

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expressionsanalyse der DNA-Methyltransferasen DNMT1
und DNMT3b bei akuten Leukämien im Kindesalter**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Alexander Höche
aus Bonn

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger
 2. Priv.-Doz. Dr. med. Chr. Scholz
 3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Claviez

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Einleitung | 6 |
| 1.1 | DNA-Methylierung: Epigenetische Regulation des Genoms | 6 |
| 1.1.1 | Grundlagen | 6 |
| 1.1.2 | Muster der DNA-Methylierung im Genom | 7 |
| 1.1.3 | Bedeutung der DNA-Methylierung | 7 |
| 1.1.4 | DNA-Methylierung: Molekulare Mechanismen | 8 |
| 1.2 | DNA-Methyltransferasen | 8 |
| 1.2.1 | Grundlagen | 8 |
| 1.2.2 | DNMT1 | 9 |
| 1.2.3 | DNMT3a und DNMT3b | 10 |
| 1.3 | DNA-Methylierung in der Tumorgenese | 11 |
| 1.3.1 | Verändertes Methylierungsmuster in Tumorzellen | 11 |
| 1.3.2 | <i>CpG-Island</i> -Hypermethylierung in Tumorzellen | 12 |
| 1.3.3 | Globale Hypomethylierung | 13 |
| 1.3.4 | Promotor-Hypermethylierung und DNMT-Expression in Tumoren | 13 |
| 1.3.5 | DNMT-Inhibitoren als Therapieoptionen bei Tumoren | 14 |
| 1.4 | Akute Leukämien im Kindesalter | 15 |
| 1.4.1 | Epidemiologie | 15 |
| 1.4.2 | Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) | 15 |
| 1.4.3 | Die akute myeloische Leukämie (AML) | 17 |
| 2 | Fragestellungen | 19 |
| 3 | Material und Methoden | 21 |
| 3.1 | Patientenkollektive | 21 |
| 3.1.1 | ALL-Rezidiv | 21 |
| 3.1.2 | AML-Ersterkrankung | 21 |
| 3.1.3 | Kontrollkollektiv | 21 |
| 3.2 | Material | 22 |
| 3.2.1 | Chemikalien | 22 |
| 3.2.2 | Nukleinsäuren | 23 |
| 3.2.3 | Enzyme und Kits | 23 |
| 3.2.4 | Puffer und Lösungen | 23 |
| 3.2.5 | Einwegmaterialien | 24 |
| 3.2.6 | Geräte | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.3 | Methoden | 25 |
| 3.3.1 | Zellseparation | 25 |
| 3.3.2 | RNA-Extraktion | 26 |
| 3.3.3 | Gelelektrophorese der RNA | 27 |
| 3.3.4 | Reverse Transkription (RT) | 29 |
| 3.3.5 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 29 |
| 3.3.6 | Gelelektrophorese der DNA | 30 |
| 3.3.7 | Klonierung | 30 |
| 3.3.8 | Sequenzierung | 31 |
| 3.3.9 | <i>Real-Time</i> quantitative RT-PCR | 32 |
| 3.4 | Statistik | 38 |
| 3.4.1 | Software | 38 |
| 3.4.2 | Relative Quantifizierung | 39 |
| 3.4.3 | Testverfahren | 39 |
| 3.4.4 | Deskriptive Statistik | 39 |
| 4 | Ergebnisse | 40 |
| 4.1 | DNMT-mRNA-Expression bei ALL-Erstrezidiv | 40 |
| 4.1.1 | Vergleich DNMT1 und DNMT3b bei ALL und Kontrollkollektiv | 40 |
| 4.1.2 | mRNA-Expression der Spleißvarianten bei ALL-Erstrezidiv | 44 |
| 4.1.3 | DNMT1 und DNMT3b bei Kindern mit und ohne Folgeereignis | 47 |
| 4.1.4 | DNMT1' bei Kindern mit und ohne Folgeereignis | 48 |
| 4.2 | DNMT-mRNA-Expression bei AML-Ersterkrankung | 49 |
| 4.2.1 | Vergleich DNMT1 und DNMT3b bei AML und Kontrollkollektiv | 49 |
| 4.2.2 | mRNA-Expression der Spleißvarianten bei AML-Ersterkrankung | 53 |
| 4.2.3 | DNMT1 und DNMT3b bei Kindern mit und ohne Folgeereignis | 56 |
| 4.2.4 | DNMT1' bei Kindern mit und ohne Folgeereignis | 57 |
| 5 | Diskussion | 58 |
| 5.1 | Methodische Aspekte | 58 |
| 5.1.1 | <i>Real-Time</i> -RT-PCR zur Quantifizierung von DNMT-mRNA | 58 |
| 5.1.2 | Quantifizierung von DNMTs auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich | 61 |
| 5.2 | Kurzdarstellung der Ergebnisse | 62 |
| 5.3 | Interpretation und Einordnung der Ergebnisse | 63 |
| 5.3.1 | Definition einer aberranten DNMT-mRNA-Expression | 63 |
| 5.3.2 | DNMT1-Expression bei Leukämien im Kindesalter | 65 |
| 5.3.3 | DNMT3b-Expression bei Leukämien im Kindesalter | 67 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.3.4 | DNMT-Spleißvarianten bei Leukämien im Kindesalter | 70 |
| 5.3.5 | Prognostische Bedeutung der DNMT-Expression | 70 |
| 5.4 | Synopsis und Ausblick | 71 |
| 5.4.1 | Schlussfolgerungen der Expressionsanalyse | 71 |
| 5.4.2 | Ausblick | 71 |
| 6 | Zusammenfassung | 73 |
| | Literaturverzeichnis | 75 |
| | Lebenslauf | 87 |
| | Publikationen | 88 |
| | Danksagung | 89 |
| | Erklärung an Eides Statt | 90 |

1 Einleitung

1.1 DNA-Methylierung: Epigenetische Regulation des Genoms

1.1.1 Grundlagen

DNA kann durch kovalente Addition einer Methylgruppe an die 5'-Position eines Cytosin-Ringes ausschließlich innerhalb eines CpG-Dinukleotids modifiziert werden [1]. Dieser Vorgang wird als DNA-Methylierung bezeichnet und von einer Gruppe von Enzymen, den DNA-Methyltransferasen (DNMTs), katalysiert [2]. Methylierte DNA kann nicht in mRNA transkribiert werden, es resultiert eine Suppression der Genexpression [3].

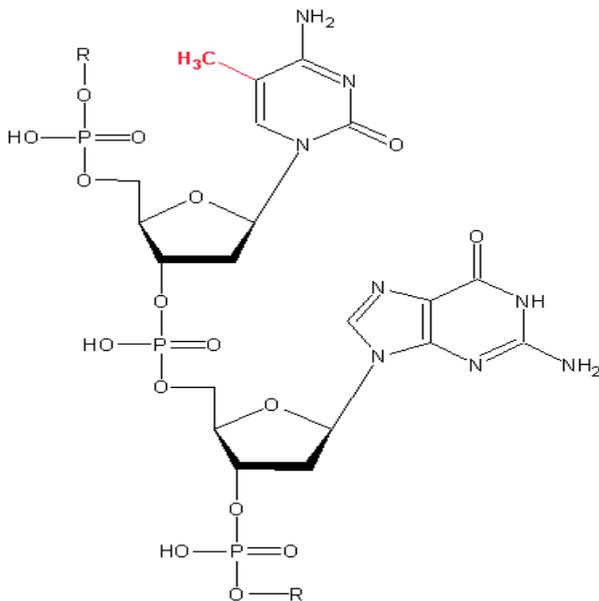


Abb. 1.1: 5'-Methylcytosin (rot) innerhalb eines CpG-Dinukleotids.

Die DNA-Methylierung ist einer der Mechanismen, welche unter dem Begriff der Epigenetik zusammengefasst werden. Die Epigenetik beschreibt vererbare und potenziell reversible Veränderungen der genetischen Funktion, die nicht mit Veränderungen der DNA-Sequenz einhergehen [4]. Die epigenetischen Prozesse finden am Chromatin statt, welches aus DNA und anlagernden Histon-Proteinen sowie Nicht-Histon-Proteinen besteht.

Neben der DNA-Methylierung werden kovalente Modifikationen der Histon-Proteine (Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung) mit konsekutiver Veränderung der Chromatinstruktur zu diesen epigenetischen Veränderungen ge-

zählt [5]. Ein gut erforschter Mechanismus ist die Methylierung von Histonen durch Proteine der Polycomb- und Trithoraxgruppe. Sie bewirkt in der Folge durch Chromatinstruktur-Änderungen entweder eine Suppression (Polycomb-Proteine) oder Aktivierung (Trithorax-Proteine) von Genexpression. Die Polycomb-Proteine können des weiteren offenbar DNMTs rekrutieren, ihre Aktivität ist wahrscheinlich einer der ersten Schritte im epigenetischen Gen-Silencing [6]. Des weiteren können Modifikationen von Histonen und der Chromatinstruktur durch non-coding RNA wie *Xist*-RNA und siRNA-Moleküle vermittelt werden [7]. Hervorgerufen werden die Modifikationen an den Histonen außerdem durch die DNA-Methylierung selbst (Acetylierung, siehe Kap. 1.1.4) [8].

1.1.2 Muster der DNA-Methylierung im Genom

Die der DNA-Methylierung zugänglichen CpG-Dinukleotide finden sich im menschlichen Genom relativ selten in einer Frequenz von 1:80 [9].

Eine Ausnahme von diesen Verhältnissen stellen die so genannten *CpG-Islands* dar [10]. Dies sind Bereiche in den Promotor-Regionen von 56% der Gene, in denen die CpG-Dichte 4-fach höher als im restlichen humanen Genom ist. Sie sind zumeist unmethyliert [11, 12]. Zwischen *CpG-Islands* und den übrigen CpG-Dinukleotiden bestehen funktionell erhebliche Unterschiede.

1.1.3 Bedeutung der DNA-Methylierung

Der Vorgang der DNA-Methylierung ist von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Genexpression und für die Integrität des Genoms. Die *CpG-Islands* dienen der Regulation der Genexpression. Nur Gene, deren *CpG-Islands* unmethyliert vorliegen, können transkribiert werden. Während embryonale Stammzellen keine Methylierung in den *CpG-Islands* ihres Genoms aufweisen [13], werden im Rahmen der Differenzierung zahlreiche Gene durch DNA-Methylierung in diesen Regionen inaktiviert. Dies ist von zentraler Bedeutung für die Ontogenese [14]. Dieser Vorgang ist auch für die Inaktivierung vom zweiten X-Chromosom weiblicher Organismen sowie für das *genetic imprinting* mitverantwortlich [14, 15].

Die CpG-Dinukleotide im übrigen Genom finden sich relativ konzentriert in Bereichen repetitiver DNA, die rund 40% des menschlichen Genoms ausmachen [16]. Sie liegen hier in überwiegend methyliertem Zustand vor; hierdurch wird das Genom vor

der destabilisierenden Wirkung geschützt, die diese Bereiche in aktivem Zustand ausüben [17].

In den Zellen ausdifferenzierter humaner Gewebe besteht somit, stark vereinfacht ausgedrückt, unter physiologischen Bedingungen folgender Zustand: Den überwiegend hypomethylierten und damit der Transkription zugänglichen *CpG-Islands* in den Promotor-Regionen von Genen steht eine Hypermethylierung der übrigen CpG-Dinukleotide gegenüber [18].

1.1.4 DNA-Methylierung: Molekulare Mechanismen

Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden steht am Anfang eines Prozesses, der zur Suppression der Genexpression in dem methylierten DNA-Abschnitt führt. Wie schon eingangs erwähnt, wird die CpG-Methylierung von den DNA-Methyltransferasen katalysiert. Es wurde postuliert, dass schon hierdurch eine Interaktion von DNA und Transkriptionsfaktoren verhindert wird [19].

Weiterhin ungeklärt ist, wie dieser Schritt genau initiiert wird [20]. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise, dass die DNA-Methyltransferasen durch Proteine rekrutiert werden, die auch über Histonmodifikationen in die epigenetische Maschinerie involviert sind, so die Histon-Methyltransferasen EZH2 (ein Protein der bereits eingangs erwähnten Polycomb-Gruppe) und SUV39 [21-24].

Nach erfolgter DNA-Methylierung binden Proteine der MBD-Familie wie MeCP2 an die methylierte DNA [25-27]. In der Folge binden verschiedene Korepressoren an diese Proteine. Außerdem rekrutiert MeCP2 im Zusammenspiel mit den DNMTs sowie dem Korepressor Sin3A Histon-Deacetylasen (HDAC). Die Deacetylierung bewirkt eine Kondensation der Histon-Proteine und damit des Chromatins, wodurch die DNA für die Transkriptionsfaktoren unzugänglich wird [28-30].

1.2 DNA-Methyltransferasen

1.2.1 Grundlagen

Die Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMT) ist für die Katalyse der DNA-Methylierung verantwortlich. Die ihr zugeordneten Proteine zeichnen sich durch die konservierten Methyltransferase-Motive I, IV, VI, IX und X im Bereich der katalyti-

schen C-terminalen Domäne aus und besitzen zusätzlich eine jeweils unterschiedliche N-terminale regulatorische Domäne [31].

Bekannte katalytisch aktive DNA-Methyltransferasen sind DNMT1, DNMT3a und DNMT3b. Alle drei Enzyme kommen in unterschiedlichen Spleißvarianten vor. Ein strukturell ähnliches Enzym ist das Protein DNMT2 [32], das allerdings keine DNA-Methyltransferase-Aktivität besitzt, sondern tRNA methyliert [33]. Darüber hinaus ist mit DNMT3L ein Protein beschrieben, das nur einen Teil der Methyltransferase-Motive aufweist. DNMT3L ist ebenfalls in die epigenetische Maschinerie integriert: Es bindet an unmethyliertes Histon H3 und rekrutiert dadurch eine Spleißvariante von DNMT3A, was zu DNA-Neumethylierungen führt [34, 35].

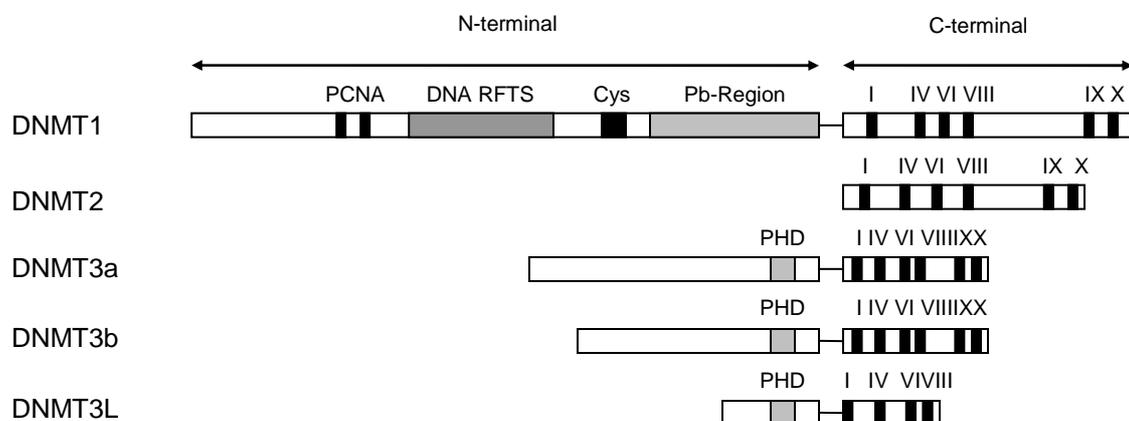


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der DNMTs und wichtiger Domänen. PCNA = PCNA-Bindungsdomäne, DNA RFTS = DNA Replication Foci Targeting Region, Cys = Cys-reiche Region, Pb-Region = Polybromo-Region mit BAH-Elementen, PHD = Plant Homeodomäne (modifiziert nach [36]).

1.2.2 DNMT1

DNMT1 ist die am längsten bekannte DNA-Methyltransferase. In somatischen Zellen ist sie im Vergleich zu den anderen DNA-Methyltransferasen am stärksten exprimiert [37].

DNMT1 besitzt eine wesentlich stärkere Affinität zu hemimethylierter DNA als zu nicht methylierter DNA. Sie hat die Aufgabe, die Methylierung des DNA-Tochterstrangs des im Rahmen der Zellteilung duplizierten Erbgutes analog zu dem Methylierungsmuster des Mutterstrangs zu katalysieren [38]. Aus diesem Grund heißt das Enzym auch *maintenance*-Methyltransferase [39].

Im Vergleich zu den Vertretern der DNMT3-Familie ist die regulatorische Domäne länger und weist Motive auf, die ihre Affinität zur DNA erklären (Zinkfinger, Nuclear Localization Signal, BAH-Domäne) und ihre Funktion bei der DNA-Duplikation unterstreichen (PCNA-Bindungsstelle, Replication-Foci-Targeting-Region) [40-43].

Entsprechend ihrer Rolle in der Konservierung bestehender Methylierungsmuster nach Zellteilung interagiert DNMT1 im Bereich der regulatorischen Domäne mit Zellzyklus-Regulatoren wie p21WAF1 [40] und pRb [29]. Des Weiteren bestehen Interaktionen mit anderen epigenetisch relevanten Proteinen, so der Histon-Methyltransferase SUV39H1 und EZH2 aus der Polycomb-Gruppe, das, wie bereits erwähnt, wahrscheinlich DNMTs rekrutiert [22, 23]. Eine weitere Interaktion besteht mit Histon-Deacetylasen im Rahmen der Chromatinkondensation [29, 44].

Es sind 3 Spleißvarianten beschrieben, die von der vorherrschenden Variante der DNMT1 (in dieser Arbeit als *DNMT1'* bezeichnet) mit 1616 Aminosäuren abweichen: DNMT1o ohne die 114 N-terminalen Aminosäuren ist von Bedeutung bei der Methylierung von DNA im Oozytenstadium [45]. DNMT1b besitzt zwischen Exon 4 und 5 zusätzlich 48 Aminosäuren. Die Funktion ist nicht bekannt [46, 47]. DNMT1p wird während der Differenzierung von Muskelgewebe exprimiert [48].

Bei Mausembryonen mit *DNMT1-Knock-out* kommt es zu einem Entwicklungsstopp im 8-Zell-Stadium sowie zu 70% weniger methyliertem Cytosin als bei gesunden Embryonen [49].

Die *maintenance*-Funktion der DNMT1 kann aber bei *DNMT1-Knock-out* auch von anderen Enzymen zumindest teilweise übernommen werden, so wahrscheinlich von einer Spleißvariante von DNMT3a [50, 51]. Auch wurde gezeigt, dass DNMT1 bei verstärkter Expression auch Neumethylierungen bewirken kann [52].

1.2.3 DNMT3a und DNMT3b

Die beiden katalytisch aktiven Vertreter der DNMT3-Familie sind DNMT3a und DNMT3b [53]. Sie sind hauptsächlich verantwortlich für Neumethylierungen im Genom während der Ontogenese und bei neu in das Genom integrierten Elementen und haben eine hohe Affinität zu unmethylierten DNA-Sequenzen. Deshalb werden sie DNMT1 als *de-novo*-Methyltransferasen gegenüber gestellt [53, 54].

DNMT3b hat zusätzlich die Aufgabe, die vorhandenen Methylierungsmuster im Bereich der Zentromere der Chromosomen zu erhalten, erfüllt also hier eine *maintenance*-Funktion [55].

Es sind 3 Spleißvarianten von DNMT3a (DNMT3a1 bis DNMT3a3) sowie 6 von DNMT3b (DNMT3b1 bis DNMT3b6) beschrieben. DNMT3a1 und DNMT3a2 sind katalytisch aktiv: DNMT3a1 wird auf niedrigem Niveau ubiquitär exprimiert und nimmt möglicherweise ebenfalls eine *maintenance*-Funktion ein, während DNMT3a2 besonders stark in Geweben exprimiert wird, die de-novo-Methylierung aufweisen; DNMT3a3 ist katalytisch inaktiv [51, 56]. Im Fall von DNMT3b sind nur DNMT3b1, DNMT3b2 und DNMT3b6 enzymatisch aktiv. DNMT3b3 bis 5 sind Proteine, denen Motive innerhalb der katalytischen Domäne fehlen. Ihnen wird eine regulatorische Rolle bei der DNA-Methylierung zugeschrieben; aktuelle Daten zu ihrer Funktion unter physiologischen Bedingungen existierten zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht [37, 47, 57].

Mutationen des DNMT3b-Gens führen zum ICF-Syndrom (Immunodeficiency, Centromeric Instability, Facial Anomalies), einer seltenen autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung, bei der es unter anderem infolge verminderter Immunglobulinbildung zu rezidivierenden Infektionen kommt, die zumeist vor Erreichen des Erwachsenenalters zum Tode führen [55, 58, 59].

1.3 DNA-Methylierung in der Tumorgenese

1.3.1 Verändertes Methylierungsmuster in Tumorzellen

In Tumorzellen findet eine ausgeprägte Alteration der DNA-Methylierung mit großer Bedeutung für die Tumorgenese statt. Zum einen werden *CpG-Islands* von Genen verstärkt methyliert, die in physiologischem Zustand unmethyliert vorliegen. Hiervon sind vor allem Tumorsuppressorgene sowie miRNA-Gene betroffen [8]. Andererseits zeigt sich eine Hypomethylierung der Promotor-Regionen vieler Protoonkogene und der übrigen CpG-Dinukleotide [60].

1.3.2 CpG-Island-Hypermethylierung in Tumorzellen

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Hypermethylierung von CpG-Islands in den Promotor-Regionen von Tumorsuppressorgenen mit dem *Silencing* dieser Gene einhergeht und ein bei vielen Tumoren auftretender Schritt in der Tumorgenese ist. Aus den Beispielen in der Tabelle 1.1 wird deutlich, dass auch bei Leukämien zahlreiche Promotor-Hypermethylierungen beschrieben sind. Des Weiteren kann der Methylierungsstatus von Promotoren auch ein prognostischer Faktor sein. So fanden Roman-Gomez et al., dass die Promotor-Hypermethylierungen von *p21^{CIP1/WAF1/SDI1}* und dem Calcitonin-Gen als unabhängige prognostische Faktoren mit schlechter Prognose für die ALL korrelieren [61, 62]. *DAP-Kinase*-Hypermethylierung ist mit einer schlechten Prognose bei Blasenkarzinom assoziiert, Hypermethylierung von *BRCA1* mit erhöhter Mortalität bei Mammakarzinom [63, 64]. Promotor-Hypermethylierungen von häufig bei AML methylierten Genen sind in höherem Maße bei einem AML-Rezidiv als bei der Erstdiagnose nachweisbar [65].

Tab. 1.1: Tumorsuppressorgene mit Promotor-Hypermethylierung bei Neoplasien. Ref.=Referenzen.

| Gen | Funktion des Proteins | Tumor (Bsp.) | Ref. |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|----------|
| <i>p15^{INK4b}, p16^{INK4a}</i> | CDKI; Zellzyklus-Regulation | AML, ALL; Lymphome; Leberkarzinom | [66, 67] |
| <i>p21^{CIP1/WAF1/SDI1}</i> | CDKI; Zellzyklus-Regulation | ALL, Leberkarzinom | [61, 68] |
| <i>DAP-Kinase</i> | Apoptose-Mediator | B-Zell-Lymphome, Blasenkarzinom | [64, 69] |
| <i>BRCA1</i> | DNA-Reparatur | Mamma-, Ovarialkarzinom | [70, 71] |
| <i>E-Cadherin</i> | epitheliale Zelladhäsion | ALL, Magen-, Mammakarzinom | [72-75] |
| <i>BNIP3</i> | proapoptotischer Faktor | ALL, Multiples Myelom | [76] |
| <i>hMLH1</i> | DNA-Reparatur | Kolon-, Endometriumkarzinom | [77-80] |
| <i>GSTP1</i> | Schutz vor oxidativem DNA-Schaden | Mamma-, Prostata-, Nierenkarzinom | [81-83] |
| <i>RUNX3</i> | Apoptose-Mediator | Mamma-, Blasen-, Leberkarzinom | [84-87] |
| <i>RASSF1A</i> | Apoptose-Mediator | Leiomyosarkom, Leberkarzinom | [88-90] |

Auch Gene, die für miRNA (microRNA) kodieren, sind in Tumorzellen häufig hypermethyliert. miRNA-Moleküle dienen unter anderem der Regulierung von Apoptose, Zellproliferation und –differenzierung, indem sie durch DNA-Interaktion oder mRNA-Degradierung die Genexpression unterbinden [8]. Für Tumoren konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Expression des Onkogens *CDK6* mit der durch Methylierung supprimierten Aktivität der miRNA *miR-124a* korreliert [91]; bei Leukämiezellen

mit *BCR-ABL-1*-Expression führt eine *in-vitro*-Demethylierung des Gens von *miR-203* zu reduzierter *BCR-ABL-1*-Expression und Inhibition von Zellproliferation [92].

1.3.3 Globale Hypomethylierung

Der Hypermethylierung von CpG-Islands steht in Tumorzellen eine unphysiologische Hypomethylierung der übrigen CpG-Dinukleotide gegenüber [93]. Die hypomethylierten Bereiche finden sich vorrangig in repetitiven Elementen und Introns. Es folgt eine unphysiologische Aktivierung dieser DNA-Sequenzen mit konsekutiver genetischer Instabilität, Reaktivierung von Transposons und Verlust von *genetic imprinting* [94]. Durch Demethylierung aktivierte Transposons haben Bedeutung in der Tumorgene- se, indem sie fehlerhaft an andere Stellen des Genoms transponiert werden [95]. Des weiteren wurde beispielsweise eine vermehrte Expression des endogenen retrovira- len Gens *GAG* in Korrelation mit einer Demethylierung dieses Gens bei Hodentumo- ren gefunden [96]. Die Demethylierung von Satelliten-DNA führt offenbar in Tumoren zur homologen Rekombination der dort angesiedelten *repeats*, was chromosomale Rekombinationen zur Folge haben kann [97-99]. Globale Hypomethylierung findet vermehrt beim Übergang eines malignen Tumors in die metastasierende Phase statt [100].

1.3.4 Promotor-Hypermethylierung und DNMT-Expression in Tumoren

Die Mechanismen, die zu der aberranten Methylierung in Tumorzellen führen, konn- ten bislang nicht ausreichend identifiziert und beschrieben werden [24, 94].

Neben Mechanismen wie einer möglichen Interaktion von DNMT3a und DNMT3b mit der Histon-Methyltransferase EZH2 wird eine verstärkte Expression der DNMTs als Ursache für die *CpG-Island*-Hypermethylierungen diskutiert [101]. In zahlreichen Un- tersuchungen für verschiedene Neoplasien gezeigt, oftmals in Korrelation mit Promo- tor-Hypermethylierungen [37, 102-112]. Vor allem DNMT1 und DNMT3b sind häufig verstärkt exprimiert. Dies deckt sich mit der Entdeckung, dass diese beiden Enzyme offensichtlich gemeinsam für das epigenetische Silencing von Tumorsuppressorge- nen verantwortlich sind [113]. Allerdings existieren auch Studien, die keine verstärkte Expression nachwiesen, obwohl Promotor-Hypermethylierungen festgestellt wurden [114-117]. Die verstärkte Expression muss somit als ein wichtiger Faktor angesehen werden, der weiter kausal evaluiert werden muss.

Weiterhin könnte eine Veränderung der Expression einzelner Spleißvarianten einen Einfluss auf die veränderte DNA-Methylierung in Tumorzellen haben. So ist beschrieben, dass eine verstärkte Expression der Spleißvariante DNMT3b4 mit der Hypomethylierung perizentromerer Regionen beim hepatozellulären Karzinom korreliert [118]. Möglicherweise konkurriert DNMT3b4 mit katalytisch aktiven Spleißvarianten um die DNA-Bindungsstellen des Enzyms.

Akute Leukämien bei erwachsenen Patienten wurden bislang in zwei Studien auf die DNMT-Expression hin untersucht. Es wurde eine verstärkte Expression von DNMT1 [119] beziehungsweise DNMT1, DNMT3a und DNMT3b beschrieben [120].

In einer Studie wurde die DNMT-Expression bei Kindern mit ALL-Ersterkrankung untersucht (n=18). DNMT1 wurde grenzwertig erniedrigt und DNMT3b in unveränderter Quantität im Vergleich zur Kontrollgruppe exprimiert [121].

1.3.5 DNMT-Inhibitoren als Therapieoptionen bei Tumoren

Die Erkenntnisse auf dem Gebiet der Epigenetik haben zur Erforschung von Substanzen geführt, die teilweise schon für die Therapie von Krebserkrankungen zur Verfügung stehen. Im Mittelpunkt stehen 2 Substanzgruppen: DNMT-Inhibitoren (DNMTi) sollen der aberranten Methylierung von Tumorsuppressorgenen und miRNA-Genen entgegenwirken, Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) der konsekutiven Deacetylierung der Histon-Proteine [122]. Als DNMT-Inhibitoren stehen unter anderem Antisense-Oligonukleotide sowie 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Desoxycytidin („Decitabine“) zur Verfügung [123, 124].

DNMT-Inhibitoren wurden bereits im Rahmen von Phase-I- bis Phase-III-Studien untersucht, darunter auch bei Erkrankungen aus dem hämatologisch-onkologischen Spektrum wie CML, AML und MDS [125, 126]. Bislang wurden Patienten primär mit dem bereits länger bekannten Nukleosid-Analogon 5-Aza-2'-Desoxycytidin behandelt; aufgrund der hohen Myelotoxizität wird an weiteren Substanzen geforscht, deren Toxizität *in vitro* geringer ist, deren inhibierende Eigenschaften aber bislang weniger effektiv sind [127, 128]. Ein weiteres Problem neben der Myelotoxizität stellt die Gefahr einer durch DNMT-Inhibitoren induzierten Hypomethylierung und in der Folge Aktivierung von Genen dar, die für die Veränderung nicht metastasierender Tumorzellen zu hoch-invasiven Zellen verantwortlich sind [129]. Der für die Wirkung der DNMT-Inhibitoren bei Tumoren verantwortliche Wirkmechanismus wird noch disku-

tiert. Während einige Autoren die erwartete Hypomethylierung von Promotoren von Tumorsuppressorgenen wie *P15/INK4B* beschreiben, konnten andere trotz des Ansprechens der Tumoren auf die Therapie keine veränderten Methylierungsmuster beobachten [130, 131].

Die Entitäten AML und Myelodysplastisches Syndrom (MDS), welches in vielen Fällen in eine AML übergeht, wurden in vielen Studien hinsichtlich der Wirksamkeit von DNMT-Inhibitoren untersucht. Mittlerweile ist 5-Azacytidin in den USA zur Therapie des MDS zugelassen. Die Verträglichkeit in den Studien war insgesamt gut. Insgesamt konnte durch den Einsatz von 5-Azacytidin ein längeres Überleben, bessere Lebensqualität und weniger Übergänge in AML erreicht werden [126].

In einigen Studien (Phase I und II) ergab die kombinierte Gabe von DNMT-Inhibitoren und Histon-Deacetylase-Inhibitoren verbesserte *Response*-Raten (22-42%) bei MDS und AML. In zwei Studien wurden auch Kinder mit AML ab 4 Jahren behandelt, allerdings in sehr geringer Fallzahl (3 bzw. 7 Kinder, 1 Kind erreichte eine Knochenmark-Remission) [132-135]. Da insbesondere Kinder mit AML-Rezidiv weiterhin eine ungünstige Prognose haben, stellt die epigenetische Therapie bei diesen Patienten möglicherweise eine Option dar [136, 137].

1.4 Akute Leukämien im Kindesalter

1.4.1 Epidemiologie

Die akuten Leukämien sind mit einem Anteil von rund 35% die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter. Die ALL hat hierbei eine Inzidenz von 3,3 Erkrankungen / 100.000 Einwohner < 15 Jahre, bei der AML liegt sie bei 0,7 / 100.000 [138]. Während etwa 80% der an einer ALL erkrankten Kinder geheilt werden können, gilt dies nur für etwa 60% der Kinder mit AML [139, 140].

1.4.2 Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL)

Die ALL wird zum einen aufgrund morphologischer Eigenschaften nach den FAB-Kriterien in L1-3 eingeteilt, wobei L3 eine reife B-Zell-Leukämie bezeichnet, die sich hinsichtlich ihrer Biologie und Behandlung von den übrigen ALL-Formen unterschei-

det. Von großer Bedeutung ist zum anderen neben den übrigen oben genannten Kriterien die Immunphänotypisierung [141].

Tab. 1.2: Immunologische Klassifikation der ALL. TdT = Terminale-Desoxyribonucleotidyl-Transferase, CD = cluster of differentiation, cy = zytoplasmatisch, s Ig = Oberflächen (surface) Ig.

| Immunphänotyp | Marker | | | | | |
|---------------|--------|--------|--------|------|---------|------|
| | TdT | HLA-DR | CD10 | CD19 | cy IgM | s Ig |
| prä-prä-B-ALL | + | + | - | + | - | - |
| common-ALL | + | + | + | + | - | - |
| prä-B-ALL | + | + | ± | + | + | - |
| B-ALL | ± | + | ± | + | ± | + |
| | TdT | CD7 | cy CD3 | CD2 | CD1/2/3 | CD8 |
| prä-T-ALL | + | + | ± | - | - | - |
| T-ALL | + | + | + | + | ± | ± |

Kinder mit einer ALL werden risikoadaptierten mehrphasigen Polychemotherapie behandelt. Hier soll das in Deutschland und anderen europäischen Ländern anerkannte Protokoll der Berlin-Frankfurt-Münster-Gruppe (BFM) beschrieben werden. Die Patienten werden anhand einer Risikoabschätzung, die vor allem auf einer sensitiven und spezifischen molekulargenetischen Beurteilung des Therapieansprechens basiert (Reduktion der Leukämiezell-Last), in 3 Gruppen mit unterschiedlichen Therapiezeigen mit unterschiedlicher Therapieintensität stratifiziert. Für Patienten im HR-Zweig existiert außer der Chemotherapie eine selektive Indikation zur Stammzelltransplantation [142].

Das Erstrezidiv der ALL wird in Deutschland nach dem ALL-REZ-Protokoll der BFM therapiert. Das ereignisfreie Überleben (EFS = Event Free Survival) liegt nach einem Erstrezidiv bei ungefähr 40% [143]. Die Patienten werden in Abhängigkeit von prognostischen Kriterien in die Gruppen S1-4 eingeteilt mit entsprechender Stratifizierung zu Polychemotherapie mit / ohne Stammzelltransplantation:

Tab. 1.3: Risikostratifizierung bei ALL-Rezidiv im Kindesalter. Definition des Zeitpunktes: sehr früh = < 18 Monate nach Erstdiagnose und < 6 Monate nach Ersttherapie; früh = > 18 Monate nach Erstdiagnose und < 6 Monate nach Ersttherapie; spät = > 6 Monate nach Ersttherapie. KM = Knochenmark.

| | Immunphänotyp: non-T | | | Immunphänotyp: (prä-) T | | |
|----------------|----------------------|------------|----------|-------------------------|------------|----------|
| Lokalisation → | Extramedullär | KM | KM | Extramedullär | KM | KM |
| Zeitpunkt ↓ | isoliert | kombiniert | isoliert | isoliert | kombiniert | isoliert |
| sehr früh | S2 | S4 | S4 | S2 | S4 | S4 |
| Früh | S2 | S2 | S3 | S2 | S4 | S4 |
| Spät | S1 | S2 | S2 | S1 | S4 | S4 |

Weitere prognostisch relevante Parameter sind das Vorliegen einer *BCR-ABL*- bzw. *TEL-AML1*-Rekombination (*BCR-ABL* ist prognostisch ungünstig, *TEL-AML1* prognostisch günstig) sowie der Nachweis leukämischer Blasten vor dem zweiten Therapieblock. Das EFS beträgt für Patienten der S1-Gruppe 75% und der S2-Gruppe 45%. Patienten der Gruppen S3 und S4 erreichen eine nur kurze Remissionsdauer mit alleiniger Polychemotherapie [144].

1.4.3 Die akute myeloische Leukämie (AML)

Die Klassifikation der AML erfolgt einerseits wie bei der ALL nach morphologischen Eigenschaften durch die FAB-Kriterien (FAB M0 bis M7). Des weiteren werden auch zytogenetische und immunologische Aspekte zur Klassifikation herangezogen [138].

Tab. 1.4: FAB-Klassifikation der AML.

| | |
|---------------|--|
| AML M0 FAB: | Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung |
| AML M1 FAB: | Akute myeloische Leukämie mit minimaler Ausreifung |
| AML M2 FAB: | Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung |
| AML M3 FAB: | Akute Promyelozytenleukämie |
| AML M4 FAB: | Akute myelomonozytäre Leukämie |
| AML M4eo FAB: | Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie |
| AML M5 FAB: | Akute Monoblastenleukämie |
| AML M6 FAB: | Akute Erythroleukämie |
| AML M7 FAB: | Akute Megakaryoblastenleukämie |

Die AML-Ersterkrankung wird mit einer risikoadaptierten mehrphasigen Polychemotherapie behandelt. Auch hier soll anhand der folgenden Tabelle beispielhaft auf das aktuelle Protokoll der BFM-Studiengruppe (AML-BFM 2004) eingegangen werden.

Tab. 1.5: Risikostratifizierung nach AML-BFM 2004. Patienten mit * werden in die Hochrisiko-Gruppe umgruppiert bei Nachweis einer FLT-3-ITD-Mutation und / oder bei $\geq 5\%$ Blasten im Knochenmark nach der 1. Induktion. eo = eosinophil; t(8;21) = Translokation(8;21); inv(16) = Inversion(16).

| Standardrisiko: | Hochrisiko: |
|------------------------------------|--|
| AML FAB M3 AML bei Down Syndrom | AML FAB M0 AML FAB M1/2 ohne Auerstäbchen |
| AML FAB M1/2 mit Auerstäbchen* | AML FAB M4 |
| AML FAB M4eo* | AML FAB M5 |
| AML mit t(8;21)* | AML FAB M6 |
| AML mit inv(16)* | AML FAB M7 |

Eine Indikation zur Stammzelltransplantation liegt vor, wenn für Patienten der Hochrisikogruppe ein *matched sibling donor* (MSD) ermittelt werden konnte oder kein Therapieansprechen vorhanden war. Weiterhin ist für alle Patienten eine prophylaktische ZNS-Bestrahlung vorgesehen [145].

Das AML-Rezidiv hat eine ungünstige Prognose. Patienten mit einem frühen Rezidiv (innerhalb von 1 – 1,5 Jahre nach Erstdiagnose) haben eine Überlebensrate von unter 10%, die von Patienten mit Spätrezidiv liegt bei 40%. Nach dem Protokoll AML-REZ-BFM 2001 erfolgt zunächst eine Chemotherapie mit Reinduktions- und Konsolidierungsphase. Bei Therapieansprechen wird protokollgemäß eine Stammzelltransplantation durchgeführt [146, 147].

2 Fragestellungen

Epigenetische Veränderungen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen. Ein zentraler epigenetischer Pathomechanismus ist die aberrante Methylierung von DNA in Tumorzellen. Ein begünstigender Faktor für die aberrante DNA-Methylierung bei vielen malignen Entitäten ist eine veränderte Expression von DNA-Methyltransferasen beziehungsweise einzelner DNMT-Spleißvarianten.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob auch bei Leukämien im Kindesalter (ALL-Erstrezidiv und AML-Ersterkrankung) Expressionsveränderungen der für die Tumorgenese wichtigen DNA-Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3b beziehungsweise ausgesuchter Spleißvarianten (DNMT1' und DNMT1b sowie DNMT3b3, DNMT3b4 und DNMT3b5) feststellbar sind. Bis auf eine Studie, in der Kinder mit ALL-Ersterkrankung (n=18) untersucht wurden, sind Expressionsanalysen von DNA-Methyltransferasen bei Leukämien im Kindesalter bis dato nicht publiziert worden.

Veränderungen der DNMT-Expression in Leukämiezellen gegenüber der Expression unter physiologischen Bedingungen würden einen Erklärungsansatz für die aberrante DNA-Methylierung wie die Promotor-Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen bei akuten Leukämien im Kindesalter sowie einen Anhaltspunkt für mögliche Therapieoptionen mittels DNMT-Inhibitoren bei ALL und AML im Kindesalter liefern. Zudem sollte geklärt werden, ob Veränderungen der Expression von prognostischer Bedeutung sind.

Mittels einer neu zu etablierenden *Real-Time-PCR* sollte die DNMT-Expression auf mRNA-Ebene bei Kindern mit Erstrezidiv einer ALL und Ersterkrankung einer AML gemessen und gegenüber gesunden Probanden verglichen werden.

Die Fragestellungen im Einzelnen:

1. ALL-Erstrezidiv:

- a) Unterscheidet sich die Expression von *DNMT1* und *DNMT3b* im Vergleich zu Leukozyten gesunder Probanden?
- b) Unterscheidet sich die Expression der untersuchten Spleißvarianten im Vergleich zu Leukozyten gesunder Probanden?
- c) Besteht eine unterschiedliche Expression von *DNMT1* und *DNMT3b* bei Kindern in Langzeitremission nach Erstrezidiv im Vergleich zu Kindern ohne Remission bzw. mit Folgeereignis?
- d) Besteht eine unterschiedliche Expression der Spleißvarianten bei Kindern in Langzeitremission nach Erstrezidiv im Vergleich zu Kindern ohne Remission bzw. mit Folgeereignis?

2. AML-Ersterkrankung:

- a) Unterscheidet sich die Expression von *DNMT1* und *DNMT3b* im Vergleich zu Leukozyten gesunder Probanden?
- b) Unterscheidet sich die Expression der untersuchten Spleißvarianten im Vergleich zu Leukozyten gesunder Probanden?
- c) Besteht eine unterschiedliche Expression von *DNMT1* und *DNMT3b* bei Kindern in Langzeitremission nach Ersterkrankung im Vergleich zu Kindern ohne Remission bzw. mit Rezidiv?
- d) Besteht eine unterschiedliche Expression der Spleißvarianten bei Kindern in Langzeitremission nach Ersterkrankung im Vergleich zu Kindern ohne Remission bzw. mit Rezidiv?

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektive

3.1.1 ALL-Rezidiv

Das Kollektiv der Patienten mit ALL-Rezidiv besteht aus 26 Patienten. Die Einschlusskriterien waren:

- Therapie gemäß ALL-REZ-BFM-Protokoll
- Anteil der leukämischen Zellen im Knochenmarkaspirat > 70 %
- RNA-Qualität / Nachweis der RNA-Integrität (siehe Kapitel 3.3.2)

Die Patienten wurden in 2 Gruppen eingeteilt, wobei die erste Gruppe (n=7) durch eine *CCR* (*continuous complete remission* = anhaltende komplette Remission) von mehr als 3 Jahren definiert war. Die zweite Gruppe (n=19) beinhaltet Patienten, bei denen keine Remission während der Therapie bzw. ein Zweitrezidiv eintrat.

3.1.2 AML-Ersterkrankung

Das Kollektiv der Patienten mit AML-Ersterkrankung besteht aus 47 Patienten. Die Einschlusskriterien waren:

- Therapie gemäß AML-BFM-Protokoll
- Anteil der leukämischen Zellen im Knochenmarkspunktat > 70 %
- RNA-Qualität / Nachweis der RNA-Integrität (siehe Kapitel 3.3.2)

Die Patienten wurden ebenfalls in 2 Gruppen eingeteilt, wobei die erste Gruppe (n=34) durch eine *CCR* von mehr als 3 Jahren definiert war. Bei den Patienten der zweiten Gruppe (n=13) war keine Remission während der Therapie bzw. ein Rezidiv eingetreten.

3.1.3 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv besteht aus 22 Personen im Alter von 24 bis 53 Jahren. Ausschlusskriterien für die Teilnahme waren:

- akute Erkrankung, insbesondere Infektionen, inflammatorische Prozesse oder Verletzungen
- medizinische Eingriffe innerhalb der letzten 4 Wochen

- chronische Erkrankungen
- onkologische Erkrankungen
- hämatologische Erkrankungen

Als Einschlusskriterium war eine nachgewiesene RNA-Integrität (siehe Kapitel 3.3.2) ausschlaggebend. Den Teilnehmern wurde aus einer peripheren Vene 20 ml Blut entnommen, aus dem durch Dichteseperation über einen Ficoll-Gradienten die mononukleären Zellen isoliert wurden (siehe Kapitel 3.3.1). Die mononukleären Zellen dienten als Vergleichsmaterial für die leukämischen Zellen der Patientengruppen.

3.2 Material

3.2.1 Chemikalien

FMC BioProducts; Rockland, ME, USA

NuSieve GTG Agarose

SeaKem GTG Agarose

Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf

Seakem LE Agarose

Merck KgaA; Darmstadt

Bromphenolblau

Essigsäure 100%

Amersham Biosciences AB; Uppsala, Schweden

Ficoll™ PM 400

Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München

EDTA

Serva Feinbiochemika GmbH; Heidelberg:

Ethidiumbromid

Braun Melsungen AG; Melsungen

Aqua ad iniectabilia Braun

DeltaSelect GmbH; Pfullingen

Aqua Spüllösung DeltaSelect

Invitrogen Inc.; Carlsbad, CA, USA

50 mM MgCl₂

Herbeta-Arzneimittel; Berlin

Ethanol 100%

3.2.2 Nukleinsäuren

Boehringer Mannheim GmbH; Mannheim

Deoxynucleoside Triphosphate Set

BRL Life Technologies, Inc.; Gaithersburg, MD, USA

1 Kb DNA Ladder

CLONTECH Laboratories, Inc; Palo Alto, CA, USA

Human Testis Total RNA

TIB Molbiol GmbH; Berlin

Oligonukleotide (Oligo(dT)₁₅ Primer, PCR-Primer und Fluoreszenz-Sonden

3.2.3 Enzyme und Kits

Qiagen Inc.; Chatsworth; CA, USA

RNase-free DNase Set

RNeasy Mini Kit

QIAprep Spin Miniprep Kit

Invitrogen, Inc.; Carlsbad, CA, USA

Superscript™ II Reverse Transcriptase Set

TOPO TA Cloning®

Platinum® Taq DNA Polymerase

3.2.4 Puffer und Lösungen

Invitrogen Inc.; Carlsbad, CA, USA

10x PCR Rxn Buffer (- MgCl₂)

Biochrom AG; Berlin

Biocoll Separating Solution

RPMI 1640 Medium (1x)

(5,5 g/l NaCl; 5mg/l Phenol Red; 2,0 g/l NaHCO₃; 25 mM HEPES)

Aqua dest. ad 5000 ml

Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München

Bovine Serum Albumin

1x TAE, pH 8,0

24,2 g Tris Base (TRIZMA® Base 99.9%)

5,71 ml Essigsäure (100%)

10 ml 0,5M EDTA

SOC-Medium

(1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, 500g/ml Ampicillin)

LB-Medium, pH 7

(2% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose)

3.2.5 Einwegmaterialien

Polaroid Co.; Cambridge, MA, USA

Land Pack Filme Typ 667 (36DIN)

Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht

S-Monovette® Blutentnahmesystem

Transfer-Pipette 3,5 ml

Becton Dickinson Labware; Franklin Lakes, NJ, USA

Falcon® Serological Pipets

Falcon® Blue Max™ 50 ml Polypropylene Conical Tube

Greiner Bio-One International AG; Kremsmünster, Österreich

CELLSTAR® TC-Tube, 12 ml

CELLSTAR® Cryo.s

2,0 ml Microcentrifugation Tube

Eppendorf AG; Hamburg

PCR-Tubes 0,5 ml, 1,5 ml

Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf

Safeseal Tips Premium 10 µl, 100 µl, 1000 µl

3.2.6 Geräte

Polaroid Co.; Cambridge, MA, USA

CU-5 Nahaufnahme-Kamera

Stratagene; La Jolla, CA, USA

Stratalinker 1800

Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA

Wide Mini Sub Cell (Agarosegelelektrophoresekammer)

IKA® Labortechnik,;Staufen

IKA-EUROTURRAX® T 20 standard

Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG; Eberstadt

Pipetus®-akku

Scaltec Instruments GmbH; Göttingen

SBC 42 Feinwaage
Andreas Hettich GmbH & Co KG; Tuttlingen
Rotina 46
Eppendorf AG; Hamburg
Centrifuge 5415 R
Centrifuge 5810
Research Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl
BioPhotometer
MJ Research Inc.; Watertown, MA, USA
PTC-200 Peltier Thermal Cycler
Labortechnik Fröbel GmbH; Lindau
TFX – 20 M UV-Lampe
F. Hoffmann-La Roche Ltd.; Basel, Schweiz
LightCycler 1.5
LightCycler Capillaries
PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
ABI Prism 7700 Sequence Detector

3.3 Methoden

3.3.1 Zellseparation

Die Patientenproben waren zu Beginn dieser Arbeit bereits aufgearbeitet, so dass nur noch die RNA aus den pelletierten Zellen extrahiert werden musste. Die Proben der Kontrollgruppe wurden aus venösem Blut entnommen und zum Gewinn der mononukleären Zellen aufgearbeitet. Hierzu findet eine Dichteseparation über einen Ficoll-Gradienten statt. Die mononukleären Zellen reichern sich in dem entstehenden Ficollring an. Hierfür wird das Material zunächst 10 Minuten bei 1500g zentrifugiert und das Plasma im Überstand dekantiert. Anschließend wird die Probe mit RPMI auf 5 ml aufgefüllt und mit 4 ml Ficoll unterschichtet. Die Probe wird nun bei 2000g für 18 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Ficoll-Ring enthält die mononukleären Zellen. Er wird abgesaugt und mit 10 ml RPMI gemischt. Die Mischung wird 10 Minuten lang bei 1500g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet zwei weitere Male mit 10 ml RPMI aufgefüllt und zentrifugiert. Die so gewonnenen und gewaschenen

Zellen können jetzt der RNA-Extraktion zugeführt werden. Die Patientenproben wurden ebenso behandelt und zwischenzeitlich in Cryoröhrchen bei -80°C gelagert.

3.3.2 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion werden die gewonnenen Zellen lysiert. Hierzu wird das Material zunächst bei 1500' / Minute sieben Minuten lang zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wird anschließend mit 600 µl des Lyse-Puffers „RLT“ (Bestandteil des *RNeasy® Mini Kit* von Qiagen) gemischt. Anschließend werden die Zellen mit Hilfe eines Dispergiergerätes bei 20.000' / Minute für 30 Sekunden homogenisiert und lysiert.

Im Anschluss findet die eigentliche RNA-Extraktion mit dem *RNeasy® Mini Kit* von Qiagen statt, das die RNA mit Hilfe einer Säule auf Silikongel-Basis vom übrigen Material separiert. 600 µl 70% Ethanol werden der Probe beigefügt. In zwei Durchgängen werden nun je 600 µl der Probe in der *RNeasy® Mini* Säule 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Der Durchfluss wird in einem Röhrchen aufgefangen und anschließend verworfen. In einem ersten Waschschrift wird die Säule nun mit 350 µl Waschpuffer „RW1“ beladen und wieder für 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Zum Ausschluss verbleibender Reste von DNA findet nun ein Verdau des in der Säule gewonnenen Materials mit dem *RNAse-Free DNase Set* von Qiagen statt. Hierzu werden 10 µl DNase Lösung (= 2,73 Units DNase) mit dem 70 µl des Puffers „RDD“ gemischt und auf der Säule platziert. Die Säule wird wiederum mit 350 µl des Waschpuffers „RW1“ beladen und für 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Mit je 500 µl des Waschpuffers „RPE“ wird die Säule nun zweimal gereinigt und dabei zunächst für 15 Sekunden und danach für 2 Minuten bei 8000g zentrifugiert. Der Waschpuffer wird nach beiden Schritten verworfen. Die Säule wird schließlich in einem frischen Auffanggefäß positioniert und nochmals für 1 Minute bei 10.000g zentrifugiert. Anschließend wird die Säule abermals in einem neuen Gefäß positioniert, mit 50 µl RNAse-freiem Wasser (Bestandteil des Kit) beladen und bei 8000g eine Minute lang zentrifugiert. Das Eluat enthält anschließend die in dem Wasser gelöste RNA. In der Folge wird eine photometrische Messung der RNA vorgenommen und der Koeffizient bei 260 nm zu 230 nm Wellenlänge (Proteinfraktion) in Aqua ermittelt. Ein Koeffizient ab 1,8 entspricht dem gängigen Reinheitsanspruch an RNA, so dass Proben diesen mindestens aufweisen mussten. Die Konzentration der RNA wird bei 260 nm Wellenlänge ermittelt

und hiervon ausgehend die Menge RNA-Lösung ermittelt, die 1 µg RNA entsprach. Diese Menge wird später der Reversen Transkription zugeführt. Proben mit zu geringer Konzentration wurden nicht berücksichtigt.

3.3.3 Gelelektrophorese der RNA

RNA ist extrem empfindlich gegenüber Degradierung durch RNAsen. Entsprechend muss die Integrität der RNA überprüft werden [148, 149]. Dies erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese. Hierzu werden 2 µl des Eluats aus 3.3.2 mit 8 µl RNase-freiem Wasser und 2 µl Gelladepuffer (Bromphenolblau, Ficoll, EDTA) gemischt. Diese Probe wird im Agarosegel unter einer angelegten Spannung von 2 V / cm nach Anzahl der Basen der enthaltenen Moleküle aufgetrennt. Die so entstehenden Banden im 1%-Agarose-Gel werden mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Diese Substanz interkaliert mit Nukleinsäuren und fluoresziert in UV-Licht. Mit Hilfe von Markersubstanzen, deren Banden eine definierte Länge haben, kann die Länge der zu bestimmenden Banden beurteilt werden.

Als Kennzeichen intakter RNA sind zwei Banden zu identifizieren: Die lange Bande entsteht durch 28S rRNA (= ribosomale RNA), die kürzere durch 18S rRNA. Das Verhältnis der Fluoreszenz-Intensität beträgt etwa 2:1. Zusätzliche kleinere Banden weisen auf eine beginnende Degradierung der RNA hin. In dieser Studie wurde nur Material analysiert, bei dem vollständig intakte RNA nachgewiesen werden konnte.

Nach Validierung der RNA hinsichtlich Integrität und Reinheit mit den oben beschriebenen Methoden standen Proben von 26 Patienten mit ALL-Erstrezidiv und 53 Patienten mit AML-Ersterkrankung zur Verfügung. Die übrigen getesteten Patientenproben wiesen degradierte oder nicht nachweisbare RNA auf und wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Es konnte intakte und reine RNA von 22 Personen für die Kontrollgruppe gewonnen werden.

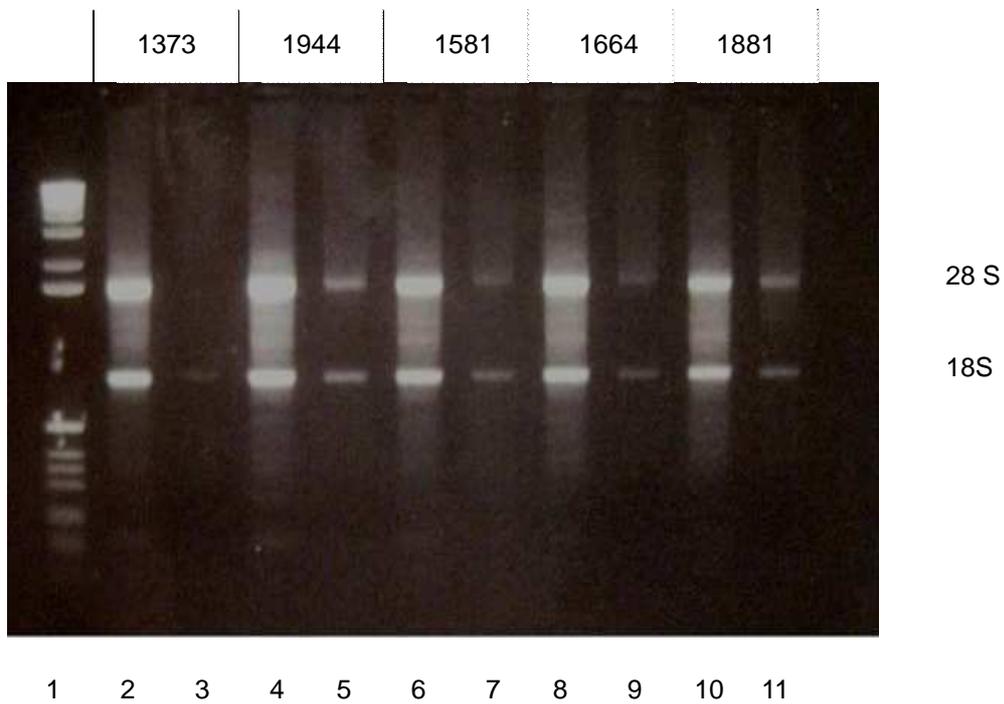


Abb. 3.1: RNA-Gelelektrophorese zur Feststellung der RNA-Integrität bei 5 Proben mit je 2 Banden von Patienten mit ALL-Rezidiv. Obere Beschriftung: Patientencode. Bande 1: Marker. Banden mit gerader Zahl: RNA aus 1. Eluat nach RNA-Isolierung. Banden mit ungerader Zahl: RNA aus 2. Eluat nach RNA-Isolierung. Die Banden zeigen sämtlich intakte RNA. Relevante Verunreinigungen sind nicht darstellbar.

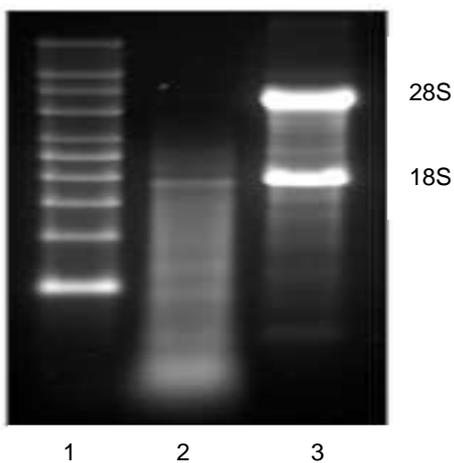


Abb. 3.2: RNA-Gelelektrophorese zur Feststellung von RNA-Integrität. Bande 1: Marker. Bande 2: degradierte RNA. Bande 3: intakte RNA mit Darstellung der 18S und 28S ribosomalen RNA [150].

3.3.4 Reverse Transkription (RT)

Um die RNA der Quantifizierung durch die *Real-Time-PCR* zugänglich zu machen, muss sie zunächst in einsträngige cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden. Hierzu bedient man sich der Reversen Transkription (RT) durch Katalyse des Enzyms Reverse Transkriptase, hier in Form von *Superscript™ II Reverse Transcriptase* von Invitrogen.

Es wird zunächst 1 µg RNA pro Probe auf 10 µl RNase-freies Wasser aufgefüllt. Nach Hinzufügen von 1 µl 106 µM Oligo-dT-Primer wird die Probe bei 70°C 10 Minuten lang inkubiert, um ein *annealing* der Primer zu gewährleisten. Oligo-dT-Primer sind komplementär zum Poly-A-Ende eukaryotischer mRNA. Somit wird mit dieser Methode ausschließlich mRNA und keine anderen RNA-Moleküle in cDNA transkribiert. Nach erfolgter Inkubation werden der Probe 2 µl 0,1-molare DTT-Lösung, 1 ml 10-mM dNTP-Lösung (also zu gleichen Anteilen die Mononukleotide ATP, GTP, TTP und CTP) und 4 µl *5x Superscript II Buffer* hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation (10 Minuten bei 25°C, danach 2 Minuten bei 42°C) wird die Reverse Transkriptase „Superscript II“ hinzugegeben und es erfolgt wiederum eine Inkubation bei 42°C für 50 Minuten und im Anschluss bei 72°C für 15 Minuten, während der das Enzym die Reverse Transkription katalysiert.

3.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen *in vitro* und simuliert mittels der Taq-DNA-Polymerase die DNA-Replikation *in vivo*. In dieser Arbeit wurde die herkömmliche PCR mit anschließender Gelelektrophorese zur Etablierung der Primerpaare und in Zusammenhang mit der Klonierung der Zielsequenzen für die Erstellung der Standardreihen angewendet.

Mit der PCR kann man DNA-Sequenzen bis etwa 10 kb (= 10.000 Basenpaare) amplifizieren. Es werden folgende Komponenten benötigt: DNA; Forward- und Reverse-Primer; DNA-Polymerase; Mononukleotide; Pufferlösung. Die PCR wird mit einem Thermocycler durchgeführt, ein Gerät, mit dem man die für die Reaktion benötigten Temperaturen erreicht.

Die PCR läuft in 3 Phasen ab. In der ersten Phase (*Denaturierung*) wird die doppelsträngige DNA mit Hilfe hoher Temperaturen (normalerweise 95°C) denaturiert

und so in zwei Einzelstränge getrennt. In der zweiten Phase (*Annealing*) bei Temperaturen, die ungefähr 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer (kurze Oligonukleotide, die die DNA-Polymerase als Ausgangspunkt für die Elongation benötigt) liegen, lagern sich diese an die DNA-Einzelstränge an. In der dritten Phase (*Elongation*) katalysiert die DNA-Polymerase die Synthese des neuen DNA-Stranges (Tochterstrang) entlang des alten DNA-Stranges (Mutterstrang), wobei die Mononukleotide als Substrat dienen. Die drei Phasen dauern zusammen etwa zwei Minuten. Zu Beginn der PCR wird ein als *Initiation* bezeichneter Schritt benötigt, der über einige Minuten bei 95°C die Separation der im Ansatz enthaltenen Nukleinsäuren sicherstellt. Die drei eingangs beschriebenen Phasen ergeben zusammen einen PCR-Zyklus. Die gesamte PCR wird über mehrere Zyklen (typischerweise 30) durchgeführt [151, 152].

Die meisten in der Natur vorkommenden DNA-Polymerasen werden durch die hohen Temperaturen zerstört. Daher verwendet man die hitzestabile Taq-Polymerase, die von dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, das bei Temperaturen von über 100°C in Geysiren lebt [153].

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien nach Etablierung der PCR werden im Kapitel 3.3.7 aufgeführt.

3.3.6 Gelelektrophorese der DNA

Das Amplifikat der PCR wird durch eine 3%-Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen. Dies geschieht auf gleiche Weise wie in Kapitel 3.3.3 erläutert. Mit Hilfe des DNA-Längenmarkers kann die Größe der amplifizierten Sequenz ermittelt werden. Stellen sich mehrere Banden dar, so wurde durch die PCR nicht nur die gewünschte DNA-Sequenz amplifiziert. In diesem Fall muss die Methode modifiziert werden.

3.3.7 Klonierung

Für den Gewinn einer suffizienten Menge an DNA für die Herstellung einer Standardreihe wurde die cDNA der jeweiligen Sequenzen (DNMTs und Referenzgene) durch Plasmidklonierung vervielfältigt. Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle, die in Bakterien eingesetzt werden können. Die cDNA hierzu wurde aus gepoolter humaner Testis-RNA gewonnen, die von der Firma Clontech erworben wurde, da hier alle untersuchten Spleißvarianten in ausreichender Quantität nachweisbar sind. Die Plas-

midklonierung beruht auf dem Prinzip, dass ein als Vektor benutztes Plasmid und die zu klonierende DNA-Sequenz von denselben Restriktionsendonukleasen geschnitten werden, wodurch sowohl im Plasmid als auch in der Ziel-DNA zueinander kompatible Abschnitte entstehen. Hierdurch kann die Ziel-DNA in das Plasmid durch Ligatur mittels einer DNA-Ligase integriert werden. Die nun mit dem Plasmid versehenen Bakterien erhalten ebenfalls ein Gen, das ihnen eine Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum verleiht, und werden mit einem Nährmedium bebrütet, das dieses Antibiotikum enthält. Hierdurch überleben im entsprechenden Medium lediglich die mit dem Plasmid ausgestatteten Bakterien [154]. In dieser Arbeit wurde das TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen verwendet, die Plasmidpräparation erfolgte mittels des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen: die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die im Kit enthaltenen E. coli („TOP 10F“, One Shot™) wurden mit Mercaptoethanol und Ligationsansatz gemischt. Es folgte eine Lagerung auf Eis für 30 Minuten sowie kurze Hitzeinwirkung (42°C) sowie erneutes Lagern auf Eis. Daraufhin wurden die Zellen in 250 µl SOC-Medium bei 37°C geschüttelt. Nach Inkubation auf Lauria-Agar-Platten mit Ampicillin bei 37°C konnten die Kolonien mit PCR-Produkt gepickt werden und nach erneuter Inkubation mit Ampicillin-LB-Medium bei 37°C mittels QIAprep Spin Miniprep Kit lt. Angaben des Herstellers isoliert werden.

3.3.8 Sequenzierung

Sowohl die per Klonierung als auch die aus zu untersuchenden Zellen gewonnene cDNA wird durch direkte Sequenzierung mit einem ABI Prism™ 377 DNA-Sequencer (Perkin-Elmer™) analysiert. Die Sequenzierung die DNA findet hierbei durch eine Synthesereaktion statt, bei für jedes der vier Nukleotide in einem optimalen Verhältnis ein verändertes Nukleotid (z.B. Didesoxynukleotid) zum Reaktionsansatz beigefügt wird, das an entsprechender Stelle einen Strangabbruch bewirkt. Die bei der Synthesereaktion entstehenden, verschieden langen DNA-Moleküle bewirken, auf ein Gel aufgetragen, unterschiedliche Banden. Die so synthetisierten DNA-Banden unterschiedlicher Länge liefern in der Gelelektrophorese Banden unterschiedlicher Länge. Der Sequencer kann die DNA-Sequenz durch fluoreszierende Didesoxynukleotide entsprechend der Bandenfolge analysieren [155].

3.3.9 *Real-Time* quantitative RT-PCR

3.3.9.1 *Prinzip*

Wie bereits in Kapitel 1.5 ausgeführt, ermöglicht die *Real-Time*-PCR durch kontinuierliches Messen der in der Probe enthaltenen Menge an DNA mit jedem Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion die Quantifizierung der Ausgangsmenge. Als RT-PCR bezeichnet man eine PCR, mit der cDNA aus einer Reversen Transkription amplifiziert wird.

Die Messung erfolgt durch Fluoreszenz-Markierung der DNA, wobei unterschiedliche Techniken zur Verfügung stehen [156]. In dieser Arbeit wurden Sonden verwendet, die sequenzspezifisch an die zu amplifizierenden DNA-Sequenzen binden. Dies ermöglicht im Gegensatz zu unspezifischen Farbstoffen eine ausschließliche Detektion der zu amplifizierenden Sequenzen. Diese Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid, an dessen Enden je ein Fluorochrom gebunden ist. Am 5'-Ende befindet sich der *Reporter* (in dieser Arbeit der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein oder *FAM*), am 3'-Ende der *Quencher* (hier Rhodamin oder *TAMRA*). Während der *Real-Time*-PCR wird der Reporter mit einer Lichtquelle angeregt. Solange eine enge räumliche Beziehung zum Quencher besteht, wird ein Teil dieser Energie jedoch auf den Quencher übertragen („Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer“ = FRET) und somit die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt. Wenn nun während eines PCR-Zyklus die DNA-Polymerase auf die an den zu amplifizierenden Strang gebundene Sonde trifft, baut sie diese mit der ihr eigenen Exonuklease-Aktivität vom 5'-Ende her ab, wodurch der Reporter den Kontakt zum Quencher verliert und die Energie auf ersteren zurück übertragen wird. Die resultierende Fluoreszenz wird vom in dieser Arbeit verwendeten Gerät, dem LightCycler (Fa. Roche), detektiert. Die optische Einheit des LightCycler emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 470 nm, welches die Reporter anregt, und detektiert bei jedem PCR-Zyklus während der Elongation das von den Reporter-Molekülen nach Trennung vom Quencher emittierte Licht mit Wellenlängen von 530, 640 und 705 nm. Die mit jedem PCR-Zyklus verstärkte Fluoreszenz ist direkt proportional zur vermehrten Menge an PCR-Produkt. Dies ermöglicht die Quantifizierung der DNA [157].

3.3.9.2 Quantifizierung

Die PCR läuft in vier Phasen ab. In Phase 1 ist die Amplifikationsrate noch gering, denn die Wahrscheinlichkeit, dass sich die zur Amplifizierung notwendigen Reaktionskomponenten treffen, ist zunächst klein. Es folgt die frühexponentielle Phase, an die sich die Log-Phase anschließt, während der die Menge an PCR-Produkt log-linear zunimmt. In Phase 4 nimmt der Zuwachs an PCR-Produkt wieder ab, da der Vorrat an Substraten erschöpft ist und die amplifizierten Nukleinsäuren miteinander hybridisieren (Plateau-Phase) [158].

Entscheidend für die Quantifizierung ist die Ermittlung des C_T -Wertes (*Threshold Cycle* = Schwellenwert-Zyklus). Er ist definiert als der Zyklus der PCR, in dem die spezifische Fluoreszenz der Sonde sich erstmals so von der Hintergrundfluoreszenz abhebt, dass das Gerät dies signifikant ermitteln kann. Der C_T -Wert kennzeichnet auch den Übergang in die exponentielle Phase [157]. Er wird von der Software des LightCycler bestimmt.

Zur Quantifizierung einer bestimmten cDNA-Sequenz benötigt man zunächst eine Standardreihe. Hierzu erstellt man eine Verdünnungsreihe einer bekannten Ausgangsmenge der gewünschten Sequenz (beispielsweise 10^7 Kopien) in definierten Schritten (beispielsweise je 1:10). Die Ausgangsmenge an DNA wurde durch Klonierung der entsprechenden Sequenzen gewonnen. Diese Verdünnungsreihe wird der *Real-Time-PCR* zugeführt. Trägt man nun die ermittelten C_T -Werte gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten Kopienzahlen in einem Diagramm auf, so lassen sich anhand einer eingesetzten Trendlinie der Schnittpunkt mit der Y-Achse sowie die negative Steigung der entstandenen Gerade ermitteln. Am Beispiel der Spleißvariante *DNMT3b5* sind diese Schritte am Light Cycler in Abb. 3.3 gezeigt.

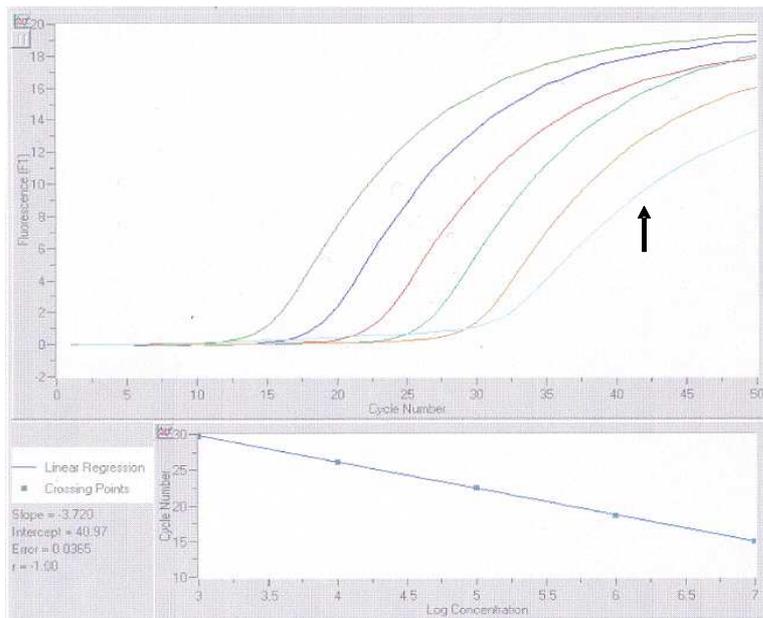


Abb. 3.3: Light-Cycler-Originalausdruck. Oberer Kasten: *Real-Time*-Fluoreszenzkurven der cDNA-Standardreihe von *DNMT3b5* (mittels Klonierung aus humaner Testis-RNA gewonnen) sowie *DNMT3b5*-cDNA direkt aus Testis-RNA (Pfeil). Primer und Sonde wie in Kap. 3.3.9.4 aufgeführt. Unterer Kasten: Eichgerade der Standardreihe; die blauen Kästchen kennzeichnen die CT-Werte der Verdünnungsreihe in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der Kopienzahl..

Die Geradengleichung der Eichgerade lautet:

$$f(x) = -mx + c$$

m = Steigung; x = C_T ; c = Schnittpunkt mit der Y-Achse

Formt man die Gleichung um, so lässt sich damit für eine Probe die Kopienzahl der Zielsequenz bestimmen:

$$\text{Kopienzahl} = 10^{(-x + c) : m}$$

In dieser Form muss für jede zu amplifizierende cDNA-Sequenz eine Standardreihe erstellt werden, mit deren Hilfe sich dann die Ausgangsmenge an Kopien der jeweiligen Probe durch Einsetzen des C_T in die Formel ermitteln lässt.

3.3.9.3 Referenzgene zur relativen Quantifizierung

Die Quantifizierung kann entweder als absolute oder relative Quantifizierung durchgeführt werden. Bei der absoluten Quantifizierung wird über eine vorher definierte Standardreihe die absolute Menge der cDNA über das PCR-Produkt bestimmt. Die relative Quantifizierung setzt die errechnete Menge in Beziehung zur Menge eines

internen Standards; zumeist werden hierfür zelleigene Referenzgene verwendet. Als Referenzgene eignen sich besonders so genannte *Housekeeping*-Gene, deren Proteine für alle Zellen elementare Aufgaben übernehmen und dementsprechend praktisch immer exprimiert werden. Die relative Quantifizierung bietet gegenüber der absoluten zwei wesentliche Vorteile: Methodisch gesehen beeinflussen mögliche Unterschiede in der cDNA-Quantität der untersuchten Proben die Ergebnisse nicht. [156]. Auch die Interpretation der erhobenen Daten wird durch die Verwendung von Referenzgenen robuster, wie im folgenden Abschnitt dargelegt wird:

Vergleicht man stark proliferierende Zelltypen wie Tumorzellen mit anderen, so sind zwei unterschiedliche Typen von Referenzgenen sinnvoll: Das erste sollte unabhängig von Zelltyp und Proteinsynthese-Aktivität der Zelle in möglichst konstanter Menge exprimiert werden. Vergleicht man die Expression des Zielgens mit der des Referenzgens, kann man Aussagen über Expressionsunterschiede des Zielgens zwischen unterschiedlichen Proben und Gewebetypen treffen. Das zweite Referenzgen sollte die Proliferationsaktivität der Zelle widerspiegeln, damit beispielsweise eine scheinbar verstärkte Expression der Zielsequenz im Kontext der insgesamt Synthese-aktiven Zellen gesehen wird und entsprechend interpretiert werden kann [115, 159].

In dieser Arbeit wurde aus den oben genannten Gründen die relative Quantifizierung durchgeführt. In der Literatur werden zahlreiche Referenzgene verwendet; hier wurden *RpL13a* (Ribosomales Protein L13a) als konstant exprimiertes Gen und *PCNA* (Proliferating Cell Nuclear Antigen) als Proliferationsmarker eingesetzt [160-162]. Zur Wahl der Referenzgene siehe auch Kapitel 5.1.1.1.

3.3.9.4 Primer und Sonden

Es wurden exonüberlappende Primer gewählt, um ausschließlich die cDNA zu amplifizieren. Sowohl für DNMT1 als auch für DNMT3b wurde für die Gesamt-mRNA und die Spleißvarianten ein gemeinsamer Forward-Primer ausgesucht, dem ein Spleißvarianten-spezifischer Reverse-Primer und ein gemeinsamer Reverse-Primer für die Gesamtexpression zugeordnet wurden. Die für alle Spleißvarianten gemeinsame Sonde liegt entsprechend in dem jeweils zu amplifizierenden Bereich.



Abb. 3.4: Primerdesign für *DNMT1* und Spleißvarianten. Der gemeinsame Forward-Primer (DNMTex4 F) und die Sonde (DNMT1ex4 TM) liegen in Exon 4, das bei allen untersuchten Spleißvarianten exprimiert wird; analog dazu liegt der gemeinsame Reverse-Primer (DNMT1x5 R) in Exon 5. Exonüberlappend liegen die Reverse-Primer für die Spleißvarianten: Der Reverse-Primer für *DNMT1b* (DNMT1x4a R) in Exon 4 und 4a, das ausschließlich bei dieser Spleißvariante transkribiert wird. Der Reverse-Primer für *DNMT1'* (DNMT1x5x4 R) liegt in Exon 4 und 5 (Exon 4a wird gespleißt).

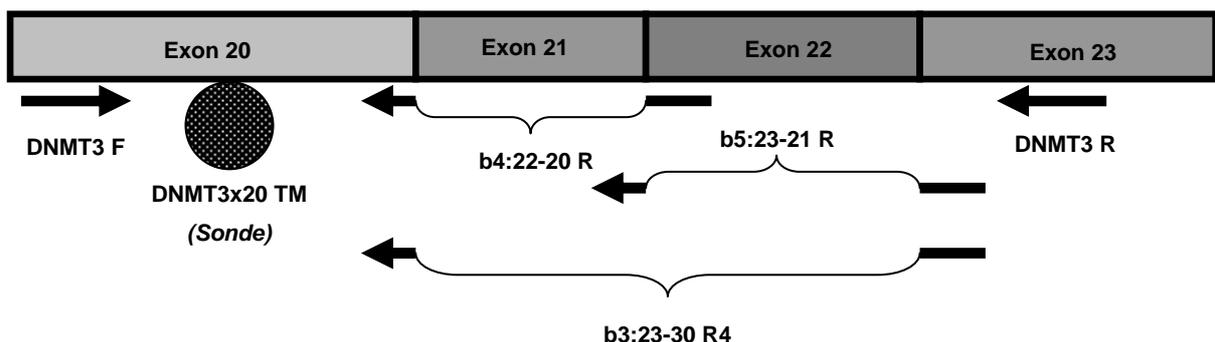


Abb. 3.5: Primerdesign für *DNMT3b* und Spleißvarianten. Der gemeinsame Forward-Primer (DNMT3 F) und die Sonde (DNMT 3x20 T) liegen in Exon 20, das bei allen untersuchten Spleißvarianten exprimiert wird; analog dazu liegt der gemeinsame Reverse-Primer (DNMT3 R) in Exon 23. Exonüberlappend liegen die Reverse-Primer für die Spleißvarianten: Der Reverse-Primer für *DNMT3b3* (b3:23-20 R4) in Exon 20 und 23 (Exon 21 und 22 werden gespleißt), der Reverse-Primer für *DNMT3b4* (b4:22-20 R) in Exon 20 und 22 (Exon 21 und 23 werden gespleißt), der Reverse-Primer für *DNMT3b5* (b5:23-21 R) in Exon 21 und 23 (Exon 22 wird gespleißt).

Folgende Sonden und Primer wurden nach Etablierung für die Expressionsanalyse verwendet:

Tab. 3.1: Liste der verwendeten Sonden für die *Real-Time* RT-PCR. FAM = Fluorescein; TAMRA = Rhodamin.

| cDNA | Sondenname | Sondensequenz (5' → 3') |
|----------------------|---------------------|---|
| <i>DNMT1</i> (alle) | DNMT1ex4 TM (26 bp) | 6FAM- acg ccc agg agg agc aag tcc ga TAMRA t p |
| <i>DNMT3b</i> (alle) | DNMT3x20 TM (24 bp) | 6FAM- ttt ctg ctg ctc aca ggg ccc ga TAMRA t p |
| <i>PCNA</i> | PCNA TM (23 bp) | 6FAM- acc gca acc tgg cca tgg gcg t TAMRA t p |
| <i>RpL13a</i> | L13 TM (26 bp) | 6FAM- ctg ccc cac aaa acc aag cga ggc c TAMRA t p |

Tab. 3.2: Liste der verwendeten Primer für die *Real-Time* RT-PCR. Jeweils gemeinsamer Forward-Primer für die Spleißvarianten von *DNMT1* und *DNMT3b*. bp = Anzahl der Basenpaare.

| cDNA | Primernamen | Primersequenz (5' → 3') |
|----------------|---------------------|---------------------------------------|
| <i>DNMT1</i> | DNMTex4 F (18 bp) | ccc caa acc cct ttc caa |
| | DNMT1x5 R (23 bp) | ctt gta atc ctg ggg cta ggt ga |
| <i>DNMT1'</i> | DNMTex4 F (18 bp) | ccc caa acc cct ttc caa |
| | DNMT1x5x4 R (23 bp) | ggc tag gtg aag gtt cag gct ta |
| <i>DNMT1b</i> | DNMTex4 F (18 bp) | ccc caa acc cct ttc caa |
| | DNMT1x4a R (21 bp) | gag ggt ctc ttg aac ggc tta |
| <i>DNMT3b</i> | DNMT3 F (23 bp) | atc tca cgg ttc ctg gag tgt aa |
| | DNMT3 A Neu (21bp) | ggg tag gtt gcc cca gaa gta |
| <i>DNMT3b3</i> | DNMT3 F (23 bp) | atc tca cgg ttc ctg gag tgt aa |
| | b3:23-30 R4 (25 bp) | gga aag cca aag at cct att cat cc |
| <i>DNMT3b4</i> | DNMT3 F (23 bp) | atc tca cgg ttc ctg gag tgt aa |
| | b4:22-20 R (28 bp) | tat tgt ctg tac ttt ctt taa cct gtt c |
| <i>DNMT3b5</i> | DNMT3 F (23 bp) | atc tca cgg ttc ctg gag tgt aa |
| | b5:23-21 R (23 bp) | agg aaa gcc aaa gat ctt ggc ta |
| <i>PCNA</i> | PCNA f (21 bp) | ggc act caa gga cct cat caa |
| | PCNA A (24 bp) | cgt tat ctt cgg ccc tta gtg taa |
| <i>RpL13a</i> | L13x4 F (18 bp) | gcg gat gaa cac caa ccc |
| | L13x6 R (20 bp) | gta ggc ttc aga cgc acg ac |

3.3.9.5 Reaktionsansatz

2,7 µl 10x Puffer (Invitrogen)
4,05 µl 7,5mM MgCl₂
2,7 µl 2mM dNTP
0,9 µl 10 µM Forward-Primer
0,9 µl 10 µM Reverse-Primer
0,45 µl 10 µM Sonde
0,27 µl BSA
0,15 µl Platinum-Taq-Polymerase (5U/µl)
2 µl cDNA-Template
H₂O ad 25 µl

3.3.9.6 PCR-Bedingungen

Initiation 3 Minuten bei 95°C
45 Zyklen:
15 Sekunden bei 95°C
35 Sekunden bei 66°C

Die PCR wurde so etabliert, dass Ansatz und PCR-Bedingungen für alle Primerpaare gleich verwendet werden konnten. Als Besonderheit für die PCR im LightCycler muss dem Ansatz BSA (*bovine serum albumine*) beigefügt werden, welches das Binden der Taq-Polymerase an die Oberfläche der Glaskapillaren verhindert. Jede cDNA wurde pro Probe zur Validierung dreimal gescreent.

3.4 Statistik

3.4.1 Software

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel (Version 9.0) und SPSS (Version 12.0).

3.4.2 Relative Quantifizierung

Zur relativen Quantifizierung wurde ein Quotient aus DNMT-Kopienzahl und der Kopienzahl der zwei Referenzgene *RpL13a* und *PCNA* gebildet. Der Quotient diente als Rohwert für die statistische Analyse.

Tab.3.3: Beispiel für Errechnung der Rohwerte für die statistische Analyse der DNMT-Expression. Ermittlung der Kopienzahl in der Probe des Patienten wie in Kapitel 3.3.9 erläutert.

| Kopien <i>DNMT1</i> | Kopien <i>PCNA</i> | Kopien <i>RpL13a</i> | Quotient <i>DNMT1 / PCNA</i> | Quotient <i>DNMT1 / RpL13a</i> |
|---------------------|--------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 2565,25 | 16549,18 | 119461,90 | 0,16 | 0,02 |

Durch die Ermittlung der Quotienten werden die Ergebnisse der einzelnen Proben untereinander vergleichbar und statistisch auswertbar.

3.4.3 Testverfahren

Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde als nicht-parametrisches Testverfahren der Mann-Whitney-U-Test zur gewählt. Der p-Wert wurde als zweiseitige Signifikanz ermittelt, da keine Hypothese hinsichtlich einer veränderten Expression formuliert worden war. Aufgrund der nicht normalverteilten Daten (durch Kolmogorov-Smirnov-Test ermittelt) sowie der relativ kleinen Stichproben vor allem hinsichtlich der unterschiedlichen Prognose dient weiterhin zur Darstellung als statistisches Maß der Median der pro Probe ermittelten Quotienten einer Gruppe, welcher dann zum Median der zu vergleichenden Gruppe in Beziehung gesetzt wurde.

Zusätzlich wurde zur Varianzanalyse der Referenzgene das Excel-Add-in *Normfinder* verwendet, das über ein von den Autoren entwickeltes Testverfahren die Varianz der benutzten Gene in Form von Stabilitätswerten sowohl innerhalb eines Kollektivs als auch zwischen verschiedenen Kollektiven ermittelt [163].

3.4.4 Deskriptive Statistik

Für die deskriptive Statistik wurde die Darstellung mit Median, Quartilen und Whiskern in Form des Boxplot gewählt. Die Whisker wurden der gängigsten Definition entsprechend als maximal 1,5-faches des Interquartilabstands gewählt. Diese Parameter sind besonders sinnvoll bei relativ kleinen Stichproben und nicht normalverteilten Daten, da der Einfluss von Extremwerten, Ausreißern und schiefen Verteilungen auf die Darstellung relativ gering ist.

4 Ergebnisse

4.1 DNMT-mRNA-Expression bei ALL-Erstrezidiv

4.1.1 Vergleich DNMT1 und DNMT3b bei ALL und Kontrollkollektiv

Die Proben von 26 Kindern mit ALL-Erstrezidiv sowie 22 Personen des Kontrollkollektivs erfüllten die Einschlusskriterien der Studie. Die *DNMT1*- und *DNMT3b*-cDNA der Leukämiezellen von beiden Patientenkollektiven wurde zunächst mittels der etablierten *Real-Time*-PCR quantifiziert und gegen die cDNA-Menge der Referenzgene *RpL13a* und *PCNA* normalisiert. In einem zweiten Schritt wurden die normalisierten Daten des ALL-Erstrezidiv- und des Kontrollkollektivs miteinander verglichen und hinsichtlich einer unterschiedlichen Expression auf mRNA-Ebene analysiert. Der Kolmogorov-Smirnov-Test ergab eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung für die ermittelten Daten, weshalb die in Kapitel 3.4.4 genannten Testverfahren und deskriptiven Techniken verwendet wurden.

4.1.1.1 cDNA-Quantifizierung von DNMT1 und DNMT3b sowie der Referenzgene

In allen untersuchten Proben konnte cDNA für *DNMT1*, *DNMT3b* sowie für *RpL13a* und *PCNA* amplifiziert und somit quantifiziert werden. Die absolute cDNA-Kopienzahl wurde über den C_T -Wert der jeweiligen Amplifikate und die zuvor etablierten Standardreihen ermittelt (vgl. Kapitel 3.3.9.2). Die Ergebnisse für das ALL-Erstrezidiv sowie das Kontrollkollektiv sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tab. 4.1: Ergebnisse der *Real-Time*-PCR für *DNMT1*, *DNMT3b*, *PCNA* und *RpL13a*. Dargestellt sind der Schwellenwert-Zyklus (C_T) sowie die mittels des C_T errechnete cDNA-Kopienzahl. Angegeben ist der Median des jeweiligen Kollektivs (in Klammern: Interquartilabstand).

| ALL-Erstrezidiv (n=26): | | | | |
|----------------------------------|---|---------------|---|---|
| | <i>DNMT1</i> | <i>DNMT3b</i> | <i>RpL13a</i> | <i>PCNA</i> |
| C_T | 26,85 (1,42) | 30,60 (3,09) | 21,20 (2,55) | 25,00 (1,75) |
| Kopien | $1,9 \times 10^4$ ($2,1 \times 10^4$) | 1893 (6036) | $9,6 \times 10^5$ ($1,4 \times 10^6$) | $6,1 \times 10^4$ ($6,6 \times 10^4$) |
| Kontrollkollektiv (n=22): | | | | |
| | <i>DNMT1</i> | <i>DNMT3b</i> | <i>RpL13a</i> | <i>PCNA</i> |
| C_T | 27,06 (1,05) | 33,01 (1,42) | 22,2 (2,87) | 27,50 (2,47) |
| Kopien | $1,2 \times 10^4$ ($1,1 \times 10^4$) | 384 (351) | $4,7 \times 10^5$ ($7,8 \times 10^5$) | $1,2 \times 10^4$ ($1,5 \times 10^4$) |

Zur relativen Quantifizierung der DNA-Methyltransferasen wurde eine Normalisierung von *DNMT1* und *DNMT3b* gegen die Referenzgene *PCNA* und *RpL13a* durchgeführt. Hierzu wurden die Quotienten aus der cDNA-Kopienzahl der DNMTs und der der Referenzgene gebildet (vgl. Kapitel 3.3.9.3 und 3.4.2) und zwischen den Kollektiven verglichen; zu diesem Zweck wurde mittels Mann-Whitney-U-Test die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Quotienten ermittelt (Kapitel 4.1.1.3 und 4.1.1.4). Zuvor wird eine Analyse der Referenzgene vorgestellt.

4.1.1.2 Analyse der Expression von *PCNA* und *RpL13a*

Hintergrundinformationen zum Thema Referenzgene sind ausführlich in Kapitel 3.3.9.3. aufgeführt. Das Referenzgen *RpL13a* sollte gruppenübergreifend eine relativ konstante Expression aufweisen. Die errechnete *absolute* cDNA-Kopienzahl von *RpL13a* wurde deshalb zwischen ALL- und Kontrollkollektiv verglichen, es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,22$). Mittels der Software *Normfinder* zur Varianzanalyse von Referenzgen-Kandidaten wurde ein gruppenübergreifender Stabilitätswert von 0,185 ermittelt (vgl. Kapitel 5.1.1.1).

Das Referenzgen *PCNA* sollte in dieser Arbeit dazu dienen, die Proliferationsaktivität der untersuchten Gewebe zu repräsentieren. Somit wurde erwartet, dass die Expression in den stark proliferierenden leukämischen Blasten des ALL-Erstrezidiv-Kollektivs in Relation zum konstant exprimierten Gen *RpL13a* höher sein würde als die des Kontrollkollektivs. Dies bestätigte sich bei der entsprechenden Analyse (siehe Abb. 4.1). Die *PCNA*-cDNA ist in Relation zu *RpL13a* im ALL-Kollektiv quantitativ um den Faktor 4 gegenüber den Kontrollen erhöht ($p<0,001$).

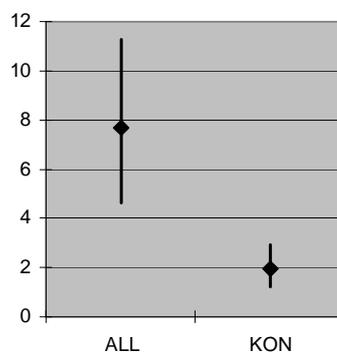


Abb. 4.1: *PCNA*-Expression im ALL-Erstrezidiv- (ALL) und Kontrollkollektiv (KON), präsentiert als Kopien pro 100 Kopien *RpL13a*. Dargestellt sind Median (Rauten) und Interquartilabstand (Striche). Median ALL = 7,66 (IQR 6,64). Median KON = 1,93 (IQR 1,70), ($p<0,001$).

4.1.1.3 ALL-Erstrezidiv und Kontrollkollektiv: Vergleich der DNMT1-mRNA-Expression

DNMT1 / Rpl13a: Kein signifikanter Expressionsunterschied

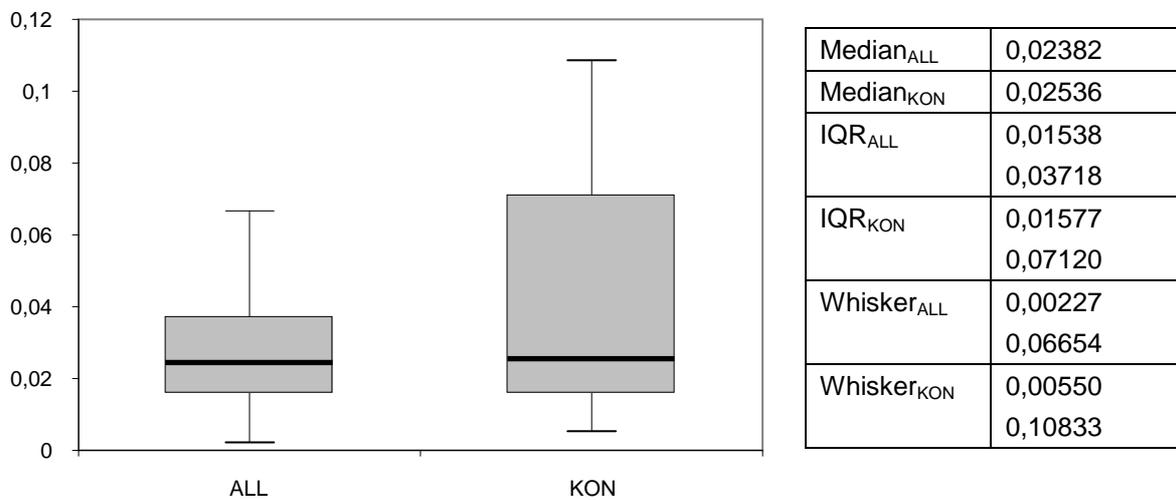


Abb. 4.2.: *DNMT1/Rpl13a*-Quotienten des ALL-Erstrezidiv- (n=26) und Kontrollkollektivs (n=22) im Vergleich. ALL=ALL-Erstrezidiv. KON=Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Whisker entsprechen dem 1,5-fachen IQR. Keine unterschiedliche Expression von *DNMT1* bei Normalisierung gegen *Rpl13a* (**p=0,57**).

DNMT1 / PCNA: Verringerte Expression im ALL-Kollektiv

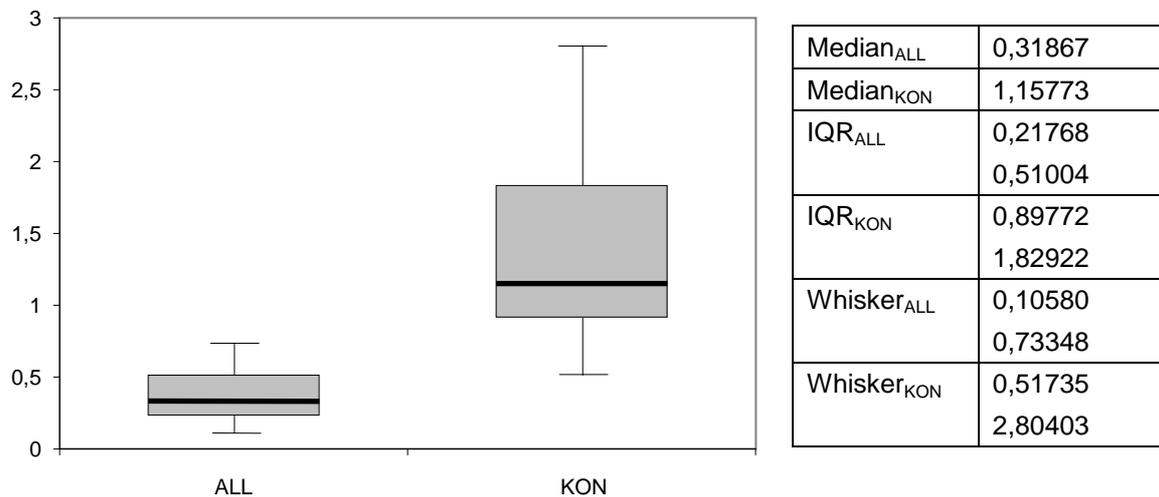


Abb. 4.3.: *DNMT1/PCNA*-Quotienten des ALL-Erstrezidiv- (n=26) und Kontrollkollektivs (n=22) im Vergleich. ALL=ALL-Erstrezidiv. KON=Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Whisker entsprechen dem 1,5-fachen IQR. Signifikant niedrigere Expression von *DNMT1* im ALL-Erstrezidiv-Kollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv bei Normalisierung gegen *PCNA* (**p<0,001**).

In den Abbildungen 4.2 und 4.3 werden das ALL-Erstrezidiv und das Kontrollkollektiv hinsichtlich der Expression von *DNMT1* bei Normalisierung gegen *RpL13a* und *PCNA* verglichen.

Die Analyse zeigt keinen Unterschied der mRNA-Expression von *DNMT1* in Relation zu dem ribosomalen Protein L13a als Referenzgen ($p=0,57$) beim Vergleich des ALL-Erstrezidiv-Kollektivs mit dem Kontrollkollektiv. Hingegen stellt sich eine statistisch signifikante Verminderung der Expression von *DNMT1* im Vergleich zum Kontrollkollektiv dar, wenn der Proliferationsmarker *PCNA* als Referenzgen dient ($p < 0,001$).

4.1.1.4 ALL-Erstrezidiv und Kontrollkollektiv: Vergleich der *DNMT3b*-mRNA-Expression

Nachfolgend werden analog zu Kapitel 4.1.1.2 die Quotienten von *DNMT3b* und der Referenzgene *RpL13a* und *PCNA* des ALL-Erstrezidiv-Kollektivs mit denen des Kontrollkollektivs verglichen und grafisch dargestellt.

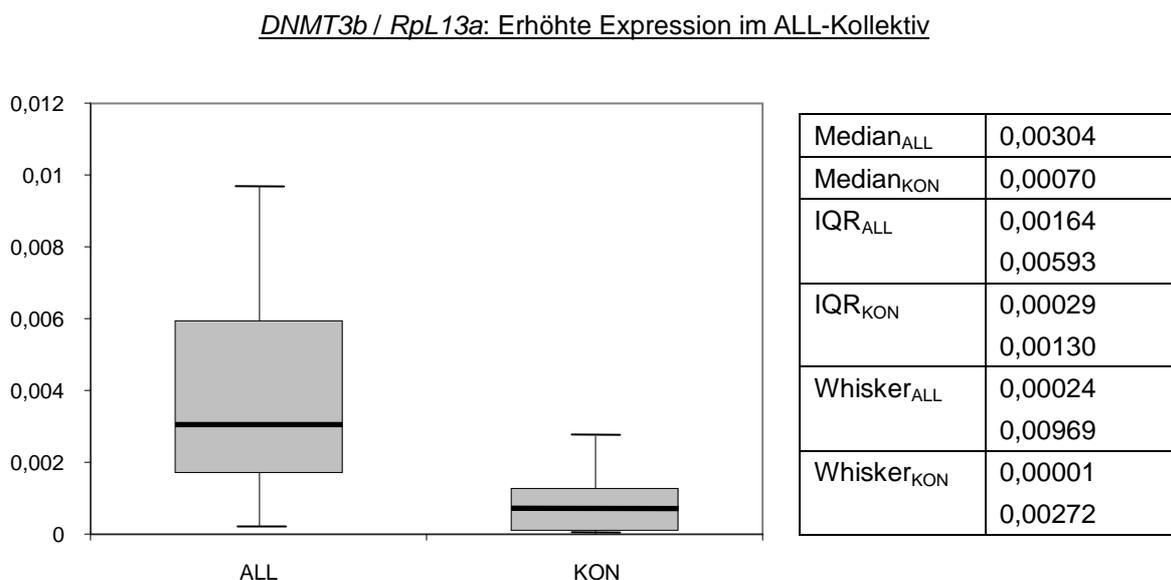


Abb. 4.4: *DNMT3b/RpL13a*-Quotienten des ALL-Erstrezidiv- ($n=26$) und Kontrollkollektivs ($n=22$) im Vergleich. ALL=ALL-Erstrezidiv. KON= Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Whisker entsprechen dem 1,5-fachen IQR. Signifikant höhere Expression von *DNMT3b* im ALL-Erstrezidiv-Kollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv bei Normalisierung gegen *RpL13a* ($p<0,001$).

DNMT3b / PCNA: Kein signifikanter Expressionsunterschied

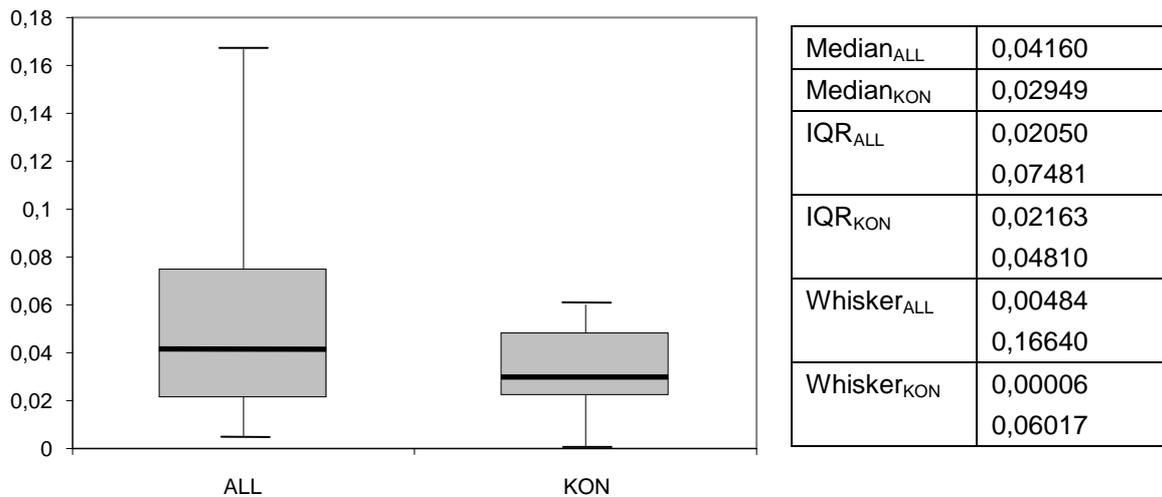


Abb. 4.5: *DNMT3b/PCNA*-Quotienten des ALL-Erstrezidiv- (n=26) und Kontrollkollektivs (n=22) im Vergleich. ALL=ALL-Erstrezidiv. KON= Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Whisker entsprechen dem 1,5-fachen IQR. Keine unterschiedliche Expression von *DNMT3b* bei Normalisierung gegen *PCNA* ($p=0,47$).

Die Analyse der *DNMT3b*-mRNA-Expression zeigt bei Normalisierung gegen *RpL13a* eine signifikant höhere Expression von *DNMT3b* im ALL-Erstrezidiv-Kollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv ($p<0,001$). Bei Normalisierung gegen den Proliferationsmarker *PCNA* zeigt sich kein Unterschied ($p=0,47$).

4.1.2 mRNA-Expression der Spleißvarianten bei ALL-Erstrezidiv

Um das mRNA-Expressionsmuster ausgesuchter Spleißvarianten bei ALL-Erstrezidiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv zu untersuchen, wurde mittels *Real-Time-PCR* die cDNA der DNMT1-Spleißvarianten *DNMT1'* und *DNMT1b* sowie der DNMT3b-Spleißvarianten *DNMT3b3*, *DNMT3b4* und *DNMT3b5* amplifiziert. Auch hierbei dienten die Referenzgene *RpL13a* und *PCNA* der Normalisierung.

4.1.2.1 cDNA-Quantifizierung der Spleißvarianten bei ALL und Kontrollkollektiv

Da nur in einem Teil der Proben Spleißvarianten amplifizierbar waren, wird in den Tabellen 4.2 und 4.3 zunächst der Anteil dieser Proben am Gesamtkollektiv gezeigt, des Weiteren wird für die betreffenden Proben die errechnete Quantität gezeigt.

Tab. 4.2: Ergebnisse der *Real-Time*-PCR für die Spleißvarianten von DNMT1 und DNMT3b im ALL-Erstrezidiv-Kollektiv. Dargestellt sind die Zahl der Proben, bei denen ein Amplifikat nachweisbar war (in Klammern in Prozent aller Proben) sowie der C_T (Schwellenwert-Zyklus) und die errechnete cDNA-Kopienzahl bei den Proben mit nachweisbarem Amplifikat. Angegeben ist der Median des jeweiligen Kollektivs (in Klammern: Interquartilabstand).

| ALL-Erstrezidiv (n=26): | | | |
|--------------------------------|---|----------------|----------------|
| | <i>DNMT1'</i> | | <i>DNMT1b</i> |
| Proben mit Amplifikat | 26 (100%) | | 19 (73%) |
| C_T | 27,27 (1,67) | | 33,06 (1,10) |
| Kopien | $1,7 \times 10^4$ ($1,5 \times 10^4$) | | 571 (329) |
| | <i>DNMT3b3</i> | <i>DNMT3b4</i> | <i>DNMT3b5</i> |
| Proben mit Amplifikat | 23 (88%) | 18 (69%) | 0 |
| C_T | 31,72 (3,13) | 32,86 (2,03) | - |
| Kopien | 1076 (3327) | 447 (328) | - |

Tab. 4.3: Ergebnisse der *Real-Time*-PCR für die Spleißvarianten von DNMT1 und DNMT3b im Kontrollkollektiv. Dargestellt sind die Zahl der Proben, bei denen ein Amplifikat nachweisbar war (in Klammern in Prozent aller Proben) sowie der C_T (Schwellenwert-Zyklus) sowie mittels des C_T errechnete cDNA-Kopienzahl bei den Proben mit nachweisbarem Amplifikat. Angegeben ist der Median des jeweiligen Kollektivs (in Klammern der Interquartilabstand).

| Kontrollkollektiv (n=22): | | | |
|----------------------------------|---|----------------|----------------|
| | <i>DNMT1'</i> | | <i>DNMT1b</i> |
| Proben mit Amplifikat | 22 (100%) | | 19 (86%) |
| C_T | 27,98 (0,95) | | 33,20 (0,92) |
| Kopien | $1,0 \times 10^4$ ($0,7 \times 10^4$) | | 267 (187) |
| | <i>DNMT3b3</i> | <i>DNMT3b4</i> | <i>DNMT3b5</i> |
| Proben mit Amplifikat | 12 (55%) | 0 | 0 |
| C_T | 33,75 (1,46) | - | - |
| Kopien | 305 (210) | - | - |

Folgende Aspekte sind bei den gezeigten Daten besonders hervorzuheben: *DNMT1'* konnte als einzige der ausgewählten Spleißvarianten in allen ALL-Erstrezidiv-Patientenproben sowie allen Kontrollen amplifiziert werden, so dass lediglich diese Spleißvariante einem quantitativen Vergleich zwischen ALL-Erstrezidiv- und Kontrollkollektiv zugeführt werden konnte. *DNMT1b* war in der Mehrzahl der Proben in einer Größenordnung von wenigen hundert Kopien nachweisbar, ebenso *DNMT3b3*. *DNMT3b4* konnte in 69% der Patientenproben des ALL-Erstrezidivs nachgewiesen

werden, im Kontrollkollektiv konnte hingegen keine Amplifikation erzielt werden. *DNMT3b5* war weder in den Patientenproben noch im Kontrollkollektiv nachweisbar.

4.1.2.2 Vergleich der *DNMT1*'-mRNA-Expression bei ALL und Kontrollkollektiv

DNMT1' / *RpL13a*: Kein signifikanter Expressionsunterschied

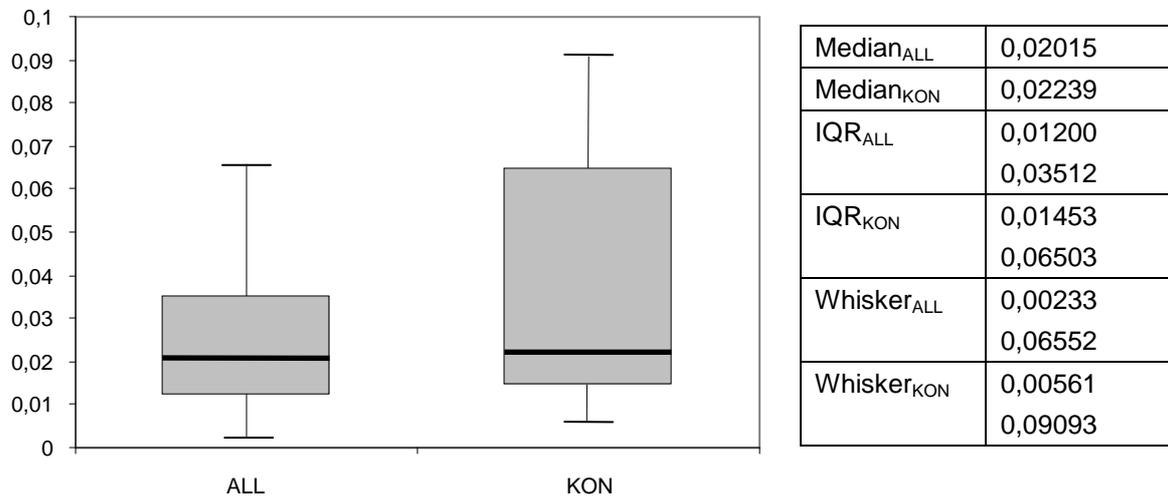


Abb. 4.6: *DNMT1*'/*RpL13a*-Quotienten des ALL-Erstrezidiv- (n=26) und Kontrollkollektivs (n=22) im Vergleich. ALL=ALL-Erstrezidiv. KON= Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Whisker entsprechen dem 1,5-fachen IQR. Keine unterschiedliche Expression von *DNMT1*' bei Normalisierung gegen *RpL13a* (**p=0,39**).

DNMT1'/*PCNA*: Verringerte Expression im ALL-Kollektiv

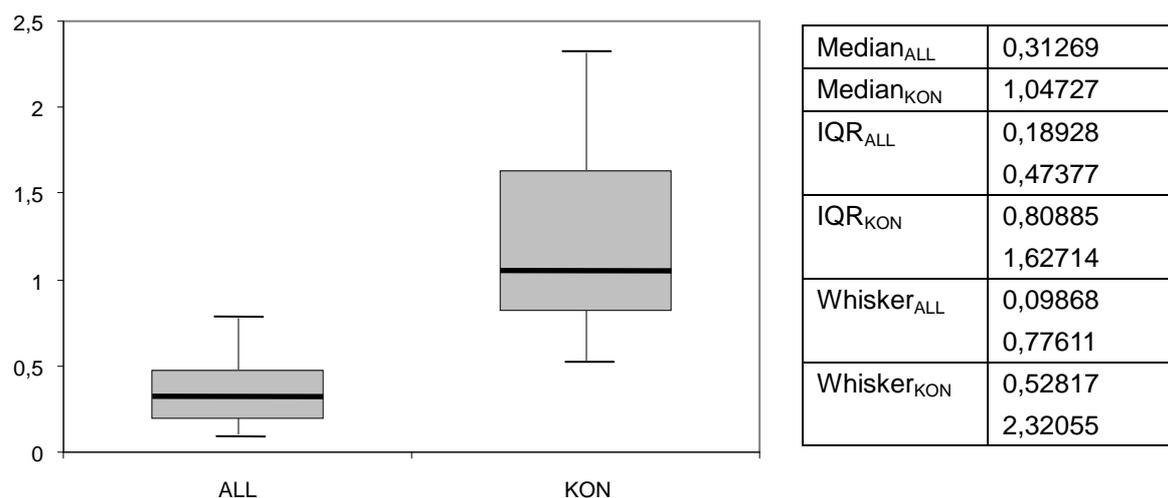


Abb. 4.7: *DNMT1*'/*PCNA*-Quotienten des ALL-Erstrezidiv- (n=26) und Kontrollkollektivs (n=22) im Vergleich. ALL=ALL-Erstrezidiv. KON= Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Signifikant niedrigere Expression von *DNMT1*' im ALL-Erstrezidiv-Kollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv bei Normalisierung gegen *PCNA* (**p<0,001**).

Die Spleißvariante *DNMT1'* konnte in allen ALL-Erstrezidiv-Patientenproben und Kontrollkollektiv-Proben amplifiziert und so hinsichtlich einer unterschiedlichen mRNA-Expression im Vergleich der beiden Kollektive analysiert werden. Hierzu wurden die Quotienten der cDNA-Kopienzahlen der Spleißvariante und der Referenzgene zur Normalisierung der Daten gebildet und nachfolgend auf Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv analysiert (siehe Abbildung 4.6 und 4.7).

Die Analyse der mRNA-Expression von *DNMT1'* als Spleißvariante von *DNMT1* zeigt keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich von ALL-Erstrezidiv-Kollektiv und Kontrollkollektiv bei Normalisierung gegen *RpL13a*. Bei Normalisierung gegen *PCNA* zeigt sich eine verminderte Expression ($p < 0,001$). Damit entspricht der Vergleich der gegen die Referenzgene normalisierten *DNMT1'*-Expression im Wesentlichen dem der *DNMT1*-Gesamtexpression (vgl. Kapitel 4.1.1.2).

Des Weiteren ist der prozentuale Anteil von *DNMT1'* an der Gesamtexpression von *DNMT1* in beiden Kollektiven nahezu gleich:

DNMT1' - Anteil von *DNMT1* im ALL-Erstrezidiv-Kollektiv: 88,3% (IQR 18,3%)

DNMT1' - Anteil von *DNMT1* im Kontrollkollektiv: 89,6% (IQR 10,0%)

Es liegt also kein Unterschied im Verhältnis der Spleißvariante *DNMT1'* zur Gesamtexpression von *DNMT1* bei ALL-Erstrezidiv-Kollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv vor ($p=0,69$). Zweitens wird deutlich, dass *DNMT1'* in beiden Kollektiven den überwiegenden Anteil an der Gesamtexpression stellt. Eine Aussage darüber, ob der fehlende Anteil allein durch *DNMT1b* erklärt werden kann, ist nicht möglich, da *DNMT1b* nicht in allen Proben quantifizierbar war und somit nicht in den Vergleich einbezogen werden kann.

4.1.3 DNMT1 und DNMT3b bei Kindern mit und ohne Folgeereignis

In einer weiteren Analyse wurde untersucht, ob die Expression von DNMT-mRNA mit der weiteren Prognose der Kinder mit ALL-Erstrezidiv korreliert. Das Kollektiv der 26 Patienten mit ALL-Erstrezidiv wurde in 2 Gruppen eingeteilt: 7 Patienten befanden sich nach einem Beobachtungszeitraum von ≥ 3 Jahren in anhaltender kompletter Remission (*continuous complete remission, CCR*), bei 19 Patienten war ein Folgeereignis (keine Remission unter Therapie oder Zweitrezidiv) eingetreten. In Tabelle 6 wird dargestellt, dass für keine der Ziel-/Referenzgen-Kombinationen Unterschiede

zwischen den Prognosegruppen hinsichtlich der mRNA-Expression von *DNMT1* und *DNMT3b* auftreten. Somit kann eine prognostische Relevanz der DNMT-mRNA-Expression für das ALL-Erstrezidiv nicht festgestellt werden.

Tab. 4.4: Vergleich der Quotienten von Ziel – und Referenzgenen der beiden ALL-Erstrezidiv-Prognosegruppen für *DNMT1* und *DNMT3b*. Quotient dargestellt als Median, in Klammern Interquartilabstand. Prognosegruppe 0 = CCR (n=7). Prognosegruppe 1 = Folgeereignis (n=19).

| Prognosegruppe | Enzym | Referenzgen | Quotient | p-Wert |
|----------------|---------------|---------------|-------------------|--------|
| 0 | <i>DNMT1</i> | <i>RpL13a</i> | 0,02295 (0,06220) | 0,78 |
| 1 | <i>DNMT1</i> | <i>RpL13a</i> | 0,02469 (0,01610) | |
| 0 | <i>DNMT1</i> | <i>PCNA</i> | 0,48111 (0,38550) | 0,43 |
| 1 | <i>DNMT1</i> | <i>PCNA</i> | 0,23619 (0,19681) | |
| 0 | <i>DNMT3b</i> | <i>RpL13a</i> | 0,00255 (0,00361) | 0,39 |
| 1 | <i>DNMT3b</i> | <i>RpL13a</i> | 0,00360 (0,00353) | |
| 0 | <i>DNMT3b</i> | <i>PCNA</i> | 0,02560 (0,03909) | 0,31 |
| 1 | <i>DNMT3b</i> | <i>PCNA</i> | 0,05304 (0,06068) | |

4.1.4 DNMT1' bei Kindern mit und ohne Folgeereignis

Auch die Spleißvariante *DNMT1'* wurde hinsichtlich unterschiedlicher mRNA-Expressionsmuster in den beiden Prognosegruppen untersucht. Eine Analyse der anderen Spleißvarianten war nicht möglich, da nicht in allen untersuchten Proben entsprechende cDNA amplifiziert werden konnte. Tabelle 7 zeigt einen Vergleich der Prognosegruppen. Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Spleißvariante *DNMT1'* zwischen den beiden Prognosegruppen feststellbar.

Tab. 4.5: Vergleich der Quotienten von Ziel – und Referenzgenen der beiden ALL-Erstrezidiv-Prognosegruppen für *DNMT1'*. Quotient dargestellt als Median, in Klammern Interquartilabstand. 0 = Gruppe in CCR (n=7). 1 = Gruppe ohne CCR (n=19).

| Prognosegruppe | Enzym | Referenzgen | Quotient | p-Wert |
|----------------|---------------|---------------|-------------------|--------|
| 0 | <i>DNMT1'</i> | <i>RpL13a</i> | 0,02015 (0,04484) | 0,65 |
| 1 | <i>DNMT1'</i> | <i>RpL13a</i> | 0,01941 (0,01369) | |
| 0 | <i>DNMT1'</i> | <i>PCNA</i> | 0,41112 (0,23489) | 0,46 |
| 1 | <i>DNMT1'</i> | <i>PCNA</i> | 0,23258 (0,18979) | |

4.2 DNMT-mRNA-Expression bei AML-Ersterkrankung

4.2.1 Vergleich DNMT1 und DNMT3b bei AML und Kontrollkollektiv

Die Proben von 47 Kindern mit AML-Ersterkrankung erfüllten die Einschlusskriterien der Studie. Die cDNA von *DNMT1* und *DNMT3b* wurde quantifiziert und gegen die cDNA-Menge von *RpL13a* und *PCNA* normalisiert. Im Anschluss wurden die Daten hinsichtlich einer unterschiedlichen Quantität mit dem Kontrollkollektiv verglichen. Der Kolmogorov-Smirnov-Test ergab eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung für die Daten des AML-Kollektivs.

4.2.1.1 cDNA-Quantifizierung von *DNMT1* und *DNMT3b* sowie der Referenzgene

In allen untersuchten AML-Proben konnte cDNA für *DNMT1*, *DNMT3b* sowie *RpL13a* und *PCNA* amplifiziert und quantifiziert werden. Die absolute cDNA-Kopienzahl wurde über den C_T -Wert der jeweiligen Amplifikate und die zuvor etablierten Standardreihen ermittelt (siehe Kapitel 3.3.9.2). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.6 dargestellt; die Daten des Kontrollkollektivs wurden bereits in Tabelle 4.1 (Kap. 4.1.1.1) aufgeführt.

Tab. 4.6: Ergebnisse der *Real-Time-PCR* für *DNMT1*, *DNMT3b*, *PCNA* und *RpL13a*. Dargestellt sind der Schwellenwert-Zyklus (C_T) sowie die mittels des C_T errechnete cDNA-Kopienzahl. Angegeben ist der Median der Daten (in Klammern: Interquartilabstand).

| AML-Ersterkrankung (n=47): | | | | |
|-----------------------------------|--------------|---------------|---|---|
| | <i>DNMT1</i> | <i>DNMT3b</i> | <i>RpL13a</i> | <i>PCNA</i> |
| C_T | 27,93 (2,06) | 30,76 (2,54) | 22,75 (2,01) | 27,73 (2,82) |
| Kopien | 7709 (9476) | 1592 (2533) | $3,2 \times 10^5$ ($4,2 \times 10^5$) | $1,1 \times 10^4$ ($2,6 \times 10^4$) |

Zur relativen Quantifizierung der DNA-Methyltransferasen wurde eine Normalisierung von *DNMT1* und *DNMT3b* gegen die Referenzgene *PCNA* und *RpL13a* durchgeführt. Es wurden die Quotienten aus der cDNA-Kopienzahl der DNMTs und der der Referenzgene gebildet (vgl. Kapitel 3.3.9.3 und 3.4.2) und zwischen den Kollektiven verglichen. Mittels Mann-Whitney-U-Test wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Quotienten ermittelt (Kapitel 4.2.1.2 und 4.2.1.3). Zuvor wird die Analyse der Referenzgene vorgestellt.

4.2.1.2 Analyse der Expression von PCNA und RpL13a

Die errechnete absolute cDNA-Kopienzahl von *RpL13a* als konstant exprimiertem Referenzgen wurde zwischen AML- und Kontrollkollektiv verglichen, es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,20$). Mittels der Software *Normfinder* zur Varianzanalyse von Referenzgen-Kandidaten wurde ein gruppenübergreifender Stabilitätswert von 0,104 ermittelt (vgl. Kapitel 5.1.1.1).

Die Expression von *PCNA* als Proliferationsmarker in Relation zu *RpL13a* als konstant exprimiertem Gen ist in den Proben des AML-Kollektivs wie im Fall des ALL-Kollektivs gegenüber dem Kontrollkollektiv erwartungsgemäß erhöht (um den Faktor 2, $p<0,001$).

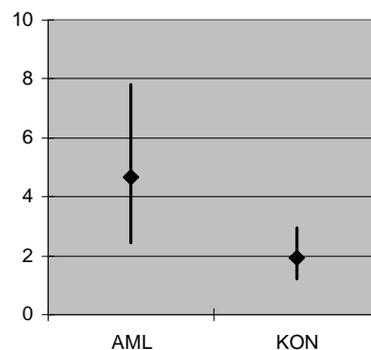


Abb. 4.8: *PCNA*-Expression im AML-Kollektiv (AML) und Kontrollkollektiv (KON), präsentiert als Kopien pro 100 Kopien *RpL13a*. Dargestellt sind Median (Rauten) und Interquartilabstand (Striche). Median AML = 4,21 (IQR 5,37). Median KON = 1,93 (IQR 1,70), ($p<0,001$).

4.2.1.3 AML und Kontrollkollektiv: Vergleich der DNMT1-mRNA-Expression

DNMT1 / Rpl13a: Kein signifikanter Expressionsunterschied

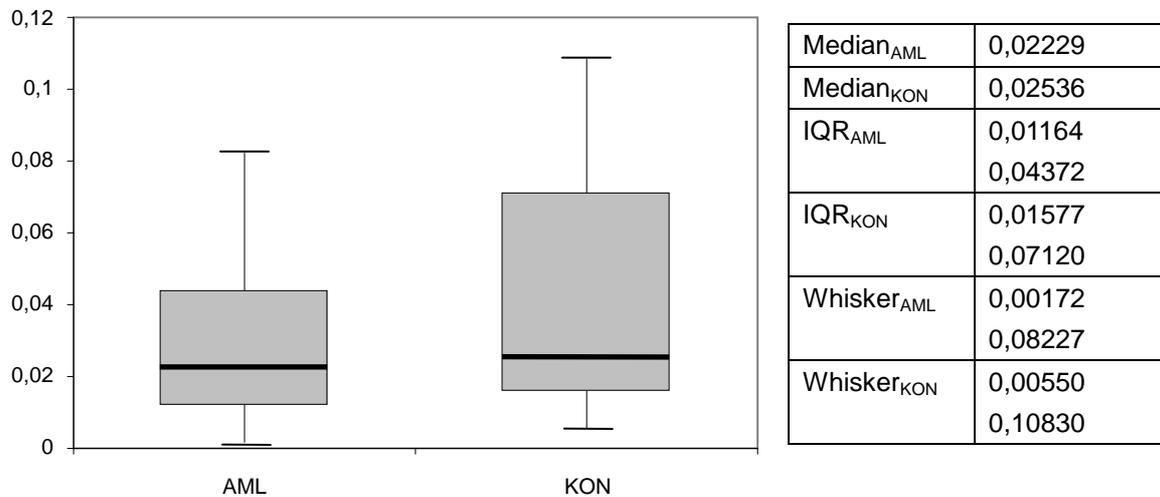


Abb. 4.9: *DNMT1/Rpl13a*-Quotienten des AML- (n=47) und Kontrollkollektivs (n=22) im Vergleich. AML=AML-Ersterkrankung. KON= Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Whisker entsprechen dem 1,5-fachen IQR. Keine unterschiedliche Expression von *DNMT1* im AML-Kollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv bei Normalisierung gegen *Rpl13a* ($p=0,34$).

DNMT1 / PCNA: Verringerte Expression im AML-Kollektiv

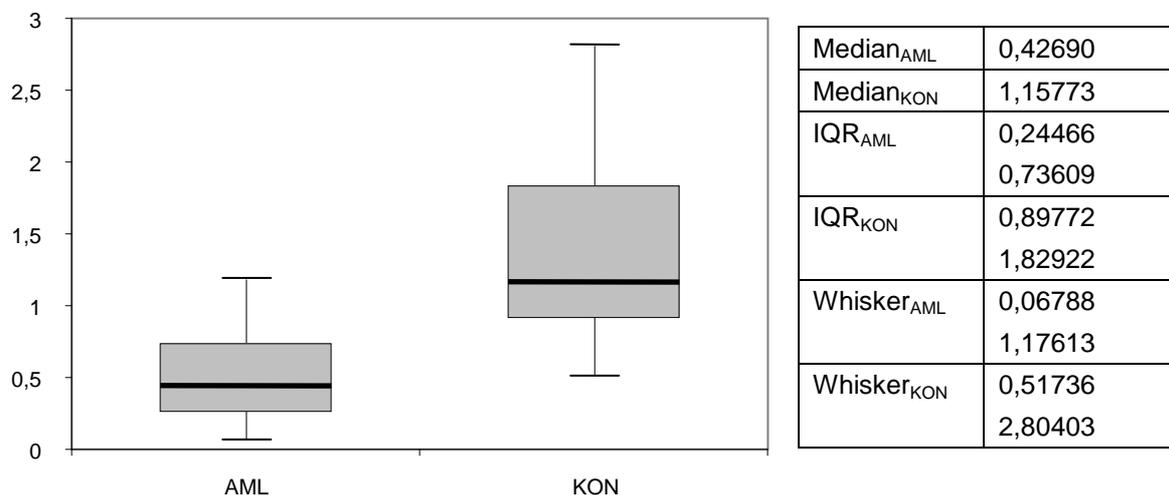


Abb. 4.10: *DNMT1/PCNA*-Quotienten des AML- (n=47) und Kontrollkollektivs (n=22) im Vergleich. AML=AML-Ersterkrankung. KON= Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Whisker entsprechen dem 1,5-fachen IQR. Signifikant niedrigere Expression von *DNMT1* im AML-Kollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv bei Normalisierung gegen *Rpl13a* ($p<0,001$).

In den Abbildungen 4.9 und 4.10 wird die Expression von *DNMT1* bei Normalisierung gegen *RpL13a* und *PCNA* im AML-Kollektiv und Kontrollkollektiv verglichen.

In der Analyse zeigt sich kein Unterschied der mRNA-Expression von *DNMT1* in Relation zu dem ribosomalen Protein L13a als Referenzgen ($p=0,34$) beim Vergleich zwischen dem AML-Ersterkrankungs-Kollektiv und dem Kontrollkollektiv. Dient jedoch der Proliferationsmarker *PCNA* als Referenzgen, so lässt sich eine statistisch signifikante Verminderung der Expression von *DNMT1* im Vergleich zum Kontrollkollektiv feststellen ($p<0,001$).

4.2.1.4 AML und Kontrollkollektiv: Vergleich der *DNMT3b*-mRNA-Expression

Nachfolgend werden die Quotienten von *DNMT3b* und der Referenzgene *RpL13a* und *PCNA* des AML-Ersterkrankungs-Kollektivs mit denen des Kontrollkollektivs verglichen und grafisch dargestellt.

DNMT3b / *RpL13a*: Erhöhte Expression im AML-Kollektiv

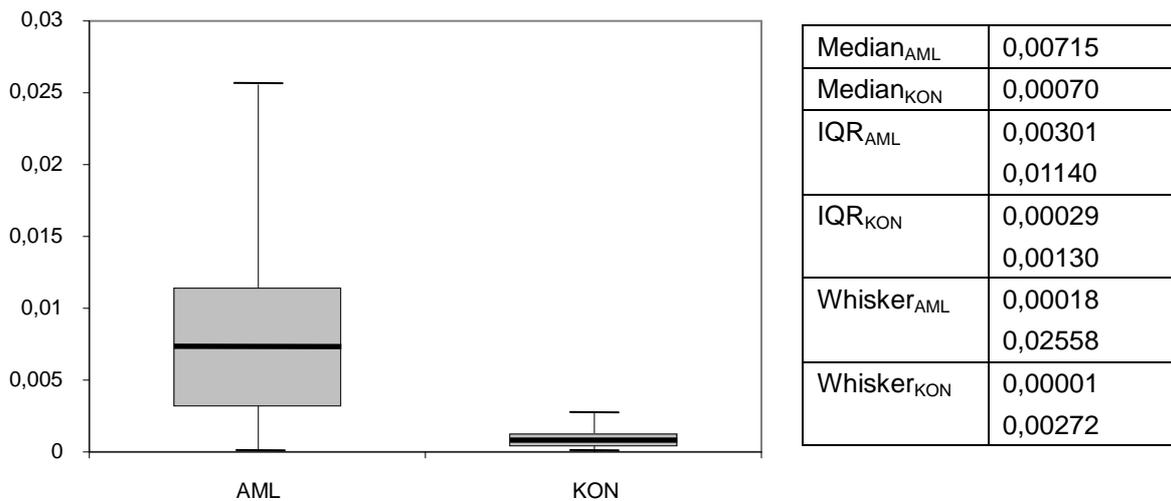


Abb. 4.11: *DNMT3b/RpL13a*-Quotienten des AML- ($n=47$) und Kontrollkollektivs ($n=22$) im Vergleich. AML=AML-Ersterkrankung. KON= Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Whisker entsprechen dem 1,5-fachen IQR. Signifikant höhere Expression von *DNMT3b* im AML-Kollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv bei Normalisierung gegen *RpL13a* ($p<0,001$).

DNMT3b / PCNA: Erhöhte Expression im AML-Kollektiv

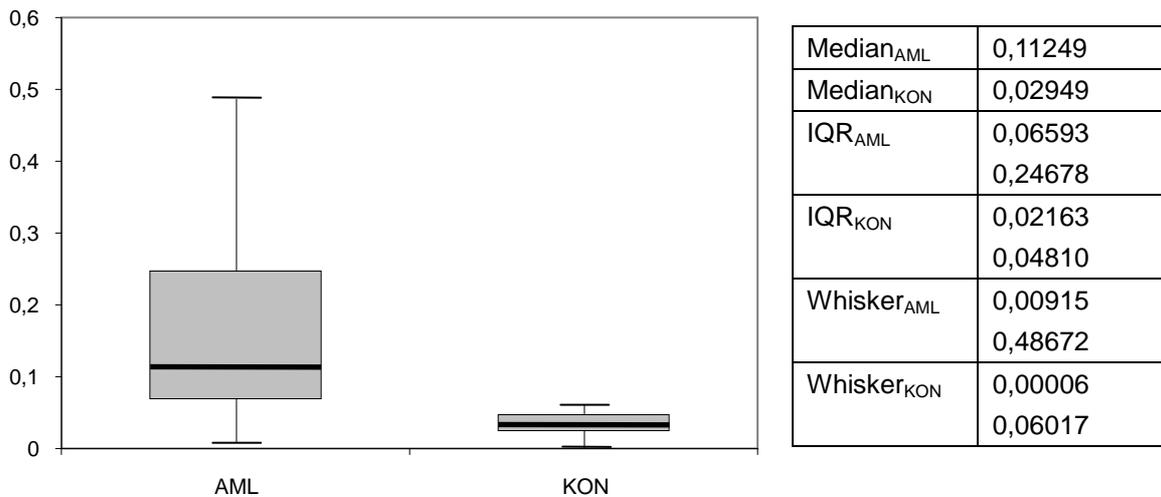


Abb. 4.12: *DNMT3b/PCNA*-Quotienten des AML- (n=47) und Kontrollkollektivs (n=22) im Vergleich. AML=AML-Ersterkrankung. KON= Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Whisker entsprechen dem 1,5-fachen IQR. Signifikant höhere Expression von *DNMT3b* im AML-Kollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv bei Normalisierung gegen *PCNA* ($p < 0,001$).

Die Analyse der *DNMT3b*-mRNA-Expression zeigt sowohl bei Normalisierung gegen *RpL13a* als auch bei Normalisierung gegen den Proliferationsmarker *PCNA* eine signifikant höhere Expression von *DNMT3b* im AML-Kollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv ($p < 0,001$).

4.2.2 mRNA-Expression der Spleißvarianten bei AML-Ersterkrankung

Zur Untersuchung des mRNA-Expressionsmusters ausgesuchter Spleißvarianten im AML-Kollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv wurde mittels *Real-Time-PCR* die cDNA der DNMT1-Spleißvarianten *DNMT1'* und *DNMT1b* sowie der DNMT3b-Spleißvarianten *DNMT3b3*, *DNMT3b4* und *DNMT3b5* amplifiziert. Die Referenzgene *RpL13a* und *PCNA* dienten der Normalisierung.

4.2.2.1 cDNA-Quantifizierung der Spleißvarianten bei AML-Ersterkrankung

Nur in einem Teil der Proben waren Spleißvarianten amplifizierbar. In Tabelle 4.7 wird der Anteil dieser Proben am Gesamtkollektiv sowie für die betreffenden Proben die errechnete Quantität gezeigt.

Tab. 4.7: Ergebnisse der *Real-Time-PCR* für die Spleißvarianten von DNMT1 und DNMT3b bei der AML-Ersterkrankung. Dargestellt sind die Zahl der Proben, bei denen ein Amplifikat nachweisbar war (in Klammern in Prozent aller Proben) sowie der C_T (Schwellenwert-Zyklus) und die errechnete cDNA-Kopienzahl bei den Proben mit nachweisbarem Amplifikat. Angegeben ist der Median des jeweiligen Kollektivs (in Klammern: Interquartilabstand).

| AML-Ersterkrankung (n=47): | | | |
|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | <i>DNMT1'</i> | | <i>DNMT1b</i> |
| Proben mit Amplifikat | 47 (100%) | | 33 (70%) |
| C_T | 28,88 (2,48) | | 33,54 (1,55) |
| Kopien | 6929 (9519) | | 248 (271) |
| | <i>DNMT3b3</i> | <i>DNMT3b4</i> | <i>DNMT3b5</i> |
| Proben mit Amplifikat | 38 (81%) | 33 (70%) | 0 |
| C_T | 31,20 (2,14) | 33,21 (1,36) | - |
| Kopien | 1449 (1605) | 246 (288) | - |

Bei Betrachtung der Daten zeigt sich wie bei den zuvor gezeigten Daten des ALL- und Kontrollkollektivs, dass *DNMT1'* als einzige der ausgewählten Spleißvarianten in allen AML-Patientenproben amplifiziert werden konnte, so dass lediglich diese Spleißvariante einem quantitativen Vergleich zwischen AML-Ersterkrankungs- und Kontrollkollektiv zugeführt werden konnte. *DNMT1b* war in der Mehrzahl der Proben in einer Größenordnung von wenigen hundert Kopien nachweisbar, ebenso *DNMT3b3* und *DNMT3b4*. *DNMT3b5* war in keiner Probe nachweisbar (vgl. Kapitel 4.1.2.1).

4.2.2.2 Vergleich der DNMT1'-mRNA-Expression bei AML und Kontrollkollektiv

DNMT1' / RpL13a: Kein signifikanter Expressionsunterschied

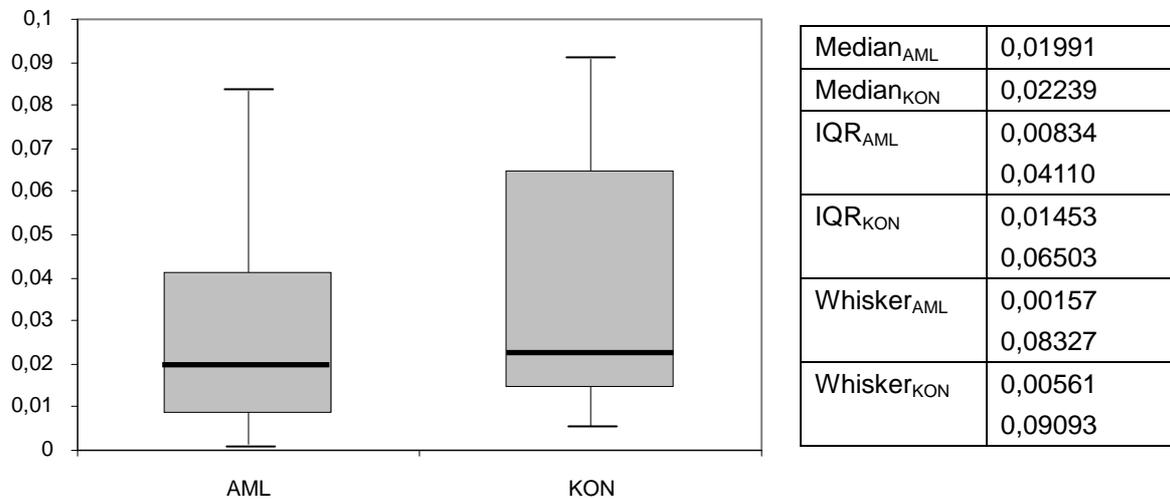


Abb. 4.13: DNMT1'/RpL13a-Quotienten des AML- (n=47) und Kontrollkollektivs (n=22) im Vergleich. AML=AML-Ersterkrankung. KON= Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Dargestellt ist der Median der Quotienten. Keine unterschiedliche Expression von DNMT1' im AML-Kollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv bei Normalisierung gegen RpL13a (p=0,29).

DNMT1' / PCNA: Verringerte Expression im AML-Kollektiv

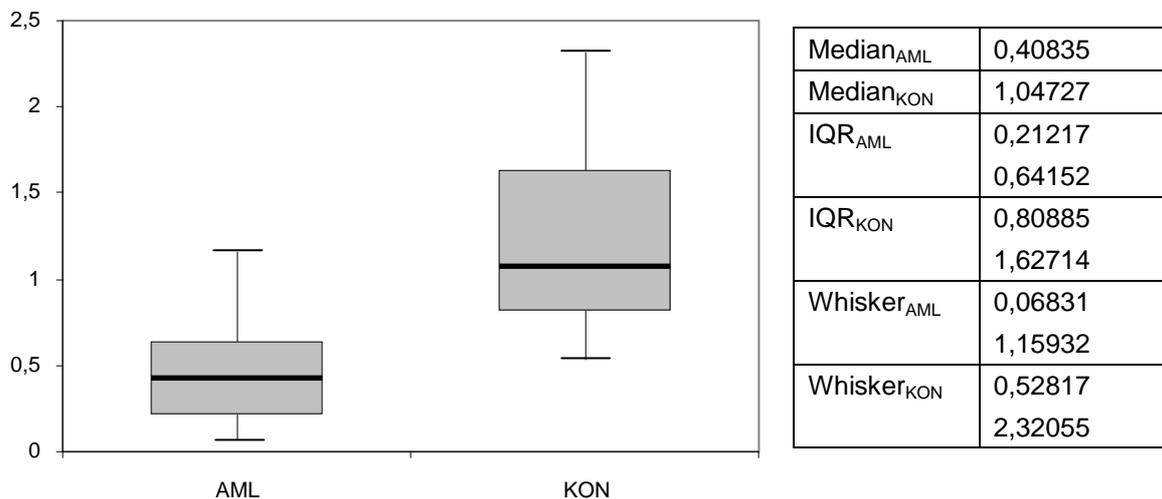


Abb. 4.14: DNMT1'/PCNA-Quotienten des AML- (n=47) und Kontrollkollektivs (n=22) im Vergleich. AML=AML-Ersterkrankung. KON= Kontrollkollektiv. IQR=Interquartilabstand. Signifikant niedrigere Expression von DNMT1' im AML-Kollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv bei Normalisierung gegen PCNA (p<0,001).

Die Spleißvariante *DNMT1'* konnte in allen AML-Patientenproben und Kontrollkollektiv-Proben amplifiziert und somit einem Vergleich der beiden Kollektive hinsichtlich einer unterschiedlichen mRNA-Expression zugeführt werden. Hierzu wurden die Quotienten der cDNA-Kopienzahlen der Spleißvariante und der Referenzgene zur Normalisierung der Daten gebildet und auf bestehende Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv analysiert (siehe Abbildungen 4.13 und 4.14).

Die deskriptive Analyse der mRNA-Expression von *DNMT1'* als Spleißvariante von *DNMT1* zeigt keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich von AML-Ersterkrankungs-Kollektiv und Kontrollkollektiv bei Normalisierung gegen *RpL13a*, während bei Normalisierung gegen *PCNA* eine verminderte Expression feststellbar ist ($p < 0,001$). Dies entspricht dem Vergleich der gegen die Referenzgene normalisierten *DNMT1*-Gesamtexpression (vgl. Kapitel 4.2.1.2) und den Verhältnissen beim ALL-Erstrezidiv (vgl. Kapitel 4.1.2.2).

Wie im Fall des ALL-Erstrezidivs ist der prozentuale Anteil von *DNMT1'* an der Gesamtexpression von *DNMT1* in beiden Kollektiven nahezu gleich:

DNMT1' - Anteil von *DNMT1* im AML-Kollektiv: 91,0% (IQR 20,4%)

DNMT1' - Anteil von *DNMT1* im Kontrollkollektiv: 89,6% (IQR 10,0%)

Es liegt somit kein Unterschied im Verhältnis der Spleißvariante *DNMT1'* zur Gesamtexpression von *DNMT1* im AML-Ersterkrankungs-Kollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv vor ($p = 0,68$). Auch im AML-Kollektiv stellt *DNMT1'* den überwiegenden Anteil an der Gesamtexpression. Eine Aussage darüber, ob der fehlende Anteil allein durch *DNMT1b* erklärt werden kann, ist nicht möglich, da *DNMT1b* nicht in allen Proben quantifizierbar war und somit nicht in den Vergleich einbezogen werden kann.

4.2.3 DNMT1 und DNMT3b bei Kindern mit und ohne Folgeereignis

In der folgenden Analyse wurde untersucht, ob die Expression von DNMT-mRNA mit der weiteren Prognose der Kinder mit AML-Ersterkrankung korreliert. Das Kollektiv der 47 Patienten mit AML-Ersterkrankung wurde in 2 Gruppen eingeteilt: 34 Patienten befanden sich nach einem Beobachtungszeitraum von ≥ 3 Jahren in anhaltender kompletter Remission (*continuous complete remission, CCR*), bei 13 Patienten war ein Folgeereignis (keine Remission unter Therapie oder Rezidiv) eingetreten. Wie in Ta-

belle 4.8 wird dargestellt, tritt für keine der Ziel-/Referenzgen-Kombinationen ein Unterschied zwischen den Prognosegruppen hinsichtlich der mRNA-Expression von *DNMT1* und *DNMT3b* auf. Eine prognostische Relevanz der DNMT-mRNA-Expression kann also nicht festgestellt werden.

Tab. 4.8: Vergleich der Quotienten von Ziel – und Referenzgenen der beiden AML-Prognosegruppen für *DNMT1* und *DNMT3b*. Quotient dargestellt als Median, in Klammern Interquartilabstand. Prognosegruppe 0 = CCR (n=34). Prognosegruppe 1 = Folgeereignis (n=13).

| Prognosegruppe | Enzym | Referenzgen | Quotient | p-Wert |
|----------------|---------------|---------------|-------------------|--------|
| 0 | <i>DNMT1</i> | <i>RpL13a</i> | 0,02025 (0,03186) | 0,78 |
| 1 | <i>DNMT1</i> | <i>RpL13a</i> | 0,02392 (0,02603) | |
| 0 | <i>DNMT1</i> | <i>PCNA</i> | 0,47368 (0,50107) | 0,52 |
| 1 | <i>DNMT1</i> | <i>PCNA</i> | 0,40870 (0,45516) | |
| 0 | <i>DNMT3b</i> | <i>RpL13a</i> | 0,00783 (0,00826) | 0,26 |
| 1 | <i>DNMT3b</i> | <i>RpL13a</i> | 0,00337 (0,00604) | |
| 0 | <i>DNMT3b</i> | <i>PCNA</i> | 0,14011 (0,24733) | 0,11 |
| 1 | <i>DNMT3b</i> | <i>PCNA</i> | 0,08338 (0,05051) | |

4.2.4 DNMT1' bei Kindern mit und ohne Folgeereignis

Nur die Spleißvariante *DNMT1'* wurde hinsichtlich unterschiedlicher mRNA-Expressionsmuster in den beiden Prognosegruppen untersucht, da bei den anderen Spleißvarianten nicht in allen untersuchten Proben cDNA amplifiziert werden konnte. Tabelle 4.9 zeigt einen Vergleich der Prognosegruppen. Signifikante Unterschiede in der Expression der Spleißvariante *DNMT1'* waren zwischen den beiden Prognosegruppen nicht feststellbar.

Tab. 4.9: Vergleich der Quotienten von Ziel – und Referenzgenen der beiden AML-Prognosegruppen für *DNMT1'*. Quotient dargestellt als Median, in Klammern Interquartilabstand. Prognosegruppe 0 = CCR (n=34). Prognosegruppe 1 = Folgeereignis (n=13).

| Prognosegruppe | Enzym | Referenzgen | Quotient | p-Wert |
|----------------|---------------|---------------|-------------------|--------|
| 0 | <i>DNMT1'</i> | <i>RpL13a</i> | 0,01944 (0,03302) | 0,91 |
| 1 | <i>DNMT1'</i> | <i>RpL13a</i> | 0,02566 (0,02718) | |
| 0 | <i>DNMT1'</i> | <i>PCNA</i> | 0,43096 (0,51611) | 0,43 |
| 1 | <i>DNMT1'</i> | <i>PCNA</i> | 0,33322 (0,41201) | |

5 Diskussion

5.1 Methodische Aspekte

Vor der Kurzdarstellung und Interpretation der Ergebnisse werden zunächst zentrale methodische Aspekte der vorliegenden Arbeit diskutiert.

5.1.1 *Real-Time*-RT-PCR zur Quantifizierung von DNMT-mRNA

5.1.1.1 Wahl der Referenzgene zur relativen Quantifizierung von DNMTs

In dieser Arbeit wurde eine relative Quantifizierung der DNMT-mRNA durchgeführt, bei der die Expression des Zielgens in Relation zu einem internen Standard (Referenzgen) gesetzt wird.

Die relative Quantifizierung findet unter der Annahme statt, dass die Expression der Referenzgene einen Vergleich verschiedener Zellpopulationen ermöglicht. Deshalb sollten für die Untersuchung der Genexpression bei Tumoren im Vergleich zu nicht-neoplastischen Zellen zum einen Referenzgene eingesetzt werden, die unabhängig vom Gewebetyp relativ konstant exprimiert werden (in dieser Arbeit *RpL13a*), zum anderen Proliferationsmarker, die die Teilungsaktivität der Zelle widerspiegeln (hier *PCNA*) [115, 159].

Essentiell für ein aussagekräftiges Ergebnis und somit für eine zulässige Interpretation der Daten bei der relativen Quantifizierung von mRNA ist die Wahl der Referenzgene. Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Suche nach Referenzgenen, die eine konstante Expression unabhängig von Gewebetyp und Proliferationsaktivität aufweisen, sowie der Definition von Kriterien zur Feststellung einer hinreichend konstanten Expression. Derzeit wird in der Literatur verlangt, dass durch den Einsatz geeigneter Hilfsmittel (wie beispielsweise der hier verwendeten Software *Normfinder*) in jeder Studie die verwendeten Gene auf ihre Expressionsvarianz hin untersucht werden müssen, da diese je nach Methode und Gewebetyp massive Unterschiede aufweisen kann. Eine unkritische Verwendung von in anderen Arbeiten eingesetzten Genen ohne Untersuchung der eigenen Daten sei unzulässig [164]. In dieser Arbeit wurde *RpL13a* aus zwei Gründen als hinreichend konstant exprimiert angesehen: Erstens zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Kontrollkollektiv und den Patientenkollektiven. Zweitens wurden mittels *Normfinder*, einer in vielen Arbeiten verwendeten und gut etablierten Software zur Ermittlung der Expressi-

onsvarianz von Referenzgenen [163], Stabilitätswerte ermittelt (gruppenübergreifend für ALL- und Kontrollkollektiv 0,185, für AML- und Kontrollkollektiv 0,104). Diese Werte werden in anderen Studien als hinreichend angesehen beziehungsweise unterschreiten die dort akzeptierte Varianz (vgl. Kapitel 3.4.3) [162, 165-167].

Die Expression von *PCNA* in Relation zu *RpL13a* war in den ALL- und AML-Zellen gegenüber dem Kontrollkollektiv signifikant verstärkt, weshalb auch *PCNA* als Proliferationsmarker als geeignet einzustufen ist (vgl. Kapitel 4.1.1.1 und 4.2.1.1).

Somit kann zusammenfassend festgehalten werden, dass sowohl *RpL13a* als konstant exprimiertes Referenzgen als auch *PCNA* als Proliferationsmarker die Voraussetzungen als Referenzgene für die DNMT-Expressionsanalyse erfüllen.

5.1.1.2 Detektion von cDNA in niedriger Kopienzahl

Einige der in dieser Arbeit quantifizierten Spleißvarianten waren in dem untersuchten Material in so geringer Kopienzahl vorhanden, dass Nachweis und Quantifizierung bei nicht allen Proben gelangen (beispielsweise *DNMT3b4*) oder die Detektion gar nicht möglich war (*DNMT3b5*), obwohl die Integrität der Methode über den Nachweis der Enzyme in gepoolter humaner Testis-cDNA gesichert wurde (vgl. Kapitel 3.3.9.2). Hier stellt sich die Frage, ob die Sensitivität der Methode im Literaturvergleich ausreichend gut war. So konnten als minimale Kopienzahl mit der hier verwendeten mathematischen Methode für *DNMT3b4* 57 Kopien errechnet werden. Der CT war in diesem Fall 35,37. Ein größerer CT-Wert (entsprechend einer kleineren Kopienzahl) wurde vom Gerät für keine Probe ermittelt und war auch über eine manuelle Auswertung der Kurvenverläufe nicht feststellbar. Kopienzahlen unterhalb von ungefähr 50 im Ausgangsmaterial wurden somit nicht detektiert. Dies entspricht den in der Literatur für cDNA in Gewebeproben beschriebenen unteren Grenzwerten und stellt somit eine akzeptable Einschränkung dar, auch wenn in einigen Studien, die vor oder während der Durchführung der vorliegenden Arbeit publiziert wurden, vor allem beim Nachweis von genomischer DNA und Plasmid-DNA etwas niedrigere Kopienzahlen amplifiziert werden konnten [168-171]. Lediglich in neuen Arbeiten nach Fertigstellung dieser Studie wurde über etwas sensitivere Methoden berichtet, beispielsweise per nested *Real-Time-PCR* [172]. Der Nachteil für die vorliegende Arbeit liegt darin, dass die betroffenen Spleißvarianten nicht in die Analyse einbezogen werden konnten; ein Vergleich der Expression ist somit nicht möglich.

5.1.1.3 Vergleich mit anderen Methoden zur Quantifizierung von mRNA

Es stehen im Wesentlichen fünf anerkannte Methoden zur Quantifizierung von mRNA zur Verfügung. Neben der in dieser Arbeit verwendeten RT-PCR sind dies *northern blot*, *in situ* Hybridisierung, RNase *protection assay* und *microarray*-Technologien. In den letzten Jahren werden *northern blot*, *in situ* Hybridisierung und RNase *protection assay*, die sich vor allem für qualitative Analysen eignen, kaum mehr verwendet, während die *Real-Time*-RT-PCR die Methode der Wahl geworden ist [164]. Dies liegt vor allem an der besseren Sensitivität und Genauigkeit der *Real-Time*-RT-PCR [173-176]. Während *microarray*-Technologien vor allem die zeitgleiche Expressionsanalyse zahlreicher Gene ermöglichen, besteht der Vorteil der *Real-Time*-RT-PCR für die Quantifizierung weniger Gene in einer hohen Sensitivität, guten Reproduzierbarkeit und großen Spannweite hinsichtlich der Kopienzahl in der zu untersuchenden Probe; deshalb wird empfohlen, mittels *microarray* als Screening-Methode Expressionsmuster zu untersuchen und so identifizierte Gene hinsichtlich einer auffälligen Expression mittels *Real-Time*-RT-PCR zu bestätigen [177].

Außer der *Real-Time*-RT-PCR kann prinzipiell auch eine andere RT-PCR als Methode verwendet werden. Häufig wird zur Quantifizierung von DNMTs bei Tumoren auch die kompetitive RT-PCR eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine PCR mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung des PCR-Produkts. Zur Quantifizierung der Zielsequenz wird der Probe eine als Kompetitor bezeichnete DNA-Sequenz mit anderer Amplifikatlänge hinzugefügt, deren Konzentration bekannt ist und die durch dieselben Primer amplifiziert wird. Über den Unterschied der Fluoreszenzintensität wird indirekt die Ausgangsmenge der Zielsequenz errechnet [178]. Es existieren allerdings einige Nachteile gegenüber der *Real-Time*-PCR: Mit der *Real-Time*-PCR ist es möglich, den genauen Zeitpunkt zu ermitteln, an dem die PCR in die exponentielle Phase eintritt. Dadurch wird verhindert, dass die Quantifizierung des PCR-Produkts während der Plateau-Phase stattfindet, während der keine effiziente Amplifizierung mehr erfolgt. Außerdem führt die Verwendung der Sonden zu einer zusätzlich erhöhten Spezifität. Im Gegensatz zur *Real-Time*-PCR führt die Auswertung der kompetitiven PCR über Nachbearbeitung und Bildanalyse häufig zu systematischen Fehlern. Außerdem ist die Spanne der Kopienzahl limitiert, da diese nur dann bestimmbar ist, wenn sie sich innerhalb der Verdünnungsreihe des Kompetitors bewegt [179]. Die *Real-Time*-PCR hat aus den genannten Gründen die kompetitive

PCR weitgehend verdrängt und kann weiterhin als Goldstandard unter den mRNA-Quantifizierungsmethoden angesehen werden [164].

Insgesamt ist somit die in dieser Arbeit verwendete *Real-Time*-RT-PCR die derzeit für die Fragestellungen adäquate Methode zur Quantifizierung von DNA-Methyltransferasen auf mRNA-Ebene.

5.1.2 Quantifizierung von DNMTs auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich

DNA-Methyltransferasen üben ihre katalytische Aktivität als Proteine aus. Insofern ist zu diskutieren, ob die Quantifizierung der mRNA die Expression der DNMTs adäquat widerspiegelt oder durch eine Quantifizierung auf Proteinebene ergänzt werden sollte. Die hier analysierte mRNA entsteht nach Transkription der für die DNMTs kodierenden DNA in heterogene nukleäre RNA und deren anschließender Modifikation (z. B. alternatives Spleißen) [180]. Sie stellt somit eine Zwischenstufe auf dem Weg zum katalytisch aktiven Protein dar. Auf diesem Weg existieren diverse Modifikations- und Regulationsmechanismen, die sowohl die Funktion des Proteins als auch die letztendlich aus einer bestimmten Zahl von mRNA-Molekülen hervorgehende Menge an katalytisch aktiven Proteinen verändern können. mRNA-Moleküle können vor der Translation in Proteine degradiert werden [181]. Die Translation von mRNA in Proteine kann durch verschiedene Mechanismen modifiziert bzw. inhibiert werden, so beispielsweise durch Interaktion inhibitorischer Faktoren mit den für die Initiation der Translation verantwortlichen Initiationsfaktoren (eIF1-5) oder das sogenannte *frameshifting* während der Elongation [182]. Die detektierte Menge an mRNA kann also deutlich von der Menge des katalytisch aktiven Enzyms abweichen. Soll analysiert werden, ob eine veränderte Anzahl von DNMT-Molekülen eine Rolle in der Tumorgenese von Leukämien hat, erscheint zunächst die Quantifizierung der DNMT-Proteine als biologisch aktive Form gegenüber der mRNA-Quantifizierung sinnvoller.

Es ist jedoch bisher nicht untersucht worden, ob die oben beschriebenen Prozesse auch bei DNMTs eine Rolle hinsichtlich der definitiven Molekülmenge auf Proteinebene spielen. In einigen Studien wurde jedoch eine DNMT-Quantifizierung sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene durchgeführt. Hier zeigte sich, dass eine Veränderung der mRNA-Expression mit einer entsprechenden Änderung der DNMT-Menge auf Proteinebene (jeweils immunhistochemisch nachgewiesen) korrelierte [183-185]. Nur in einer Studie konnte eine signifikante Abweichung der Expression

auf mRNA- und Proteinebene für DNMT1 gezeigt werden, während eine entsprechende Tendenz ohne statistische Signifikanz für DNMT3a vorhanden war. DNMT3b wurde in dieser Studie nicht untersucht [117].

Unter Berücksichtigung der momentanen Datenlage scheint eine veränderte DNMT-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ohne signifikante Alteration der Molekülanzahl auf dem Weg von mRNA zum Protein stattzufinden, weshalb die Analyse auf mRNA-Ebene hinsichtlich der Aussagekraft als geeignet anzusehen ist.

5.2 Kurzdarstellung der Ergebnisse

In der hier vorgestellten Arbeit sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der Expression der DNA-Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3b sowie ausgesuchter Spleißvarianten bei akuten Leukämien im Kindesalter im Vergleich zu gesunden Probanden bestehen und ob ein Zusammenhang zwischen der Expression und der Prognose der Patienten existiert. Im Hinblick auf die Fragestellungen können folgende Ergebnisse zusammenfassend dargestellt werden:

ALL-Rezidiv: Expression von DNMT1 und DNMT3b

Tab. 5.1: Ergebnisse der Expressionsanalyse von *DNMT1* und *DNMT3b* normalisiert gegen *RpL13a* und *PCNA* für das ALL-Kollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv (KON). n.s.=nicht signifikant.

| DNMT | Referenzgen | Vergleich zu KON |
|---------------|---------------|-------------------|
| <i>DNMT1</i> | <i>RpL13a</i> | n. s. |
| <i>DNMT1</i> | <i>PCNA</i> | Erniedrigt |
| <i>DNMT3b</i> | <i>RpL13a</i> | Erhöht |
| <i>DNMT3b</i> | <i>PCNA</i> | n. s. |

AML-Ersterkrankung: Expression von DNMT1 und DNMT3b

Tab. 5.2: Ergebnisse der Expressionsanalyse von *DNMT1* und *DNMT3b* normalisiert gegen *RpL13a* und *PCNA* für das AML-Kollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv (KON). n.s.=nicht signifikant.

| DNMT | Referenzgen | Vergleich zu KON |
|---------------|---------------|-------------------|
| <i>DNMT1</i> | <i>RpL13a</i> | n. s. |
| <i>DNMT1</i> | <i>PCNA</i> | Erniedrigt |
| <i>DNMT3b</i> | <i>RpL13a</i> | Erhöht |
| <i>DNMT3b</i> | <i>PCNA</i> | Erhöht |

Expression der Spleißvarianten:

Die Spleißvarianten *DNMT1b* sowie *DNMT3b3* konnten in allen Kollektiven nur in einem Teil der Proben nachgewiesen werden; *DNMT3b4* nur in einem Teil der ALL- und AML-Proben, nicht jedoch im Kontrollkollektiv. *DNMT3b5* wurde in keiner Probe amplifiziert. Nur *DNMT1'* konnte in allen Proben amplifiziert und somit der vergleichenden Analyse zugeführt werden. Der Anteil an der Gesamtexpression von *DNMT1* lag sowohl in den Leukämie-Kollektiven als auch im Kontrollkollektiv bei rund 90%.

Tab. 5.3: Ergebnisse der Expressionsanalyse von *DNMT1'* normalisiert gegen *RpL13a* und *PCNA* für das ALL- und AML-Kollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv (KON). n.s.=nicht signifikant.

| DNMT | Referenzgen | Vergleich zu KON |
|---------------|---------------|-------------------|
| <i>DNMT1'</i> | <i>RpL13a</i> | n. s. |
| <i>DNMT1'</i> | <i>PCNA</i> | Erniedrigt |

Expression von DNMT1 und DNMT3b bei Kindern mit und ohne Folgeereignis:

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von *DNMT1* und *DNMT3b* in den beiden Prognosegruppen der ALL- und AML-Patienten.

Expression der Spleißvarianten bei Kindern mit und ohne Folgeereignis:

Nur *DNMT1'* wurde analysiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den beiden Prognosegruppen der ALL- und AML-Patienten.

5.3 Interpretation und Einordnung der Ergebnisse

5.3.1 Definition einer aberranten DNMT-mRNA-Expression

Bereits 1996 konnten Lee et al. nachweisen, dass eine absolute Erhöhung der mRNA-Expression von DNMTs in Kolonkarzinom-Zellen nicht mehr feststellbar ist, wenn sie in Relation zu einem Proliferationsmarker (in diesem Fall cDNA des Histonproteins H4F2 sowie *PCNA*) bestimmt wird [186]. Die Autoren folgerten daraus, dass die DNMT-Expression, die in proliferierenden Zellen aufgrund ihrer Funktion grundsätzlich relativ hoch anzusiedeln ist [187], in den stark proliferierenden Kolonkarzinom-Zellen nicht unphysiologisch verstärkt sei und somit eine Normalisierung der DNMT-Expression gegen einen Proliferationsmarker bei Studien über Tumoren

wichtig ist. Seither wurde in zahlreichen Arbeiten, die die DNMT-Expression in Tumoren untersucht haben, ein Proliferationsmarker verwendet und entsprechend in die Dateninterpretation einbezogen (Referenzen siehe Kapitel 5.3.2 und 5.3.3).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde für die vorliegende Arbeit die Interpretation der DNMT-Expression unter Berücksichtigung sowohl des konstant exprimierten Referenzgens *RpL13a* als auch des Proliferationsmarkers *PCNA* vorgenommen:

1. Eine verstärkte DNMT-Expression in Leukämiezellen gegenüber der physiologischen Expression in Leukozyten wurde nur dann angenommen, wenn diese sowohl im Vergleich zu dem konstant exprimierten Gen *RpL13a* als auch zu *PCNA* festzustellen ist, da durch *PCNA* als Proliferationsmarker berücksichtigt wird, dass in neoplastischem Gewebe aufgrund der ausgeprägten Proliferationsaktivität die mRNA-Synthese vermehrt stattfindet. Eine verstärkte Expression im Vergleich zu *RpL13a* bei konstanter Expression gegenüber *PCNA* weist hingegen auf eine Expression hin, die mit der Proliferationsaktivität der Zelle korreliert.

2. Umgekehrt wurde die Annahme einer reduzierten Expression gegenüber physiologischen Verhältnissen nur dann als hinreichend begründet angesehen, wenn eine solche nicht nur bei Normalisierung gegen *PCNA*, sondern auch gegen das von der Proliferationsaktivität in seiner Expression wenig beeinflusste Gen *RpL13a* gemessen wird. Bei konstanter Expression im Vergleich zu *RpL13a* und reduzierter Expression gegenüber *PCNA* wurde von einer Expression ausgegangen, die der von schwach proliferierenden Zellen entspricht.

Somit lassen sich hinsichtlich der erhobenen Daten folgende Aussagen treffen:

ALL-Erstrezidiv:

- Die Expression von *DNMT1* ist gegenüber physiologischen Verhältnissen nicht verändert: Im Vergleich zu *RpL13* zeigt sich eine konstante, zu *PCNA* eine verminderte Expression. Es besteht somit keine Korrelation mit der Proliferationsaktivität.
- *DNMT1'* als einzige analysierbare Spleißvariante zeigt dasselbe Muster.
- Die Expression von *DNMT3b* ist nicht verändert: Im Vergleich zu *RpL13a* ist sie verstärkt, zu *PCNA* indes konstant. Die Expression von *DNMT3b* korreliert somit mit der Proliferationsaktivität.
- Eine prognostische Bedeutung der Expression ist nicht feststellbar.

AML-Ersterkrankung:

- Die Expression von *DNMT1* ist gegenüber physiologischen Verhältnissen nicht verändert: Im Vergleich zu RpL13 zeigt sich eine konstante, zu *PCNA* eine verminderte Expression. Es besteht somit keine Korrelation mit der Proliferationsaktivität.
- *DNMT1'* als einzige analysierbare Spleißvariante zeigt dasselbe Muster.
- Die Expression von *DNMT3b* ist verstärkt. Dies zeigt sich im Vergleich mit beiden Referenzgenen.
- Eine prognostische Bedeutung der Expression ist nicht feststellbar.

5.3.2 DNMT1-Expression bei Leukämien im Kindesalter

In der vorliegenden Arbeit konnten gezeigt werden, dass DNMT1 in leukämischen Zellen bei ALL-Erstrezidiv und AML-Ersterkrankung in derselben Größenordnung exprimiert wird wie unter physiologischen Bedingungen und die Expression somit nicht mit der hohen Proliferationsaktivität der Zellen korreliert.

Es ist seit langem bekannt, dass in nicht-malignen Geweben die Expression von DNMT1 mit der Proliferationsaktivität von Zellen korreliert [187, 188]. Bei neoplastischen Erkrankungen hingegen ist die Studienlage uneinheitlich:

In einigen Arbeiten wird über eine mit der Proliferation korrelierende Expression berichtet unter Einsatz von sowohl konstant exprimierten Referenzgenen als auch Proliferationsmarkern. Hierzu zählt die in Kapitel 5.3.1 aufgeführte Studie von Eads et al., in der Patienten mit Kolonkarzinom untersucht wurden [115]. Gleiche Resultate existieren für das Magenkarzinom und die B-CLL [189, 190]. In einem gemischten Kollektiv (Entitäten siehe Tab. 5.4) stellten Robertson et al. eine geringfügig verstärkte Expression gegenüber den Kontrollen fest [37].

Bei erwachsenen Patienten mit AML ist die Expression von *DNMT1* auch nach Normalisierung gegen *PCNA* verstärkt [120]. Als weitere Entitäten, bei denen unter Verwendung eines Proliferationsmarkers eine verstärkte Expression von *DNMT1* gezeigt wurde, sind das Myelodysplastische Syndrom (FAB-Subtypen RA und RAEB) und das Bronchialkarzinom zu nennen [191, 192].

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete *DNMT1*-Expression auf relativ *niedrigem* Niveau ist somit offenbar kein generelles Phänomen bei Neoplasien. Jedoch wurde

in der einzigen bislang publizierten Arbeit über die DNMT-Expression bei ALL-Ersterkrankung im Kindesalter (n=18) ebenfalls eine niedrige *DNMT1*-Expression festgestellt. Auch hier war die Expression gegenüber dem Kontrollkollektiv nicht verändert bei Normalisierung mit einem konstant exprimiertem Referenzgen (*GAPDH*) und es zeigte sich ein deutlicher Trend zu einer verminderten Expression bei Normalisierung mit *PCNA* (p=0,06) [121].

In Tabelle 5.4 sind die oben genannten Studien näher beschrieben.

Tab. 5.4: *DNMT1*-Expressionsanalysen mit Proliferationsmarker. k=konstant exprimiertes Gen. p=Proliferationsmarker. ↔ : Expression korreliert mit Proliferation. ↑ : Expression verstärkt. *Heterogenes Kollektiv mit Blasen-, Kolon-, Nieren-, Pankreaskarzinom und jeweils gepaartem gesundem Gewebe.

| Entität | Kontrollkollektiv | Methode | Referenzgene | Expression | Ref. |
|--|--|--|---|------------|-------|
| Kolon-CA (n=25) | Gesunde Kolonmukosa (n=25) | <i>Real-Time</i> -PCR | <i>β-Actin</i> (k) <i>POLR2A</i> (k) <i>PCNA</i> (p) <i>H4F2</i> (p) | ↔ | [115] |
| Magen-CA (n=34) | Gesunde Magenmukosa (n=34) | <i>Real-Time</i> -PCR | <i>GAPDH</i> (k) <i>H4F2</i> (p) | ↔ | [189] |
| B-CLL (n=15) | B-Zellen gesunder Probanden (n=11) | <i>Real-Time</i> -PCR | <i>GAPDH</i> (k) <i>PCNA</i> (p) | ↔ | [190] |
| * (n=10) | | <i>northern blot</i> | <i>PCNA</i> (p) | (↑) | [37] |
| Adulte AML (n=33) | CD34+-KM-Zellen Mononukleäre Zellen (Fallzahl nicht genannt) | Kompetitive PCR | <i>GAPDH</i> (k) <i>PCNA</i> (p) | ↑ | [120] |
| MDS FAB RA (n=27) MDS FAB RAEB (n=27) | KM-Zellen gesunder Probanden (n=15) | <i>Real-Time</i> -PCR | <i>Cyclin D2</i> (p) <i>PCNA</i> (p) | ↑ | [192] |
| Pädiatrische ALL (n=18) | Mononukleäre Zellen gesunder Probanden (n=18) | RT-PCR (Gel- Fluoreszenz- Intensität) | <i>GAPDH</i> (k) <i>PCNA</i> (p) | ↔ (↓) | [121] |
| Bronchial-CA (n=102) | Lungengewebe gesunder Probanden (n=102) | RT-PCR (Gel- Fluoreszenz- Intensität) | <i>PCNA</i> (p) | ↑ | [191] |

Einige Studien, die eine verstärkte Expression von *DNMT1* bei Tumoren beschreiben, wurden ohne Proliferationsmarker durchgeführt, weshalb möglicherweise ein verzerrtes Bild der Expression entstanden ist [103, 117, 193-195]. Auch in der einzigen Arbeit, in die ALL-Patienten (n=2) neben AML-Patienten (n=8) einbezogen wurden, verwendeten die Autoren keinen Proliferationsmarker; hier diente β -Actin als Referenzgen [119].

Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete relativ niedrige Expressionsniveau von *DNMT1* wurde auch in einer Studie beschrieben, in der Urothelkarzinom-Zellen untersucht wurden (n=45; Kontrollen: Urothelzellen gesunder Probanden, gepaart; Me-

thode: RT-PCR mit Gel-Fluoreszenz-Intensitätsbestimmung; Referenzgene: *GAPDH* und *PCNA*) [196]. Bereits eine Reduktion der DNMT1-Expression im Tiermodell auf unter 20% der physiologischen Situation führt zu globaler Hypomethylierung sowie Chromosomeninstabilität und hat T-Zell-Lymphome zur Folge [197, 198]. Entsprechende Daten existieren für Melanom-Zelllinien [199].

Es ist somit denkbar, dass eine DNMT1-Expression, die im Verhältnis zur Proliferationsaktivität auf niedrigem Niveau anzusiedeln ist, eine Rolle bei der pathologischen Hypomethylierung auch bei AML und ALL im Kindesalter spielt; möglicherweise kann DNMT1 seine *maintenance*-Funktion bei einer relativ geringen Molekülmenge nicht suffizient ausüben [196-199].

5.3.3 DNMT3b-Expression bei Leukämien im Kindesalter

Die Gesamtexpression von DNMT3b korrelierte in dieser Arbeit im Fall des ALL-Erstrezidivs mit der Proliferationsaktivität der untersuchten Zellen und war somit im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert. Im AML-Kollektiv hingegen zeigte sich eine verstärkte Expression gegenüber den Kontrollen.

In mehreren Studien wurde eine verstärkte Expression von DNMT3b bei Neoplasien sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene beschrieben. Bezüglich hämatologischer Entitäten stellten Mizuno et al. (siehe auch Kapitel 5.3.2.) eine verstärkte mRNA-Expression auch bei Normalisierung gegen *PCNA* bei Erwachsenen mit AML fest. In der Studie wurde dies auch in CML-Zellen während der Blastenkrise (n=17) beobachtet [120]. Eine verstärkte *DNMT3b*-Expression unter Einsatz eines Proliferationsmarkers ist ebenfalls für das Endometrium- und das Bronchialkarzinom beschrieben [183, 191]. Im Fall des Myelodysplastisches Syndroms wurde jedoch eine unveränderte Expression beschrieben [192]; bei der B-CLL ist sie sowohl gegenüber *GAPDH* als auch *PCNA* als Proliferationsmarker reduziert [190].

In der bereits in Kap. 5.3.2 aufgeführten Studie zur kindlichen ALL-Ersterkrankung wurde gezeigt, dass die Expression von DNMT3b mit der Proliferationsaktivität korreliert, was den in dieser Arbeit erhobenen Daten für das ALL-Erstrezidiv entspricht [121].

In Tabelle 5.5 sind die oben genannten Studien näher beschrieben. Sie sind zum Teil bereits in Tabelle 5.4 (für DNMT1) aufgeführt.

Tab. 5.5: *DNMT3b*-Expressionsanalysen mit Proliferationsmarker. CA: Karzinom. k=konstant exprimiertes Gen. p=Proliferationsmarker. ↓ : Expression reduziert. ↑ : Expression verstärkt.

| Entität | Kontrollkollektiv | Methode | Referenzgene | Expression | Ref. |
|--|--|-------------------------------------|---|------------|-------|
| Adulte AML (n=33) Adulte CML (n=17) | CD34+-KM-Zellen Mononukleäre Zellen (Fallzahl nicht genannt) | Kompetitive PCR | <i>GAPDH</i> (k) <i>PCNA</i> (p) | ↑ | [120] |
| Bronchial-CA (n=102) | Lungengewebe gesunder Probanden (n=102) | RT-PCR (Gel-Fluoreszenz-Intensität) | <i>PCNA</i> (p) | ↑ | [191] |
| MDS FAB RA (n=27) MDS FAB RAEB (n=27) | KM-Zellen gesunder Probanden (n=15) | <i>Real-Time</i> -PCR | <i>Cyclin D2</i> (p) <i>PCNA</i> (p) | ↑ | [192] |
| Endometrium-CA (n=28) | Endometrium gesunder Probanden (n=14) | <i>Real-Time</i> -PCR | <i>GAPDH</i> (k) <i>PCNA</i> (p) | ↑ | [183] |
| Pädiatrische ALL (n=18) | Mononukleäre Zellen gesunder Probanden (n=18) | RT-PCR (Gel-Fluoreszenz-Intensität) | <i>GAPDH</i> (k) <i>PCNA</i> (p) | ↔ | [121] |
| B-CLL (n=15) | B-Zellen gesunder Probanden (n=11) | <i>Real-Time</i> -PCR | <i>GAPDH</i> (k) <i>PCNA</i> (p) | ↓ | [190] |

Einige Arbeiten beschreiben eine verstärkte *DNMT3b*-mRNA-Expression bei Tumoren, ohne dass ein Proliferationsmarker verwendet wurde [34, 103, 114, 193-195, 200]. Hier bestehen bezüglich einer Interpretation die bereits beschriebenen Einschränkungen.

In den oben genannten Studien von Mizuno et al. und Kim et al. wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen DNMT-Expression und Promotor-Hypermethylierungen von Tumorsuppressorgenen besteht. Mizuno et al berichten über einen Zusammenhang zwischen verstärkter Promotor-Methylierung von *p15^{INK4B}* und verstärkter *DNMT1*-, jedoch nicht *DNMT3b*-Expression. Kim et al. kamen zu den gleichen Ergebnissen bei Untersuchung der Promotor-Methylierung von *p16^{INK4A}*. In verschiedenen Studien konnte jedoch ein statistischer Zusammenhang zwischen verstärkter *DNMT3b*-Expression auf Proteinebene und Promotor-Hypermethylierungen insbesondere von Tumorsuppressorgenen mit konsekutivem Silencing dieser Gene bei Neoplasien aufgezeigt werden; andere fanden hingegen keine Korrelation (Referenzen siehe Kapitel 1.3.4). Es wurde postuliert, dass erst ab einer besonders ausgeprägten Hyperexpression eine Promotor-Hypermethylierung über diesen Mechanismus erfolgt beziehungsweise begünstigt wird. Eine Definition, ab welchem Expressionsniveau dies der Fall ist, gestaltet sich angesichts der unterschiedlichen Methoden, die in den jeweiligen Studien verwendet wurden, derzeit schwierig (Quan-

tifizierung auf mRNA- oder Proteinebene, absolute oder relative Quantifizierung, Wahl der Referenzgene, Definition einer verstärkten Expression bezogen auf die jeweilige Methode) [52, 191].

Nosho et al. beschreiben für das Kolonkarzinom einen Zusammenhang zwischen verstärkter DNMT3b-Expression und gezielter Hypermethylierung bestimmter Promotor-Regionen (Gene *CACNA1G*, *IGF2*, *SOCS1*), während für andere häufig in Kolonkarzinom-Zellen hypermethylierten Promotor-Regionen kein Zusammenhang gefunden wurde (Gene *CDKN2A*, *CRABP1*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3*) [201]. Dies könnte auch die widersprüchlichen Ergebnisse der übrigen Studien erklären. Möglicherweise ist eine verstärkte DNMT3b-Expression nicht für die generelle, sondern für eine gezielte Promotor-Hypermethylierung im Sinne einer *de-novo*-Methylierung bestimmter Gene bei Neoplasien verantwortlich.

Auch wenn weiterhin Unklarheit über die genauen Mechanismen der Hypermethylierung besteht, kann die verstärkte Expression der DNMTs einschließlich DNMT3b als ein Faktor angenommen werden. Eine wie in dieser Arbeit gefundene unphysiologisch hohe DNMT3b-Expression könnte über die in Abbildung 5.3 illustrierten Mechanismen eine Rolle in der Pathogenese der AML im Kindesalter spielen.

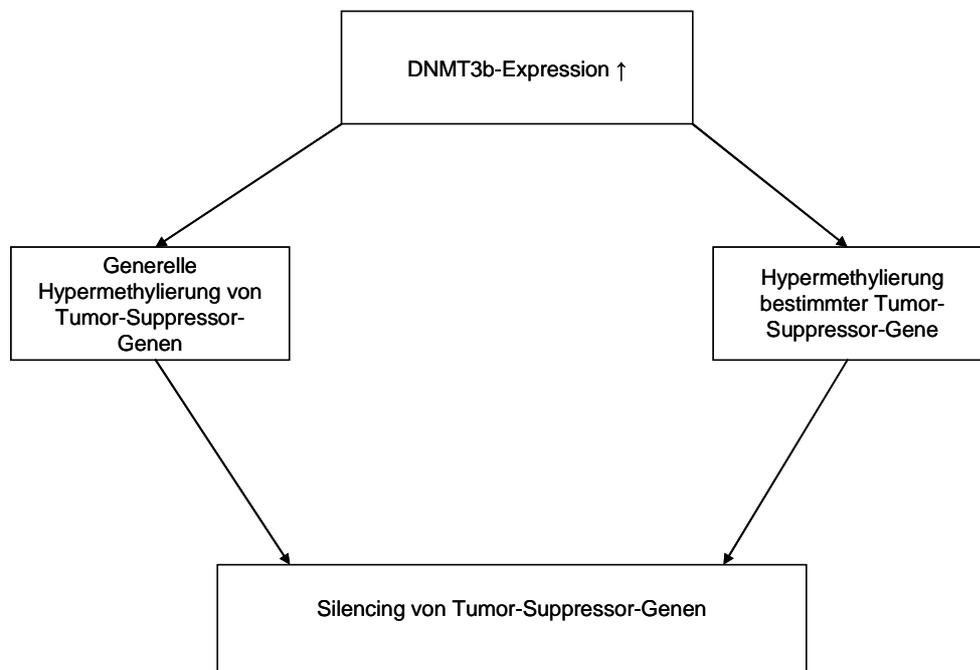


Abb. 5.1: Mögliche Folgen einer verstärkten DNMT3b-Expression bei AML im Kindesalter.

5.3.4 DNMT-Spleißvarianten bei Leukämien im Kindesalter

Aufgrund der niedrigen Expression der Spleißvarianten konnte nur *DNMT1* verglichen analysiert werden. Hier zeigte sich keine Veränderung der Expression bei AML und ALL-Rezidiv, der Anteil an der Gesamtexpression entspricht ebenfalls mit rund 90% den Verhältnissen unter physiologischen Bedingungen, was auch den Daten in der Literatur entspricht [46].

Die *DNMT3b*-Spleißvarianten konnten, wie in Kapitel 5.2.1.3 diskutiert, aufgrund der niedrigen Expression nicht in die Analyse einbezogen werden. Auffallend ist dennoch, dass *DNMT3b4* im Kontrollkollektiv in keiner Probe amplifizierbar war, während ein Amplifikat in 69% der ALL-Proben und 70% der AML-Proben nachgewiesen werden konnte. Dies könnte methodisch bedingt sein, da *DNMT3b* insgesamt im Kontrollkollektiv im Median mit 384 Kopien in relativ geringer Zahl nachweisbar war und somit der Anteil von *DNMT3b4* möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze der *Real-Time*-RT-PCR lag. Es ist jedoch gezeigt worden, dass eine verstärkte Expression der Spleißvariante *DNMT3b4* für destabilisierende Hypomethylierungen im Genom verantwortlich sein kann, indem sie mit katalytisch aktiven DNMTs um DNA-Bindungsstellen konkurriert [102]. Möglicherweise spielt *DNMT3b4* eine Rolle in aberranten DNA-Methylierungsprozessen in Leukämiezellen und wird deshalb verstärkt exprimiert. Diese These kann jedoch anhand der Daten dieser Arbeit nicht ausreichend gestützt werden.

5.3.5 Prognostische Bedeutung der DNMT-Expression

In einigen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen aberranter DNMT-Expression und Prognose von Patienten mit Tumoren beschrieben. So ist eine verstärkte *DNMT3b*-Expression auf Proteinebene mit einer kürzeren Remissionsdauer bei B-Zell-Lymphomen assoziiert [111], ebenso eine verstärkte *DNMT1*-Expression auf Proteinebene mit einer kürzeren Überlebensdauer bei Patienten mit Bronchialkarzinom [191]. Ein Zusammenhang zwischen DNMT-Expression und Prognose der Kinder mit ALL-Erstrezidiv und AML-Ersterkrankung wurde in dieser Arbeit nicht festgestellt. Es zeigte sich ein Trend hin zu einer erniedrigten Expression von *DNMT3b* im Vergleich zu *PCNA* bei Kindern mit Folgeereignis bei AML-Ersterkrankung im Vergleich zu Kindern in *CCR* ($p=0,11$). Bei Normalisierung gegen *RpL13a* korrelierte die Expression nicht mit der Prognose. Die Fallzahl der Gruppe mit Folgeereignis ist klein ($n=13$),

ebenso wie die Gruppe in *CCR* im ALL-Erstrezidiv-Kollektiv (n=7), was die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt.

5.4 Synopsis und Ausblick

5.4.1 Schlussfolgerungen der Expressionsanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Expression von DNMTs bei Kindern mit ALL-Rezidiv und AML gemessen. Die Expression von DNMT1 erscheint bei kindlichen Leukämien gegenüber Leukozyten gesunder Probanden trotz verstärkter Proliferation der leukämischen Zellen nicht verändert. Dies könnte Teil des Mechanismus sein, der für die aberrante Hypomethylierung des Genoms von Tumorzellen verantwortlich ist. DNMT3b ist bei Kindern mit AML auch unter Berücksichtigung der Proliferationsaktivität verstärkt exprimiert. Über verschiedene Mechanismen (Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen global oder spezifisch, Konkurrenz mit DNMT1 und konsekutive Hypomethylierung) könnte dies zur Genese und Progression von Leukämien beitragen.

5.4.2 Ausblick

5.4.2.1 Weiterführende Untersuchungen

Einige Studien konnten einen statistischen Zusammenhang zwischen aberranter DNMT-Expression und Promotor-Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen bei bestimmten Neoplasien nachweisen. So fanden Mizuno et al. eine verstärkte *DNMT1*-Expression bei AML-Zellen Erwachsener mit hypermethyliertem Tumorsuppressorgen *p15^{INK4A}* [120]. Möglicherweise besteht ein solcher Zusammenhang auch für hypermethylierte Promotor-Regionen in AML-Zellen von Kindern, die DNMT3b verstärkt exprimieren. Dies würde die Vermutung untermauern, dass eine verstärkte DNMT3b-Expression zur Entstehung von Leukämien beiträgt. Eine Analyse des Methylierungsstatus ausgesuchter Tumorsuppressorgene mittels Methylierungsspezifischer PCR (beispielsweise *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}* oder *p21^{CIP1/WAF1/SDI1}*, *BNIP3* oder *E-Cadherin*, deren Promotor-Regionen häufig bei akuten Leukämien hypermethyliert sind) bei den untersuchten Patientenproben könnte hier aufschlussreich sein. Ebenfalls auf diese Weise könnte die Frage geklärt werden, ob aberrante Hy-

omethylierungen in Leukämie-Zellen verstärkt dann auftreten, wenn DNMT3b4 als Spleißvariante quantifizierbar ist (siehe Kapitel 5.3.4).

5.4.2.2 DNMT-Inhibitoren bei AML im Kindesalter?

Die Therapie des AML-Rezidivs im Kindesalter ist weiterhin problematisch. Eine Heilungschance besteht nur bei Spätrezidiv, die Therapie erfolgt mittels Hochdosischemotherapie und folgender Stammzelltransplantation [136]. Insofern besteht Bedarf für neue Therapieoptionen für Patienten mit AML-Rezidiv, insbesondere bei solchen mit frühem Rezidiv und Rezidiv unter Therapie.

Wie in Kapitel 1.3.5 ausführlich beschrieben, stellen DNMT-Inhibitoren eine Therapieoption von Krebserkrankungen auf epigenetischer Ebene dar. Ein synergistischer Effekt konnte durch Einsatz von Histon-Deacetylasen erzielt werden.

Eine wichtige Beobachtung ist, dass der zytotoxische Effekt durch den DNMT-Inhibitor 5-Aza-2'-Desoxycytidin (Decitabine) primär durch DNMT3a und 3b vermittelt wird. Bei embryonalen Stammzellen mit DNMT3a und/oder DNMT3b-*Knock-out* ist keine Wirkung durch Decitabine feststellbar, während der Effekt mit zunehmender Expression von DNMT3-Enzymen steigt [202]. Eine hohe DNMT3b-Expression in Hodenkarzinom-Zellen verstärkt die Wirkung von Decitabine [203]. Dies ist ein viel versprechender Hinweis auf einen möglichen Effekt von Decitabine bei Zellen mit verstärkter DNMT3b-Expression.

In Anbetracht dieser Erkenntnisse könnten DNMTi (auch in Kombination mit HDACi) eine Therapieoption für Kinder mit AML sein, insbesondere für Patienten, deren leukämische Zellen eine besonders hohe DNMT3b-Expression aufweisen.

6 Zusammenfassung

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG: Die DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b katalysieren die Methylierung von DNA, welche über komplexe epigenetische Prozesse zur Komprimierung und Inaktivierung des entsprechenden DNA-Abschnitts führt. Im physiologischen Zustand findet sich im Genom eine globale Hypermethylierung bei Hypomethylierung der Promotor-Regionen von Genen. In der Tumorgenese hingegen werden diese Promotoren vor allem bei Tumorsuppressorgenen häufig hypermethyliert und damit inaktiviert, während das übrige Genom aberrant hypomethyliert ist. Bei einigen Tumoren korreliert nach heutiger Studienlage die verstärkte Expression von DNMTs in Tumorzellen mit dieser Hypermethylierung. DNMT-Inhibitoren konnten teilweise in Phase-I- bis III-Studien Hypermethylierungen aufheben. Die DNMT-Expression bei AML und ALL-Rezidiv im Kindesalter wurde bislang nicht analysiert. In dieser Arbeit wurde die Expression der für die aberrante Methylierung in Tumorzellen hauptverantwortlichen Enzyme DNMT1 und DNMT3b inklusive ausgesuchter Spleißvarianten bei ALL-Erstrezidiv und AML-Ersterkrankung im Kindesalter im Vergleich zu gesunden Probanden analysiert und untersucht, inwieweit diese eine prognostische Bedeutung hat.

MATERIAL UND METHODEN: Es wurden Tumorzellen von 26 Patienten mit ALL-Erstrezidiv (davon 7 in CCR und 19 mit Folgeereignis) sowie 47 Patienten mit AML-Ersterkrankung (davon 34 in CCR und 13 mit Folgeereignis) im Vergleich mit Leukozyten von 22 gesunden Probanden hinsichtlich der DNMT-Expression untersucht. Nach Aufreinigung der Zellen wurde die RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben; diese wurde durch eine Real-Time-PCR nach Etablierung einer Standardreihe gegen 2 Referenzgene (*RpL13a* als konstant exprimiertes Gen und *PCNA* als Proliferationsmarker) quantifiziert.

ERGEBNISSE: Die Expression von *DNMT1* ist sowohl im ALL- als auch im AML-Kollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv normalisiert zu *RpL13a* nicht verändert und normalisiert zu *PCNA* vermindert. *DNMT3b* ist im ALL-Kollektiv in Normalisierung gegen *RpL13a* verstärkt und in Normalisierung gegen *PCNA* nicht verändert. Im AML-Kollektiv ist *DNMT3b* gegenüber beiden Referenzgenen verstärkt exprimiert. Der Anteil der Spleißvariante *DNMT1'* an der *DNMT1*-Gesamtexpression liegt in allen Kollektiven konstant bei rund 90%. Die übrigen Spleißvarianten von DNMT1 und

DNMT3b wurden nicht in die Analyse einbezogen, da sie nicht in allen Proben nachweisbar waren. *DNMT3b4* konnte in rund 70% der ALL- und AML-Proben nachgewiesen werden, jedoch nicht im Kontrollkollektiv. Prognostisch relevante Expressionsunterschiede wurden nicht gefunden.

DISKUSSION: Die *DNMT1*-Expression in ALL- und AML-Zellen ist im Vergleich zum Kontrollkollektiv trotz der verstärkten Proliferationsaktivität nicht verändert. Diese somit vergleichsweise niedrige Expression in leukämischen Zellen ist ein möglicher Faktor für die Hypomethylierung neu synthetisierter DNA. *DNMT3b* ist in AML-Zellen gegenüber beiden Referenzgenen verstärkt exprimiert. Dies könnte einerseits zur Hypermethylierung von Promotor-Regionen führen, andererseits über Konkurrenz mit DNMT1 ebenfalls zur Hypomethylierung beitragen, beispielsweise durch die Spleißvariante DNMT3b4, der diese Eigenschaft bei anderen Tumoren zugeordnet werden konnte. Möglicherweise stellt die verstärkte Expression ein relevantes Entscheidungskriterium zur Therapie beispielsweise des AML-Erstrezidivs mit DNMT-Inhibitoren sein, deren Wirkung vor allem über Enzyme der DNMT3-Familie entfaltet wird.

In dieser Arbeit konnte somit eine gegenüber physiologischen Verhältnissen deutlich aberrante Expression der DNA-Methyltransferasen bei ALL und AML im Kindesalter festgestellt werden.

Literaturverzeichnis

1. Ehrlich, M. and R.Y. Wang, *5-Methylcytosine in eukaryotic DNA*. Science, 1981. **212**(4501): p. 1350-7.
2. Bestor, T., et al., *Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases*. J Mol Biol, 1988. **203**(4): p. 971-83.
3. Bird, A., *The essentials of DNA methylation*. Cell, 1992. **70**(1): p. 5-8.
4. Henikoff, S. and M.A. Matzke, *Exploring and explaining epigenetic effects*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 293-5.
5. Bernstein, B.E., A. Meissner, and E.S. Lander, *The mammalian epigenome*. Cell, 2007. **128**(4): p. 669-81.
6. Kim, J.K., M. Samaranyake, and S. Pradhan, *Epigenetic mechanisms in mammals*. Cell Mol Life Sci, 2008.
7. Feil, R., *Epigenetics, an emerging discipline with broad implications*. C R Biol, 2008. **331**(11): p. 837-43.
8. Hirst, M. and M.A. Marra, *Epigenetics and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(1): p. 136-46.
9. Lehmann, U., K. Brakensiek, and H. Kreipe, *Role of epigenetic changes in hematological malignancies*. Ann Hematol, 2004. **83**(3): p. 137-52.
10. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
11. Antequera, F. and A. Bird, *Number of CpG islands and genes in human and mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11995-9.
12. Cooper, D.N., M.H. Taggart, and A.P. Bird, *Unmethylated domains in vertebrate DNA*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(3): p. 647-58.
13. Lei, H., et al., *De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells*. Development, 1996. **122**(10): p. 3195-205.
14. Jaenisch, R., *DNA methylation and imprinting: why bother?* Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 323-9.
15. Jaenisch, R., et al., *Mammalian X chromosome inactivation*. Novartis Found Symp, 1998. **214**: p. 200-9; discussion 209-13, 228-32.
16. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 335-40.
17. Cooper, D.N. and M. Krawczak, *Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes*. Hum Genet, 1989. **83**(2): p. 181-8.
18. Fazzari, M.J. and J.M. Greally, *Epigenomics: beyond CpG islands*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(6): p. 446-55.
19. Tate, P.H. and A.P. Bird, *Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression*. Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(2): p. 226-31.
20. Richly, H., et al., *Setting and resetting of epigenetic marks in malignant transformation and development*. Bioessays, 2010. **32**(8): p. 669-79.

21. D'Alessio, A.C. and M. Szyf, *Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation*. *Biochem Cell Biol*, 2006. **84**(4): p. 463-76.
22. Vire, E., et al., *The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation*. *Nature*, 2006. **439**(7078): p. 871-4.
23. Fuks, F., et al., *The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(9): p. 2305-12.
24. Chou, R.H., Y.L. Yu, and M.C. Hung, *The roles of EZH2 in cell lineage commitment*. *Am J Transl Res*, 2011. **3**(3): p. 243-50.
25. Lewis, J.D., et al., *Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA*. *Cell*, 1992. **69**(6): p. 905-14.
26. Wakefield, R.I., et al., *The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA*. *J Mol Biol*, 1999. **291**(5): p. 1055-65.
27. Nan, X., F.J. Campoy, and A. Bird, *MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin*. *Cell*, 1997. **88**(4): p. 471-81.
28. Jones, P.L., et al., *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. *Nat Genet*, 1998. **19**(2): p. 187-91.
29. Robertson, K.D., et al., *DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters*. *Nat Genet*, 2000. **25**(3): p. 338-42.
30. Fuks, F., et al., *Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription*. *Embo J*, 2001. **20**(10): p. 2536-44.
31. Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(16): p. 2395-402.
32. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(11): p. 2536-40.
33. Goll, M.G., et al., *Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2*. *Science*, 2006. **311**(5759): p. 395-8.
34. Ahluwalia, A., et al., *DNA methylation in ovarian cancer. II. Expression of DNA methyltransferases in ovarian cancer cell lines and normal ovarian epithelial cells*. *Gynecol Oncol*, 2001. **82**(2): p. 299-304.
35. Ooi, S.K., et al., *DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA*. *Nature*, 2007. **448**(7154): p. 714-7.
36. Hermann, A., H. Gowher, and A. Jeltsch, *Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(19-20): p. 2571-87.
37. Robertson, K.D., et al., *The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(11): p. 2291-8.
38. Takebayashi, S., et al., *Major and essential role for the DNA methylation mark in mouse embryogenesis and stable association of DNMT1 with newly replicated regions*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(23): p. 8243-58.

39. Pradhan, S., et al., *Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation.* J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33002-10.
40. Chuang, L.S., et al., *Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1.* Science, 1997. **277**(5334): p. 1996-2000.
41. Leonhardt, H., et al., *A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei.* Cell, 1992. **71**(5): p. 865-73.
42. Bestor, T.H., *Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain.* Embo J, 1992. **11**(7): p. 2611-7.
43. Zhang, Z., et al., *Structure and function of the BAH-containing domain of Orc1p in epigenetic silencing.* Embo J, 2002. **21**(17): p. 4600-11.
44. Damelin, M. and T.H. Bestor, *Biological functions of DNA methyltransferase 1 require its methyltransferase activity.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(11): p. 3891-9.
45. Howell, C.Y., et al., *Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene.* Cell, 2001. **104**(6): p. 829-38.
46. Bonfils, C., et al., *Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b.* J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 10754-60.
47. Xu, F., et al., *Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs.* Curr Med Chem, 2010. **17**(33): p. 4052-71.
48. Aguirre-Arteta, A.M., et al., *Expression of an alternative Dnmt1 isoform during muscle differentiation.* Cell Growth Differ, 2000. **11**(10): p. 551-9.
49. Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch, *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.* Cell, 1992. **69**(6): p. 915-26.
50. Rhee, I., et al., *CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1.* Nature, 2000. **404**(6781): p. 1003-7.
51. Galetzka, D., et al., *Sex-specific windows for high mRNA expression of DNA methyltransferases 1 and 3A and methyl-CpG-binding domain proteins 2 and 4 in human fetal gonads.* Mol Reprod Dev, 2007. **74**(2): p. 233-41.
52. Vertino, P.M., et al., *De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)-methyltransferase.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(8): p. 4555-65.
53. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases.* Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 219-20.
54. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.* Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
55. Hansen, R.S., et al., *The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14412-7.
56. Chen, T., et al., *A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation.* J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38746-54.
57. Xie, S., et al., *Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family.* Gene, 1999. **236**(1): p. 87-95.

58. Maraschio, P., et al., *Immunodeficiency, centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1, 9, and 16, and facial anomalies: the ICF syndrome*. J Med Genet, 1988. **25**(3): p. 173-80.
59. Xu, G.L., et al., *Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene*. Nature, 1999. **402**(6758): p. 187-91.
60. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
61. Roman-Gomez, J., et al., *5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2002. **99**(7): p. 2291-6.
62. Roman, J., et al., *Hypermethylation of the calcitonin gene in acute lymphoblastic leukaemia is associated with unfavourable clinical outcome*. Br J Haematol, 2001. **113**(2): p. 329-38.
63. Xu, X., et al., *BRCA1 promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008.
64. Amara, K., et al., *Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas*. Ann Oncol, 2008. **19**(10): p. 1774-86.
65. Kroeger, H., et al., *Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1366-73.
66. Ko, E., et al., *Promoter hypermethylation of the p16 gene is associated with poor prognosis in recurrent early-stage hepatocellular carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(9): p. 2260-7.
67. Herman, J.G., et al., *Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 837-41.
68. Zhang, C., et al., *CpG island methylator phenotype association with upregulated telomerase activity in hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer, 2008. **123**(5): p. 998-1004.
69. Katzenellenbogen, R.A., S.B. Baylin, and J.G. Herman, *Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies*. Blood, 1999. **93**(12): p. 4347-53.
70. Tapia, T., et al., *Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors*. Epigenetics, 2008. **3**(3): p. 157-63.
71. Esteller, M., et al., *Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(7): p. 564-9.
72. Zhao, Y.F., et al., *Aberrant methylation of multiple genes in gastric carcinomas*. Int J Surg Pathol, 2007. **15**(3): p. 242-51.
73. Graff, J.R., et al., *E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas*. Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5195-9.
74. Graff, J.R., et al., *Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma*. Cancer Res, 1998. **58**(10): p. 2063-6.

75. Yoshiura, K., et al., *Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7416-9.
76. Murai, M., et al., *Aberrant DNA methylation associated with silencing BNIP3 gene expression in haematopoietic tumours*. Br J Cancer, 2005. **92**(6): p. 1165-72.
77. Ramirez, N., et al., *Epigenetic events in normal colonic mucosa surrounding colorectal cancer lesions*. Eur J Cancer, 2008. **44**(17): p. 2689-95.
78. Kane, M.F., et al., *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 808-11.
79. Leung, S.Y., et al., *hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability*. Cancer Res, 1999. **59**(1): p. 159-64.
80. Esteller, M., et al., *MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas*. Oncogene, 1998. **17**(18): p. 2413-7.
81. Ellinger, J., et al., *CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer*. Urology, 2008. **71**(1): p. 161-7.
82. Lee, W.H., et al., *Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11733-7.
83. Esteller, M., et al., *Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia*. Cancer Res, 1998. **58**(20): p. 4515-8.
84. Jiang, Y., et al., *Expression of RUNX3 gene, methylation status and clinicopathological significance in breast cancer and breast cancer cell lines*. Pathobiology, 2008. **75**(4): p. 244-51.
85. Park, W.S., et al., *Hypermethylation of the RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma*. Exp Mol Med, 2005. **37**(4): p. 276-81.
86. Kim, W.J., et al., *RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9347-54.
87. Ku, J.L., et al., *Promoter hypermethylation downregulates RUNX3 gene expression in colorectal cancer cell lines*. Oncogene, 2004. **23**(40): p. 6736-42.
88. Honda, S., et al., *The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients*. Int J Cancer, 2008. **123**(5): p. 1117-25.
89. Seidel, C., et al., *Alterations of cancer-related genes in soft tissue sarcomas: hypermethylation of RASSF1A is frequently detected in leiomyosarcoma and associated with poor prognosis in sarcoma*. Int J Cancer, 2005. **114**(3): p. 442-7.
90. Yeo, W., et al., *High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumor and plasma of patients with hepatocellular carcinoma*. Liver Int, 2005. **25**(2): p. 266-72.
91. Lujambio, A., et al., *Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1424-9.

92. Bueno, M.J., et al., *Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression*. *Cancer Cell*, 2008. **13**(6): p. 496-506.
93. Baylin, S.B., et al., *Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia*. *Adv Cancer Res*, 1998. **72**: p. 141-96.
94. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(11): p. 1148-59.
95. Kazazian, H.H., Jr. and J.L. Goodier, *LINE drive. retrotransposition and genome instability*. *Cell*, 2002. **110**(3): p. 277-80.
96. Gotzinger, N., et al., *Regulation of human endogenous retrovirus-K Gag expression in teratocarcinoma cell lines and human tumours*. *J Gen Virol*, 1996. **77 (Pt 12)**: p. 2983-90.
97. Ehrlich, M., et al., *Satellite DNA hypomethylation in karyotyped Wilms tumors*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003. **141**(2): p. 97-105.
98. Wong, N., et al., *Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with q-arm copy gain in human hepatocellular carcinoma*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(2): p. 465-71.
99. Cadieux, B., et al., *Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation*. *Cancer Res*, 2006. **66**(17): p. 8469-76.
100. Fraga, M.F., et al., *A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors*. *Cancer Res*, 2004. **64**(16): p. 5527-34.
101. Senyuk, V., et al., *The Oncoprotein EVI1 and the DNA Methyltransferase Dnmt3 Co-Operate in Binding and De Novo Methylation of Target DNA*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e20793.
102. Kanai, Y., et al., *Alterations in gene expression associated with the overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, during human hepatocarcinogenesis*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004. **130**(11): p. 636-44.
103. Nagai, M., et al., *Expression of DNA (5-cytosin)-methyltransferases (DNMTs) in hepatocellular carcinomas*. *Hepatol Res*, 2003. **26**(3): p. 186-191.
104. Nakagawa, T., et al., *Increased DNA methyltransferase 1 protein expression in human transitional cell carcinoma of the bladder*. *J Urol*, 2003. **170**(6 Pt 1): p. 2463-6.
105. De Marzo, A.M., et al., *Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis*. *Cancer Res*, 1999. **59**(16): p. 3855-60.
106. Patra, S.K., et al., *DNA methyltransferase and demethylase in human prostate cancer*. *Mol Carcinog*, 2002. **33**(3): p. 163-71.
107. Peng, D.F., et al., *DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multi-stage carcinogenesis of the pancreas*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(6): p. 1160-8.
108. Peng, D.F., et al., *Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas*. *Cancer Sci*, 2005. **96**(7): p. 403-8.

109. Qayum, I. and M. Ashraf, *Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) gene expression in human lymphomas by fluorescent in situ hybridization*. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2004. **16**(4): p. 1-6.
110. Butcher, D.T. and D.I. Rodenhiser, *Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours*. Eur J Cancer, 2007. **43**(1): p. 210-9.
111. Amara, K., et al., *DNA methyltransferase DNMT3b protein overexpression as a prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphomas*. Cancer Sci, 2010.
112. Hervouet, E., F.M. Vallette, and P.F. Cartron, *Impact of the DNA methyltransferases expression on the methylation status of apoptosis-associated genes in glioblastoma multiforme*. Cell Death Dis, 2010. **1**: p. e8.
113. Rhee, I., et al., *DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 552-6.
114. Park, H.J., E. Yu, and Y.H. Shim, *DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation in human hepatocellular carcinoma*. Cancer Lett, 2005.
115. Eads, C.A., et al., *CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression*. Cancer Res, 1999. **59**(10): p. 2302-6.
116. Vallbohmer, D., et al., *DNA methyltransferases messenger RNA expression and aberrant methylation of CpG islands in non-small-cell lung cancer: association and prognostic value*. Clin Lung Cancer, 2006. **8**(1): p. 39-44.
117. Oh, B.K., et al., *DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation*. Int J Mol Med, 2007. **20**(1): p. 65-73.
118. Saito, Y., et al., *Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): p. 10060-5.
119. Melki, J.R., et al., *Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia*. Leukemia, 1998. **12**(3): p. 311-6.
120. Mizuno, S., et al., *Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1172-9.
121. Sayin, D.B., et al., *DNA methyltransferase expression differs with proliferation in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(5): p. 2471-6.
122. Ghoshal, K., et al., *Inhibitors of histone deacetylase and DNA methyltransferase synergistically activate the methylated metallothionein I promoter by activating the transcription factor MTF-1 and forming an open chromatin structure*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(23): p. 8302-19.
123. Jones, P.A., S.M. Taylor, and V.L. Wilson, *Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine*. Recent Results Cancer Res, 1983. **84**: p. 202-11.
124. Ramchandani, S., et al., *Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 684-9.

125. Scandura, J.M., et al., *Phase I study of epigenetic priming with decitabine prior to standard induction chemotherapy for patients with AML*. Blood, 2011.
126. Garcia-Manero, G., *Myelodysplastic syndromes: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management*. Am J Hematol, 2011. **86**(6): p. 490-8.
127. Chuang, J.C., et al., *Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(10): p. 1515-20.
128. Billam, M., M.D. Sobolewski, and N.E. Davidson, *Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **120**(3): p. 581-92.
129. Szyf, M., *DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy*. Biochemistry (Mosc), 2005. **70**(5): p. 533-49.
130. Daskalakis, M., et al., *Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2957-64.
131. Issa, J.P., et al., *Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate*. J Clin Oncol, 2005. **23**(17): p. 3948-56.
132. Soriano, A.O., et al., *Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2302-8.
133. Gore, S.D., et al., *Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms*. Cancer Res, 2006. **66**(12): p. 6361-9.
134. Garcia-Manero, G., et al., *Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3271-9.
135. Mercurio, C., S. Minucci, and P.G. Pelicci, *Histone deacetylases and epigenetic therapies of hematological malignancies*. Pharmacol Res, 2010. **62**(1): p. 18-34.
136. Meshinchi, S. and R.J. Arceci, *Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia*. Oncologist, 2007. **12**(3): p. 341-55.
137. Brown, P., et al., *Novel targeted drug therapies for the treatment of childhood acute leukemia*. Expert Rev Hematol, 2009. **2**(9): p. 145-158.
138. Creutzig, U. and M. Schrappe, *[Acute leukemia in childhood. Classification--diagnosis--therapy--prognosis]*. Internist (Berl), 1996. **37**(10): p. 982-93.
139. Schrappe, M., et al., *Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3310-22.
140. Vormoor, J., et al., *Therapy of childhood acute myelogenous leukemias*. Ann Hematol, 1996. **73**(1): p. 11-24.
141. Foon, K.A. and R.P. Gale, *Immunologic classification of lymphoma and lymphoid leukemia*. Blood Rev, 1987. **1**(2): p. 77-88.
142. Schrappe, M., *ALL-BFM-Studie zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit akuter lymphoblastischer Leukämie*. 2000, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH): Kiel, Germany.

143. Einsiedel, H.G., et al., *Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87*. J Clin Oncol, 2005. **23**(31): p. 7942-50.
144. Henze, G., *ALL-REZ BFM 2002 - Protokoll zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie*. 2003, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH): Berlin, Germany.
145. Creutzig, U., *AML-BFM 2004 - Akute myeloische Leukämie*. 2004, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH): Hannover.
146. Fleischhack, G. and D. Reinhardt, *AML-REZ-2001/01 - Akute myeloische Leukämie – Rezidive*. 2001, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH): Bonn, Münster, Germany.
147. Schrappe, M. and U. Creutzig, *Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie*. AWMF online, 2008.
148. Ribaud, R., et al., *Preparation of RNA from tissues and cells*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 10**: p. Unit 10 11.
149. Fleige, S. and M.W. Pfaffl, *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 126-39.
150. AMBION, *RNAse Control: The Basics*.
151. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. 1986. Biotechnology, 1992. **24**: p. 17-27.
152. Mullis, K.B., *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. Sci Am, 1990. **262**(4): p. 56-61, 64-5.
153. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
154. Quail, M., *DNA Cloning*. 2005, Encyclopedia of Life Sciences.
155. PERKIN-ELMER, *ABI PRISM(TM)-System 377 A user's handbook*. PERKIN ELMER Applied Biosystems Division.
156. Wong, M.L. and J.F. Medrano, *Real-time PCR for mRNA quantitation*. Biotechniques, 2005. **39**(1): p. 75-85.
157. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
158. Tichopad, A., et al., *Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(20): p. e122.
159. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
160. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. J Biotechnol, 1999. **75**(2-3): p. 291-5.
161. Radonic, A., et al., *Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(4): p. 856-62.
162. Foldager, C.B., et al., *Validation of suitable house keeping genes for hypoxia-cultured human chondrocytes*. BMC Mol Biol, 2009. **10**: p. 94.

163. Andersen, C.L., J.L. Jensen, and T.F. Orntoft, *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets*. *Cancer Res*, 2004. **64**(15): p. 5245-50.
164. Thellin, O., et al., *A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection*. *Biotechnol Adv*, 2009. **27**(4): p. 323-33.
165. Fu, L.Y., et al., *Suitable reference genes for real-time PCR in human HBV-related hepatocellular carcinoma with different clinical prognoses*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 49.
166. Gao, Q., et al., *Selection of reference genes for real-time PCR in human hepatocellular carcinoma tissues*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008. **134**(9): p. 979-86.
167. Cicinnati, V.R., et al., *Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 350.
168. Overbergh, L., et al., *Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR*. *Cytokine*, 1999. **11**(4): p. 305-12.
169. Broberg, E.K., et al., *Low copy number detection of herpes simplex virus type 1 mRNA and mouse Th1 type cytokine mRNAs by Light Cycler quantitative real-time PCR*. *J Virol Methods*, 2003. **112**(1-2): p. 53-65.
170. Pietila, J., et al., *Rapid differentiation of Borrelia garinii from Borrelia afzelii and Borrelia burgdorferi sensu stricto by LightCycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the recA gene*. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(7): p. 2756-9.
171. Teo, I.A., et al., *LightCycler qPCR optimisation for low copy number target DNA*. *J Immunol Methods*, 2002. **270**(1): p. 119-33.
172. Perrott, P., et al., *A nested real-time PCR assay has an increased sensitivity suitable for detection of viruses in aerosol studies*. *J Appl Microbiol*, 2009. **106**(5): p. 1438-47.
173. Kupper, H., et al., *A method for cellular localization of gene expression via quantitative in situ hybridization in plants*. *Plant J*, 2007. **50**(1): p. 159-75.
174. Morrison, T.B., J.J. Weis, and C.T. Wittwer, *Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification*. *Biotechniques*, 1998. **24**(6): p. 954-8, 960, 962.
175. Malinen, E., et al., *Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria*. *Microbiology*, 2003. **149**(Pt 1): p. 269-77.
176. Wang, T. and M.J. Brown, *mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection*. *Anal Biochem*, 1999. **269**(1): p. 198-201.
177. Provenzano, M. and S. Mocellin, *Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR*. *Adv Exp Med Biol*, 2007. **593**: p. 66-73.
178. Siebert, P.D. and J.W. Larrick, *Competitive PCR*. *Nature*, 1992. **359**(6395): p. 557-8.

179. Wall, S.J. and D.R. Edwards, *Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): a comparison of primer-dropping, competitive, and real-time RT-PCRs*. *Anal Biochem*, 2002. **300**(2): p. 269-73.
180. Blencowe, B.J., *Alternative splicing: new insights from global analyses*. *Cell*, 2006. **126**(1): p. 37-47.
181. Decker, C.J. and R. Parker, *Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes*. *Trends Biochem Sci*, 1994. **19**(8): p. 336-40.
182. Kozak, M., *Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes*. *Gene*, 2005. **361**: p. 13-37.
183. Xiong, Y., et al., *Opposite alterations of DNA methyltransferase gene expression in endometrioid and serous endometrial cancers*. *Gynecol Oncol*, 2005. **96**(3): p. 601-9.
184. Jin, F., et al., *Up-regulation of DNA methyltransferase 3B expression in endometrial cancers*. *Gynecol Oncol*, 2005. **96**(2): p. 531-8.
185. Yakushiji, T., et al., *Over-expression of DNA methyltransferases and CDKN2A gene methylation status in squamous cell carcinoma of the oral cavity*. *Int J Oncol*, 2003. **22**(6): p. 1201-7.
186. Lee, P.J., et al., *Limited up-regulation of DNA methyltransferase in human colon cancer reflecting increased cell proliferation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(19): p. 10366-70.
187. Novakovic, B., et al., *DNA methylation-mediated down-regulation of DNA methyltransferase-1 (DNMT1) is coincident with, but not essential for, global hypomethylation in human placenta*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(13): p. 9583-93.
188. Robertson, K.D., et al., *Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal and tumor cells*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(10): p. 2108-13.
189. Kanai, Y., et al., *DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers*. *Int J Cancer*, 2001. **91**(2): p. 205-12.
190. Kn, H., et al., *Expression analysis of the epigenetic methyltransferases and methyl-CpG binding protein families in the normal B-cell and B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)*. *Cancer Biol Ther*, 2004. **3**(10): p. 989-94.
191. Kim, H., et al., *Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer*. *Cancer*, 2006. **107**(5): p. 1042-9.
192. Langer, F., et al., *Up-regulation of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in myelodysplastic syndrome*. *Leuk Res*, 2005. **29**(3): p. 325-9.
193. Saito, Y., et al., *Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and peri-centromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis*. *Hepatology*, 2001. **33**(3): p. 561-8.
194. Kreth, S., et al., *O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation*. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e17156.
195. Rajendran, G., et al., *Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas*. *J Neurooncol*, 2011.

196. Kimura, F., et al., *Decrease of DNA methyltransferase 1 expression relative to cell proliferation in transitional cell carcinoma*. Int J Cancer, 2003. **104**(5): p. 568-78.
197. Gaudet, F., et al., *Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation*. Science, 2003. **300**(5618): p. 489-92.
198. Howard, G., et al., *Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice*. Oncogene, 2008. **27**(3): p. 404-8.
199. Lorient, A., et al., *Transient down-regulation of DNMT1 methyltransferase leads to activation and stable hypomethylation of MAGE-A1 in melanoma cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10118-26.
200. Girault, I., et al., *Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(12): p. 4415-22.
201. Nosho, K., et al., *DNMT3B Expression Might Contribute to CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer*. Clin Cancer Res, 2009.
202. Oka, M., et al., *De novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b primarily mediate the cytotoxic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine*. Oncogene, 2005. **24**(19): p. 3091-9.
203. Beyrouthy, M.J., et al., *High DNA methyltransferase 3B expression mediates 5-aza-deoxycytidine hypersensitivity in testicular germ cell tumors*. Cancer Res, 2009. **69**(24): p. 9360-6.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Kongressbeitrag

Hoeche A., Einsiedel H.G., Wellmann S., Henze G., Seeger K.

„Expressionsanalyse von DNA-Methyltransferasen bei ALL und AML im Kindesalter“

Vortrag, XV. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede, 12.-15.06.2002.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. K. Seeger danke ich für die Überlassung des Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die kompetente Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. H. Graf von Einsiedel, der entscheidenden Anteil an der Entstehung dieser Arbeit trägt, für seine intensive theoretische und praktische Anleitung und Unterstützung.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Professor Seeger und der gesamten Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie für die kompetente und umfangreiche Hilfe und kollegiale Zusammenarbeit.

Der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Münster danke ich für die Bereitstellung von Material und Daten des AML-Patientenkollektivs.

Herrn Prof. Dr. J. Denissen (Institut für Psychologie, HU Berlin) danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Analyse.

Meinen Eltern, meiner Frau und meinen Kindern danke ich für Unterstützung und Geduld.

Erklärung an Eides Statt

Ich, Alexander Höche, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „*Expressionsanalyse der DNA-Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3b bei akuten Leukämien im Kindesalter*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift