter, 2006, gezeigt werden, dass Zellen, welche *PRAME* überexprimieren, eine erniedrigte Expression von Proteinen aufweisen, welche für den programmierten Zelltod (Apoptose) einer Zelle wichtig sind. Weiterhin konnte in solchen Zellen eine erhöhte Bildung von ABC Transportern festgestellt werden. Eine vermehrte Bildung solcher Membrantransportproteine kann zu vermehrter Ausschleusung von Chemotherapeutika und damit zu einer MDR führen.

Das *PRAME*-Protein wurde in der Zellmembran, dem Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert [TAJEDDINE *et al.* 2005; PROTO-SIQUEIRA *et al.* 2006]. Für eine nukleare Lokalisation des 509 Aminosäure (AS) umfassenden, sehr Leucin-reichen Proteins, spricht das Vorhandensein von sieben möglichen Nuklearen-Rezeptor-Boxen. Solche Boxen besitzen ein LXXLL-Motiv in dem L für Leucin und X für eine beliebige AS steht. Proteine mit solchen Motiven binden und verändern oft die Aktivität von Nuklearen-Hormon-Rezeptoren. Aus diesem Grund testeten Epping und Mitarbeiter, 2005, *PRAME* auf seine Fähigkeit hin die Aktivität von Nuklearen-Hormon-Rezeptoren der Klassen I und II zu beeinflussen. Dabei zeigte sich, dass *PRAME*, in konzentrationsabhängiger Weise, die durch Retinsäure (RA) induzierte und durch den Retinsäure-Rezeptor (RAR)-vermittelte Aktivierung von RAR-bindende Elemente (RARE) enthaltenden Ziel promotoren inhibiert (Abbildung 1.5). *PRAME* stellt somit einen dominanten Repressor des RAR- Signalweges dar.

RA ist als Vitamin-A-Metabolit in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert. Dazu gehören Embryogenese, Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und die

Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase von Zellen. Die Vermittlung von RA-Effekten erfolgt über intrazelluläre Rezeptoren (RAR, RXR), die zur Familie der Steroidrezeptoren gehören und sich in ihrer Affinität zu verschiedenen Formen von RA-Isomeren unterscheiden. Diese Rezeptoren binden spezifisch RARE in den Promotoren ihrer Ziel-Gene, wodurch diese, mit Hilfe von Repressor-Komplexen, stillgelegt werden (Abbildung 1.5). RA bindet die Rezeptoren als Ligand, was in normalen Zellen zur Ablösung der Repressor-Komplexe und Rekrutierung von Koaktivatoren führt, wodurch die Expression des Ziel-Gens induziert wird. RA aktiviert so die Transkription einer Reihe von Genen, was in reagierenden Zellen zu Differenzierung, Zellzyklusstop und Apoptose führt [ALTUCCI *et al.* 2001].

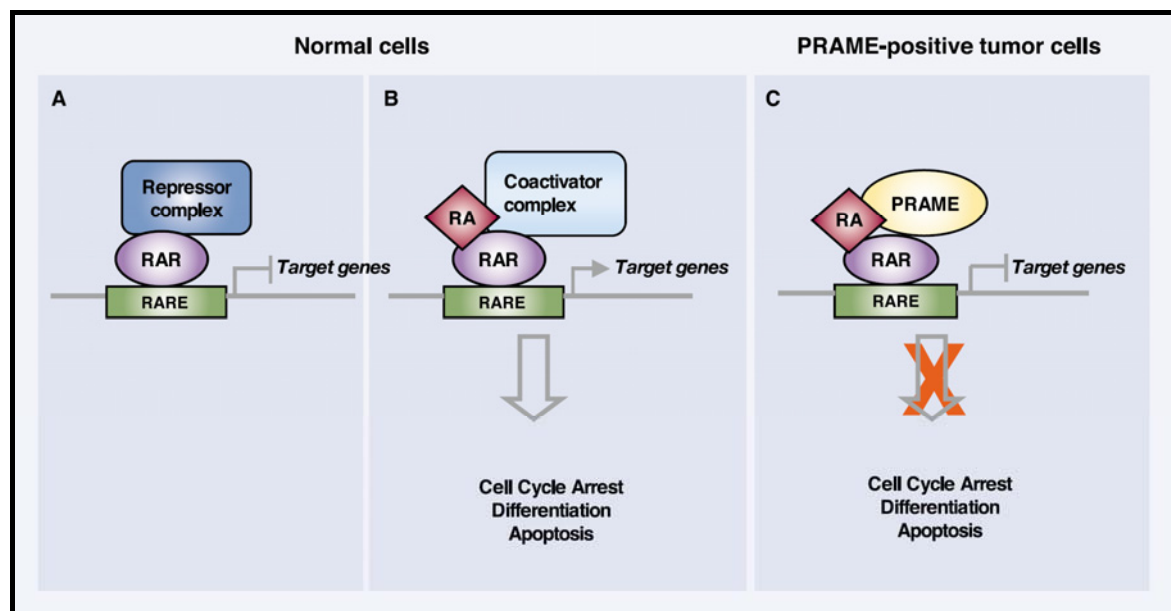


Abbildung 1.5: Modell der PRAME-Funktion in Tumorzellen [aus Epping & Bernards 2006].

A: In der Abwesenheit seines Liganden RA rekrutiert RAR α , in normalen Zellen, Repressor-Komplexe zu den Promotoren seiner Ziel-Gene, was zu deren Repression führt. **B:** Durch die Bindung von RA an RAR α kommt es zur Ablösung der Repressor-Komplexe und Rekrutierung von Koaktivatoren, was wiederum zu einer Induktion der Genexpression des Ziel-Gens führt. Da die viele der Ziel-Gene von RAR α in Zellzyklusstop, Differenzierung und Apoptose involviert sind, werden diese Prozesse in Gang gesetzt. **C:** In PRAME-positiven Tumorzellen führt die Bindung von RA an RAR α zur Rekrutierung von PRAME, wodurch die Rekrutierung von Koaktivatoren und die folgende Induktion der Genexpression des Ziel-Gens reprimiert wird.

Ein Verlust der Ansprechbarkeit von Zellen gegenüber RA ist deshalb förderlich für die Tumorentwicklung. Epping und Mitarbeiter konnten zeigen, dass PRAME, RA-abhängig, direkt an RAR bindet und so die Bindung von Koaktivatoren und damit die Aktivierung der Ziel-Gene RARs verhindert. Ektopische PRAME-Expression in RA-sensitiven Zellen

verlieh diesen Resistenz gegenüber RA-induziertem Wachstumsarrest, Differenzierung und Apoptose. Herabregulierung von PRAME durch siRNA in ausnahmslos RA-resistenten Melanomzellen hingegen führte zur Wiederherstellung der RA-Sensitivität der Zellen und Induktion der Ziel-Gene RAR β und p21. Des Weiteren konnte in einem Melanom-Xenograft-Modell in Mäusen gezeigt werden, dass eine Behandlung mit RA von Tumoren mit herabreguliertem PRAME im Gegensatz zu Tumoren welche ein hohes PRAME-mRNA-Level aufweisen zu einer signifikant verringerten TumorgroÙe führt [EPPING *et al.* 2005]. RAR α ist auch an den Chromosomen-Translokationen t(15;17) und t(11;17), welche die kindliche Akute Promyeloische Leukämie (APL) verursachen, beteiligt. Die hierbei entstehenden Fusionsproteine (PML)-RAR α und PLZF-RAR α stellen funktionell veränderte Rezeptoren dar, welche im Gegensatz zum nativen RAR α die RA-induzierte Differenzierung leukämischer Blasten konstitutiv inhibieren [ALTUCCI *et al.* 2001]. Möglicherweise hat die Überexpression von PRAME in vielen Tumoren einen ähnlichen Effekt wie die beschriebenen Fusionsproteine in APL. Die Repression des RAR-Signalweges durch PRAME und die folgende Suppression von Zellzyklusstop, Differenzierung und Apoptose könnte den Grund dafür darstellen, warum PRAME-exprimierende Zellen einen selektiven Vorteil gegenüber PRAME-negativen Zellen besitzen. Es könnte auch erklären, warum PRAME-Expression in vielen Tumoren hochsignifikant mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Metastasen und einem schlechten klinischen Verlauf der Krankheit korreliert.

Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob PRAME-exprimierende Tumorzellen abhängig von einem hohen PRAME-Level sind. Eine Verwicklung von PRAME in den malignen Phänotyp ist am ehesten in Melanomen vorstellbar, da diese zu einem Großteil PRAME exprimieren (Tabelle 1.1). Dies wird durch die Feststellung unterstützt, dass eine durch RNAi vermittelte Herunterregulierung von PRAME in solchen Zellen zu einer Wiederherstellung der RA-Sensitivität und zu verringertem TumorgroÙe führt. Es wird diskutiert, dass PRAME in der Tumorgenese solider Tumore eine andere Funktion besitzen könnte als hämatologischen Neoplasien. Diese These wird dadurch unterstützt, dass in kindlichen akuten lymphatischen Leukämien eine Korrelation zwischen PRAME-Expression und einem guten Verlauf der Krankheit gezeigt werden konnte [STEINBACH *et al.* 2002a]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass transiente PRAME-Überexpression in leukämischen Zellen zu einem Caspase-unabhängigen Zelltod führen kann [TAJEDDINE

et al. 2005]. Eine stabile PRAME-Überexpression führte hier zu einer verminderten Proliferationsrate, die Herunterregulation von PRAME durch RNAi hingegen zu einer erhöhten Tumorgenität von K562-Leukämiezellen in Mäusen.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist über die Funktion des PRAME-Proteins in normalen Körperzellen nichts bekannt. Seine Expression in Testis, Endometrium und Ovarien weist auf eine ursprüngliche Funktion im Bereich der Spermatogenese und Oogenese hin. In einer genomweiten Analyse menschlicher PRAME-Homologe konnten kürzlich 22 „PRAME-like“-Gene und 10 Pseudogene gefunden werden, welche vermutlich erst vor kurzem evolutionär durch umfassende Genduplikationen entstanden sind [BIRTLE *et al.* 2005]. Auch das Mausgenom enthält mehrere „PRAME-like“-Gene. Es ist jedoch unklar ob ein Ortholog zum menschlichen PRAME-Gen in Mäusen existiert. Auch über die Funktionen dieser Proteine ist nur sehr wenig bekannt.

1.4.4 PRAME und seine klinische Anwendbarkeit

Tumor Antigene, und besonders CTA, können für verschiedene klinische Zwecke genutzt werden. Unter anderem für die Detektion von minimal residual disease (MRD) oder als Ziel einer Immuntherapie. Somit stellt auch PRAME ein geeignetes Ziel für solche Ansätze dar.

1.4.4.1 Minimal residual disease (MRD)

Als MRD wird der Verbleib sehr weniger maligner Zellen nach Remission der Krankheit bezeichnet. Solche verbleibenden Zellen stellen ein hohes Risiko für das Auftreten eines Rezidivs dar. Bei akuten Leukämien ist eine Remission definitionsgemäß dann erreicht, wenn der Blastenanteil im Knochenmark weniger als 5% beträgt. Wenn lichtmikroskopisch keine Blasten mehr entdeckt werden können, kann mit anderen Methoden wie dem durchflusszytometrischen Nachweis aberranter Immunphänotypen oder der PCR-Analyse von spezifischen Chromosomen-Translokationen, wie BCR/ABL, HER-2/neu oder AML/ETO, oder dem Nachweis der Genexpression bestimmter Gene MRD nachgewiesen werden. So kann der Krankheitsverlauf während der Therapie beobachtet und prognostische Aussagen getroffen werden. In den vergangenen Jahren wurden viele Gene mittels quantitativer Real time PCR auf ihre Nutzbarkeit als MRD-Marker getestet. Wegen seiner Reduktion in PRAME-exprimierenden Neoplasien nach Chemotherapie ist

PRAME ein sehr guter Marker um MRD in Leukämien, und vor allem in AML, zu detektieren [STEINBACH *et al.* 2006; MATSUSHITA *et al.* 2001].

1.4.4.1 Immuntherapie

Für effektivere und weniger toxische Krebstherapien ist eine erhöhte Selektivität der Therapeutika notwendig. Tumor-spezifische Proteine und Signalwege bilden deshalb sehr gute Ziele für solche Ansätze. So existieren z. B. bereits Wirkstoffe gegen die Onkogene BCR/ABL in CML und HER-2/neu in Brustkrebs. Das Tumorantigen PRAME hat einige nützliche Eigenschaften mit den genannten Zielen gemein. Erstens ist es fast ausschließlich und in hohem Maße in Tumoren exprimiert, zweitens trägt es durch seinen inhibitorischen Effekt auf den RAR-Signalweg zum onkogenen Phänotyp des Tumors bei und drittens werden PRAME-Antigene auf der Oberfläche von Zellen präsentiert, welche durch autologe zytotoxische T-Zellen erkannt werden können. Diese Eigenschaften machen PRAME zu einem interessanten Kandidaten für Tumor-Immuntherapien [GREINER *et al.* 2004; GRIFFIOEN *et al.* 2006; IKEDA *et al.* 1999; LI *et al.* 2006]. So könnten beispielsweise Immuntherapien entworfen werden, welche die körpereigene T-Zell-basierte Immunantwort verstärken. PRAME-positive Testis-Zellen wären davon nicht betroffen, da diese keine MHC-Klasse I-Moleküle bilden und somit keine PRAME-Epitope präsentieren würden und in anderen Körperzellen mit niedrigem PRAME-Level könnte dieses zu niedrig für eine Immunreaktion sein. Griffioen und Mitarbeiter, 2006, konnten bereits zeigen, dass verschiedene Tumorarten PRAME-spezifisch durch CTL lysiert werden können. In AML-Patienten konnte erst kürzlich eine gegen PRAME-Peptide gerichtete, antileukämische Immunantwort festgestellt werden. Diese trat vorwiegend in Patienten auf, bei welchen eine vollständige Remission der Krankheit vorlag. Dies zeigt, dass es eine natürlich vorkommende Immunreaktion gegen PRAME gibt, welche vermutlich zur Auslöschung von Neoplasien beitragen kann. Li und Mitarbeiter, 2006, entwickelten einen Immuntherapeutischen Ansatz für AML. Sie generierten Dendritische Zellen aus PRAME-positiven AML Blasten (*AML-dendritic cells*), welche kostimulatorische Moleküle bilden und durch T-Zellen erkannt werden. Diese *AML-dendritic cells* wurden AML-Patienten injiziert, was zu einer erhöhten Zahl von T-Zellen führte, welche ein bestimmtes PRAME-Peptid erkannten.

Als problematisch für solche Therapieansätze könnte sich hingegen die Expression von PRAME in CD34+ Vorläuferzellen herausstellen, die ebenfalls ein Ziel einer solchen

Therapie darstellen könnten [STEINBACH *et al.* 2001]. Auch die heterogene Expression von PRAME in manchen Tumorphpopulationen und das fehlen eines PRAME-Orthologs in Nagetieren, für vorklinische *in vivo* Experimente, könnten die Entwicklung solcher Therapien erschweren [SIGALOTTI *et al.* 2004; BIRTLE *et al.* 2005]. Eine andere Strategie PRAME-basierter Tumorthherapie könnten niedermolekulare Wirkstoffe darstellen, welche sich gegen die Bindung von PRAME an RAR α richten.

1.5 Fragestellung / Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die nähere Untersuchung des Gens des *preferentially expressed antigen of melanoma* (PRAME), dessen Regulation als auch seiner Transkripte. Hierbei steht die Frage im Mittelpunkt, welche Mechanismen seiner aberranten Expression in malignen Erkrankungen zugrunde liegen und ob ein verändertes PRAME-Level zur Regulation bestimmter, von Göllner und Mitarbeitern, 2006, definierter, Apoptose- und MDR-relevanter, Ziel-Gene führt. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf den Verhältnissen in den malignen Blasten in AML-Patientenmaterial. Um mögliche Unterschiede in der Regulation der PRAME-Expression in soliden und hämatologischen Neoplasien aufzudecken, sollen hier zusätzlich Zelllinien, welche sowohl aus soliden als auch aus hämatologischen Neoplasien stammen untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laborausstattung

Geräte und Laborausstattung, die in der Arbeit zum Einsatz kamen, sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Geräte und Laborausstattung

Gerät	Hersteller
Abi Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Biofuge 13	Heraeus
Biolumin 960	Molecular Dynamics
BX51 System-Mikroskop	Olympus
CO ₂ -Brutschrank IG150	Jouan
Elektrophoreseapparaturen	Roth
GelVue UV-Transilluminators	Syngene
Gene Genius Gel Documentation and Analysis System	Syngene
Labor-pH-Meter CG 840	Schott
Laminar-Box LaminAir® HB2472	Heraeus
Laminar-Box LC2.12	Jouan
Luminoskan TL Plus	Labsystems
Magnetrührer/Heizplatte IKAMAG®RCT	IKA-Labortechnik Staufen
Microwelle Micromat 135	AEG
NanoDrop™ ND-1000 Spektrometer	NanoDrop Technologies, Inc.
Orbital Shaker IKA-VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik Staufen
Refrigerated Vapor Trap RVT 100	Savant
Speed-Vac® Plus SC210 A	Savant
Speed-Vac® SC110	Savant
Thermomixer 5436	Eppendorf
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc
Zentrifuge RC 5C Plus	Sorvall
Zentrifuge 3K18	Sigma
Zentrifuge 4K18	Sigma
Zentrifuge 4K10	Sigma

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien, die in der Arbeit zum Einsatz kamen, sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Einmalspritzen 2ml	Braun
Einmalspritzennadel 19Gx2	Braun

Eppendorf-Tubes	Roth
Kryo-Röhrchen (2 ml)	Roth
Microcon Filter, 30	Millipore
Mikrotiterplatten , 96-Loch	Nalge Nunc. Int.
Objektträger J. Melvin Freed	J. Melvin Freed Brand
PCR-Platten, 96-Loch	Biozym
PCR-Tubes Applied	Applied Biosystems
PCR-Tubes	Roth
Spritzenfilter steril, 0,2 µm	Renner GmbH
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ²	TPP
Zellkulturschalen Ø 6 cm, 10 cm, 15 cm	TPP
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	TPP

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien, die in der Arbeit zum Einsatz kamen, sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Chemikalien

Reagenz	Hersteller
5'Aza2'Deoxyctidin	Sigma
Agarose	Sigma
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Antifade	Molecular Probes
Borsäure	Roth
DAPI (0,1mg/ml)	Roche
Dihydroethidium	Sigma
Dihydrorhodamin 123	Sigma
DEPC	Roth
EDTA 2Na 2H ₂ O	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (99,8% (v/v))	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Formamid	Merck
Glycerin (99,5% (v/v))	Roth
Glycin	Merck
HEPES free acid	Sigma
Hydroxylamin Hydrochlorid	Sigma
Lösung S1 (Resuspension buffer)	Clontech
Lösung S2 (Lysis buffer)	Clontech
Lösung S3 (Neutralization buffer)	Clontech
Magnesiumchlorid MBI	Fermentas
Methanol	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Sigma
Natriumhydroxyd	Roth

10x PCR Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄ MBI	Fermentas
Reinstwasser	Naturstofftechnikum des HKI
RNAse Away®	Roth
Salzsäure	Roth
SDS	Roth
Tris	Roth
Triton-X-100	Fluka
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween®20	Roth

2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

Lösungen, Puffer und Medien, die in der Arbeit zum Einsatz kamen, wurden nach den in Tabelle 2.4 angegebenen Vorschriften angesetzt.

Tabelle 2.4: Puffer, Lösungen und Medien

Puffer, Lösung, Medium	Zusammensetzung
5-Aza-2'-Deoxycytidin (5mM)	in Essigsäure:H ₂ O 1:1 gelöst und bei 4°C aufbewahrt
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin in dd H ₂ O
CaCl ₂ (2,5M)	277,5 g/l CaCl ₂ in dd H ₂ O, sterilfiltrieren
DEPC-H ₂ O (0,1% (v/v))	1 ml/l DEPC in dd H ₂ O; autoklavieren
dNTP Stammlösung (10 mM)	je 10 µl dATP (100 mM), dCTP (100mM), dGTP (100 mM) und dTTP (100mM) in 60 µl dd H ₂ O
Einfriermedium Zellkultur	Dulbecco's Medium mit Glutamax und 4,5 g/l Glukose mit 30% fötalem Kälberserum und 10% DMSO versetzt
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml in dd H ₂ O
HCl (0,1 M)	10 M Salzsäure 1:100 in dd H ₂ O
HEPES (2 M)	477 g/l HEPES in dd H ₂ O, sterilfiltrieren
Natriumbicarbonat-Lösung	8,4 g in 1l dd H ₂ O, pH 9 mit NaOH einstellen, sterilfiltrieren
NaOH (0,1 M)	4,1 g/l NAOH in dd H ₂ O, sterilfiltrieren
Natriumbisulfit/Hydrochinon-Lösung	5,41 g Natriumbisulfit in 8 ml dd H ₂ O lösen, 0,22 g Hydrochinon in 10 ml dd H ₂ O lösen, von dieser frischen Lösung 500 µl in die Natriumbisulfitlösung geben [10mM], pH mit ca. 400 µl 10 M NaOH auf 5,0 einstellen, filtern
PBS-Puffer	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM H ₂ PO ₄
RNaseA-Lösung	100mg/ml RNaseA in dd H ₂ O
TBE-Puffer (10x)	108,0 g Tris, 55,0 g Borsäure, 9,3 g EDTA in 1l dd H ₂ O, autoklavieren
TE-Puffer (1x)	1 ml Tris HCl (pH 8,0), 200 µl 0,5 M EDTA in 1l dd H ₂ O
Trypsin/EDTA Lösung 0,05%	Trypsin, 0,02 mM EDTA 2Na 2H ₂ O
Vollmedium Zellkultur	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Glutamax und 4,5 g/l Glukose mit 10% fötalem Kälberserum, Penicillin(1000U) und Streptomycin (100 µg/ml)

2.1.5 Nukleinsäuren

Alle verwendeten Nukleinsäuren, wie DNA-Leitern und Vektoren, siRNAs und PCR-Primer, die in der Arbeit zum Einsatz kamen, sind in den Tabellen 2.5-2. aufgelistet.

Tabelle 2.5: DNA-Leitern und Vektoren

Nukleinsäure	Hersteller
GeneRuler 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas
GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
Lambda PstI Marker	MBI Fermentas
pGL3-basic Vektor	Promega
pRL-SV40 Vektor	Promega
pCR2.1	Invitrogen
pcDNA3	Invitrogen

Tabelle 2.6: siRNAs

Name	Richtung	Sequenz 5' - 3'
<i>PRAME</i> siRNA 1		r(CUGUGUAGACUGUUGUAAA)dTdT
<i>PRAME</i> siRNA 2		r(GCUAAGUGUCCUGAGUCUA)dTdT

Tabelle 2.7: PCR-Primer für den Dual-Luciferase-Assay.

Name	Richtung	Sequenz 5' - 3'
Luc-XhoI-947F	sense	ATCTCGAGCCTTCTCATCAGCCCTCTGCTC
Luc-XhoI-452F	sense	CTCTCGAGTGTTCTGTCATTCATCTGTGC
Luc-XhoI-314F	sense	TGCTCGAGATAGCCTGTGGCAGGAGATG
Luc-XhoI-259F	sense	GGCTCGAGGAGTTTGTGGAGGCGGAGTA
Luc-XhoI-165F	sense	TGCTCGAGCTTGAACACGGGGTCCTTC
Luc-XhoI-60F	sense	TACTCGAGCTGGGAGGAAGTGGGTTTTG
Luc-HindIII+11R	antisense	CTAAGCTTAACTCGCGTCTGGGGCCAG
Luc-HindIII+40R	antisense	CTAAGCTTGGGGGAGCTGTACCCTGAAG
Luc-HindIII+246R	antisense	TCAAGCTTACTCCCCGTGTTTCCACTCT
Luc-HindIII+365R	antisense	GTAAGCTTCCGGGCTGAAGAGACCAC

Aufbau der Primernamen: Verwendung*, Restriktionsschnittstelle, Position**, Richtung***

* Luc = Dual-Luciferase Assay System

** Position der 5'-Base relativ zum 1. Transkriptionsstartpunkt

*** F = forward (sense), R = reverse (antisense)

Tabelle 2.8: Primer für die Methylierungsanalyse durch genomische Sequenzierung

Name	Richtung	Sequenz 5' - 3'	Paar
BSS-809F	sense	TTTTAGAAAAGGAGAGTTGG	U1

BSS+37R	antisense	AAAAACTATACCCTAAAACC	
BSS-267F	sense	TTAAGCTTGAAAATAGAGTTTGTGGAGG	D1
BSS+382R	antisense	TGGAATCCCTACTATCTATAACCCCC	
BSS-591F	sense	AAGTAAAGAGGGGAGGTTG	U2
BSS-64R	antisense	ATACAAAACCCACTTCCTCC	
BSS-70F	sense	TTAAGCTTTTTAGAGGTTTGGGAGG	D2
BSS+346R	antisense	AAGAATCCCCCRAAAATCAATTAACCTACTC	

Aufbau der Primernamen: Verwendung*, Position**, Richtung***

* Bisulfite Sequenzierung

** Position der 5'-Base relativ zum 1. Transkriptionsstartpunkt

*** F = forward (sense), R = reverse (antisense)

Tabelle 2.9: Primer für die Analyse der PRAME-Transkripte

Name	Richtung	Sequenz 5' - 3'
<i>PRAME E1a F</i>	sense	TTCCCAGGCGTGACCTGT
<i>PRAME E1b F</i>	sense	AAAGCGGGCGGAGTCCTC
<i>PRAME E4 R</i>	antisense	GGCTTGTCCACACACTCATGC
<i>PRAME E3+ R</i>	antisense	CCACGCACGTCTGAGAGT
<i>PRAME I2 R</i>	antisense	ACTACGGTCTTGCAGCGACA

Aufbau der Primernamen: Genname, Position*, Richtung**

* Exon/Intron

** F = forward (sense), R = reverse (antisense)

Tabelle 2.10: Primer für methylation-specific-PCR (MSP)

Name	Richtung	Sequenz 5' - 3'
MSP <i>PRAME F</i>	sense	GCTAGAGCATCGATCGATC
MSP <i>PRAME R</i>	antisense	CTTCAGGGTACAGCTCCCC

Tabelle 2.11: Primer für die RTQ-PCR

Name	Richtung	Sequenz 5' - 3'
<i>PRAME RTQ F</i>	sense	ATTTCCCCGGAGAAGGAAG
<i>PRAME RTQ R</i>	antisense	CGAAAGCCGGCAGTTAGTTA
<i>GUSB RTQ F</i>	sense	AAACGATTGCAGGGTTTCACC
<i>GUSB RTQ R</i>	antisense	GCGTTTTTGATCCAGACCCA
<i>bax RTQ F</i>	sense	TGGAGCTGCAGAGGATGATTG
<i>bax RTQ R</i>	antisense	CCAGTTGAAGTTGCCGTCAGA
<i>akt3 RTQ F</i>	sense	CACGGTACACAATCTTTCCGG
<i>akt3 RTQ R</i>	antisense	GTCGAGAGAGCGGGTGTCT
<i>mrp3 RTQ F</i>	sense	CTCCCAGGCGTACAGCTTCA
<i>mrp3 RTQ R</i>	antisense	GCGCCTTTCAGGTAAAGCA
<i>bcrp RTQ F</i>	sense	GTACGTATAGCGATCGTTGC

<i>bcrp</i> RTQ R	antisense	CTAGTCTCGATGTCGATACG
<i>ciap2</i> RTQ F	sense	TACTATTCCCGACTGACGAG
<i>ciap2</i> RTQ R	antisense	GGCTAATTCGGTATAGCACG
<i>bak</i> RTQ F	sense	TGCATCGATGCTATCGGAAC
<i>bak</i> RTQ R	antisense	CTGATCGTGACGACTCGTCC
Aufbau der Primernamen: Genname, Verwendung*, Richtung**		
* quantitative Real time PCR		
* F = forward (sense), R = reverse (antisense)		

2.1.6 Enzyme und Kits

Enzyme und Kits, die in der Arbeit zum Einsatz kamen, sind in Tabelle 2.12 aufgelistet.

Tabelle 2.12: Enzyme und Kits

Enzym, Kit	Hersteller
Eurogentech Real time-PCR-Kit	Eurogentech
DNase I	Qiagen
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
HindIII	Fermentas
NucleoBond® PC 500 (Maxi)	Macherey-Nagel
NucleoSpin-Extraction-Kit	Clontech
PowerScript™ Reverse Transcriptase	Clontech
QIAquick PCR-Purification-Kit	Qiagen
Ribonuklease A	Sigma
Plasmid-Mini-Präparationskit Nucleo-Spin	Macherey-Nagel
Restriktionspuffer Red	Fermentas
RNeasy® Mini Kit (RNA Isolation)	Qiagen
TA-Cloning Kit	Invitrogen
Taq DNA Polymerase (rekombinant)	MBI Fermentas
Titanium Taq	Clontech
XhoI	Fermentas

2.1.7 Software

Software, die in der Arbeit zum Einsatz kam, ist in Tabelle 2.13 aufgelistet.

Tabelle 2.13: Software

Software	Hersteller
ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems
Adobe Acrobat 7.0	Adobe
Adobe Photoshop 7.0	Adobe
Adobe Illustrator CS	Adobe
AnalySIS™	SIS
Excel 2003	Microsoft
Gene Genius Gel Documentation and Analysis System	Syngene
GeneQuest	Lazergene

Matinspector	Genomatix
Nucleic Acid Sequence Massager	Tonjum-Group
Primer3	Whitehead Inst. for Biomedical Res.
SigmaPlot 9.0	STATCON
Word 2003	Microsoft

2.1.9 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene humane Zelllinien kultiviert und für Experimente eingesetzt (Tabelle 2.14).

Tabelle 2.14: Verwendete humane Zelllinien

Zelllinie	Art	ATCC* Zugangsnummer
HL60	AML-M2**	CLL-240
U937	AML-M5**	CRL-1593.2
K562	CML in Blastenkrise, Ph+	CCL-243
HeLa	Zervixkarzinom	CCL-2
CaSki	Zervixkarzinom	CRL-1550

* American Type Cell Culture Collection

** FAB (French-American-British) Klassifikation der AML Zelllinien

2.1.10 Patientenproben und Kontrollen

Total RNA und DNA, gewonnen aus dem Knochenmark oder peripherem Blut an AML-erkrankter Kinder und gesunder Personen, wurde von der Kinderklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena gestellt. Für diese Arbeit wurden vier von 50 AML-Proben nach ihrer vorher bestimmten *PRAME*-Expression ausgewählt. Zusätzlich wurde die RNA und DNA aus Testis eines gesunden Spenders bei der Firma BioCat gekauft.

Tabelle 2.15: Patientenproben und Kontrollen

Probe	Beschreibung	<i>PRAME</i> -mRNA-Level der Zellen**
AML-7	AML-M1*	sehr niedrig
AML-28	AML-M5*	sehr niedrig
AML-45	AML-M5*	hoch
AML-47	AML-M2*	hoch
Blut	Mischung aus 3 Blutproben gesunder Spender	sehr niedrig
Testis	ein gesunder Spender Firma BioCat	hoch

* FAB (French-American-British) Klassifikation der AML Zelllinien

** nach Steinbach *et al.* 2001

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden bei 5% CO₂, 96% relativer Luftfeuchte und 37°C im Brutschrank in Vollmedium in Kulturschalen oder Flaschen kultiviert. Dabei wurde für die Zelllinien HL60, U937 und K562 RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) und für die Zelllinien HeLa und CaSki DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) verwendet und mit 10% FCS, 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt.

Zum Passagieren der Zellen wurden die mit adhären Zellen (HeLa und CaSki) bis zu 70% bewachsenen Kulturgefäße vom Medium befreit und anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung und einer ca. 5 minütigen Inkubation bei 37°C konnten die von der Oberfläche abgelösten Zellen in frischem Medium aufgenommen werden. Je nach Bedarf wurden Teilmengen dieser Zellsuspension in ein neues Kulturgefäß gegeben und mit dem entsprechendem Volumen an Medium versorgt. Zellen welche in Suspension wachsen (HL60, U937 und K562) wurden bis zu einer Dichte von 10⁶ Zellen pro Milliliter kultiviert, bei 220 g pelletiert, in Vollmedium gewaschen und zum Teil in neue Kulturgefäße überführt.

Für eine Langzeitlagerung der Zelllinien wurden Aliquots zu einem Milliliter in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierfür wurden adhären Zellen, welche bis zu einer Konfluenz von ca. 70% herangewachsen waren mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit PBS-Puffer gewaschen und in 15 ml Zentrifugenröhrchen bei 220 g pelletiert. Zellen welche in Suspension wachsen wurden bis zu einer Dichte von 10⁶ Zellen pro Milliliter kultiviert und bei 220 g pelletiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in vier ml Einfriermedium aufgenommen und Aliquots zu je einem Milliliter in Kryokonservierungsröhrchen abgefüllt. Diese wurden anschließend für zwei Tage in -80°C kaltem Isopropanol inkubiert und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zum auftauen wurden die in Kryokonservierungsröhrchen abgefüllten humanen Zellen aus dem flüssigem Stickstoff entnommen und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Danach erfolgte ein Anwärmen der Zellen im Wasserbad bei 37°C für weitere 2 Minuten. 1 ml der Zellsuspension wurde anschließend in 5 ml Nährmedium aufgenommen und in 15 ml Falcon-Röhrchen abgefüllt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 220 g konnte der Überstand vollständig entfernt und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen werden. Nach vorsichtigem lösen des Zellpellets wurden die entstandene Zellsuspension

auf zwei Kulturschalen verteilt und mit dem entsprechenden Volumen Medium versorgt. Nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel.

Vor Beginn der Untersuchungen wurden die verwendeten Zelllinien mittels DAPI-Färbung auf Mykoplasmeninfektion getestet. Hierfür wurden Zellen auf Deckgläschen aufgebracht und mit 1ml DAPI-Fixierlösung für 20 min fixiert. Nach dem Ersetzen der Fixierlösung durch 1ml DAPI-Färbelösung wurden die Zellen in Dunkelheit bei RT 5min inkubiert und danach mit Wasser gespült. Nach Trocknung der Deckgläschen wurden diese mit Antifade auf Objektträgern fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda=460$ nm betrachtet.

2.2.2 RNA Extraktion

Die Isolation humaner total RNA erfolgte mit dem Qiagen RNeasy Mini-Kit nach den Vorgaben des Herstellers. Es wurden 10^6 - 10^7 Zellen eingesetzt. Die Reinheit und Ausbeute der isolierten genomischen RNA wurde anschließend mittels UV-Vis-Spektrophotometrie im Nanodrop ermittelt. Zusätzlich wurde die Integrität der Proben durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.3 cDNA Synthese

Bei dieser Reaktion wird mRNA in cDNA umgeschrieben. Der Prozess wird durch eine modifizierte virale RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) katalysiert. Als Primer dienen 6bp DNA-Fragmente mit zufälliger Basenverteilung (random hexamer-primer). Zur Denaturierung der RNA wurden in einem Volumen von 10 μ l 2 μ g RNA mit 5 μ M random hexamer primer für 10min auf 70°C erhitzt. Nach Abkühlung auf Eis wurde ein RT-Mix, bestehend aus 4 μ l 5x RT-Puffer, 2 μ l dNTP Mix (10 mM), 2 μ l DTT (100mM), 1 μ l RNase Inhibitor (20 U/ μ l) und 1 μ l PowerScript Reverse Transkriptase (200 U/ μ l) zum RNA/Primer-Gemisch hinzugegeben und 1,5 h bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der RT erfolgte eine Inkubation für 5min bei 90°C. Nach einer Abkühlung der Proben auf Eis erfolgte eine Degradation der RNA durch basische Hydrolyse. Dazu wurden 15 μ l 0,1N NaOH zum 20 μ l Reaktionsmix hinzugegeben und dieser für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Reaktionsmix für 1 min auf Eis gestellt. Die Neutralisation der Lösung erfolgte anschließend durch Hinzugabe von 25 μ l HEPES. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der cDNA. Dafür wurde die cDNA unter Zugabe von 6 μ l K-Ac und 100 μ l Isopropanol für 30 min bei RT gefällt, abzentrifugiert, mit

200 µl 70% EtOH gewaschen, erneut abzentrifugiert, getrocknet und in 100 µl DEPC Wasser aufgenommen. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert. In jeder RT-Reaktion wurden Negativkontrollen (ohne RNA) und Positivkontrollen (bereits getestete RNA) mitgeführt.

2.2.4 DNA Extraktion

Die Gewinnung von genomischer DNA aus humanen Zellkulturproben erfolgte mit Hilfe des DNeasy Tissue-Kits der Firma QIAGEN. Die Vorgehensweise entsprach den Angaben des Herstellers. Es wurden je etwa 10^6 - 10^7 Zellen verwendet. Die Reinheit und Ausbeute der isolierten genomischen DNA wurde anschließend mittels UV-Vis-Spektrophotometrie im Nanodrop ermittelt. Zusätzlich wurde die Integrität der Proben durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.5 Quantifizierung von DNA und RNA

Konzentration und Reinheit von RNA und DNA wurden photometrisch mittels UV/Vis-Spektrophotometrie in einem NanodropTM ND-1000 der Firma NanoDrop Technologies bestimmt. Hierbei wird die Absorption (optische Dichte = OD) der Nukleinsäurelösung bei 230, 260 und 280 nm gemessen und anschließend die Konzentration, aus folgender Formel, berechnet.

$$c [\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ (bei RNA) bzw. } 50 \text{ (bei DNA)}.$$

Der Quotient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ spiegelt den Grad der Kontamination mit Protein wieder und sollte größer als 1,5 sein. Des Weiteren wurde der Quotient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{230\text{nm}}$ ermittelt, welcher den Grad der Kontamination mit verschiedenen Lösungsmitteln widerspiegelt.

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Beurteilung sowohl der Qualität von RNA und DNA als auch die der PCR-Produkte erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung in 2%igen Agarosegelen. Im Gegensatz dazu wurden zur Aufreinigung von PCR-Produkten vor Klonierung und bei der Elektrophorese von Plasmiden 0,8%ige Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer diente SB-Puffer. Durch Zusatz von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zum Gel wurden DNA bzw. RNA angefärbt, Die PCR-Produkte bzw. die RNA wurden mit Gelladepuffer versetzt und

zusammen mit einem Molekulargewicht-Standard aufgetragen. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte auf einem UV-Durchleuchtungstisch bei 254nm, das Ergebnis wurde mit einer CCD-Kamera dokumentiert.

2.2.7 Inkubation mit 5-Aza-dC, TSA und VPA

Die Zelllinien HeLa und CaSki wurden konzentrationsabhängig mit den Substanzen 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-dC), Trichostatin A (TSA) oder Valproinsäure (VPA) stimuliert. Eine Behandlung mit dem Cytosin Analogon 5-Aza-dC führt zu Hypomethylierung der genomischen DNA einer Zelle. TSA und VPA sind Histone-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC-I) und führen zu verstärkter Histoneacetylierung.

Die Zellen wurden 5 Tage in Vollmedium, welches mit 2 μ M 5-Aza-dC versetzt war, kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde geerntet und ein Teil für weitere 45 Tage in Vollmedium ohne 5-AZA-dC weiterkultiviert und danach geerntet. TSA kam für 6h in der Konzentrationen 5 mM zur Anwendung. Zur Kontrolle wurden immer auch unbehandelte Kulturen mitgeführt.

2.2.8 Quantitative Real time PCR

Die Quantitative Real time PCR basiert auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals, welches proportional zur Amplifikation eines PCR-Produktes entsteht [Higuchi *et al.* 1993]. Dies ermöglicht erstens die akkurate Quantifizierung eines spezifischen Nukleinsäure-Templates in einer Probe (Absolute Quantifikation) und zweitens vergleichende Messungen zwischen verschiedenen Proben (Relative Quantifikation). Die hier angewandte Variante beruht auf dem Prinzip, dass sich ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR-Green I) unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagert, dadurch seine Fluoreszenz stark erhöht und so die Akkumulation doppelsträngiger DNA in der PCR verfolgt werden kann.

Die Quantitative Real time PCR wurde im MiniOpticon Real time PCR Detection System von BioRad mit Hilfe eines qPCR Core kit von Eurogentec nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Volumen der Reaktionen betrug 25 μ l und als interne Kontrolle diente das House-Keeping-Gen *GUSB* (β -Glucuronidase). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.11 aufgeführt. Zur Amplifikation der cDNA-Sequenzen wurde folgender Ansatz (Tabelle 2.16) und folgendes Programm (Tabelle 2.17) verwendet.

Tabelle 2.16: Ansatz für quantitative Real time PCR

Komponente (Stammkonzentration)	Volumen
Reaktionspuffer (10x)	2,50 µl
dNTP/dUTP Mix (5 mM)	1,00 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,75 µl
Primer sense (10 µM)	0,5 µl
Primer antisense (10 µM)	0,5 µl
Sybr®Green Lösung	0,75 µl
HotGoldStar Taq Polymerase (5U/ µl)	0,12 µl
dd H ₂ O	7,88 µl
Template (ca. 200 pg cDNA)	10 µl
Total	25 µl

Tabelle 2.17: Programm für quantitative Real time PCR

Vorgang	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	15 sec	
Annealing	60°C	15 sec	40
Extension	72°C	30 sec	

Die Bestimmung des Expressionsverhältnisses der untersuchten Proben erfolgte nach Pfaffl, 2001.

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

ratio = Expressionsverhältnis

E = Effizienz = $10^{[-1/slope]}$

CP* = crossing point

target = *PRAME*

ref = *GUSB*

control und sample = zu vergleichende Proben

* Als CP (crossing point) wird der Punkt definiert, an dem die Fluoreszenz der Proben deutlich über die Background – Fluoreszenz ansteigt.

Da alle Werte 3fach bestimmt wurden, konnte nach der Berechnung der Ratio der Mittelwert und die Standardabweichung der Expressionsverhältnisse berechnet werden.

2.2.9 Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung

Die Methode der Bisulfit-Sequenzierung genomischer DNA wurde 1992 von Frommer und Mitarbeitern entwickelt. Sie ermöglicht es den Methylierungsstatus aller spezifischen Cytosine eines DNA Einzelstranges limitierter Länge zu bestimmen. Diese Technik beruht auf der Tatsache, dass mit Hilfe von Natriumbisulfit unmethyliertes Cytosin effizient in Uracil umwandelt werden kann, während 5-Methylcytosin vor diesen Modifikationen weitgehend geschützt ist.

Damit eine Reaktion von Natriumbisulfit mit dem Cytosin der DNA hochspezifisch für Einzelstränge ist muss diese vorher alkalisch denaturiert werden. Anschließend findet unter Inkubation mit Natriumbisulfit eine reversible Addition des Bisulfitions an das Kohlenstoffatom C-6 des Cytosinrings statt (Abbildung 2.1, Schritt 1). Es entsteht Cytosin-Sulfonat, das durch hydrolytische Desaminierung weiter in Uracil-Sulfonat umgewandelt wird (Abbildung 2.1, Schritt 2). Danach werden die modifizierten Basen (Uracil-Sulfonate) zu Uracil desulfoniert (Abbildung 2.1, Schritt 3). Dann wird die Reaktion neutralisiert. Alle unmethylierten Cytosine werden durch chemische Umwandlung in Uracile konvertiert. Bei methylierten Cytosinen erfolgt der nukleophile Angriff durch das Bisulfitanion dagegen nur sehr langsam, und die 5-mC-Basen bleiben unverändert. Nach der Bisulfit-Behandlung liegen zwei nicht mehr zueinander komplementäre Einzelstränge vor. Bei der sich anschließenden PCR-Amplifikation verhält sich Uracil wie Thymin. Die Bisulfit-induzierten Sequenzänderungen bilden dann die Basis für die Unterscheidung von methylierten und unmethylierten Cytosinen und können durch Sequenzierung und Vergleich mit der Ausgangssequenz bestimmt werden.

Die hier angewandte Methode ist eine Abwandlung der Methode von Olek und Mitarbeitern, 1996. Dabei wurden 500 ng genomische DNA mit *EcoRI* vorverdaut und anschließend in 0,3 M NaOH für 20 min in einem Volumen von 25 µl bei 55°C denaturiert. Die denaturierte DNA wurde mit 50 µl Low Melting Point-Agarose (2%) vermischt. Anschließend wurde durch pipettieren von 10 µl DNA/Agarose-Gemisch in eisgekühltes Mineralöl Kugeln geformt. Dies erfolgte pro Ansatz sieben Mal, wodurch eine DNA/Agarose-Kugel ca. 67 ng DNA enthielt. Danach wurden je 500 µl Natriumbisulfit/Hydrochinone-Lösung zu den DNA/Agarose-Kugeln unter das Mineralöl pipettiert und für 18h bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden die Kugeln in 1 x TE gewaschen und durch eine Behandlung mit 0,3 M NaOH für 15 min bei 37°C die in den

Kugeln gebundene DNA desulfoniert. Nach nochmaligem waschen der Kugeln in TE und dd H₂O wurden diese direkt als Template in die folgende Nested-PCR eingesetzt.

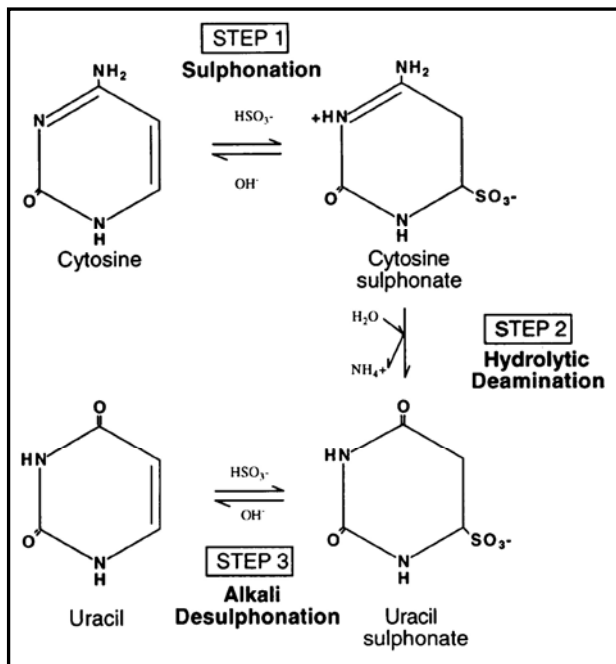


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konvertierung [Clark et al. 1994]

Schritt 1. Addition des Bisulfitions an das Kohlenstoffatom C-6 des Cytosinrings.

Schritt 2. Cytosin-Sulphonat wird durch hydrolytische Desaminierung in Uracil-Sulphonat umgewandelt.

Schritt 3. Uracil-Sulphonat wird im alkalischen Schritt zu Uracil desulfoniert.

Zwei DNA Sequenzen des kodierenden Stranges der *PRAME*-Promotorregion sollten hier untersucht werden. Eine Sequenz stromaufwärts vom ersten TSP des Gens (Position –591 bis –64) und eine Sequenz die stromabwärts vom ersten TSP des Gens reicht (Position –70 bis +346).

Tabelle 2.18: Ansätze für die Bisulfit Sequencing Nested-PCR

Komponente (Stammkonzentration)	Volumen
Hot Start Reaktionspuffer (10x)	5 µl
dNTP/dUTP Mix (10 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
Primer sense (10 µM)	1 µl
Primer antisense (10 µM)	1 µl
Hot Start Pol (JenaBioscience) (5U/ µl)	0,3 µl
dd H ₂ O	27,7 µl
Template	ca. 10 µl
1. PCR: DNA/Agarose-Kugel mit ca. 67 ng DNA	
2. PCR: 1/100 des PCR Products der 1. PCR	
Total	50 µl

Die erste PCR erfolgte dabei mit den Primerpaaren U1 (Stromaufwärts-Primerpaar 1) bzw. D1 (Stromabwärts-Primerpaar 1) und je einer DNA/Agarose-Kugel und die zweite PCR

mit den Primerpaaren U2 bzw. D2 und je 1/100 des PCR Products der ersten Reaktion. Die Ansätze und Programme der Nested-PCR sind in Tabelle 2.18 bzw. Tabelle 2.19 aufgelistet. Informationen über die verwendeten Primerpaare können Tabelle 2.8 entnommen werden.

Tabelle 2.19: Programme für die Bisulfit Sequencing Nested-PCR

PCR	Primerpaar	Denaturierung1	Annealing	Extension2	Zyklen
1	U1	94°C, 15 sec	60°C, 15 sec	68°C, 30 sec	32
1	D1	94°C, 15 sec	56°C, 15 sec	68°C, 30 sec	32
2	U2	94°C, 15 sec	62°C, 15 sec	68°C, 30 sec	36
2	D2	94°C, 15 sec	56°C, 15 sec	68°C, 30 sec	36

1Die initiale Denaturierung im 1. Zyklus der PCR erfolgte für 1min.
 2Auf den letzten Zyklus folgte eine Inkubation für 2min bei 68°C, um eine Komplettierung der noch unvollständigen Moleküle zu ermöglichen.

Die PCR-Amplifikate wurden anschließend mittels eines TA cloning Kit (Invitrogen) nach den Vorgaben des Herstellers in den Vektor pCR2.1 kloniert, in kompetente DH5 α *E. coli* Zellen transformiert, gescreent und sequenziert (Abschnitt 2.2.10).

2.2.10 Klonierung

Die Klonierung von PCR-Produkten fand bei der Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung (Abschnitt 2.2.9), der Herstellung der Konstrukte für den Dual-Luciferase-Assay (Abschnitt 2.2.11) und der Überexpression von *PRAME* in CaSki-Zellen (Abschnitt 2.2.12) Verwendung.

Bei dieser Methode werden DNA Fragmente in Plasmidvektoren eingebracht, diese in kompetente prokaryontische Wirtszellen transformiert, in denen sie vermehrt werden, um anschließend wieder aus diesen isoliert, analysiert und für verschiedene Anwendungen verwendet zu werden. Folgende Schritte wurden für die Klonierung durchgeführt.

2.2.10.1 Amplifizierung der zu klonierenden DNA Fragmente mittels PCR

Die Amplifikation der zu klonierenden DNA Fragmente mittels PCR erfolgte Anwendungsspezifisch (Abschnitte 2.2.9, 2.2.11 & 2.2.12).

2.2.10.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde das QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet. Das zugrunde liegende Verfahren nutzt die Tatsache aus, dass DNA bei hohen Salzkonzentrationen an Silicate bindet, sich bei niedrigen Salzkonzentrationen aber wieder eluieren lässt. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte wie vom Hersteller beschrieben. Die Reinheit und Ausbeute wurde anschließend via UV-Vis-Spektrophotometrie im Nanodrop ermittelt (Abschnitt 2.2.5).

2.2.10.3 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau der Vektoren und DNA-Fragmente erfolgte in 20 µl Ansätzen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen unter den enzyspezifischen Reaktionsbedingungen (Abschnitt 2.2.11 und 2.2.12.) Die anschließende Aufreinigung der DNA erfolgte wie in Abschnitt 2.2.10.2 beschrieben. Die Messung der Konzentration und Reinheit der DNA-Lösungen erfolgte mittels UV-Vis-Spektrophotometrie im Nanodrop (Abschnitt 2.2.5).

2.2.10.4 Ligation

Die Ligation der restriktionsverdauten PCR-Fragmente mit den ebenfalls restriktionsverdauten Vektoren erfolgte ÜN bei 15°C mit T4 DNA-Ligase in Ligationspuffer.

2.2.10.5 Transformation und Selektion

Die Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien des Stammes DH5α erfolgte nach Hanahan, 1983, mit 2 µl des Ligationsansatzes. Eine Selektion der Transformanden erfolgte über die Zugabe von Ampicillin (50µg/ml). Da für Methode 2.2.9 der Vektor pCR2.1, welcher eine Blau-Weiß- Selektion zulässt, eingesetzt wurde, wurden hier die LB-Platten zusätzlich mit x-Gal (40µg/ml) versetzt.

2.2.10.6 Plasmid Präparation

Für die Isolation hochreiner Plasmid-DNA wurde das NucleoSpin-Kit der Firma Macherey-Nagel eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieses Kits entspricht der Methode der alkalischen Lyse kombiniert mit einer

finalen Aufreinigung über eine Silikat-Membran. Als Ausgangsmaterial diente eine 2ml Übernachtkultur plasmidtragender *E. coli* DH5a Zellen.

2.2.10.7 Screening nach positiven Klonen

Zur Unterscheidung von fragmenttragenden, positiven Klonen und rezyklierten oder ungeschnittenen, negativen Klonen wurde zum einen die Methode der Colony-PCR, vor der Isolierung der Plasmid-DNA und zum anderen eine Restriktionsanalyse nach der Isolierung der Plasmid-DNA, durchgeführt.

2.2.10.7.1 Colony-PCR

Die Colony-PCR ist eine schnelle und kostengünstige Variante des Screenings nach positiven Transformanten. Hierbei wird anstelle der Template-DNA Zellen einer Bakterienkolonie direkt in das Reaktionsgefäß mit dem PCR-Mix gegeben und anschließend die Reaktion gestartet. Im ersten Schritt der Reaktion (Denaturierung: 95°C für 10 min) werden dabei die Zellen lysiert und die austretende Plasmid-DNA kann als Template für die Polymerase-Kettenreaktion erkannt werden. Als Primer wurden die für die Amplifizierung der zu klonierenden DNA Fragmente eingesetzten Oligonukleotide verwendet (Abschnitt 2.2.10.1). Nach Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese konnten positive Klone, welche eine Primerpaar-spezifische Bande aufwiesen in LB-Medium angezogen und Plasmid-DNA beschrieben isoliert werden (Abschnitt 2.2.10.6).

2.2.10.7.2 Restriktionsanalyse

Zur Kontrolle der ordnungsgemäßen Insertion des PCR-Produktes in den Vektor wurde jeweils ein Aliquot des isolierten Plasmidextrakts einer Restriktionsanalyse unterworfen. Der Restriktionverdau erfolgte standardmäßig in einem Volumen von 20 µl mit ca. 500 ng Plasmidextrakt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen unter den für die Funktion der Restriktionsenzyme nötigen Pufferbedingungen für 90 min bei 37°C. 10 µl des Ansatzes wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.2.6) analysiert.

2.2.10.8 Sequenzierung

Die hier angewendete Sequenzierungsmethode, das sogenannte Cycle-Sequencing, basiert auf der 1977 von Sanger und Mitarbeitern entwickelten Didesoxy-Kettenabbruch-Methode; die auch als „enzymatische Sequenzierung“ bezeichnet wird.

Die Sequenzierung von DNA erfolgte hier mittels Thermo-Sequenase-fluorescent-labelled-primer-cycle-sequencing-kit mit 7-deaza-dGTP der Firma Amersham Pharmacia Biotech auf einem LI-COR 4300 DNA Analyzer. Die Vorgehensweise entsprach dabei den Herstellerangaben.

2.2.11 Dual-Luciferase Reporter Assay (DLR)

Ein DLR ist ein *in vivo* Reportersystem, welches Genexpressionsstudien in eukaryotischen Zellen erlaubt. Der Name „Dual Reporter“ resultiert aus der Besonderheit, dass bei diesem System zwei individuelle Reporter in einer Zelle gleichzeitig exprimiert und gemessen werden können. Dabei unterscheidet man zwischen einem „experimentellen“ Reporter, welcher auf Grund der zu untersuchenden Versuchsbedingungen unterschiedlich exprimiert wird und einem „Kontroll-Reporter“, dessen Expression unabhängig von äußeren Einflüssen ist. Die Normalisierung des experimentellen Reporters zum Kontroll-Reporter minimalisiert dabei experimentelle Unterschiede, welche beispielsweise durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen, Zellzahlen, Pipettiervolumen oder Zell-Lysis-Effekten auftreten können.

Das hier verwendete DLR System (DLR™) der Firma PROMEGA besitzt als experimentellen Reporter das Enzym Firefly-Luciferase. Firefly-Luciferase ist ein monomeres, 61 kDa schweres Protein aus dem amerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Da das Protein für seine enzymatische Aktivität keiner posttranslationalen Modifikationen bedarf [WOOD *et al.* 1984; DE WET *et al.* 1985], steht es nach der Translation sofort als genetischer Reporter zur Verfügung. Als Substrat für die Firefly-Luciferase dient Beetle-Luciferin, welches mit ATP und O₂ unter Lichtemission zu Oxyluciferin oxidiert wird. Das Gen der Firefly-Luciferase *luc+* liegt in diesem System auf dem Vektor pGL3-basic und folgt einer multiple cloning site (MCS) in welche das zu untersuchende Promotorfragment kloniert wird. Als Kontroll-Reporter wird in diesem System das Enzym Renilla-Luciferase verwendet. Renilla-Luciferase ist ein monomeres, 36 kDa schweres Protein aus der Weichkoralle *Renilla reniformis*. Auch dieses Protein bedarf keiner posttranslationalen Modifikationen und steht somit nach der Translation auch

sofort als genetischer Reporter zur Verfügung. Für die lichterzeugende Reaktion bedarf es als Ausgangsprodukt Coelenterazin und O₂, welche zu Coelenteramid, CO₂ und Licht umgesetzt werden. Das Renilla-Luciferasegen *Rluc* befindet sich auf dem Vektor pRL-SV40 hinter einem SV-40-Early-Enhancer-Promotor und einem T7-Promotor, welche für eine starke Transkription des Referenzgens sorgen. Für die Termination der *Rluc*-Transkription sorgt ein SV40-late-poly(A)-Element, welches hinter dem Gen positioniert ist.

Der DLR wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Klonierung (Abschnitt 2.2.10) der *PRAME* Promotorkonstrukte erfolgte über die in der MCS des Vektors pGL3-basic enthaltenen Restriktionsstellen für *XhoI* und *HindIII*. Die für die Amplifizierung der zu klonierenden DNA Fragmente verwendeten Primer sind in Tabelle 2.7 aufgelistet. Welche Promotorfragmente analysiert wurden kann Abbildung 3.9 entnommen werden. Als Template für die PCR wurde genomische DNA aus HeLa-Zellen verwendet. Die Transfektion der klonierten Promoterstrukture und des Kontrollvektors (pRL-SV40) erfolgte wie in Abschnitt 2.2.12 beschrieben. Es wurden sowohl *PRAME*-exprimierende HeLa-Zellen als auch *PRAME* nicht exprimierende CaSki-Zellen transfiziert. 24h nach der Transfektion erfolgte die Ernte der Zellen mittels des Passive-Lysis-Buffer (PLB) und anschließenden abschaben der Zellen. Zellen in PLB konnten direkt weiterverwendet oder bei -20. eingefroren werden. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte nach Herstellerangaben im Luminometer Luminoskan TL Plus der Firma Labsystems. Als Leerwert wurden Zellen mit dem unveränderten pGL3-basic Leervektor. Die Messung der Promotoraktivität erfolgte für jedes Konstrukt im Triplet. Für die Berechnung der Promotoraktivität wurde zuerst das Verhältnis von Reporterogenaktivität (Firefly-Lumineszenz) zur Referenzaktivität (Renilla-Lumineszenz) berechnet. Damit erhält man für jedes Konstrukt eine relative Lumineszenzaktivität, die als normalisiertes Maß für den in der Zelle exprimierten Reporter steht. Danach erfolgte die Berechnung des Verhältnisses aus der relativen Lumineszenzaktivität für jedes Promotorkonstrukt gegenüber dem pGL3-basic Leervektor. Dieser Wert beschreibt die relative Aktivierung des getesteten Promotorkonstruktes gegenüber des vom pGL3-basic-Leervektor ausgehenden Hintergrundsignals. Da jedes Konstrukt dreifach unabhängig voneinander gemessen wurde und angenommen wird, dass die Messwerte normal verteilt sind, konnte für die Abschätzung, ob zwischen verschiedenen Promotorkonstrukt ein signifikanter

Unterschied besteht ein zweiseitiger T-Test für Stichproben mit unterschiedlicher Varianz durchgeführt werden.

Die Methylierung ausgewählter Konstrukte erfolgte durch *SssI* (CpG) Methylase der Firma NEB in 1x NEBuffer 2 und 160 μ M S-Adenosylmethionin für eine Stunde bei 37°C. Die Reaktion wurde durch den Verdau der Fragmente mit *HpaII* und *MspI* überprüft.

2.2.12 Überexpression von *PRAME* in CaSki-Zellen

Um das humane *PRAME* in CaSki-Zellen, welche selbst nur ein sehr geringes *PRAME*-mRNA-Level besitzen, überzuexprimieren, wurde das Gen zunächst in den Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) kloniert. Das resultierende Vektorkonstrukt (*pPRAME*) wurde anschließend in die Zellen transfiziert in welchen dann das Gen exprimiert wird. Die Expression des *PRAME*-Gens und sechs anderer Gene erfolgte anschließend mittels Real time PCR.

2.2.12.1 Klonierung des Offenen Leserahmens des *PRAME*-Gens

Der Offene Leserahmen des Gens, welcher eine Länge von 1527 bp besitzt, wurde mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *NotI* in den Expressionsvektor pcDNA3 der Firma Invitrogen kloniert (Abschnitt 2.2.10). Anschließend erfolgte die Transfektion der CaSki-Zellen mit dem Vektorkonstrukt.

2.2.12.2 Transiente Transfektion humaner Zellen durch Lipofektion

Die hier verwendete Methode der Transfektion durch Lipofektion beruht auf der Tatsache dass negativ geladene DNA-Moleküle durch elektrostatische Wechselwirkungen an kationische Lipide binden. Die gebildeten DNA-Liposomen-Komplexe können mit der Zellmembran der Zellen fusionieren und so die gebundene DNA in die Zelle gelangen.

Die Transfektion der Vektorkonstrukte erfolgte hier mittels der TransFectinTM Lipid Reagenz der Firma Bio-Rad nach den Angaben des Herstellers in zu 80-90% bewachsenen Kulturschalen. Es wurden stets Kontrollen mitgeführt in welchen die Zellen mit Leervektor bzw. nicht transfiziert wurden. Die Zellen wurden 24h nach Transfektion geerntet. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden Zellen mit dem Plasmid pEGFP der Firma Clontech von welchem in eukaryotischen Zellen das Protein Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) exprimiert wird, transfiziert. Anschließend erfolgte die

Bestimmung des Verhältnisses der Transfizierten Zellen zur Gesamtzahl der Zellen via Fluoreszenzmikroskopie.

2.2.12.3 Messung des mRNA Levels von *PRAME* und anderer relevanter Gene

Die Messung des mRNA Levels von *PRAME* und anderer relevanter Gene erfolgte wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben. Primerinformationen können Tabelle 2.11 entnommen werden.

2.2.13 Verringerung des *PRAME*-Levels in HeLa-Zellen durch short interfering RNAs (siRNA)

Die Methode der Stilllegung von Genen durch siRNA beruht darauf, dass nach dem einbringen kleiner spezifischer doppelsträngiger RNAs in Zellen, diese an spezifische mRNAs binden wodurch die mRNA der Degradation durch doppelstrangspezifische Nukleasen zugeführt werden (Abschnitt 3.9).

Die hier verwendeten *PRAME*-spezifischen siRNAs wurden durch die Firma Qiagen designed und synthetisiert. Es wurden zwei alternative siRNAs und eine Kontroll-RNA, welche zusätzlich mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa 532 konjugiert wurde, verwendet (Tabelle 2.6). Die HeLa-Zellen wurden mittels des HiPerFect Transfection Reagent der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers transfiziert. Die Analyse des Stilllegungseffekts und die Expression weiterer Gene erfolgte wie in Abschnitt 2.8 beschrieben.

2.2.14 *In silico* Analysen des *PRAME*-Gens

Mit Hilfe der Analyse bekannter DNA und RNA Sequenzen *in silico* kann ein allgemeiner Überblick über das zu untersuchende Gen und dessen Transkripte erlangt werden.

Die Darstellung der chromosomalen Lokalisation und der Nachbargene des *PRAME*-Gens erfolgte mit Hilfe des Ensemble Genome Browser (EMBL-EBI & Sanger Institute).

Zur genauen Bestimmung CpG-reicher Regionen und zur Vorhersage von CpG-Inseln wurde das Programm CpGPlot (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>) aus der Programmsammlung EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite) nach den Herstellerangaben verwendet. Die Analyse der CpG-Inseln erfolgte nach den von Gardiner-Garden und Frommer, 1987, vorgeschlagenen Kriterien.

Die Analyse der bekannten Transkriptvarianten, welche durch differentielles Splicing der prä-mRNA entstehen, erfolgte über die NCBI-Datenbank.

2.2.15 Relative Quantifizierung der PRAME-Transkriptvarianten

Die Quantifizierung der PRAME-Transkriptvarianten erfolgte mittels quantitativer Real time PCR (2.2.8). Mit Hilfe spezifischer Primerpaare (Tabelle 2.9) wurden diese relativ zueinander quantifiziert.

2.2.16 Methylierungsanalyse mittels methylation-specific-PCR (MSP)

Bei dieser Methode von Singer-Sam und Mitarbeitern, 1990, wird genomische DNA mit Hilfe eines methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym verdaut und anschließend eine PCR über die zu untersuchenden CpG-Dinukleotide hinweg durchgeführt.

Hier kamen dafür die Isoschizomere *MspI* und *HpaII* zum Einsatz. Beide Enzyme besitzen die gleiche Zielsequenz (C[▼]CGG), jedoch ist *HpaII* im Gegensatz zu *MspI* sensitiv gegenüber einer Methylierung des zweiten Cytosin. Der Verdau von 200 ng genomischer DNA erfolgte unter den jeweiligen Pufferbedingungen nach Herstellerangaben für 60 min bei 37°C. Anschließend erfolgte die Amplifikation eines zu analysierenden DNA Fragments mittels PCR (Abschnitt 2.2.10.1). Primerinformationen können Tabelle 2.10 entnommen werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 *PRAME*-Expression in Zelllinien, Patienten- und Kontrollproben

In gesunden Menschen ist *PRAME*-mRNA in messbaren Leveln nur in Gewebe aus Testis, Uterus, Endometrium und Nebenniere zu finden (Tabelle 1.1) [IKEDA *et al.* 1997]. Es konnte jedoch in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass in vielen humanen Tumoren und besonders in akuten myeloischen Leukämien das *PRAME*-Gen exprimiert wird [IKEDA *et al.* 1997; VAN BAREN *et al.* 1998; PAYDAS *et al.* 2005; GREINER *et al.* 2004; STEINBACH *et al.* 2001]. Steinbach und Mitarbeiter, 2001, untersuchten dazu Proben aus Knochenmark und peripherem Blut von 50 an AML neu erkrankten Kindern. Für diese Arbeit wurden aus diesen 50 Proben vier Proben, zwei in denen ein hohes *PRAME*-mRNA-Level nachgewiesen werden konnte (AML-45 und AML-47) und zwei Proben in denen *PRAME* nur sehr schwach exprimiert wurde (AML-7 und AML-28), ausgewählt (Tabelle 2.15).

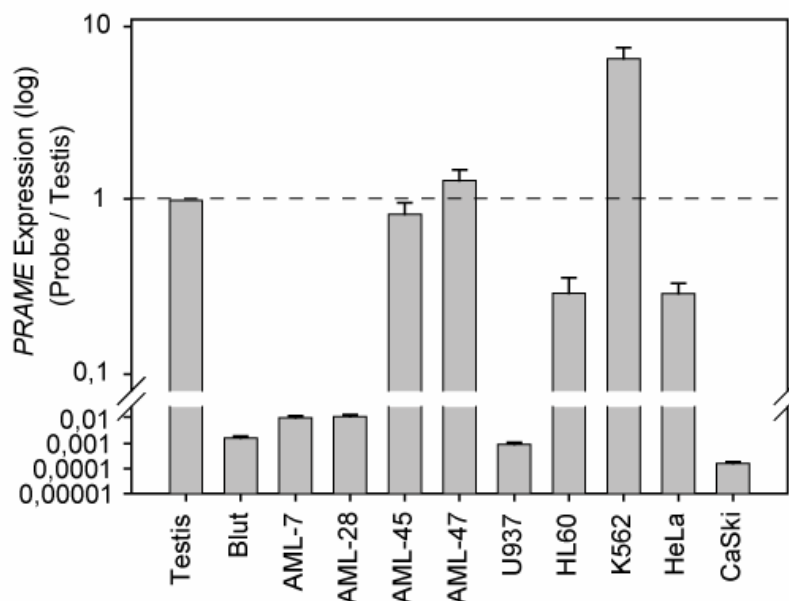


Abbildung 3.1: *PRAME*-mRNA-Level in humanen Zelllinien, AML-Patienten-, und Kontrollproben. Das *PRAME*-mRNA-Level verschiedener Proben wurde mittels quantitativer Real time PCR ermittelt und relativ zu dem in gesundem Testis dargestellt.

Da das *PRAME*-Expressionslevel der Proben in der vorangegangenen Arbeit von Steinbach und Mitarbeitern, 2001, nur densitometrisch und damit recht ungenau bestimmt wurde, wurde es in dieser Arbeit noch einmal mittels quantitativer Real time PCR bestimmt. Zusätzlich wurde die *PRAME*-Expression in Blutzellen dreier gesunder Kontrollpersonen,

Testis einer gesunden Kontrollperson, drei leukämischen Zelllinien (HL60, U937 und K562) und zwei Zervixkarzinom-Zelllinien (HeLa und CaSki) ermittelt (Tabelle 2.15). Als Vergleichswert der Expression wurde hier das *PRAME*-mRNA-Level in Testis verwendet. Das Ergebniss der Messung der relativen *PRAME*-mRNA-Level mittels quantitativer Real time PCR ist in Abbildung 3.1 gezeigt. Übereinstimmend mit Steinbach und Mitarbeitern, 2001, zeigt es, dass die AML-Patientenproben AML-7 und AML-28 ein sehr niedriges, mit dem in Blut der Kontrollpersonen vergleichbares *PRAME*-mRNA-Level besitzen, wohingegen das Level in den Patientenproben AML-45 und AML-47 um ca. 100fach höher, mit dem in Testis vergleichbar, ist. Die Zelllinien U937 und CaSki exprimieren, im Gegensatz zu den Zelllinien HL60 und HeLa, nur sehr wenig *PRAME*. Das mit Abstand höchste *PRAME*-mRNA-Level konnte in der CML-Zelllinie K562 gemessen werden. Insgesamt besteht ein sehr großer Unterschied im *PRAME*-mRNA-Level der verschiedenen Proben. Um die spätere Bezeichnung der Expression der Proben zu erleichtern werden in dieser Arbeit alle Proben deren *PRAME*-mRNA-Level weniger als 2% des in Testis gemessenen Levels beträgt als *PRAME*-negativ und alle Proben in denen das *PRAME*-mRNA-Level über 2% des in Testis gemessenen Levels liegt als *PRAME*-positiv bezeichnet.

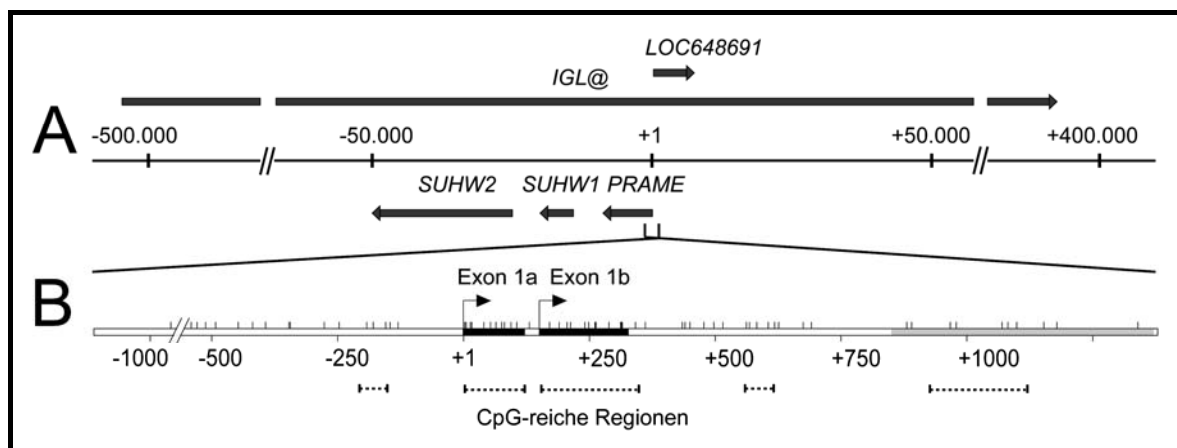


Abbildung 3.2: Das *PRAME*-Gen. (A) Schematische Darstellung des *PRAME*-Gens und seiner Nachbargene im Ig-Lambda Locus. (B) Vergrößerte Darstellung mit CpG-reichen Regionen, welche CpG-Inseln darstellen könnten (gestrichelte Linien) und Tandem-Repeat (hellgrau hinterlegt).

3.2 Analyse des *PRAME*-Gens und seiner Transkripte

Um mögliche Regulationsmechanismen zu identifizieren, wurde das *PRAME*-Gen, dessen Promotorregion und seine Transkripte zunächst mittels verschiedener *in silico* Analysen untersucht. Diese umfassten die Darstellung der genauen chromosomalen Lokalisation von *PRAME* und dessen Nachbargene, die Suche nach möglichen CpG-Inseln auf der DNA und die Darstellung der Transkriptvarianten, welche durch differentielles Splicing der prä-mRNA entstehen. Die verschiedenen Transkriptvarianten wurden zudem *in vitro* mittels quantitativer Real time PCR relativ zueinander quantifiziert.

3.2.1 Das *PRAME*-Gen

Das *PRAME*-Gen umfasst etwa 11000bp befindet sich auf dem q-Arm von Chromosom 22 in der Bande q11.22. Diese Bande ist Träger des Immunoglobulin-Lambda-Locus (IGL@), welcher für die leichten Ketten der Immunglobuline kodiert. *PRAME* und zwei stromabwärts folgende Gene, *SUHW1* und *SUHW2*, liegen revers-komplementär orientiert, auf dem Minusstrand der DNA, in einem Intron im zweiten Drittel des IGL@ (Abbildung 3.2). Nur etwa 50bp stromaufwärts von *PRAME* befindet sich ein bislang uncharakterisiertes Gen, LOC648691, welches auf dem Plusstrang der DNA kodiert ist und demzufolge in entgegengesetzter Richtung transkribiert wird. Die Expression dieses Gens korreliert nicht signifikant mit der von *PRAME* (Daten nicht gezeigt). Weiterhin sind im Bereich 22q11 verschiedene instabile chromosomale Elemente, wie z. B. die Breakpoint-Cluster-Region (BCR) und das am Philadelphia-Syndrom beteiligte Translokationsgen BCR, sowie ein 3 Mb großer Deletionsbereich (Loss of heterozygosity) vorhanden. Im ersten Intron des *PRAME*-Gens befindet sich in HeLa-Zellen ein Cytosin-reiches Tandem-Repeat mit ca. 35 Wiederholungen der Konsensussequenz [TGTCTCCCTTCCCCATGCCACCCCTCCCCACCC]. Der Startpunkt dieses Repeats liegt bei Position +856 und reicht bis Position +1401, relativ zum ersten TSP. Da ein solches Repeat in unmittelbarer Umgebung des Transkriptionsstartes auch ein putatives Enhancer- oder Silencerelement darstellen kann, wurde die Sequenz nach möglichen bindenden Transkriptionsfaktoren abgesucht. Als mögliche Faktoren sind z. B. das Myeloid-Zink-Finger-Protein, welches mit einer Core-Similarität von 100% 16 Mal im Repeat eine Konsensussequenz aufweist oder der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor ZBP-89, welcher 31 Mal eine Bindestelle finden könnte.

3.2.2 *PRAME*-Promotorregion – Transkriptvarianten, Promotorelemente und Transkriptionsfaktoren

In Datenbanken sind zurzeit 454 *PRAME* expressed sequence tags (EST) zu finden. Seit kurzem sind diese fünf Transkriptvarianten (TV 1-5, GenBank Zugangsnummern: NM_206956, NM_206955, NM_206954, NM_006115 und NM_206953) zugeordnet (Abbildung 3.4). Diese

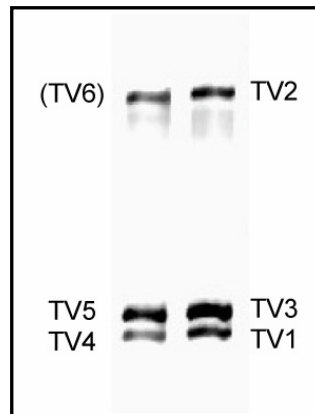


Abbildung 3.3: *PRAME*-Transkripte in K562. Nach 40 Zyklen PCR können alle Transkripte detektiert werden. Links: Transkripte startend vom 2. Startpunkt. Rechts: Transkripte startend vom 1. Startpunkt

Transkriptvarianten (TV) besitzen zwei verschiedene Transkriptionsstartpunkte (TSP). Die Transkription der Varianten TV 1, 2 und 3 starten 150bp weiter stromaufwärts als die der Varianten TV 4 und TV 5. Alle TVs besitzen den gleichen offenen Leserahmen und kodieren somit für das gleiche, ca. 58 kDa schwere, Protein. Es konnte gezeigt werden, dass es noch eine weitere TV des *PRAME*-Gens gibt (Abbildung 3.3). Diese stellt, startend vom zweiten Startpunkt aus, höchstwahrscheinlich das Äquivalent zur Variante TV 2, in welcher Exon 2 und Exon 3 zusammen mit dem dazwischenliegenden Intron ein großes Exon bilden, dar.

Mittels quantitativer Real time PCR wurden die relativen Mengen der verschiedenen *PRAME* Transkripte in verschiedenen Zelltypen ermittelt. Dafür wurden die Patientenprobe AML-45, die Zelllinien K562 und HL60 und eine Probe aus gesundem humanem Testis vermessen. Es zeigte sich, dass in allen analysierten Proben vorwiegend TV3 gebildet wird (Abbildung 3.4). TV 1 und TV 5 bilden den Großteil der restlichen *PRAME*-mRNA in der Zelle. TV 2 und TV 4 sind unterrepräsentiert und kaum messbar. Allgemein lässt sich feststellen, dass vorwiegend Transkripte welche vom ersten TSP aus gebildet werden in der Zelle vorhanden sind. Für die Anlagerung der RNA-Polymerase II im Core-Promotorbereich eines eukaryotischen Gens werden weitere Proteine benötigt, die an spezifische DNA-Sequenzen binden [Zawel & Reinberg 1995]. Aus diesem Grund wurden beide potentiellen TSPs nach Core-Promotorelementen, wie TATA-Boxen, BRE-Elementen, CAAT-Boxen, CT-Elementen und DPE-Elementen, abgesucht. Diese Faktoren besitzen alle eine spezielle Konsensussequenz und einen relativ festen Abstand zum TSP. Eine TATA-Box oder ein BRE-Element konnte für keinen der beiden TSPs gefunden

werden. TSP eins zeigte jedoch eine starke Homologie zum INR-Element, welches immer direkt mit dem TSP überlappen muss. TSP zwei besaß ebenfalls Homologie zum INR-Element, diese war aber nicht so stark ausgeprägt. Beide TSPs wiesen zudem an Position +27 große Homologie zum DPE-Element auf. Nur TSP eins besaß zusätzlich ein CT-Signal als Core-Promotorelement.

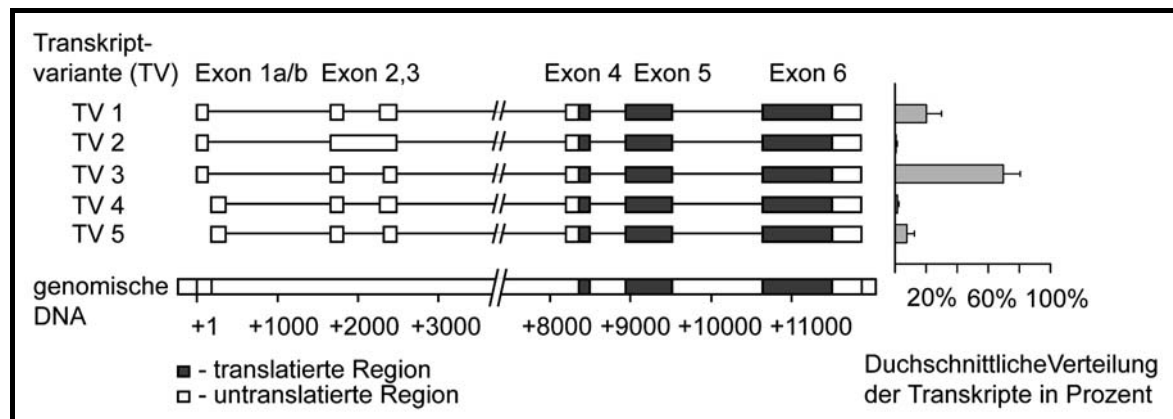


Abbildung 3.4: PRAME-Transkripte und deren Verteilung in der Zelle. Die Transkriptvarianten (TV) 4 und 5 besitzen im Gegensatz zu TV 1, TV2 und TV 3 einen 150bp stromabwärts gelegenen Transkriptionsstart. Alle Transkripte kodieren das gleiche Protein. TV 3 wird vorwiegend gebildet.

Um sich einen Überblick zu verschaffen, welche Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion binden könnten wurde ein Sequenzabgleich mit Hilfe des Programms MATINSPECTOR von Genomatix im Bereich von Position -550 bis +350 durchgeführt. In Tabelle A.1 ist eine Auswahl an Faktoren aufgeführt, die eine Core-Similarität von 100% und eine Matrix-Similarität von >95% aufwiesen.

3.2.3 Identifizierung CpG-reicher Regionen zur Vorhersage von CpG-Inseln

Die Bestimmung CpG-reicher Regionen zur Vorhersage von CpG-Inseln wurde mittels eines CpG-Plot durchgeführt. Die Analyse der CpG-Inseln erfolgte nach den von Gardiner-Garden und Frommer, 1987, vorgeschlagenen Kriterien.

Die Analyse zeigte vier CpG-reiche Regionen in der Nähe der Transkriptionsstartpunkte von Position -210 bis -148, +1 bis +123, +154 bis +354 und +559 bis +617, welche mögliche CpG-Inseln darstellen (Abbildung 3.2). Weitere CpG-reiche Regionen erstrecken sich von Position +906 bis +1109, +1595 bis +1784, +1892 bis +2003, +2051 bis +2111 und +2379 bis +2453. Die Sequenzen weisen alle einen GC-Anteil von über 50% auf und besitzen ein CpG-Vorkommen mit einem Verhältnis

$CpG_{\text{beobachtet}}/CpG_{\text{erwartet}}$ von $>0,60$. Die erforderliche Länge von 200bp, welche eine CpG-Insel nach Definition von Gardiner-Garden und Frommer, 1987, haben sollte, erreichen allerdings nur die CpG-reichen Regionen von +154 bis +354 und +906 bis +1109, wobei letztere Region im oben beschriebenen Cytosin-reichen Tandem-Repeat liegt.

3.3 Erhöhung der *PRAME*-Expression nach Inhibition der DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung

Aufgrund der aberranten Expression des *PRAME*-Gens und des Vorhandenseins von vier CpG-reichen Regionen im Promotorbereich des Gens schien eine epigenetische Regulation möglich. Um dies näher zu untersuchen wurde zunächst der Einfluss DNA- und Histon-modifizierender Substanzen getestet. Einige Substanzen, wie z. B. 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-dC), verhindern die Methylierung von DNA und können daher eingesetzt werden um Hypomethylierung genomischer DNA in Tochterzellen und dadurch eine veränderte Genexpression hervorzurufen (Abschnitt 1.3.2). Trichostatin A (TSA) und Valproinsäure (VPA) sind Histon-Deacetylaseinhibitoren (HDAC-I). Sie induzieren Histon-Hyperacetylierung und nehmen somit Einfluss auf Chromatinstruktur und Genexpression (Abschnitt 1.3.1).

3.3.1 5-Aza-dC erhöht die *PRAME*-Expression in HeLa- und CaSki-Zellen

Die Behandlung mit 5-Aza-dC führte in beiden behandelten Zelllinien, HeLa und CaSki, zu einer erhöhten *PRAME*-Expression (Abbildung 3.5). In *PRAME*-negativen CaSki-Zellen war der Anstieg der Expression mit einem Faktor von 37,03 wesentlich höher als in *PRAME*-positiven HeLa-Zellen mit 3,85. Das relative *PRAME*-mRNA-Level war damit jedoch in CaSki-Zellen nach der Behandlung immer noch ca. 66fach niedriger als in unbehandelten HeLa-Zellen. Nach einer Kultivierung der Zellen für weitere 45 Tage ohne Zugabe von 5-Aza-dC wurden die Zellen erneut auf ihre *PRAME*-Expression hin getestet. Es konnte ein Rückgang des relativen *PRAME*-mRNA-Levels detektiert werden. Dieser betrug in HeLa-Zellen 28% und in CaSki-Zellen 40%.

3.3.2 Trichostatin A (TSA) erhöht die *PRAME*-Expression in CaSki-Zellen

Im Gegensatz zur Behandlung mit VPA konnte mit TSA eine Erhöhung der *PRAME*-Expression in CaSki-Zellen erzielt werden (Abbildung 3.5). Diese fiel mit einer Steigerung um das 43fache etwa genauso groß aus wie die mit 5-Aza-dC erreichte Erhöhung der

PRAME-Expression. In den *PRAME*-positiven HeLa-Zellen konnte die *PRAME*-Expression weder mit TSA noch mit VPA gesteigert werden.

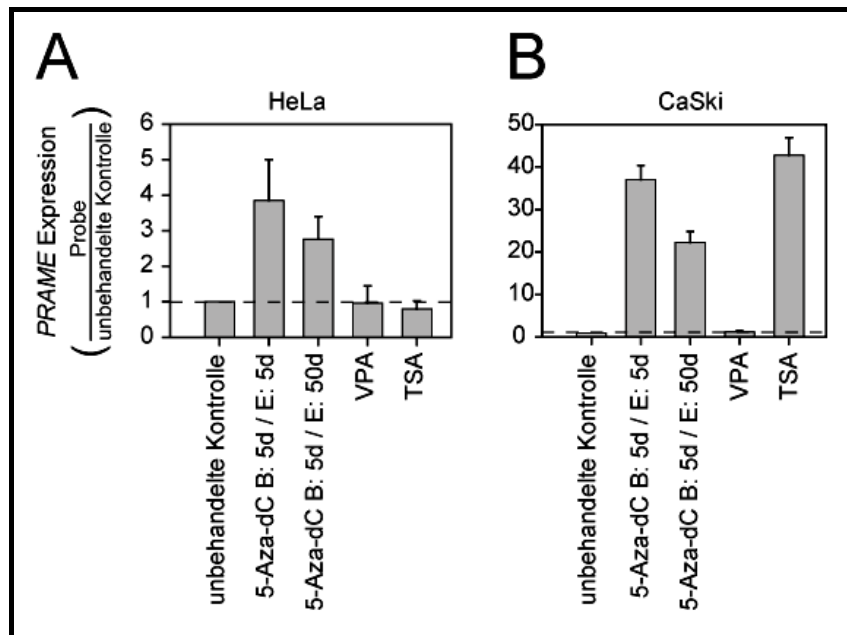


Abbildung 3.5: *PRAME*-Expression in HeLa- und CaSki-Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-dC), Valproinsäure (VPA) oder Trichostatin A (TSA). Das *PRAME*-mRNA-Level verschiedener Proben wurde mittels quantitativer Real time PCR ermittelt und relativ zu dem in unbehandelten Kontrollen dargestellt. B = Behandlung mit 5-aza-dC für X Tage (d); E = Ernte der Zellen nach X Tagen (d). (A) *PRAME*-Expression in HeLa. (B) *PRAME*-Expression in CaSki.

3.4 DNA-Methylierungsanalyse mittels methylation-specific-PCR

Zur weiteren Untersuchung von Methylierung als möglichem Regulator der *PRAME*-Expression wurde eine Methylierungsanalyse des CpG an Position +13, relativ zum ersten TSP, mittels methylation-specific-PCR (MSP) durchgeführt. Das CpG +13 wurde für diese Analyse ausgewählt, weil es direkt hinter dem ersten TSP innerhalb einer möglichen Bindestelle für den methylierungsabhängig bindenden Transkriptionsfaktor Elk-1 liegt und durch die umliegenden Basen für eine Analyse mittels MSP geeignet war. Genomische DNA der Zelllinien CaSki, HeLa, U-973, K562 und HL60 als auch DNA aus Testis und peripherem Blut gesunder Spender wurde isoliert, mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym *HpaII* verdaut und anschließend als Template für eine PCR, über CpG + 13 hinweg, eingesetzt. Da DNA, die an dieser Schnittstelle methyliert vorliegt durch *HpaII* nicht verdaut wird, kann eine anschließende PCR-Amplifikation des Fragments, welches CpG +13 enthält durchgeführt werden. Zur Kontrolle wurde die DNA mit dem

methylierungsinsensitiven Restriktionsenzym *MspI*, welches ein Isoschizomer von *HpaII* ist, verdaut bzw. unverdaut als Template für die PCR eingesetzt.

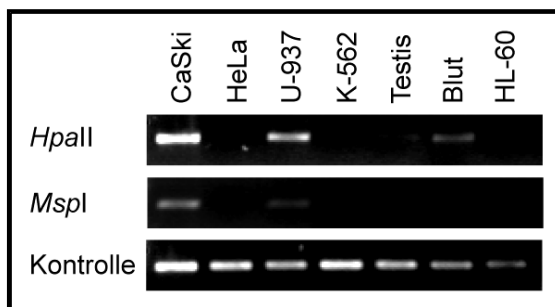


Abbildung 3.6: Methylation-specific-PCR (MSP) von CpG +13 des *PRAME*-Promotors. DNA aus HeLa, K562, HL-60 und humanem Testis trägt im Gegensatz zu DNA aus CaSki, U937 und humanem Blut 5-Methylcytosin im CpG an Position +13.

Es konnte gezeigt werden, dass alle *PRAME*-exprimierenden Zelllinien wie HeLa, K562 und HL60, sowie DNA aus gesundem Testis kein 5-Methylcytosin im CpG +13 tragen (Abbildung 3.6). Im Gegensatz dazu ist das Cytosin des CpG an Position +13 in den *PRAME*-negativen Proben aus CaSki, U937 und Kontrollblut methyliert.

3.5 DNA-Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung

Um den Methylierungsstatus jedes einzelnen CpGs des *PRAME*-Promotorbereichs zu untersuchen wurde eine Methylierungsanalyse der DNA mittels Bisulfit-Sequenzierung durchgeführt.

Untersucht wurde der Methylierungsstatus von 40 CpG-Dinukleotiden des kodierenden Stranges der *PRAME*-Promotor und 5'-Region in den AML-Patientenproben, AML-7, AML-28, AML-45 und AML-47, den Kontrollproben von gesunden Spendern aus Testis und Blut, den Leukämiezelllinien U937, K562 und HL60 und den Zervixkarzinom-Zelllinien HeLa und CaSki. Dafür wurde genomische DNA der Proben nach einer Bisulfit-Behandlung kloniert und sequenziert. Durch die Bisulfit-Behandlung wird Cytosin in Uracil deaminiert. 5-Methylcytosin ist vor dieser Konversion besser geschützt und erscheint nach Sequenzierung unverändert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.7 und 3.8 dargestellt.

Alle *PRAME*-positiven Proben zeigten, im Vergleich zu den *PRAME*-negativen Proben, eine deutliche Hypomethylierung im *PRAME*-Promotorbereich. Diese war besonders ausgeprägt im Bereich vom CpG an Position -189 bis zum CpG an Position -130 und vom CpG an Position +132 bis zum CpG an Position +314. Die DNA aus gesundem Testis-Gewebe zeigte ein ähnliches Methylierungsmuster wie die DNA aus den *PRAME*-exprimierenden AML-Patientenproben AML-45 und AML-47 (Abbildung 3.7A) sowie der

DNA aus der CML-Zelllinie K562 (Abbildung 3.7C). Die DNA aus dem Blut gesunder Spender besaß hingegen ein dem der *PRAME*-negativen AML-Patientenproben AML-7 und AML-28 identisches Methylierungsmuster (Abbildung 3.7B).

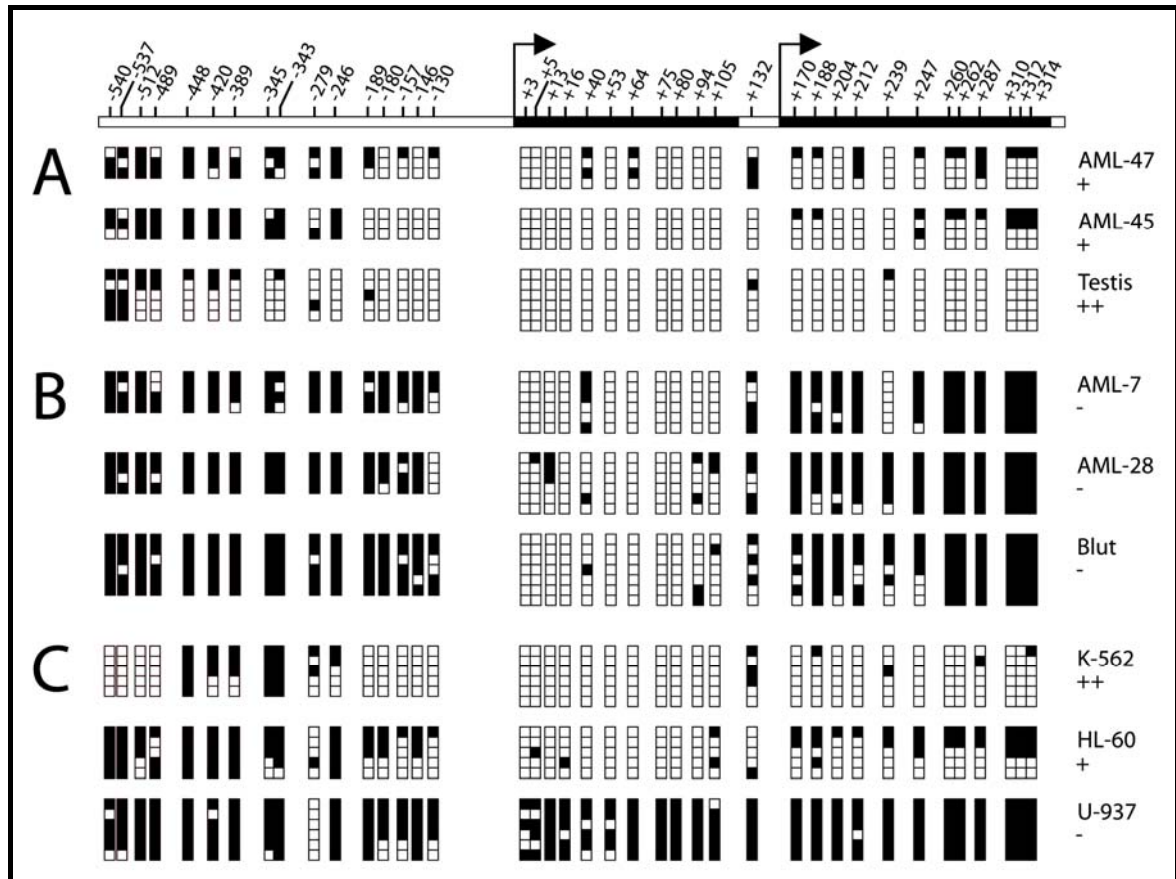


Abbildung 3.7: DNA-Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung. Es wurden 40 CpG-Dinukleotide im Promotorbereich des *PRAME*-Gens mittels Bisulfit-Sequenzierung analysiert. Je Probe wurden zwischen vier und sieben DNA Stränge sequenziert. Jedes der 2000 dargestellten Quadrate repräsentiert ein CpG. Weiß gefüllte Quadrate stehen für ein unmethyliertes Cytosin und schwarz gefüllte für ein 5-Methylcytosin. (A) *PRAME*-positive AML-Patientenproben und Testis. (B) *PRAME*-negative AML-Patientenproben und Blut. (C) Leukämiezelllinien

Die stromaufwärts vom ersten TSP gelegenen CpG-Stellen zwischen Position -540 und -190 waren sowohl in *PRAME*-positiven als auch in *PRAME*-negativen Proben größtenteils methyliert, wohingegen die Cytosine der CpG-Dinukleotide zwischen Position +3 und +105, außer in U937 und CaSki (Abbildung 3.8B), in allen Proben vollständig unmethyliert vorlagen. Der Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide der Positionen -189, -146 und +260 bis +314 korrelierte am deutlichsten mit dem *PRAME*-Expressionsstatus der untersuchten Proben. In Proben, wie der aus gesundem Testis oder

der CML-Zelllinie K562, in denen das *PRAME*-mRNA-Level am höchsten war, lagen diese CpG-Stellen fast vollständig unmethyliert vor. In den *PRAME*-negativen AML-Patientenproben, der Probe aus gesundem Blut und der Zelllinie U937, in denen so gut wie keine *PRAME*-mRNA detektierbar war, hingegen, sind diese CpG-Stellen so gut wie immer vollständig aufgemethyliert. In Proben in denen *PRAME* durchschnittlich stark exprimiert war, wie in AML-45, AML-47, HL60 und HeLa (Abbildung 3.7A), waren sowohl unmethylierte als auch methylierte DNA-Stränge vorhanden. Es kann hier allerdings nicht eindeutig geklärt werden ob diese unterschiedliche Allele des Gens darstellen oder aus unterschiedlichen Zellen stammten.

Im Bezug auf den Methylierungsgrad des CpG an Position +13 konnte festgestellt werden, dass die Methode der Bisulfit-Sequenzierung, das gleiche Ergebnis wie die Analyse mittels MSP erbrachte. Lediglich das Ergebnis der MSP der Probe aus normalem Spenderblut ließ einige methylierte CpGs vermuten, was jedoch auf keinen der sieben mittels Bisulfit-Sequenzierung analysierten Klone zutraf (Abbildung 3.6).

3.6 Behandlung von humanen Zellkulturen mit 5-Aza-2'-

Desoxycytidin (5-Aza-dC) führt zur Hypomethylierung der DNA der *PRAME*-Promotor und 5'-Region.

Um die DNA-hypomethylierende Wirkung des 5-Aza-dC zu zeigen und zu überprüfen inwiefern die hypomethylierten CpG-Stellen remethyliert werden können, wurde eine Methylierungsanalyse nach Behandlung mit 5-Aza-dC durchgeführt. Dafür wurden HeLa- und CaSki-Zellen für 5 Tage mit 5-Aza-dC behandelt. Die Zellen wurden anschließend direkt nach der Behandlung und nach einer weiteren Kultivierung für 45 Tage ohne 5-Aza-dC geerntet.

Nach dieser Behandlung mit 5-Aza-dC war eine deutliche Hypomethylierung im *PRAME*-Promotorbereich zu erkennen (Abbildung 3.8). Diese war in HeLa-Zellen stärker ausgeprägt als in CaSki-Zellen. Nach weiteren 45 Tagen Kultivierung ohne 5-Aza-dC konnte eine Remethylierung der Region gezeigt werden. Hypomethylierung und Remethylierung konnten direkt mit der *PRAME*-Expression der Zellen korreliert werden (Abschnitt 3.3.1). So war die *PRAME*-Expression in den mit 5-Aza-dC behandelten, hypomethylierten Proben höher als in den unbehandelten Kontrollproben. Remethylierung führte zur Rücknahme dieses Effekts.

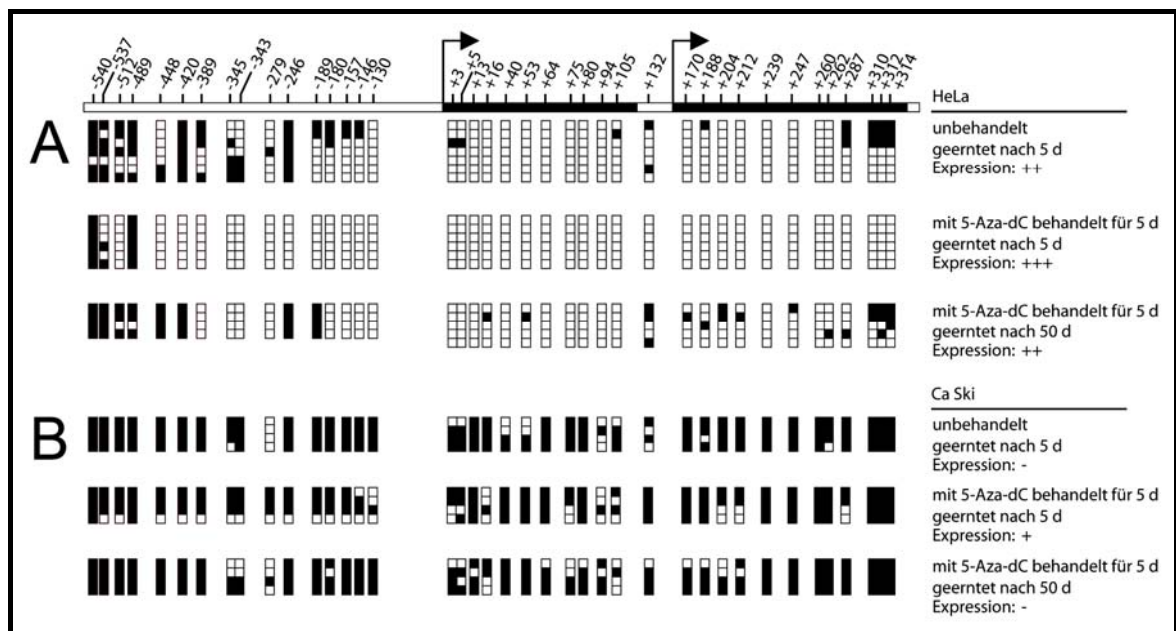


Abbildung 3.8: DNA-Methylierungsanalyse nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin. HeLa- und CaSki-Zellen wurden für 5 Tage mit 5-Aza-dC behandelt und anschließend direkt nach der Behandlung (5 d) und nach einer weiteren Kultivierung für 45 Tage (50 d) ohne 5-Aza-dC geerntet. (A) Behandlung von HeLa-Zellen. (B) Behandlung von CaSki-Zellen.

3.7 DNA-Methylierung inhibiert die Aktivität der für die Transkription von *PRAME* notwendigen Promotorbereiche

Um den *PRAME*-Promotorbereich auf transaktivierende Sequenzbereiche zu untersuchen wurde ein DLR durchgeführt (Abschnitt 2.2.11). Es wurden verschieden lange Sequenzelemente, zwischen Position -947 und +365, der Promotor und 5'-Region des *PRAME*-Gens unmethyliert (Abbildung 3.9A & 3.9C) und aufmethyliert (Abbildung 3.9B) auf ihre transaktivierende Aktivität hin, in HeLa- und CaSki-Zellen, getestet.

3.7.1 Aktivität der Fragmente in HeLa

Alle Konstrukte, welche den stromaufwärts vom ersten TSP gelegenen Bereich zwischen Position -945 und -165 besaßen, zeigten in etwa die gleiche Aktivität (Abbildung 3.9A). Eine weitere Verkürzung der 5'-Region der Fragmente von -165 auf -60 führte zu einer signifikanten ($P < 0,05$), fast vollständigen Reduktion der transaktivierenden Aktivität in etwa auf das Basal-Level des leeren Kontrollvektors. Im Bereich zwischen Position -165 auf -60 befinden sich drei CpG-Stellen, welche sich in der Bisulfit-Sequenzierung als differentiell methyliert gezeigt hatten (Abbildung 3.7 & 3.8). Eine Verlängerung der

Fragmente im 3'-Bereich bewirkte dagegen eine Zunahme der transaktivierenden Aktivität. Die höchste Aktivität besaß ein Fragment, welches die Promotor und 5'-Region des *PRAME*-Gens von Position -165 bis Position +365 umfasste. Dieses Fragment besaß beide, in verschiedenen Transkriptionsvarianten alternativ benutzen, Exons 1a und 1b und einen Teil des ersten Introns. Insgesamt sind in diesem Fragment 29 CpG-Stellen, ein Teil der ersten und die zwei folgenden möglichen CpG-Inseln, enthalten.

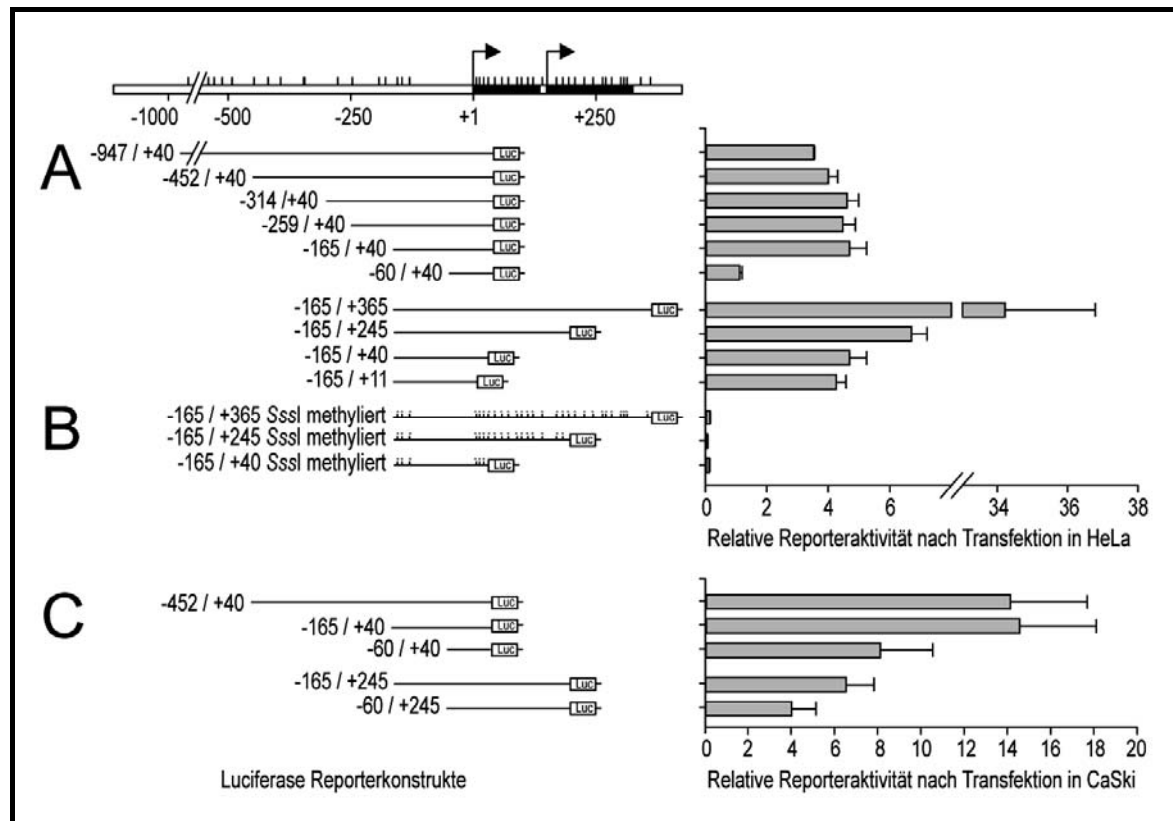


Abbildung 3.9: Dual-Luciferase Reporter Assay des *PRAME*-Promotors. Es wurden verschieden lange Sequenzelemente, zwischen Position -947 und +365, der 5'-Region des *PRAME*-Gens in pGL3-basic (Promega) kloniert, transfiziert und auf ihre transaktivierende Aktivität hin getestet. (A) Transfektion von HeLa-Zellen mit unmethylierten Vektorkonstrukten. (B) Transfektion von HeLa-Zellen mit mittels SssI aufmethylierten Vektorkonstrukten. (C) Transfektion von CaSki-Zellen mit unmethylierten Vektorkonstrukten.

3.7.2 Aktivität der Fragmente in CaSki

Um den Einfluss des *PRAME*-Expressionsstatus der transfizierten Zellen auf die Aktivität der Konstrukte zu untersuchen, wurde diese auch in *PRAME*-negativen CaSki-Zellen bestimmt (Abbildung 3.9C). Es zeigte sich, dass die transfizierten, unmethylierten *PRAME*-Promotor-Fragmente auch in CaSki-Zellen aktiv sind. Die Verkürzung der Fragmente im 5'-Bereich von -165 auf -60, um 105 Basepaare, führt auch hier zu einer

signifikanten ($P < 0,05$) Reduktion der Aktivität. Im Gegensatz zu HeLa-Zellen besitzen jedoch in CaSki-Zellen die Fragmente mit längerem 3'-Bereich (-165/+245 und -60/+245) im Vergleich zu den im 3'-Bereich verkürzten Fragmenten (-165/+40 und -60/+40) eine geringere Aktivität.

3.7.3 Aktivität von Sssl-methylierten Fragmenten in HeLa-Zellen

Es wurden drei Fragmente (Abbildung 3.9B) *in vitro* mittels *SssI*-Methylase aufmethyliert und deren Aktivität in HeLa-Zellen bestimmt. Methylierung führte in allen drei Fragmenten zu einer sehr starken Abnahme der Aktivität (Abbildung 3.9B).

3.8 Überexpression von *PRAME* in CaSki-Zellen führt nicht zu einer veränderten Expression ausgewählter Gene

Um das *PRAME*-mRNA-Level in CaSki-Zellen, welche selbst nur ein sehr geringes *PRAME*-mRNA-Level besitzen, zu erhöhen, wurde ein Vektorkonstrukt (*pPRAME*), von welchem aus *PRAME* in humanen Zellen exprimiert werden kann, kloniert und in CaSki-Zellen transfiziert (Abschnitt 2.2.12). Anschließend erfolgte die Messung der Expression des *PRAME*-Gens und sechs weiterer Gene mittels Real time PCR. Die sechs Gene, *mrp3*, *bax*, *bak*, *bcrp*, *ciap2* und *akt3*, wurden ausgewählt, weil ihre Expression mit der *PRAME*-Expression, in AML-Patientenproben korreliert (Göllner *et al.* 2006). Um allgemeine Effekte der Transfektion zu normalisieren wurden Zellen mit einem Kontrollplasmid (*pcDNA3*), welches nicht die *PRAME* CDS

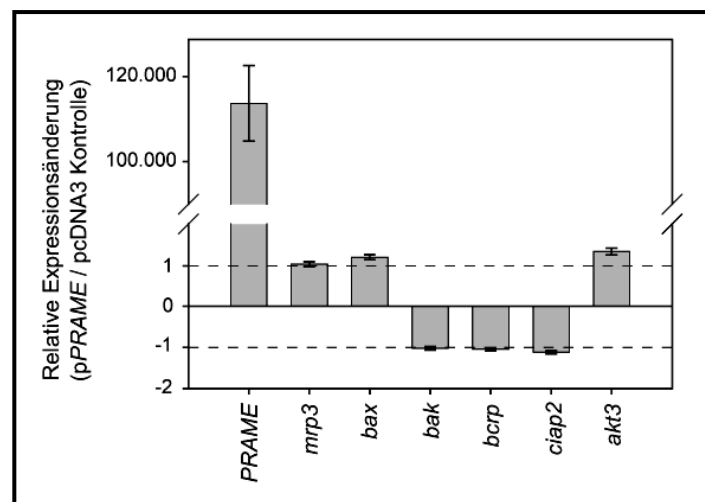


Abbildung 3.10: Überexpression von *PRAME* in CaSki-Zellen. Ein Vektorkonstrukt (*pPRAME*), von welchem aus *PRAME* in humanen Zellen exprimiert werden kann, wurde in *PRAME*-negative CaSki-Zellen transfiziert und anschließend die Expression sowohl des *PRAME*-Gens als auch sechs anderer möglicherweise *PRAME*-assoziierter Gene mittels Real time PCR bestimmt. Die Expressionsänderung wurde relativ zu CaSki-Zellen welche mit dem Kontrollplasmid *pcDNA3* transfiziert wurden bestimmt.

trug, transfiziert. Die Expressionsänderung wurde relativ zu CaSki-Zellen welche, mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden bestimmt.

Das endogene *PRAME*-mRNA-Level konnte durch die Transfektion des Vektorkonstrukts (*pPRAME*) in CaSki-Zellen über 100.000fach auf ein Level >10 Mal höher als in HeLa-Zellen, ähnlich dem in K562-Zellen erhöht werden (Abbildung 3.10). Alle sechs untersuchten Gene änderten ihre Expression dagegen nicht. Sie zeigten alle eine Regulation von weniger als 1,5fach.

3.9 Verringerung des *PRAME*-mRNA-Levels in HeLa-Zellen durch short interfering RNA (siRNA)

Um das *PRAME*-mRNA-Level in HeLa-Zellen zu reduzieren, wurden diese mit siRNA, welche spezifisch gegen *PRAME*-mRNA gerichtet war, transfiziert (Abschnitt 2.2.13). Es wurden zwei verschiedene siRNA Varianten getestet, wobei sich Variante zwei mit einer Stilllegungseffizienz von 85% als potenter als Variante eins, mit einer Effizienz von 70%, erwies. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen und allgemeine Effekte der Transfektion mit siRNA zu normalisieren, wurde eine Kontroll-siRNA transfiziert, welche zusätzlich mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa 532 markiert war. Anschließend erfolgte die Messung der *PRAME*-Expression und die der, in Abschnitt 3.8 beschriebenen, sechs weiteren Gene mittels Real time PCR.

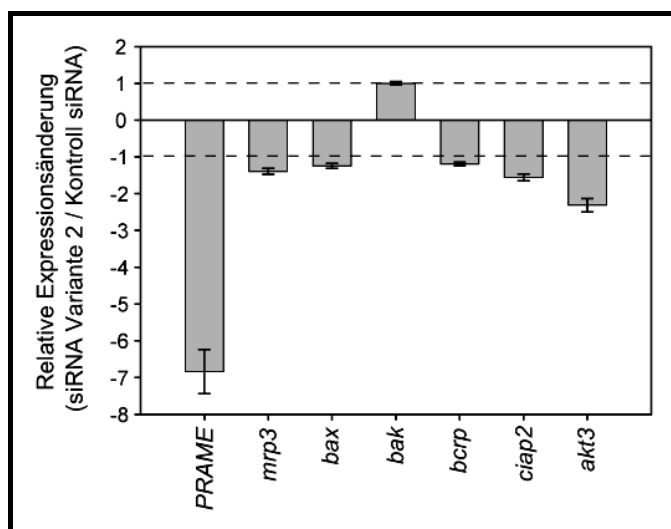


Abbildung 3.11: Stilllegung von *PRAME* in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit spezifischer gegen *PRAME*-mRNA gerichteter siRNA (Variante 2) transfiziert und anschließend die Expression des *PRAME*-Gens und sechs weiterer möglicherweise *PRAME* assoziierter Gene mittels Real time PCR bestimmt. Die Expressionsänderung wurde relativ zu einer nicht *PRAME* spezifischen Kontroll-siRNA ermittelt.

Das endogene *PRAME*-mRNA-Level konnte durch Transfektion der siRNA Variante 2 in HeLa-Zellen um etwa 85% gesenkt werden (Abbildung 3.11). Damit lag es immer noch

mehr als 10fach über dem Level in *PRAME*-negativen AML-Patientenproben und mehr als 90fach über dem im Kontrollblut gesunder Spender. Die sechs untersuchten Gene änderten ihre Expression nur unwesentlich (Abbildung 3.11). Sie zeigten alle, außer *akt3*, eine Regulation von weniger als 2fach. Die Expression von *akt3* erhöhte sich nach Transfektion der siRNA Variante 2 im Vergleich zur Transfektion mit der Kontroll siRNA 2,3fach.

4. DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methoden und Ergebnisse

In malignen Zellen existieren viele Mechanismen, welche die Genexpression beeinflussen. Genetische Läsionen, wie Mutationen, Deletionen, Insertionen und Translokationen, besitzen dabei permanente Effekte, wohingegen epigenetische Veränderungen, wie DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung, reversible Regulationsmechanismen darstellen. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Regulation des Gens des Cancer/Testis-Antigen (CTA) *preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME)*, seiner Transkripte und deren Einfluss auf die Expression Apoptose- und MDR-relevanter Ziel-Gene. Besonderes sollte hierbei auf die Verhältnisse in der kindlichen AML eingegangen werden.

***PRAME*-exprimierende Proben besitzen ein *PRAME*-mRNA-Level ähnlich dem in Testis, wohingegen *PRAME*-negative Proben ein dem in Blut ähnliches *PRAME*-mRNA-Level aufweisen.**

Für diese Arbeit wurden vier Proben von Kindern mit einer neu entwickelten AML ausgewählt und ihre *PRAME*-Expression relativ zu der in gesundem Testis bestimmt (Abschnitt 2.1.10, Abschnitt 3.1). Die ausgewählten Proben erschienen als sehr geeignet, da das *PRAME*-mRNA-Level der *PRAME*-negativen Proben in etwa dem in Blut, und das der *PRAME*-positiven Proben in etwa dem im gesunden Testis entsprach. Um weitere Vergleichswerte und Kontrollen zu erhalten, wurde das *PRAME*-mRNA-Level zusätzlich in drei leukämischen Zelllinien, U937, K562 und HL60, und einem Pool aus drei Blutproben gesunder Spender gemessen (Abschnitt 2.1.9 & 2.1.10). Da vermutet wird, dass *PRAME* in soliden Tumoren andere Funktionen als in hämatologischen Neoplasien besitzt [Epping & Bernards 2006], wurden in die Untersuchung auch die Zervixkarzinom-Zelllinien HeLa und CaSki einbezogen (Abschnitt 2.1.9). Dabei zeigte sich, dass HeLa-Zellen ein dem in *PRAME*-positiven AML-Patientenproben, K562 und Testis, CaSki-Zellen dagegen ein dem in *PRAME*-negativen AML-Patientenproben und U-937 ähnliches *PRAME*-mRNA-Level besitzen. Die vergleichbaren *PRAME*-mRNA-Level in diesen soliden und hämatologischen Neoplasien lassen eine ähnliche Regulation der Expression in diesen vermuten.

***In silico* Untersuchungen lassen eine DNA-Methylierungs-abhängige Regulation des *PRAME*-Gens und seiner stromabwärts liegenden Nachbargene vermuten.**

Um Anhaltspunkte für verschiedene Regulationsmechanismen des Gens zu erkennen, wurde *PRAME*, dessen Promotorregion und seine Transkripte mittels verschiedener *in silico* Analysen untersucht (Abschnitt 2.2.14 & 3.2). Diese umfassten die Darstellung der genauen chromosomalen Lokalisation von *PRAME* und dessen Nachbargene, die Untersuchung der Transkriptvarianten, welche durch differentielles Splicing der prä-mRNA entstehen, und die Suche nach möglichen CpG-Inseln auf der DNA.

PRAME und zwei seiner Nachbargene, suppressor of hairy wings 1 (*SUHW1*) und 2 (*SUHW2*), liegen revers-komplementär in einem Intronbereich des *Immunoglobulin-Lambda-Locus* (IGL@). Diese spezielle Lokalisation könnte zur Folge haben, dass *PRAME* und seine stromabwärts liegenden Nachbargene über die Regulationsmechanismen des IGL@ reguliert werden und somit die Expression der Gene mit der, der Gene des IGL@ zusammenhängt. Einen weiteren Hinweis auf eine gemeinsame Regulation der Expression des *PRAME*-Gens und seiner Nachbargene ist, dass besonders *SUHW2* in mehreren Tumoren, in denen *PRAME* überexprimiert wird, ebenfalls heraufreguliert ist (Daten nicht gezeigt). Besonders stark ist seine Expression, genau wie im Fall von *PRAME*, in K562-Zellen. Da die genomische DNA von K562-Zellen stark hypomethyliert ist, könnte dies bedeuten, dass sowohl *PRAME* als auch seine Nachbargene methylierungsabhängig reguliert sind.

Weiterhin konnte ein im ersten Intron des *PRAME*-Gens befindliches Cytosinreiches Tandem-Repeat gefunden werden, welches ein regulatorisches Enhancer- oder Silencerelement darstellen könnte.

Vom *PRAME*-Gen werden fünf bekannte Transkriptvarianten (TV 1 bis TV 5) von zwei Startpunkten aus transkribiert. Eine weitere Variante, beginnend vom zweiten Transkriptionsstartpunkt (TSP), konnte in dieser Arbeit identifiziert werden (TV 6). Die meisten Transkripte werden vom ersten TSP aus gebildet und zur TV 3 gespleißt. In allen hier untersuchten Proben waren die Expressionsverhältnisse zwischen den TVs relativ konstant, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine Neoplasie-spezifische Expression bestimmter TVs besteht. Eine Analyse der CpG-Stellen in der *PRAME*-Promotor und 5'-Region zeigte vier CpG-reiche Regionen, von denen zwei sehr genau mit den beiden ersten Exons (1a und 1b) übereinstimmen.

DNA-Hypomethylierung und Histon-Acetylierung induzieren *PRAME*-Expression.

Berichte über die epigenetische Kontrolle anderer CTA-Gene [DE SMET *et al.* 1999], die starke Anhäufung von CpG-Stellen im Promotor- und 5'-Bereich des *PRAME*-Gens und der Hinweis, dass die Expression von *PRAME* durch 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-dC) heraufreguliert werden kann [SIGALOTTI *et al.* 2004], ließen vermuten, dass die transkriptionelle Regulation von *PRAME* entweder direkt oder indirekt von epigenetischen Mechanismen, wie DNA Methylierung oder Histon-Acetylierung, abhängig ist. Um dem nachzugehen wurden Experimente durchgeführt, welche weitere Hinweise auf eine solche Art der Genregulation liefern sollten.

Zunächst wurden *PRAME*-positive HeLa und *PRAME*-negative CaSki-Zellen mit dem hypomethylierenden Agens 5-Aza-dC behandelt (Abschnitt 2.2.7 & 3.3.1). Die zuvor beschriebene Heraufregulierung der *PRAME*-Expression nach einer solchen Behandlung konnte bestätigt werden. Es wurde eine Expressionssteigerung in CaSki-Zellen von ~37fach und in HeLa-Zellen von ~4fach festgestellt. Die stärkere Steigerung der *PRAME*-Expression in CaSki-Zellen ist dabei vermutlich auf die Inaktivität des *PRAME*-Promotors in diesen Zellen und die bereits hohe Aktivität des *PRAME*-Promotors in HeLa-Zellen zurückzuführen. Es ist hierbei anzumerken, dass selbst nach dieser starken Aktivierung des Gens in CaSki-Zellen die Gesamtmenge an *PRAME*-mRNA in diesen Zellen um mehr als 66fach unter der in unbehandelten HeLa-Zellen blieb. Da keine weiteren Versuche der Optimierung der Versuchsbedingungen vorgenommen wurden, bleibt unklar ob allein mit 5-Aza-dC eine Expressionssteigerung in CaSki-Zellen bis auf das Level von HeLa möglich ist. Eine anschließende 45-tägige Weiterkultivierung der Zellen in 5-Aza-dC-freiem Vollmedium führte sowohl in CaSki-Zellen als auch in HeLa-Zellen zu einer verringerten *PRAME*-Expression um 40 bzw. 28%. Dies zeigt einerseits die Reversibilität und andererseits die doch relativ lange Persistenz einer Behandlung mit 5-Aza-dC. 5-Aza-dC wird als Nukleosid-Analogon in die DNA eingebaut und bildet stabile Komplexe mit der Methyltransferase DNMT1 was dazu führt, dass die durch 5-Aza-dC ersetzten Basen nicht mehr methyliert werden können und durch die kovalente Bindung der DNMT1 die allgemeine Methyltransferase-Aktivität sinkt. Dies trägt weiter zu reduzierter DNA-Methylierung bei. Auf diese Art und Weise kommt es vermutlich zu einem verminderten Methylierungsgrad in den für die *PRAME*-Expression verantwortlichen Regionen, was zu einer verstärkten Transkription des Gens führt. Da jedoch 5-Aza-dC nachgewiesenermaßen

toxisch für Zellen ist und die Zellen fünf Tage behandelt wurden, könnte die beobachtete Expressionssteigerung des *PRAME*-Gens in HeLa und CaSki Zellpopulationen auch durch eine positive Selektion *PRAME*-exprimierender Zellen hervorgerufen sein. Dies ist mit diesem Experiment alleine nicht zu klären.

Um die These der epigenetischen Regulierbarkeit der *PRAME*-Expression zu untermauern, wurden HeLa- und CaSki-Zellen auch mit den Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC-I) Trichostatin A (TSA) und Valproinsäure (VPA) behandelt (Abschnitt 2.2.7 & 3.3.2). Im Gegensatz zu VPA, was weder in CaSki-Zellen noch in HeLa-Zellen Wirkung zeigte, konnte durch TSA das *PRAME*-mRNA-Level in CaSki-Zellen deutlich erhöht werden. Die Steigerung der Expression fiel dabei ähnlich hoch aus wie nach der Behandlung mit 5-Aza-dC, was auf einen ähnlichen Weg der Aktivierung hinweisen könnte. Eine positive Selektion *PRAME*-exprimierender Zellen, wie im Fall von 5-Aza-dC, ist durch TSA nicht denkbar, da im Gegensatz zur Behandlung mit 5-Aza-dC, welche fünf Tage andauerte, die Zellen hier nur für sechs Stunden behandelt wurden. Eine Kombination von 5-Aza-dC und TSA wurde hier nicht getestet.

Derzeit wird in mehreren Studien der Einsatz von 5-Aza-dC und/oder TSA zur Krebstherapie evaluiert (Abschnitt 1.3.2.6). Die zytostatische Wirkung dieser Therapie beruht sowohl auf der Toxizität der Substanzen als auch auf der unspezifischen Aktivierung von Tumorsuppressorgenen. Wie hier gezeigt wurde, kann durch die Behandlung mit diesen Substanzen auch die Expression von *PRAME* erhöht werden. Da *PRAME*-Expression in mehreren Arbeiten als unvorteilhaft für den Verlauf vieler Krebserkrankungen beschrieben wurde (Abschnitt 1.4.1), könnte eine solche Therapie in einigen Fällen, z. B. in Tumoren welche keine *PRAME*-Expression zeigen, unvorteilhaft sein. Erst vor kurzem beschrieben Epping und Mitarbeiter, 2005, *PRAME* als einen dominanten Repressor des Retinsäure (RA)- Rezeptor (RAR)- Signalweges (Abschnitt 1.4.3). Die Induktion der Expression des *PRAME*-Gens durch den Einsatz hypomethylierender oder Histon-Deacetylase-inhibierender Substanzen könnte so eine verschlechterte Ansprechbarkeit von Tumoren auf eine Therapie mit RA bewirken. RA ist in eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie Embryogenese, Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase von Zellen involviert. RA bindet die intrazellulären Rezeptoren RAR und RXR als Ligand. In Folge dessen kommt es zur Ablösung von Repressor-Komplexen und zur Rekrutierung von Koaktivatoren an RAR-bindende Elemente (RARE), wodurch die Expression der Ziel-

Gene initiiert wird. RA aktiviert so die Transkription einer Reihe von Genen, was zu Differenzierung, Zellzyklusstop und Apoptose der Zellen führt. Ein Verlust der Ansprechbarkeit von Zellen gegenüber RA, z. B. durch die Expression von PRAME, ist deshalb förderlich für die Tumorentwicklung. Des Weiteren wurde durch Göllner und Mitarbeiter, 2006, eine Korrelation der Expression des *PRAME*-Gens in AML mit der Expression von ABC-Transportproteinen und einer Erniedrigung der Expression von für die Apoptose wichtigen Proteinen beschrieben. Ferner scheint die Expression von *PRAME* in Zellen diesen einen selektiven Vorteil zu verleihen [Ikeda *et al.* 1997]. Dies könnte sich negativ auf die Behandlung von Neoplasien mit hypomethylierenden oder Histone-Deacetylase-inhibierenden Substanzen, wie 5-Aza-dC und/oder TSA, zur Krebstherapie auswirken.

***PRAME*-Expression korreliert mit der Hypomethylierung spezifischer CpG-Dinukleotide in der *PRAME*-Promotor und 5'-Region.**

Zur weiteren Untersuchung der DNA-Methylierung als möglichem Regulator der aberranten *PRAME*-Expression wurde zunächst eine methylation-specific-PCR (MSP)-Analyse des CpG an Position +13, relativ zum ersten TSP, in verschiedenen *PRAME*-positiven und -negativen Zelllinien und Geweben durchgeführt (Abschnitt 2.2.16). Dabei zeigte sich, dass die genomische DNA der *PRAME*-exprimierenden HeLa-, K562-, HL60- und Testis-Zellen keine Methylierung des Cytosin an Position +13 aufweist. Die DNA der *PRAME*-negativen CaSki-, U937- und dem Blutzellen gesunder Spender trug dagegen vorwiegend 5-Methylcytosin an dieser Position (Abschnitt 3.4). Diese direkte Korrelation zwischen *PRAME*-mRNA-Level und Methylierungsstatus des CpG +13 stellt ein weiteres Indiz für die epigenetische Regulation der *PRAME*-Expression dar.

Das CpG +13 wurde für diese Analyse ausgewählt, weil es direkt hinter dem ersten TSP innerhalb einer möglichen Bindestelle für den methylierungsabhängig bindenden Transkriptionsfaktor Elk-1 liegt und durch die umliegenden Basen für eine Analyse mittels MSP geeignet ist. Das Protein Elk-1 ist vorwiegend in Lunge und auch in Testis exprimiert und kann über seine ETS-DNA-Bindedomäne an ETS-Elemente der DNA binden. Für das CTA *MAGE-1* konnte gezeigt werden, dass zwei ETS-Elemente innerhalb des *MAGE-1* Promotors 90% der Genaktivität regulieren [DE SMET *et al.* 2004].

Der Vorteil der Analyse von CpG-Stellen mittels MSP gegenüber anderen Methoden ist die einfache, schnelle und kostengünstige Anwendbarkeit. Nachteilig ist

jedoch die oft auftretende hohe Rate an falsch positiven Resultaten, welche durch die Amplifikation mittels PCR zustande kommt. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass sie nur an Cytosinen, welche innerhalb der Konsensussequenz einer methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease, wie *HpaII*, liegen, vorgenommen werden kann. Zusätzlich muss ein methylierungsinsensitives Isoschizomer, wie *MspI*, existieren, um den Verdau kontrollieren zu können. Diese limitierenden Parameter erfüllen nur ca. 10% aller CpG-Dinukleotide im menschlichen Genom.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Analyse des Methylierungsstatus mittels Bisulfit-Sequenzierung vorgenommen (Abschnitt 2.2.9). Mit Hilfe dieser von Frommer und Mitarbeitern, 1992, entwickelte Methode ist es möglich den Methylierungsstatus aller CpG-Dinukleotide eines DNA-Stranges limitierter Länge, unabhängig von Restriktionsendonuklease-Konsensussequenzen, zu bestimmen. Ein weiterer großer Vorteil dieser Methode ist, dass durch die Analyse mehrerer Klone einer Zellpopulation, wie etwa aus Blut oder Organen, eine Quantifizierung des Methylierungsgrades vorgenommen werden kann. Auch ist es möglich Hemimethylierung in CpG-Dinukleotiden doppelsträngiger DNA nachzuweisen, was allerdings hier nicht untersucht wurde. Eine Schwierigkeit der Technik kann unter Umständen die unvollständige Konversion von unmethyliertem Cytosin zu Uracil darstellen, die vor allem bei einer inkompletten Denaturierung der DNA vor Bisulfit-Exposition auftritt. Dies ist durch die strikte Abhängigkeit der Bisulfit-Reaktion von der Einzelsträngigkeit der DNA begründet. Die Länge der zu untersuchenden DNA-Fragmente ist durch den Abbau der DNA während der 18-stündigen Inkubationszeit und die Entstehung von Strangbrüchen, welche durch die starke alkalische Behandlung zur Entfernung des $-SO_3$ Rests vom Uracil vor der PCR entstehen können, limitiert. Durch diesen Umstand kann die anschließende PCR nur über ein paar Hundert Basenpaare durchgeführt werden. Ein weiteres Problem kann die ungenügend spezifische Bindung der verwendeten Primer an konvertierte DNA darstellen, so dass auch unkonvertierte DNA Fragmente amplifiziert werden können. Aus diesem Grund ist eine Konstruktion der Primer über viele Cytosine oder gar CpG-Dinukleotide hinweg nicht ratsam.

Mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung wurde hier der Methylierungsstatus von 40 CpG-Dinukleotiden in der *PRAME*-Promotor und 5'-Region analysiert (Abschnitt 3.5). Es konnte gezeigt werden, dass alle *PRAME*-exprimierenden Proben eine deutliche Hypomethylierung im untersuchten Bereich aufweisen. Diese war besonders stark in einem

60bp großen Bereich, 130bp vor dem ersten TSP, und einem 182bp großen Bereich, 132bp hinter dem ersten, direkt nach dem zweiten TSP, ausgeprägt. Das Methylierungsmuster in Testis glich dabei den Mustern der *PRAME*-positiven AML-Patientenproben und das der Blutproben denen der *PRAME*-negativen AML-Patientenproben. Auch bei den analysierten Zelllinien zeigte sich die klare Korrelation zwischen der Methylierung dieser CpG-Stellen und dem *PRAME*-mRNA-Level. Dabei konnte kein genereller Unterschied zwischen Zelllinien, welche aus hämatologischen Neoplasien etabliert wurden und solchen die aus soliden Tumoren stammen festgestellt werden. Eine Analyse der CpG-Stellen im zweiten Exon des *PRAME*-Gens durch Roman-Gomez und Mitarbeiter, 2007, zeigte ebenfalls einen Zusammenhang zwischen DNA-Hypomethylierung und *PRAME*-Expression in CML-Patientenproben.

Tumoren zeigen oft eine genomweite Hypomethylierung welche etwa 20-60% der CpG-Stellen im Genom betrifft (Abschnitt 1.3.2.5). Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind weitgehend ungeklärt. Es ist aber davon auszugehen, dass es sich dabei größtenteils nicht um aktive sondern passive Vorgänge, wie eine Reduktion der Methyltransferase-Aktivität [Adams *et al.* 1990], handelt. Hypomethylierung führt zu DNA-Brüchen, homologer Rekombination, Reaktivierung parasitärer DNA-Sequenzen und Expression von Gene, welche in normalen Zellen durch Hypermethylierung inaktiviert sind [Feinberg & Tycko 2004; Kaneda 2004]. Solche Gene sind oft Proto-Onkogene, welche Funktionen in der Differenzierung, der Zellzykluskontrolle und der Apoptose besitzen. Dies könnte auch bei *PRAME* der Fall sein.

Die Bisulfid-Sequenzierung zeigte bei der leukämischen, *PRAME*-negativen, Zelllinie U937 einen auffällig hohen Methylierungsgrad der DNA. In diesen Zellen waren auch die CpG-Dinukleotide im Bereich zwischen dem ersten und zweiten TSP, welcher in der DNA aus gesundem Kontrollblut unmethyliert war, aufmethyliert. Der Grund dafür könnte sein, dass es in diesen Zellen, welche dem FAB-Typ AML-M5 zuzuordnen sind (Abbildung 1.1), während oder nach ihrer Tumorgenese zu einer aberranten Hypermethylierung der *PRAME*-Promotor und 5'-Region gekommen ist.

Aberrante Hypermethylierung erfolgt vorwiegend an CpG-Inseln und wird in so gut wie allen humanen Tumoren gefunden (Abschnitt 1.3.2.5). Sie führt oft zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Dies ist hier allerdings nicht der Fall, da es sich bei *PRAME* vermutlich um ein Onkogen handelt und die Aufmethylierung des beschriebenen Bereichs, zwischen erstem und zweitem TSP, für die Stilllegung der Expression des Gens, wie die

Probe aus gesundem Blut und die *PRAME*-negativen AML-Patientenproben zeigen, nicht notwendig ist. Auch die DNA der *PRAME*-negativen Zervixkarzinomzelllinie CaSki ist im Bereich zwischen beiden TSPs aufmethyliert. Allerdings kann durch das fehlen einer Kontrolle aus gesundem Gewebe gleicher Herkunft keine Aussage getroffen werden inwiefern hier eine aberrante Hypermethylierung vorliegt.

Um zu überprüfen ob der oben beschriebene Effekt der Aktivierung des *PRAME*-Gens in HeLa- und CaSki-Zellen durch 5-Aza-dC auf dessen hypomethylierender Wirkung beruht, wurden auch diese Proben einer Analyse mittels Bisulfit-Sequenzierung unterzogen (Abschnitt 3.6). Es konnte gezeigt werden, dass es nach der Behandlung mit 5-Aza-dC zu einer Hypomethylierung in der *PRAME*-Promotor und 5'-Region kommt. Dieser Effekt war in HeLa-Zellen wesentlich stärker ausgeprägt als in CaSki-Zellen. Ein Grund dafür könnte u. a. eine verschlechterte Aufnahmefähigkeit und/oder eine verstärkte Ausschleusung von 5-Aza-dC in CaSki-Zellen, z. B. durch eine verstärkte Expression von ABC Transporterproteinen, sein. Eine verstärkte Ausschleusung von Chemotherapeutika ist bei vielen Tumoren bekannt und wird als *multi drug resistance* (MDR) bezeichnet. Dass die fast vollständige Demethylierung der *PRAME*-Promotor und 5'-Region in HeLa-Zellen nur zu einer Steigerung der Expression um etwa Faktor vier, die Demethylierung regulatorischer CpG-Stellen in wenigen CaSki-Klonen jedoch zu einer Expressionssteigerung um das etwa 37fache führte ist dabei vermutlich auf die sehr geringe Aktivität des *PRAME*-Promotors in CaSki-Zellen und die bereits hohe Aktivität in HeLa-Zellen zurückzuführen.

Nach der Behandlung der Zellen mit 5-Aza-dC für fünf Tage, wurden diese weitere 45 Tage in 5-Aza-dC-freiem Vollmedium kultiviert. Dieses führte sowohl in CaSki- als auch in HeLa-Zellen zu einer verringerten *PRAME*-Expression, um 40 bzw. 28%. Das Ergebnis der Bisulfit-Sequenzierung dieser Proben zeigte eine Remethylierung mehrerer CpG-Stellen, was die Vermutung nahe legt, dass diese remethylierten CpG-Dinukleotide für den Rückgang der *PRAME*-Expression verantwortlich sind.

Da sowohl die Aktivierung als auch die Reinaktivierung von *PRAME* mit dem Methylierungsgrad in den untersuchten Proben korreliert, kann man davon ausgehen, dass der Transkriptionssteigerung von *PRAME* die Hypomethylierung bestimmter CpG-Stellen in der *PRAME*-Promotor und 5'-Region zugrunde liegt. Ob diese jedoch direkt auf die hypomethylierende Wirkung des 5-Aza-dC oder aber auf eine positive Selektion von Zellen mit unmethyliertem *PRAME*-Promotor- und 5'-Bereich, und daraus resultierender

PRAME-Expression zurückzuführen ist, kann auch mit diesem Experiment nicht abschließend geklärt werden. Dafür wären Experimente mit Einzelzellklonen notwendig.

***In vitro*-Methylierung des *PRAME*-Promotors inhibiert dessen Aktivität.**

Um jene Sequenzbereiche in der *PRAME*-Promotor und 5'-Region auffindig zu machen, welche für die Transkription des *PRAME*-Gens notwendig sind, wurde ein DLR durchgeführt (Abschnitt 3.7). Es zeigte sich, dass die meiste transaktivierende Aktivität, in *PRAME*-exprimierenden HeLa-Zellen, von einem Bereich 165bp stromaufwärts und 365bp stromabwärts vom ersten TSP ausgeht. Dieser Bereich umfasst beide TSPs, die Exons 1a und 1b und insgesamt 29 CpG-Dinukleotide, von denen sich mehrere in der Bisulfit-Sequenzierung als in *PRAME*-positiven Proben hypomethyliert erwiesen hatten. Unter diesen hypomethylierten CpG-Stellen sind die drei stromaufwärts vom ersten TSP gelegenen CpG-Dinukleotide an Position -157, -146 und -130, über welchen möglicherweise für die Transkription notwendige Faktoren methylierungsabhängig binden.

Die Aktivität aller Fragmente zeigte sich in HeLa-Zellen direkt abhängig von der Länge ihres stromabwärts vom ersten TSP gelegenen 3'-Bereichs. Umso länger die Fragmente waren, desto mehr transaktivierende Aktivität besaßen sie. Da sich in diesem Sequenzbereich viele in *PRAME*-exprimierenden Proben hypomethylierte CpG-Stellen befinden, binden dort vermutlich mehrere die Transkription steigernde methylierungssensitive Faktoren. Im Gegensatz zu den Versuchen mit HeLa-Zellen, ging in CaSki-Zellen die transaktivierende Aktivität nur von der 165bp großen Region stromaufwärts vom ersten TSP aus. Die Verlängerung der 3'-Region der Fragmente erniedrigte deren Aktivität. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass in dieser Region Faktoren binden könnten, welche die Transkription von *PRAME* inhibieren. Da die in diesem Versuch verwendeten Fragmente, im Gegensatz zur genomischen DNA der *PRAME*-Promotor und 5'-Region in CaSki-Zellen, vollständig unmethyliert sind, ist davon auszugehen, dass diese inhibitorischen Faktoren methylierungsunabhängig binden können. Da die Aktivität der Konstrukte, welche den Promotor-Bereich und 40bp der 5'-Region des *PRAME*-Gens umfassten, in CaSki-Zellen ähnlich hoch wie in HeLa-Zellen war, binden in diesem Bereich vermutlich keine Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren.

Um die Abhängigkeit der Aktivität der Fragmente vom Methylierungsstatus der enthaltenen CpG-Stellen zu untersuchen, wurden verschiedene, ausgewählte Fragmente vor deren Transfektion mittels *SssI*-Methylase aufmethyliert. Wie in Abbildung 3.7B zu

sehen ist, besaßen diese Fragmente keinerlei Aktivität, was wiederum die These unterstützt, dass die Transkription von *PRAME* über methylierungsabhängig bindende Transkriptionsfaktoren gesteuert wird.

Überexpression von *PRAME* in CaSki-Zellen und Verringerung des *PRAME*-mRNA-Levels in HeLa-Zellen durch short interfering RNA (siRNA).

Göllner und Mitarbeiter, 2006, untersuchten in einer Microarray-basierten Analyse den Zusammenhang zwischen der *PRAME*-Überexpression und der Expression Apoptose- und MDR-relevanter Gene in kindlichen AML-Patientenproben. *PRAME*-exprimierende AML-Patientenproben zeigten in dieser Analyse, im Gegensatz zu *PRAME*-negativen AML-Patientenproben, eine erniedrigte Expression von Genen, welche für Proteine kodieren die für apoptotische Prozesse wichtig sind und gleichzeitig eine Erhöhung der Expression von Genen, welche für ABC-Transporter-Proteine kodieren. Insgesamt wurden 31 differentiell exprimierte Gene unterschiedlicher Funktionsgruppen identifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die gezeigten Expressionsunterschiede der wichtigsten gefundenen Apoptose- und MDR-relevanten Gene direkt vom *PRAME*-mRNA-Level der Zelle abhängig sind. Dazu wurde das *PRAME*-Level in *PRAME*-negativen CaSki-Zellen künstlich erhöht und in *PRAME*-positiven HeLa-Zellen künstlich gesenkt.

Die Erhöhung des *PRAME*-mRNA-Levels in CaSki-Zellen erfolgte durch die Transfektion eines Vektorkonstrukts von dem aus translatierbare *PRAME*-mRNA gebildet wird (Abschnitt 2.2.12). In Folge der Transfektion stieg das *PRAME*-mRNA-Level um über 100.000fach auf ein Level, vergleichbar dem in HeLa- oder K562-Zellen an (Abschnitt 3.8). Die Messung der Expressionsänderung vierer Apoptose- (*bax*, *bak*, *ciap2* und *akt3*) und zweier MDR-relevanter Gene (*mrp3* und *bcrp*) zeigte hingegen bei keinem der vermessenen Gene eine Änderung der Expression. Das hohe *PRAME*-mRNA-Level der von Göllner und Mitarbeitern, 2006, untersuchten AML-Patientenproben scheint also nicht der direkte Grund für die erhöhte Expression der sechs hier untersuchten Gene zu sein.

Zu erwähnen ist, dass die sehr starke Überexpression des *PRAME*-Gens in den CaSki-Zellen keine mikroskopisch sichtbaren Auswirkungen auf die Morphologie oder das Wachstum der Zellen hatte (Daten nicht gezeigt). Ein genereller Wachstumsvorteil *PRAME*-Überexprimierender Zellen, wie von Ikeda und Mitarbeitern, 1997, beschrieben,

konnte nicht ausgemacht werden. Dies könnte anders sein, wenn die Zellen einem selektiven Stress ausgesetzt werden.

Die Senkung des *PRAME*-mRNA-Levels in HeLa-Zellen erfolgte durch die Transfektion spezifisch gegen *PRAME*-mRNA gerichteter siRNA. Das endogene *PRAME*-mRNA-Level konnte so um etwa 85% gesenkt werden (Abschnitt 2.2.13 & 3.9). Die sechs untersuchten Gene änderten hingegen ihre Expression, infolge der Absenkung des *PRAME*-mRNA-Levels, nur unwesentlich. Morphologie und Wachstum der transfizierten HeLa-Zellen zeigten sich, abgesehen von den Effekten welche durch die Lipofektion hervorgerufen werden, auch hier unverändert (Daten nicht gezeigt). Dies könnte aber wiederum daran gelegen haben, dass die Zellen keinem selektiven Stress ausgesetzt wurden. Ein weiterer Grund für die sehr geringen Expressionsänderungen könnte darin liegen, dass das *PRAME*-mRNA-Level nach der Behandlung mit der siRNA in HeLa-Zellen immer noch etwa 10fach über dem in *PRAME*-negative AML-Patientenproben und 90fach über dem im Kontrollblut gesunder Spender lag. Es ist nicht auszuschließen, dass die geringen Expressionsänderung der untersuchten Gene auf eine ungenügende Stilllegung des *PRAME*-Gens zurückzuführen ist. Eine vollständige Stilllegung von *PRAME* dürfte schwierig sein, da Experimente, wie etwa das ausknocken in Mausmodellen, auf Grund eines fehlenden Orthologs von *PRAME* in Nagetieren nicht möglich sind. Eine mögliche Erklärung könnte auch sein, dass als Modell hier keine leukämischen sondern Zellen aus soliden Tumoren verwendet wurden und dies das Ergebnis beeinflusst hat.

Die mit dieser Methode gewonnenen Daten zeigen, dass die von Göllner und Mitarbeitern gezeigten Expressionsunterschiede der sechs hier untersuchten Apoptose- und MDR-relevanten Gene in AML-Patientenproben nicht direkt vom *PRAME*-mRNA-Level der Zelle abhängig zu sein scheinen. Es ist eher wahrscheinlich, dass die Korrelation der Expression des *PRAME*-Gens mit der Expression der anderen Gene auf eine gemeinsame Regulation, z. B. im Rahmen der Tumorgenese, zurückzuführen ist.

4.2 Schlussfolgerungen

Die hier dargestellten Daten zeigen, dass die aberrante Expression des Cancer/Testis-Antigens PRAME in diversen humanen Neoplasien epigenetischen Regulationsmechanismen unterliegt.

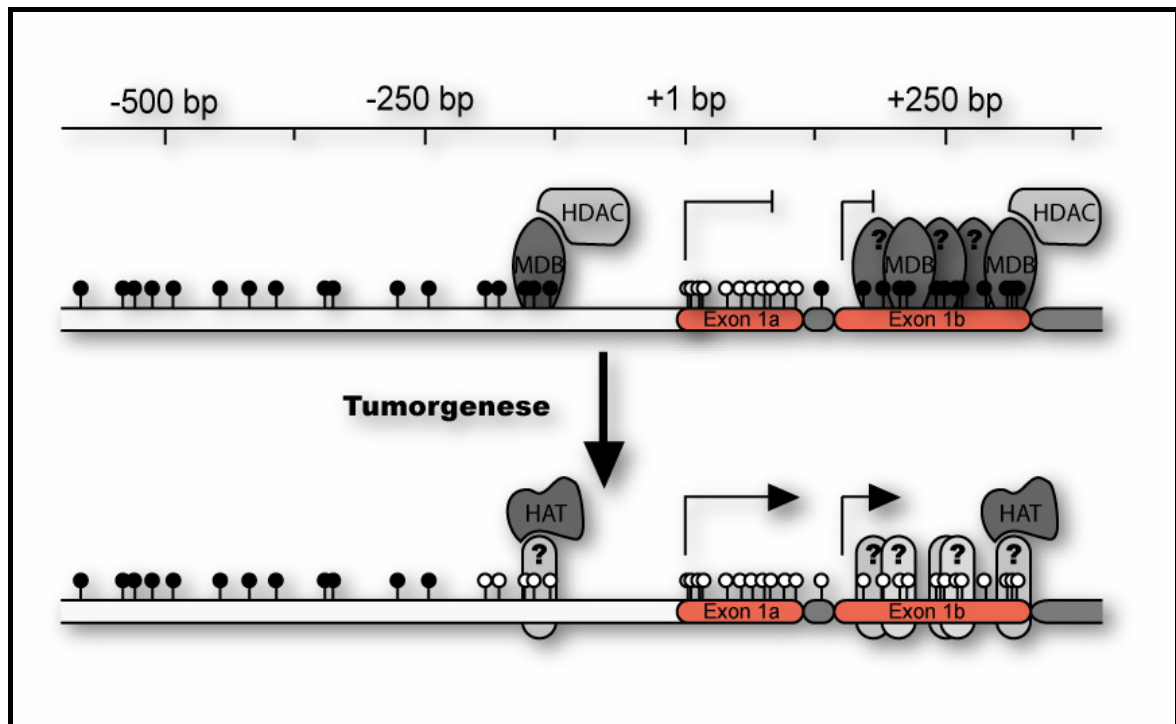


Abbildung 4.1 Modell der PRAME-Regulation. Während der Tumorgenenese kommt es im Rahmen der genomweiten Hypomethylierung, zur Demethylierung der CpG-reichen Regionen vor dem ersten und im zweiten Exon des PRAME-Gens. Dies führt zur Ablösung von Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD)-Proteinen und Histon-Deacetylasen (HDAC). Infolge dessen können methylierungssensitive Transkriptions-steigernde Faktoren binden welche Histonacetyltrasen (HAT) rekrutieren, wodurch es zu Histonacetylierung, Relaxierung des Chromatins und letztlich zur aberranten PRAME-Expression kommt. Weiß gefüllte Kreise entsprechen unmethylierten, schwarz gefüllte Kreise methylierten CpG-Dinukleotiden.

PRAME ist natürlicherweise nur in Testis, Endometrium, Ovarien und Nebennieren exprimiert. Während der Tumorgenenese kommt es in vielen soliden und hämatologischen Neoplasien zu einer aberranten PRAME-Überexpression. Dabei entwickeln sowohl solide als auch hämatologische Tumoren ein dem in Testis vergleichbar hohes PRAME-mRNA-Level. Die PRAME-Expression geht in allen Neoplasien vor allem auf eine Aktivierung des ersten Transkriptionsstartpunkts (TSP) zurück. Bevorzugt wird eine Transkriptvariante (TV 3) gebildet. Die stärkste Promotor-Aktivität geht in PRAME-exprimierenden Zellen von einer 165bp stomaufwärts und einem 365bp stomabwärts vom ersten TSP gelegenen

Region aus. Innerhalb dieser Bereiche befinden sich mehrere CpG-reiche Regionen, welche durch die Gabe des Cytidin-Analogons 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-dC) reversibel hypomethyliert werden können. Diese reversible Methylierung führt zu einer gleichermaßen reversiblen Induktion der *PRAME*-Expression. Eine vollständige Aufmethylierung *in vitro* hemmt die Expression des *PRAME*-Gens vollständig. Unmethylierte *PRAME*-Promotor-Konstrukte besitzen auch in *PRAME*-negativen CaSki-Zellen Aktivität, so dass vermutet werden kann, dass alle Zelltypen potentiell in der Lage sind *PRAME* zu exprimieren.

Neoplasien weisen in der Regel drei generelle Methylierungsmuster der *PRAME*-Promotor und 5'-Region auf. Die genomische DNA in *PRAME*-negativen Neoplasien, sowohl aus AML-Patientenproben als auch gesundem Blut und Zelllinien, besitzt eine stark ausgeprägte Methylierung aller CpG-Dinukleotide vor dem ersten und nach dem zweiten TSP. Einige, wie die Zelllinien U937 und CaSki, sind zusätzlich in der Region zwischen dem ersten und zweiten TSP aufmethyliert. Alle *PRAME*-exprimierenden malignen Zellen, tragen dagegen immer ein dem in gesundem Testis ähnliches Methylierungsmuster mit einem hypomethylierten Bereich vor dem ersten TSP und direkt nach dem zweiten TSP.

Wie die zusätzliche Induzierbarkeit der *PRAME*-Expression durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC-I) zeigt, unterliegt die Expression des *PRAME*-Gens epigenetischen Regulationsmechanismen.

Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass es bei Neoplasien, welche eine aberrante Expression des *PRAME*-Gens aufweisen, während der Tumorgenese, vermutlich im Rahmen einer genomweiten Hypomethylierung, zur Demethylierung der CpG-reichen Regionen vor dem ersten und nach dem zweiten TSP des *PRAME*-Gens kommt. Die Demethylierung der Regionen könnte dabei auf einen ähnlichen Mechanismus, wie er von de Smet und Mitarbeitern, 2004, für das humane CTA MAGE-A1 beschrieben wurde, zurückzuführen sein. Dieser Mechanismus umfasst eine primäre genomweite Hypomethylierung, welche anschließend in bestimmten Genen und deren Promotoren, durch eine stetige Transkription aufrechterhalten wird. Infolge der Demethylierung der CpG-reichen Regionen vor dem ersten und nach dem zweiten TSP des *PRAME*-Gens kommt es vermutlich zur Ablösung von Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD)-Proteinen. Da diese Proteine mit Histon-modifizierenden Proteinen, wie Histon-Deacetylasen (HDAC), interagieren können, kommt es infolge dessen zur Ablösung von Histon-

Deacetylasekomplexen. Dadurch wird die Region wieder zugänglich für Histon-Acetyltransferasen (HAT). Diese, meist in größeren Komplexen vorliegenden Proteine, katalysieren die Acetylierung der Lysinreste der Histone, was zu einer lokalen Chromatindekondensation und damit zur Zugänglichkeit des Chromatins für Transkriptionsfaktoren und der Polymerase II führt. Infolge dessen kommt es letztlich zur Expression des *PRAME*-Gens. Welche methylierungsabhängig bindenden Transkriptionsfaktoren an die differentiell methylierten DNA-Bereiche des *PRAME*-Gens binden kann nur spekuliert werden.

Die Hypomethylierung der CpG-Stellen zwischen dem ersten und dem zweiten TSP in *PRAME*-negativen als auch *PRAME*-exprimierenden Zellen zeigt, dass diese vermutlich keine Funktion in der Stilllegung der *PRAME*-Expression besitzen.

Neben den beschriebenen direkten Mechanismen der Aktivierung der *PRAME*-Expression durch DNA-Methylierung sind auch indirekte Mechanismen, wie die methylierungsabhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren denkbar. Auch eine Kombination aus beiden wäre möglich.

Wie mehrfach gezeigt werden konnte, korreliert die aberrante Expression von *PRAME* in vielen Neoplasien mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Metastasen, einem höheren Alter der Patienten und einem schlechteren klinischen Verlauf der Krankheit (Abschnitt 1.4.1). Im Verlauf einiger Krebsarten kommt es zu einer späten Induktion der *PRAME*-Expression, mit negativen Folgen für den weiteren Krankheitsverlauf.

Das Verständnis der Regulation des *PRAME*-Gens in Neoplasien könnte weiteren Aufschluss über den Status einer Krebszelle und seiner Tumorgenese geben. Des Weiteren könnte das Wissen über die epigenetische Regulation für eine sehr frühe Diagnose, sensitives Monitoring, eine genaue Prognose und eine gezielte Beeinflussung der Expression von *PRAME*, zur Bekämpfung von Tumorzellen genutzt werden.

5. AUSBLICK

In dieser Arbeit wird durch mehrere unabhängige Versuchsansätze gezeigt, dass die aberrante Expression des CTA PRAME direkt abhängig vom Methylierungsstatus einiger CpG-Dinukleotide in der 5'-Region des Gens ist. Erste weitere Versuche zeigten, dass im Bereich dieser CpG-Stellen Proteine an die DNA binden. Ziel zukünftiger Versuche wird es sein, diese zu identifizieren und ihre Bindung und deren Folgen zu charakterisieren.

Da ein Einfluss von Histon-Acetylierung auf die Aktivierung des *PRAME*-Gens vermutet werden kann, soll in weiteren Experimenten auch auf diese Aspekte der epigenetischen Regulation des *PRAME*-Gens eingegangen werden. So soll u. a. durch eine native Chromatinimmunopräzipitation gegen acetylierte Histone (N-ChIP) eine Aufklärung des Acetylierungsstatus der *PRAME*-Promotor und 5'-Region durchgeführt werden.

Des Weiteren wären Analysen in den Geweben des Testis interessant um mehr Hinweise auf die natürliche Funktion von PRAME zu erfahren.

Weitere Untersuchungen könnten die Expressionsabhängigkeit des *PRAME*-Gens von seiner Lokalisation näher beleuchten. Interessant wäre auch die Frage, ob die stromabwärts-liegenden Nachbargene von *PRAME*, *SUHW1* und *SUHW2*, auch geeignete Tumormarkergene darstellen.

Eine nähere Charakterisierung der hier gefundenen sechsten Transkriptvariante des *PRAME*-Gens (TV 6) wäre vorstellbar, aufgrund der sehr geringen Transkriptmenge aber unbedeutend für Tumor-relevante Fragestellungen.

In einem ChIP-on-Chip-basierten Screening identifizierten Polo und Mitarbeiter, 2007, den PRAME-Promotor als einen von vielen Bindungsorten für den Transkriptionsrepressor BCL6. BCL6 bindet als Zinkfingerprotein direkt an DNA und rekrutiert HDAC. Dies könnte einen Mechanismus der Repression des *PRAME*-Gens darstellen. Eine *in silico*-Analyse der BCL6-Bindestellen im *PRAME*-Promotorbereich ergab, dass sich zwei mögliche Bindestellen für BCL6 stromaufwärts vom ersten TSP befinden. Weitere Analysen, wie ein Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA), sollen darüber Klarheit bringen ob und wo BCL6 an den *PRAME*-Promotor bindet und ob es dort eine Funktion besitzt.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, R. L., Hanley, A. & Rinaldi, A. (1990).** DNA demethylation in erythroleukaemia cells. *FEBS Lett* **269**, 29-31.
- Ahuja, N., Li, Q., Mohan, A. L., Baylin, S. B. & Issa, J. P. (1998).** Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer research* **58**, 5489-5494.
- Altucci, L. & Gronemeyer, H. (2001).** The promise of retinoids to fight against cancer. *Nature reviews* **1**, 181-193.
- Anacleto, C., Leopoldino, A. M., Rossi, B., Soares, F. A., Lopes, A., Rocha, J. C., Caballero, O., Camargo, A. A., Simpson, A. J. & Pena, S. D. (2005).** Colorectal cancer "methylator phenotype": fact or artifact? *Neoplasia* **7**, 331-335.
- Antequera, F. & Bird, A. (1993).** CpG islands. *EXS* **64**, 169-185.
- Antequera, F. & Bird, A. (1993).** Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 11995-11999.
- Attwood, J. T., Yung, R. L. & Richardson, B. C. (2002).** DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci* **59**, 241-257.
- Avner, P. & Heard, E. (2001).** X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* **2**, 59-67.
- Bachman, K. E., Park, B. H., Rhee, I., Rajagopalan, H., Herman, J. G., Baylin, S. B., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (2003).** Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* **3**, 89-95.
- Barth, R. J., Jr., Mule, J. J., Spiess, P. J. & Rosenberg, S. A. (1991).** Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* **173**, 647-658.
- Baylin, S. & Bestor, T. H. (2002).** Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence? *Cancer Cell* **1**, 299-305.
- Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R., Vertino, P. M. & Issa, J. P. (1998).** Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* **72**, 141-196.
- Belinsky, S. A., Nikula, K. J., Baylin, S. B. & Issa, J. P. (1996).** Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 4045-4050.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R. & Sultan, C. (1976).** Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* **33**, 451-458.
- Berger, S. L. (2002).** Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 142-148.
- Bestor, T. H. (2000).** The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**, 2395-2402.
- Bhattacharya, S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N. & Szyf, M. (1999).** A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* **397**, 579-583.
- Bird, A. P. (1986).** CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209-213.
- Birtle, Z., Goodstadt, L. & Ponting, C. (2005).** Duplication and positive selection among hominin-specific PRAME genes. *BMC Genomics* **6**, 120.
- Blaheta, R. A. & Cinatl, J., Jr. (2002).** Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev* **22**, 492-511.
- Boon, K., Edwards, J. B., Siu, I. M., Olschner, D., Eberhart, C. G., Marra, M. A., Strausberg, R. L. & Riggins, G. J. (2003).** Comparison of medulloblastoma and

- normal neural transcriptomes identifies a restricted set of activated genes. *Oncogene* **22**, 7687-7694.
- Boon, T., Coulie, P. G. & Van den Eynde, B. (1997).** Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* **18**, 267-268.
- Boon, T. & van der Bruggen, P. (1996).** Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* **183**, 725-729.
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A. & Cedar, H. (1994).** Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* **371**, 435-438.
- Burnet, F. M. (1970).** The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* **13**, 1-27.
- Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G. & Baylin, S. B. (1999).** Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature genetics* **21**, 103-107.
- Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G. & Baylin, S. B. (1999).** Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature genetics* **21**, 103-107.
- Chambost, H., van Baren, N., Brasseur, F. & Olive, D. (2001).** MAGE-A genes are not expressed in human leukemias. *Leukemia* **15**, 1769-1771.
- Chedin, F., Lieber, M. R. & Hsieh, C. L. (2002).** The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16916-16921.
- Chen, J. X., Zheng, Y., West, M. & Tang, M. S. (1998).** Carcinogens preferentially bind at methylated CpG in the p53 mutational hot spots. *Cancer research* **58**, 2070-2075.
- Chen, M. L., Pittet, M. J., Gorelik, L., Flavell, R. A., Weissleder, R., von Boehmer, H. & Khazaie, K. (2005).** Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 419-424.
- Clark, S. J., Harrison, J. & Frommer, M. (1995).** CpNpG methylation in mammalian cells. *Nature genetics* **10**, 20-27.
- Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L. & Frommer, M. (1994).** High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic acids research* **22**, 2990-2997.
- Clark, S. J. & Melki, J. (2002).** DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* **21**, 5380-5387.
- Coulie, P. G., Ikeda, H., Baurain, J. F. & Chiari, R. (1999).** Antitumor immunity at work in a melanoma patient. *Adv Cancer Res* **76**, 213-242.
- Coulondre, C., Miller, J. H., Farabaugh, P. J. & Gilbert, W. (1978).** Molecular basis of base substitution hotspots in Escherichia coli. *Nature* **274**, 775-780.
- Cross, S. H., Charlton, J. A., Nan, X. & Bird, A. P. (1994).** Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nature genetics* **6**, 236-244.
- de Smet, C., Lorient, A. & Boon, T. (2004).** Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells. *Molecular and cellular biology* **24**, 4781-4790.
- de Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V. & Boon, T. (1999).** DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Molecular and cellular biology* **19**, 7327-7335.
- de Vos, D. & van Overveld, W. (2005).** Decitabine: a historical review of the development of an epigenetic drug. *Annals of hematology* **84 Suppl 13**, 3-8.
- de Vos, D. & van Overveld, W. (2005).** Decitabine: a historical review of the development of an epigenetic drug. *Annals of hematology* **84 Suppl 13**, 3-8.

- de Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R. & DeLuca, M. (1985). Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 7870-7873.
- Delgado, S., Gomez, M., Bird, A. & Antequera, F. (1998). Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *EMBO J* **17**, 2426-2435.
- Denissenko, M. F., Chen, J. X., Tang, M. S. & Pfeifer, G. P. (1997). Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3893-3898.
- Dhordain, P., Lin, R. J., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J. P., Evans, R. M. & Albagli, O. (1998). The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic acids research* **26**, 4645-4651.
- Di Croce, L., Raker, V. A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., Minucci, S. & Pelicci, P. G. (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science (New York, NY)* **295**, 1079-1082.
- Di Croce, L., Raker, V. A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., Minucci, S. & Pelicci, P. G. (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science (New York, NY)* **295**, 1079-1082.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A. & Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science (New York, NY)* **300**, 455.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A. & Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science (New York, NY)* **300**, 455.
- Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**, 5400-5413.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A. & Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic acids research* **10**, 2709-2721.
- Epping, M. T. & Bernards, R. (2006). A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer research* **66**, 10639-10642.
- Epping, M. T., Wang, L., Edel, M. J., Carlee, L., Hernandez, M. & Bernards, R. (2005). The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* **122**, 835-847.
- Esteller, M. (2000). Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* **36**, 2294-2300.
- Esteller, M. (2003). Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol* **109**, 80-88.
- Esteller, M. (2005). Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 629-656.
- Esteller, M. (2006). Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* **94**, 179-183.
- Esteller, M., Fraga, M. F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A. K., Trojan, J., Vaurs-Barriere, C., Bignon, Y. J., Ramus, S., Benitez, J., Caldes, T., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Launonen, V., Canal, M. J., Rodriguez, R., Capella, G., Peinado, M. A., Borg, A., Aaltonen, L. A., Ponder, B. A., Baylin, S. B. & Herman, J. G. (2001). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* **10**, 3001-3007.
- Esteller, M., Gaidano, G., Goodman, S. N., Zagonel, V., Capello, D., Botto, B., Rossi, D., Gloghini, A., Vitolo, U., Carbone, A., Baylin, S. B. & Herman, J. G. (2002). Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA

- methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of the National Cancer Institute* **94**, 26-32.
- Feinberg, A. P. & Tycko, B. (2004).** The history of cancer epigenetics. *Nature reviews* **4**, 143-153.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983).** Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89-92.
- Feltus, F. A., Lee, E. K., Costello, J. F., Plass, C. & Vertino, P. M. (2003).** Predicting aberrant CpG island methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12253-12258.
- Ferti, A., Panani, A., Dervenoulas, J. & Raptis, S. A. (1996).** Cytogenetic findings in a Fanconi anemia patient with AML. *Cancer Genet Cytogenet* **90**, 182-183.
- Fialkow, P. J., Singer, J. W., Raskind, W. H., Adamson, J. W., Jacobson, R. J., Bernstein, I. D., Dow, L. W., Najfeld, V. & Veith, R. (1987).** Clonal development, stem-cell differentiation, and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **317**, 468-473.
- Filaci, G., Fravega, M., Setti, M., Traverso, P., Millo, E., Fenoglio, D., Negrini, S., Ferrera, F., Romagnoli, A., Basso, M., Contini, P., Rizzi, M., Ghio, M., Benatti, U., Damonte, G., Ravetti, J. L., Carmignani, G., Zanetti, M. & Indiveri, F. (2006).** Frequency of telomerase-specific CD8+ T lymphocytes in patients with cancer. *Blood* **107**, 1505-1512.
- Fletcher, T. M. & Hansen, J. C. (1996).** The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **6**, 149-188.
- Foster, S. A., Wong, D. J., Barrett, M. T. & Galloway, D. A. (1998).** Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Molecular and cellular biology* **18**, 1793-1801.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Montoya, G., Taysavang, P., Wade, P. A. & Esteller, M. (2003).** The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic acids research* **31**, 1765-1774.
- Franchina, M. & Kay, P. H. (2000).** Evidence that cytosine residues within 5'-CCTGG-3' pentanucleotides can be methylated in human DNA independently of the methylating system that modifies 5'-CG-3' dinucleotides. *DNA Cell Biol* **19**, 521-526.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L. & Paul, C. L. (1992).** A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 1827-1831.
- Gama-Sosa, M. A., Slagel, V. A., Trewyn, R. W., Oxenhandler, R., Kuo, K. C., Gehrke, C. W. & Ehrlich, M. (1983).** The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic acids research* **11**, 6883-6894.
- Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. (1987).** CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology* **196**, 261-282.
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J. J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M. & Stern, P. L. (1997).** Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* **18**, 89-95.
- Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., Leonhardt, H. & Jaenisch, R. (2003).** Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science (New York, NY)* **300**, 489-492.
- Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., Leonhardt, H. & Jaenisch, R. (2003).** Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science (New York, NY)* **300**, 489-492.
- Giles, R. H., Peters, D. J. & Breuning, M. H. (1998).** Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet* **14**, 178-183.

- Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E. & Hayday, A. C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science (New York, NY)* **294**, 605-609.
- Godfrey, D. I., Hammond, K. J., Poulton, L. D., Smyth, M. J. & Baxter, A. G. (2000). NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* **21**, 573-583.
- Goellner, S., Steinbach, D., Schenk, T., Gruhn, B., Zintl, F., Ramsay, E. & Saluz, H. P. (2006). Childhood acute myelogenous leukaemia: association between PRAME, apoptosis- and MDR-related gene expression. *Eur J Cancer* **42**, 2807-2814.
- Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G. & Heinzl, T. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* **20**, 6969-6978.
- Graff, J. R., Gabrielson, E., Fujii, H., Baylin, S. B. & Herman, J. G. (2000). Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *The Journal of biological chemistry* **275**, 2727-2732.
- Graff, J. R., Herman, J. G., Myohanen, S., Baylin, S. B. & Vertino, P. M. (1997). Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *The Journal of biological chemistry* **272**, 22322-22329.
- Greenberg, P. D. (1991). Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol* **49**, 281-355.
- Greiner, J., Ringhoffer, M., Taniguchi, M., Li, L., Schmitt, A., Shiku, H., Dohner, H. & Schmitt, M. (2004). mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int J Cancer* **108**, 704-711.
- Griffioen, M., Kessler, J. H., Borghi, M., van Soest, R. A., van der Minne, C. E., Nouta, J., van der Burg, S. H., Medema, J. P., Schrier, P. I., Falkenburg, J. H., Osanto, S. & Melief, C. J. (2006). Detection and functional analysis of CD8+ T cells specific for PRAME: a target for T-cell therapy. *Clin Cancer Res* **12**, 3130-3136.
- Gruenbaum, Y., Cedar, H. & Razin, A. (1982). Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature* **295**, 620-622.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**, 557-580.
- Haqq, C., Nosrati, M., Sudilovsky, D., Crothers, J., Khodabakhsh, D., Pulliam, B. L., Federman, S., Miller, J. R., 3rd, Allen, R. E., Singer, M. I., Leong, S. P., Ljung, B. M., Sagebiel, R. W. & Kashani-Sabet, M. (2005). The gene expression signatures of melanoma progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6092-6097.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A. & Bloomfield, C. D. (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* **17**, 3835-3849.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H. & Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**, 1983-1993.
- Hendrich, B. & Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Molecular and cellular biology* **18**, 6538-6547.
- Herman, J. G., Merlo, A., Mao, L., Lapidus, R. G., Issa, J. P., Davidson, N. E., Sidransky, D. & Baylin, S. B. (1995). Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer research* **55**, 4525-4530.

- Hermann, A., Gowher, H. & Jeltsch, A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2571-2587.
- Hermann, A., Goyal, R. & Jeltsch, A. (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *The Journal of biological chemistry* **279**, 48350-48359.
- Hermann, A., Schmitt, S. & Jeltsch, A. (2003). The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *The Journal of biological chemistry* **278**, 31717-31721.
- Herranz, M., Martin-Caballero, J., Fraga, M. F., Ruiz-Cabello, J., Flores, J. M., Desco, M., Marquez, V. & Esteller, M. (2006). The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma. *Blood* **107**, 1174-1177.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **11**, 1026-1030.
- Holm, T. M., Jackson-Grusby, L., Brambrink, T., Yamada, Y., Rideout, W. M., 3rd & Jaenisch, R. (2005). Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer Cell* **8**, 275-285.
- Huschtscha, L. I., Noble, J. R., Neumann, A. A., Moy, E. L., Barry, P., Melki, J. R., Clark, S. J. & Reddel, R. R. (1998). Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer research* **58**, 3508-3512.
- Ikeda, H., Lethe, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J. F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T. & Coulie, P. G. (1997). Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* **6**, 199-208.
- Ikeda, H., Matsushita, M. & Kawakami, H. (1999). [PRAME protein expressed in leukemia cells as a target molecule for immunotherapy]. *Rinsho Ketsueki* **40**, 484-486.
- Issa, J. P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature reviews* **4**, 988-993.
- Issa, J. P., Ahuja, N., Toyota, M., Bronner, M. P. & Brentnall, T. A. (2001). Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer research* **61**, 3573-3577.
- Issa, J. P., Baylin, S. B. & Herman, J. G. (1997). DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia* **11 Suppl 1**, S7-11.
- Issa, J. P., Garcia-Manero, G., Giles, F. J., Mannari, R., Thomas, D., Faderl, S., Bayar, E., Lyons, J., Rosenfeld, C. S., Cortes, J. & Kantarjian, H. M. (2004). Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* **103**, 1635-1640.
- Issa, J. P., Garcia-Manero, G., Giles, F. J., Mannari, R., Thomas, D., Faderl, S., Bayar, E., Lyons, J., Rosenfeld, C. S., Cortes, J. & Kantarjian, H. M. (2004). Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* **103**, 1635-1640.
- Issa, J. P., Ottaviano, Y. L., Celano, P., Hamilton, S. R., Davidson, N. E. & Baylin, S. B. (1994). Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nature genetics* **7**, 536-540.
- Jaenisch, R. & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* **33 Suppl**, 245-254.
- Jakobisiak, M., Lasek, W. & Golab, J. (2003). Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* **90**, 103-122.
- Jassim, A., Ollier, W., Payne, A., Biro, A., Oliver, R. T. & Festenstein, H. (1989). Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *European journal of immunology* **19**, 1215-1220.

- Jones, P. A. (1996). DNA methylation errors and cancer. *Cancer research* **56**, 2463-2467.
- Jones, P. A. & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**, 415-428.
- Jones, P. A. & Laird, P. W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nature genetics* **21**, 163-167.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. & Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature genetics* **19**, 187-191.
- Jost, J. P., Siegmund, M., Sun, L. & Leung, R. (1995). Mechanisms of DNA demethylation in chicken embryos. Purification and properties of a 5-methylcytosine-DNA glycosylase. *The Journal of biological chemistry* **270**, 9734-9739.
- Kaneda, A., Tsukamoto, T., Takamura-Enya, T., Watanabe, N., Kaminishi, M., Sugimura, T., Tatematsu, M. & Ushijima, T. (2004). Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer Sci* **95**, 58-64.
- Kawakami, K., Brabender, J., Lord, R. V., Groshen, S., Greenwald, B. D., Krasna, M. J., Yin, J., Fleisher, A. S., Abraham, J. M., Beer, D. G., Sidransky, D., Huss, H. T., Demeester, T. R., Eads, C., Laird, P. W., Ilson, D. H., Kelsen, D. P., Harpole, D., Moore, M. B., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V. & Meltzer, S. J. (2000). Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 1805-1811.
- Kersting, M., Friedl, C., Kraus, A., Behn, M., Pankow, W. & Schuermann, M. (2000). Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol* **18**, 3221-3229.
- Klose, R. J., Sarraf, S. A., Schmiedeberg, L., McDermott, S. M., Stancheva, I. & Bird, A. P. (2005). DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol Cell* **19**, 667-678.
- Knudson, A. G. (2000). Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* **34**, 1-19.
- Koyama, S., Maruyama, T., Adachi, S. & Nozue, M. (1998). Expression of costimulatory molecules, B7-1 and B7-2 on human gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **124**, 383-388.
- Laird, P. W. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature reviews* **3**, 253-266.
- Laird, P. W. & Jaenisch, R. (1996). The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* **30**, 441-464.
- Le Gouill, S., Pellat-Deceunynck, C., Housseau, J. L., Rapp, M. J., Robillard, N., Bataille, R. & Amiot, M. (2002). Farnesyl transferase inhibitor R115777 induces apoptosis of human myeloma cells. *Leukemia* **16**, 1664-1667.
- Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D. & Wolffe, A. P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**, 73-84.
- Lehmann, U., Berg-Ribbe, I., Wingen, L. U., Brakensiek, K., Becker, T., Klempnauer, J., Schlegelberger, B., Kreipe, H. & Flemming, P. (2005). Distinct methylation patterns of benign and malignant liver tumors revealed by quantitative methylation profiling. *Clin Cancer Res* **11**, 3654-3660.
- Li, C. M., Guo, M., Borczuk, A., Powell, C. A., Wei, M., Thaker, H. M., Friedman, R., Klein, U. & Tycko, B. (2002). Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol* **160**, 2181-2190.
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**, 662-673.

- Li, E., Beard, C., Forster, A. C., Bestor, T. H. & Jaenisch, R. (1993). DNA methylation, genomic imprinting, and mammalian development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**, 297-305.
- Li, E., Bestor, T. H. & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915-926.
- Li, L., Giannopoulos, K., Reinhardt, P., Tabarkiewicz, J., Schmitt, A., Greiner, J., Rolinski, J., Hus, I., Dmoszynska, A., Wiesneth, M. & Schmitt, M. (2006). Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts. *Int J Oncol* **28**, 855-861.
- Lindahl, T. (1982). DNA repair enzymes. *Annual review of biochemistry* **51**, 61-87.
- Litvinov, S. V., Balzar, M., Winter, M. J., Bakker, H. A., Briaire-de Bruijn, I. H., Prins, F., Fleuren, G. J. & Warnaar, S. O. (1997). Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol* **139**, 1337-1348.
- Litvinov, S. V., Velders, M. P., Bakker, H. A., Fleuren, G. J. & Warnaar, S. O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* **125**, 437-446.
- Liu, K., Wang, Y. F., Cantemir, C. & Muller, M. T. (2003). Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Molecular and cellular biology* **23**, 2709-2719.
- Mahlknecht, U. & Hoelzer, D. (2000). Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. *Mol Med* **6**, 623-644.
- Malone, C. S., Miner, M. D., Doerr, J. R., Jackson, J. P., Jacobsen, S. E., Wall, R. & Teitell, M. (2001). CmC(A/T)GG DNA methylation in mature B cell lymphoma gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10404-10409.
- Mann, J. R., Szabo, P. E., Reed, M. R. & Singer-Sam, J. (2000). Methylated DNA sequences in genomic imprinting. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**, 241-257.
- Matsushita, M., Ikeda, H., Kizaki, M., Okamoto, S., Ogasawara, M., Ikeda, Y. & Kawakami, Y. (2001). Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia. *Br J Haematol* **112**, 916-926.
- Melki, J. R. & Clark, S. J. (2002). DNA methylation changes in leukaemia. *Semin Cancer Biol* **12**, 347-357.
- Melki, J. R., Warnecke, P., Vincent, P. C. & Clark, S. J. (1998). Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia. *Leukemia* **12**, 311-316.
- Mirro, J., Jr., Kalwinsky, D. K., Grier, H. E., Santana, V. M., Mason, C., Murphy, S. B. & Dahl, G. V. (1989). Effective reinduction therapy for childhood acute nonlymphoid leukemia using simultaneous continuous infusions of teniposide and amsacrine. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **24**, 123-127.
- Mizuno, S., Chijiwa, T., Okamura, T., Akashi, K., Fukumaki, Y., Niho, Y. & Sasaki, H. (2001). Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* **97**, 1172-1179.
- Monk, M. (1995). Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev Genet* **17**, 188-197.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389.
- Neumann, E., Engelsberg, A., Decker, J., Storkel, S., Jaeger, E., Huber, C. & Seliger, B. (1998). Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer research* **58**, 4090-4095.

- Ng, H. H., Jeppesen, P. & Bird, A. (2000).** Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Molecular and cellular biology* **20**, 1394-1406.
- Novellino, L., Castelli, C. & Parmiani, G. (2005).** A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 187-207.
- Noyer-Weidner, M. & Trautner, T. A. (1993).** Methylation of DNA in prokaryotes. *EXS* **64**, 39-108.
- Oberthuer, A., Hero, B., Spitz, R., Berthold, F. & Fischer, M. (2004).** The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* **10**, 4307-4313.
- Ochsenbein, A. F., Sierro, S., Odermatt, B., Pericin, M., Karrer, U., Hermans, J., Hemmi, S., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (2001).** Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* **411**, 1058-1064.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. (1999).** DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257.
- Okano, M., Xie, S. & Li, E. (1998).** Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature genetics* **19**, 219-220.
- Old, L. J. (2001).** Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun* **1**, 1.
- Old, L. J. & Chen, Y. T. (1998).** New paths in human cancer serology. *J Exp Med* **187**, 1163-1167.
- Olek, A., Oswald, J. & Walter, J. (1996).** A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic acids research* **24**, 5064-5066.
- O'Neill, R. J., O'Neill, M. J. & Graves, J. A. (1998).** Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature* **393**, 68-72.
- Ossendorp, F., Mengede, E., Camps, M., Filius, R. & Melief, C. J. (1998).** Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J Exp Med* **187**, 693-702.
- Paydas, S., Tanriverdi, K., Yavuz, S., Disel, U., Baslamisli, F. & Burgut, R. (2005).** PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: clinical importance and future prospects. *Am J Hematol* **79**, 257-261.
- Paz, M. F., Wei, S., Cigudosa, J. C., Rodriguez-Perales, S., Peinado, M. A., Huang, T. H. & Esteller, M. (2003).** Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colon cancer cells deficient in DNA methyltransferases. *Hum Mol Genet* **12**, 2209-2219.
- Pellat-Deceunynck, C., Mellerin, M. P., Labarriere, N., Jego, G., Moreau-Aubry, A., Harousseau, J. L., Jotereau, F. & Bataille, R. (2000).** The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells. *European journal of immunology* **30**, 803-809.
- Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45.
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A. & Klein, P. S. (2001).** Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *The Journal of biological chemistry* **276**, 36734-36741.
- Polo, J. M., Juszczynski, P., Monti, S., Cerchietti, L., Ye, K., Greally, J. M., Shipp, M. & Melnick, A. (2007).** Transcriptional signature with differential expression of BCL6 target genes accurately identifies BCL6-dependent diffuse large B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 3207-3212.

- Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R. D. & Roberts, R. J. (1999).** Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 33002-33010.
- Proto-Siqueira, R., Figueiredo-Pontes, L. L., Panepucci, R. A., Garcia, A. B., Rizzatti, E. G., Nascimento, F. M., Ishikawa, H. C., Larson, R. E., Falcao, R. P., Simpson, A. J., Gout, I., Filonenko, V., Rego, E. M. & Zago, M. A. (2006).** PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Leuk Res* **30**, 1333-1339.
- Pui, C. H., Behm, F. G., Raimondi, S. C., Dodge, R. K., George, S. L., Rivera, G. K., Mirro, J., Jr., Kalwinsky, D. K., Dahl, G. V. & Murphy, S. B. (1989).** Secondary acute myeloid leukemia in children treated for acute lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine* **321**, 136-142.
- Qu, G., Dubeau, L., Narayan, A., Yu, M. C. & Ehrlich, M. (1999).** Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat Res* **423**, 91-101.
- Quatan, N., Spicer, J., Plunkett, T. & Pandha, H. (2004).** Cellular immunotherapy for cancer: current concepts and clinical perspectives scientific basis and approaches for therapeutic cancer vaccines. Part I. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* **16**, 356-365.
- Quesnel, B., Guillermin, G., Vereecque, R., Wattel, E., Preudhomme, C., Bauters, F., Vanrumbeke, M. & Fenaux, P. (1998).** Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* **91**, 2985-2990.
- Radich, J. P., Dai, H., Mao, M., Oehler, V., Schelter, J., Druker, B., Sawyers, C., Shah, N., Stock, W., Willman, C. L., Friend, S. & Linsley, P. S. (2006).** Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2794-2799.
- Rainier, S., Johnson, L. A., Dobry, C. J., Ping, A. J., Grundy, P. E. & Feinberg, A. P. (1993).** Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* **362**, 747-749.
- Ramchandani, S., Bhattacharya, S. K., Cervoni, N. & Szyf, M. (1999).** DNA methylation is a reversible biological signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6107-6112.
- Razin, A. & Riggs, A. D. (1980).** DNA methylation and gene function. *Science (New York, NY)* **210**, 604-610.
- Razin, A., Szyf, M., Kafri, T., Roll, M., Giloh, H., Scarpa, S., Carotti, D. & Cantoni, G. L. (1986).** Replacement of 5-methylcytosine by cytosine: a possible mechanism for transient DNA demethylation during differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 2827-2831.
- Reik, W. & Walter, J. (2001).** Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* **2**, 21-32.
- Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P. F. & Parmiani, G. (2001).** A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* **50**, 3-15.
- Rhee, I., Bachman, K. E., Park, B. H., Jair, K. W., Yen, R. W., Schuebel, K. E., Cui, H., Feinberg, A. P., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Baylin, S. B. & Vogelstein, B. (2002).** DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* **416**, 552-556.
- Rhee, I., Jair, K. W., Yen, R. W., Lengauer, C., Herman, J. G., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Baylin, S. B. & Schuebel, K. E. (2000).** CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* **404**, 1003-1007.
- Robertson, K. D. (2005).** DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* **6**, 597-610.

- Robertson, K. D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P. A., Jones, P. L. & Wolffe, A. P. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nature genetics* **25**, 338-342.
- Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Agirre, X., Castillejo, J. A., Navarro, G., Jose-Eneriz, E. S., Garate, L., Cordeu, L., Cervantes, F., Prosper, F., Heiniger, A. & Torres, A. (2007). Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*.
- Ross, M. E., Mahfouz, R., Onciu, M., Liu, H. C., Zhou, X., Song, G., Shurtleff, S. A., Pounds, S., Cheng, C., Ma, J., Ribeiro, R. C., Rubnitz, J. E., Girtman, K., Williams, W. K., Raimondi, S. C., Liang, D. C., Shih, L. Y., Pui, C. H. & Downing, J. R. (2004). Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood* **104**, 3679-3687.
- Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry* **70**, 81-120.
- Rudolf, M. P., Man, S., Melief, C. J., Sette, A. & Kast, W. M. (2001). Human T-cell responses to HLA-A-restricted high binding affinity peptides of human papillomavirus type 18 proteins E6 and E7. *Clin Cancer Res* **7**, 788s-795s.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Scandura, J. M., Boccuni, P., Cammenga, J. & Nimer, S. D. (2002). Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme. *Oncogene* **21**, 3422-3444.
- Scanlan, M. J., Chen, Y. T., Williamson, B., Gure, A. O., Stockert, E., Gordan, J. D., Tureci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M. & Old, L. J. (1998). Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer* **76**, 652-658.
- Shaker, S., Bernstein, M., Momparler, L. F. & Momparler, R. L. (2003). Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells. *Leuk Res* **27**, 437-444.
- Shaker, S., Bernstein, M., Momparler, L. F. & Momparler, R. L. (2003). Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells. *Leuk Res* **27**, 437-444.
- Sidransky, D. (2002). Emerging molecular markers of cancer. *Nature reviews* **2**, 210-219.
- Sigalotti, L., Fratta, E., Coral, S., Tanzarella, S., Danielli, R., Colizzi, F., Fonsatti, E., Traversari, C., Altomonte, M. & Maio, M. (2004). Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer research* **64**, 9167-9171.
- Singal, R. & Ginder, G. D. (1999). DNA methylation. *Blood* **93**, 4059-4070.
- Singer-Sam, J., LeBon, J. M., Tanguay, R. L. & Riggs, A. D. (1990). A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA from a small number of cells. *Nucleic acids research* **18**, 687.
- Smiraglia, D. J., Rush, L. J., Fruhwald, M. C., Dai, Z., Held, W. A., Costello, J. F., Lang, J. C., Eng, C., Li, B., Wright, F. A., Caligiuri, M. A. & Plass, C. (2001). Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet* **10**, 1413-1419.
- Smyth, M. J., Godfrey, D. I. & Trapani, J. A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* **2**, 293-299.
- Soengas, M. S., Capodiceci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J. G., Gerald, W. L., Lazebnik, Y. A., Cordon-Cardo, C.

- & Lowe, S. W. (2001).** Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* **409**, 207-211.
- Steinbach, D., Hermann, J., Viehmann, S., Zintl, F. & Gruhn, B. (2002).** Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* **133**, 118-123.
- Steinbach, D., Schramm, A., Eggert, A., Onda, M., Dawczynski, K., Rump, A., Pastan, I., Wittig, S., Pfaffendorf, N., Voigt, A., Zintl, F. & Gruhn, B. (2006).** Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* **12**, 2434-2441.
- Steinbach, D., Viehmann, S., Zintl, F. & Gruhn, B. (2002).** PRAME gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* **138**, 89-91.
- Stephan, J. P., Roberts, P. E., Bald, L., Lee, J., Gu, Q., Devaux, B. & Mather, J. P. (1999).** Selective cloning of cell surface proteins involved in organ development: epithelial glycoprotein is involved in normal epithelial differentiation. *Endocrinology* **140**, 5841-5854.
- Sterner, D. E. & Berger, S. L. (2000).** Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 435-459.
- Strahl, B. D. & Allis, C. D. (2000).** The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Tajeddine, N., Gala, J. L., Louis, M., Van Schoor, M., Tombal, B. & Gailly, P. (2005).** Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo. *Cancer research* **65**, 7348-7355.
- Takai, D. & Jones, P. A. (2002).** Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 3740-3745.
- Tang, X., Khuri, F. R., Lee, J. J., Kemp, B. L., Liu, D., Hong, W. K. & Mao, L. (2000).** Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 1511-1516.
- Tazi, J. & Bird, A. (1990).** Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* **60**, 909-920.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M. B., Vanin, E. F., Grenet, J., Valentine, V. A., Behm, F. G., Look, A. T., Lahti, J. M. & Kidd, V. J. (2000).** Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* **6**, 529-535.
- Timmermann, S., Lehrmann, H., Polesskaya, A. & Harel-Bellan, A. (2001).** Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci* **58**, 728-736.
- Tommasi, S., Denissenko, M. F. & Pfeifer, G. P. (1997).** Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases. *Cancer research* **57**, 4727-4730.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B. & Issa, J. P. (1999).** CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8681-8686.
- Toyota, M., Kopecky, K. J., Toyota, M. O., Jair, K. W., Willman, C. L. & Issa, J. P. (2001).** Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* **97**, 2823-2829.
- Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y. & Koizumi, K. (1976).** A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot (Tokyo)* **29**, 1-6.
- Uchida, T., Kinoshita, T., Nagai, H., Nakahara, Y., Saito, H., Hotta, T. & Murate, T. (1997).** Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood* **90**, 1403-1409.
- Urnov, F. D., Yee, J., Sachs, L., Collingwood, T. N., Bauer, A., Beug, H., Shi, Y. B. & Wolffe, A. P. (2000).** Targeting of N-CoR and histone deacetylase 3 by the

- oncoprotein v-erbA yields a chromatin infrastructure-dependent transcriptional repression pathway. *EMBO J* **19**, 4074-4090.
- Van den Eynde, B. J. & van der Bruggen, P. (1997).** T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* **9**, 684-693.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. & Boon, T. (1991).** A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, NY)* **254**, 1643-1647.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. & Boon, T. (1991).** A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, NY)* **254**, 1643-1647.
- van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R. & Friend, S. H. (2002).** Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530-536.
- Vertino, P. M., Yen, R. W., Gao, J. & Baylin, S. B. (1996).** De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Molecular and cellular biology* **16**, 4555-4565.
- Villar-Garea, A. & Esteller, M. (2004).** Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* **112**, 171-178.
- Vonderheide, R. H. (2002).** Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Oncogene* **21**, 674-679.
- Wade, P. A. (2001).** Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* **20**, 3166-3173.
- Waki, T., Tamura, G., Sato, M. & Motoyama, T. (2003).** Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene* **22**, 4128-4133.
- Wang, H. Y., Lee, D. A., Peng, G., Guo, Z., Li, Y., Kiniwa, Y., Shevach, E. M. & Wang, R. F. (2004).** Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* **20**, 107-118.
- Wang, J., Sauntharajah, Y., Redner, R. L. & Liu, J. M. (1999).** Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer research* **59**, 2766-2769.
- Wang, R. F. & Rosenberg, S. A. (1999).** Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev* **170**, 85-100.
- Wang, Y. & Leung, F. C. (2004).** An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics* **20**, 1170-1177.
- Watanabe, Y., LePage, S., Elliott, M., Secrist, H., Tanaka, T., Kawahara, M., Matsumura, A., Hosoe, S., Ogawara, M., Okada, M., Repasky, B., Sleath, P., Wang, T. & Henderson, R. (2006).** Characterization of preexisting humoral immunity specific for two cancer-testis antigens overexpressed at the mRNA level in non-small cell lung cancer. *Cancer Immun* **6**, 3.
- Watari, K., Tojo, A., Nagamura-Inoue, T., Nagamura, F., Takeshita, A., Fukushima, T., Motoji, T., Tani, K. & Asano, S. (2000).** Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. *FEBS Lett* **466**, 367-371.
- Whiteside, T. L. & Herberman, R. B. (1995).** The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* **7**, 704-710.
- Wilkinson, J., Cope, A., Gill, J., Bourboulia, D., Hayes, P., Imami, N., Kubo, T., Marcelin, A., Calvez, V., Weiss, R., Gazzard, B., Boshoff, C. & Gotch, F. (2002).** Identification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)-specific cytotoxic

T-lymphocyte epitopes and evaluation of reconstitution of KSHV-specific responses in human immunodeficiency virus type 1-Infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Virol* **76**, 2634-2640.

- Willenbrock, K., Koppers, R., Renne, C., Brune, V., Eckerle, S., Weidmann, E., Brauning, A. & Hansmann, M. L. (2006).** Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* **91**, 596-604.
- Wolffe, A. P., Jones, P. L. & Wade, P. A. (1999).** DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 5894-5896.
- Wong, I. H., Ng, M. H., Huang, D. P. & Lee, J. C. (2000).** Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood* **95**, 1942-1949.
- Wood, K. V., de Wet, J. R., Dewji, N. & DeLuca, M. (1984).** Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Commun* **124**, 592-596.
- Workman, J. L. & Kingston, R. E. (1998).** Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annual review of biochemistry* **67**, 545-579.
- Wurm, J., Constantinidis, J., Bogeschdorfer, F., Baenkler, H., Bowing, B. & Iro, H. (2001).** [Eicosanoid metabolism in peripheral blood cells in patients with cystic fibrosis]. *Hno* **49**, 922-926.
- Yamashita, K., Dai, T., Dai, Y., Yamamoto, F. & Perucho, M. (2003).** Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell* **4**, 121-131.
- Yoder, J. A., Walsh, C. P. & Bestor, T. H. (1997).** Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* **13**, 335-340.
- Yoo, C. B., Cheng, J. C. & Jones, P. A. (2004).** Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. *Biochem Soc Trans* **32**, 910-912.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. & Beppu, T. (1990).** Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *The Journal of biological chemistry* **265**, 17174-17179.
- Zawel, L. & Reinberg, D. (1995).** Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annual review of biochemistry* **64**, 533-561.
- Zawel, L. & Reinberg, D. (1995).** Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annual review of biochemistry* **64**, 533-561.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: FAB-Klassifikation der AML.....	- 3 -
Abbildung 1.2: T-Zell-Erkennung von Tumorantigenen [aus Cancer Medicine].	- 4 -
Abbildung 1.3: Chromatinmodifikationen.....	- 8 -
Abbildung 1.4: Transitionen von Cytosin.....	- 10 -
Abbildung 1.5: Modell der PRAME-Funktion in Tumorzellen [aus Epping & Bernards 2006].	- 22 -
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konvertierung [Clark <i>et al.</i> 1994] ..	- 40 -
Abbildung 3.1: <i>PRAME</i> -mRNA-Level in humanen Zelllinien, AML-Patienten-, und Kontrollproben.	- 49 -
Abbildung 3.2: Das <i>PRAME</i> -Gen.	- 50 -
Abbildung 3.3: <i>PRAME</i> -Transkripte in K562.....	- 52 -
Abbildung 3.4: <i>PRAME</i> -Transkripte und deren Verteilung in der Zelle.	- 53 -
Abbildung 3.5: <i>PRAME</i> -Expression in HeLa- und CaSki-Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-dC), Valproinsäure (VPA) oder Trichostatin A (TSA).	- 55 -
Abbildung 3.6: Methylation-specific-PCR (MSP) von CpG +13 des <i>PRAME</i> -Promotors.	- 56 -
Abbildung 3.7: DNA-Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung.	- 57 -
Abbildung 3.8: DNA-Methylierungsanalyse nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin.	- 59 -
Abbildung 3.9: Dual-Luciferase Reporter Assay des <i>PRAME</i> -Promotors.....	- 60 -
Abbildung 3.10: Überexpression von <i>PRAME</i> in CaSki-Zellen.....	- 61 -
Abbildung 3.11: Stilllegung von <i>PRAME</i> in HeLa-Zellen.....	- 62 -
Abbildung 4.1 Modell der <i>PRAME</i> -Regulation.....	- 75 -

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: <i>PRAME</i> -Expression in Tumoren und normalen Geweben [nach Epping et al. 2006].	- 19 -
Tabelle 2.1: Geräte und Laborausstattung	- 27 -
Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien	- 27 -
Tabelle 2.3: Chemikalien	- 28 -
Tabelle 2.4: Puffer, Lösungen und Medien	- 29 -
Tabelle 2.5: DNA-Leitern und Vektoren	- 30 -
Tabelle 2.6: siRNAs	- 30 -
Tabelle 2.7: PCR-Primer für den Dual-Luciferase-Assay	- 30 -
Tabelle 2.8: Primer für die Methylierungsanalyse durch genomische Sequenzierung	- 30 -
Tabelle 2.9: Primer für die Analyse der <i>PRAME</i> -Transkripte	- 31 -
Tabelle 2.10: Primer für methylation-specific-PCR (MSP)	- 31 -
Tabelle 2.11: Primer für die RTQ-PCR	- 31 -
Tabelle 2.12: Enzyme und Kits	- 32 -
Tabelle 2.13: Software	- 32 -
Tabelle 2.14: Verwendete humane Zelllinien	- 33 -
Tabelle 2.15: Patientenproben und Kontrollen	- 33 -
Tabelle 2.16: Ansatz für quantitative Real time PCR	- 38 -
Tabelle 2.17: Programm für quantitative Real time PCR	- 38 -
Tabelle 2.18: Ansätze für die Bisulfit Sequencing Nested-PCR	- 40 -
Tabelle 2.19: Programme für die Bisulfit Sequencing Nested-PCR	- 41 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius	INR	Initiator Element
5-Aza-dC	5-Aza-2'-Desoxycytidin	kDa	Kilodalton
Amp	Ampicillin	LB	Luria Bertani (Medium)
As	Aminosäure	M	Molar (mol/Liter)
bp	Basenpaare	MgSO ₄	Magnesiumsulfat
bzw.	beziehungsweise	min	Minute
ca.	circa	mRNA	messenger-RNA
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	n. b.	nicht bestimmt
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	NaOH	Natriumhydroxyd
DLR	Dual-Luciferase Reporter Assay	PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerasekettenreaktion
dNTP	desoxy Ribonukleosid-(5')- Triphosphat	PLB	Passiver-Lysis-Puffer
DPE	Downstream Promotorelement	RLU	relative light units (relative Lichteinheiten)
dsDNA	double stranded DNA (doppelsträngige DNA)	RNA	Ribonukleinsäure
E	Effizienz	RT	Raumtemperatur
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	RT-PCR	reverse Transkription
g	Gravitationskonstante	sec	Sekunden
h	Stunde	ssDNA	single stranded DNA (einzelsträngige DNA)
HBS	HEPES buffered saline (HEPES gepufferte Salzlösung)	TdT	Terminale Deoxynukleotid Transferase
HCl	Salzsäure	TKS	Transkriptionsstart
HEPES	N- (2-Hydroxyethyl) - piperazine-N'-2-ethane- Sulfonicacid	TrisHCL	Tris Base-Puffer (auf spez. pH-Wert mit Salzsäure eingestellt)
i. d. R.	in der Regel	TSP	Transkriptionsstartpunkt
IGL	Immunglobulin-Lambda- Locus	TV	Transkriptvariante
		U	Unit
		z. B.	zum Beispiel
		NanoDrop	NanoDrop TM Spektrometer

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während des Studiums und der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. H. P. Saluz möchte ich sehr für die Überlassung des Themas, die Schaffung der guten Arbeitsbedingungen, seine wissenschaftlichen Anregungen und das stete Interesse am Fortgang und Gelingen dieser Arbeit danken.

Dr. Thomas Munder sei an dieser Stelle für die Übernahme des Zweitgutachtens und sein dafür aufgebrachtes Engagement gedankt.

Dr. Steinbach möchte ich für die Bereitstellung der AML-Patientenproben, die hilfreichen Hinweise und sein stetes Interesse an dieser Arbeit danken.

Dr. Krügel, Dr. Hähnel und besonders Dr. Tretiakov gilt mein Dank für die kritischen Hinweise, Anregungen und Diskussionen.

Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern der Abteilung Zell- und Molekularbiologie für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre meinen Dank aussprechen. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei unser aller Labor-Fee Grit ohne die so manches Experiment wohl nicht gelungen währ.

Besonders(t) bedanken möchte ich mich auch bei Katrin für alle biologischen und nichtbiologischen Tipps und Gespräche und die sehr gute, kritische Durchsicht der vorliegenden Schrift.

Ein extra dickes Danke geht an Sven für seine stets brillanten Ideen und die Hilfe bei der grafischen Umsetzung dieser Arbeit.

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich immer in jeder Hinsicht unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle einen besonders herzlichen Dank aussprechen.

Abschließend möchte ich nicht versäumen, all meinen anderen Freunden und besonders Steffi, ohne die diese Arbeit vermutlich nie Fristgerecht eingereicht worden wäre, für ihre Unterstützung und die schöne Zeit außerhalb des Labors danken.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder mittelbar, noch unmittelbar Geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten die im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation stehen. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ist mir bekannt.

Jena, den 12.07.07

Tino Schenk

LEBENS LAUF

Persönliche Informationen

- Geburtstag: 29.11.1978
- Geburtsort: Salzwedel

Ausbildung

- 1985/91 Einschulung in die „Ernst Thälmann Oberschule“ Weimar
- 1991/92 Besuch des „Goethe Gymnasium“ Weimar
- 1992/97 Besuch des „Schiller Gymnasium“ Weimar
- 1997 Abitur
- 1998/00 Biologiestudium an der FSU-Jena
- 2000/01 Erasmus-Student an der University of Birmingham
- 2001/04 Biologiestudium an der FSU-Jena. Abschluss als Diplombiologe
- 2004 Beginn der Promotion am HKI-Jena

Ersatzdienst

- 1997/98 Zivildienst am Klinikum der FSU-Jena

PUBLIKATIONEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Publikationen erstellt:

Goellner, S., Steinbach, D., Schenk, T., Gruhn, B., Zintl, F., Ramsay, E. & Saluz, H. P. (2006). Childhood acute myelogenous leukaemia: Association between PRAME, apoptosis- and MDR-related gene expression. *Eur J Cancer* **42**, 2807–2814.

Schenk, T., Stengel, S., Goellner, S., Steinbach, D. & Saluz, H. P. (2007). Hypomethylation of *PRAME* is Responsible for its Aberrant Overexpression in Human Malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* **46**, 796-804.

ANHANG

In Tabelle A.1 sind Bindungsstellen möglicher Transkriptionsfaktoren in der PRAME-Promotor und 5'-Region von Position -550 bis +350 relativ zum ersten TSP aufgelistet, deren Bindung möglich sein könnte. Opt. bezeichnet das Threshold-Level für den jeweiligen Faktor, es sollte einen geringeren Wert aufweisen, als die Matrix-Similarität (Matr.). Str. (Strang) bezeichnet die Binderichtung des Faktors ((+) in Transkriptionsrichtung, (-) entgegen der Transkriptionsrichtung) und Pos. (Position) die relative Lage zum ersten TSP.

Tabelle A1: Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Transkriptionsfaktor	Opt.	Start	Ende	Str.	Matr.
GATA binding factor	0,93	-534	-522	-	0,986
Winged-helix transcription factor IL-2 enhancer binding factor (ILF), forkhead box K2 (FOXK2)	0,98	-525	-509	-	0,972
Ikaros 2, potential regulator of lymphocyte differentiation	0,98	-510	-498	-	0,961
Cut-like homeodomain protein	0,94	-493	-475	-	0,972
TCF11/LCR-F1/Nrf1 homodimers	1	-481	-475	-	0,993
Gut-enriched Krueppel-like factor	0,96	-477	-465	-	0,952
Winged-helix transcription factor IL-2 enhancer binding factor (ILF), forkhead box K2 (FOXK2)	0,98	-461	-445	-	0,969
MEL1 (MDS1/EVI1-like gene 1) DNA-binding domain 2	0,99	-445	-429	-	0,963
Ikaros 2, potential regulator of lymphocyte differentiation	0,98	-430	-418	+	0,968
Non-palindromic nuclear factor I binding sites	0,92	-408	-388	-	0,978
Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	-400	-392	+	0,989
Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	-389	-381	+	0,984
NMP4 (nuclear matrix protein 4) / CIZ (Cas-interacting zinc finger protein)	0,97	-366	-356	+	0,958
Activator protein 2	0,9	-313	-299	+	0,955
Transcription factor Kaiso, ZBTB33	0,92	-306	-296	-	0,988
Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	-289	-281	-	0,995
MYC-associated zinc finger protein related transcription factor	0,88	-289	-277	-	0,978
Zinc finger transcription factor ZBP-89	0,93	-292	-270	+	0,961
Kruppel-like zinc finger protein 219	0,91	-289	-267	+	0,998
Gut-enriched Krueppel-like factor	0,96	-278	-266	-	0,95
Winged-helix transcription factor IL-2 enhancer binding factor (ILF), forkhead box K2 (FOXK2)	0,98	-270	-254	+	1
Purine-rich element binding protein A	0,97	-250	-238	+	0,96
Zinc finger transcription factor RU49	0,98	-243	-237	+	0,979
Zinc finger transcription factor RU49	0,98	-242	-236	-	0,988
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3	0,98	-243	-233	+	0,951
Ikaros 2, potential regulator of lymphocyte differentiation	0,98	-241	-229	-	0,964
GATA binding factor	0,93	-226	-214	+	0,986

Sox-5	0,87	-221	-205	+	0,987
Cell cycle gene homology region (CDE/CHR tandem elements regulate cell cycle dependent repression)	0,92	-216	-204	-	0,957
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	0,98	-188	-168	+	0,962
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	0,98	-178	-158	+	0,996
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	0,98	-174	-154	-	0,957
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	0,98	-163	-143	+	0,967
Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene Spi1/transcription factor PU.1	0,96	-157	-137	-	0,968
Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	-123	-115	-	0,99
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	0,98	-111	-91	-	0,977
Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	-101	-93	-	0,985
MEF3 binding site, present in skeletal muscle-specific transcriptional enhancers	0,89	-86	-74	-	0,987
Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	-75	-67	-	0,989
LyF-1 (Ikaros 1), enriched in B and T lymphocytes	0,98	-61	-49	+	0,97
Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene Spi1/transcription factor PU.1	0,96	-61	-41	+	0,987
Homeodomain protein NKX3.2 (BAPX1, NKX3B, Bagpipe homolog)	0,96	-57	-43	+	0,952
Octamer-binding factor 1	0,85	-48	-34	-	0,971
Winged-helix transcription factor IL-2 enhancer binding factor (ILF), forkhead box K2 (FOXK2)	0,98	-33	-17	-	0,97
Smad3 transcription factor involved in TGF-beta signaling	0,99	-4	4	-	0,982
Elk-1	0,91	1	21	-	0,969
Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	33	41	-	0,973
Basic krueppel-like factor (KLF3)	0,95	80	96	-	0,967
Ikaros 2, potential regulator of lymphocyte differentiation	0,98	93	105	-	0,965
Binding site for monomeric Meis1 homeodomain protein	0,95	109	119	+	0,998
Winged-helix transcription factor IL-2 enhancer binding factor (ILF), forkhead box K2 (FOXK2)	0,98	108	124	+	0,959
AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)	0,98	116	128	+	0,957
Modulator recognition factor 2 (MRF2, ARID5B)	0,98	121	129	-	0,97
Human zinc finger protein ZNF35	0,96	123	135	-	0,95
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	0,98	134	154	-	0,977
Ikaros 2, potential regulator of lymphocyte differentiation	0,98	154	166	+	0,951
Kruppel-like zinc finger protein 219	0,91	178	200	-	0,958
Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	188	196	+	0,973
Zinc finger transcription factor ZBP-89	0,93	181	203	-	0,979
Collagen krox protein (zinc finger protein 67 - zfp67)	0,88	187	203	+	0,957
Myc associated zinc finger protein (MAZ)	0,9	189	201	+	1
Kidney-enriched kruppel-like factor, KLF15	0,91	189	205	+	0,979
Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	193	201	+	0,991
Purine-rich element binding protein A	0,97	192	204	+	0,981
Myc associated zinc finger protein (MAZ)	0,9	194	206	+	0,969

Kidney-enriched kruppel-like factor, KLF15	0,91	194	210	+	0,98
Homeobox transcription factor Nanog	0,94	203	219	+	0,969
AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)	0,98	230	242	-	0,973
Nuclear factor of activated T-cells	0,95	229	247	+	0,968
Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	238	246	+	0,975
Myc associated zinc finger protein (MAZ)	0,9	244	256	+	0,969
Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	248	256	+	0,991
MyT1 zinc finger transcription factor	0,88	270	282	+	0,991
Ikaros 2, potential regulator of lymphocyte differentiation	0,98	276	288	+	0,992
AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)	0,98	279	291	-	0,982
Zinc finger / POZ domain transcription factor	0,95	308	318	-	0,956
Binding site for S8 type homeodomains	0,97	326	338	+	0,999
SIX3 / SIXdomain (SD) and Homeodomain (HD) transcription factor	1	329	337	-	0,953
Photoreceptor conserved element 1	0,89	327	343	+	0,958