

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht - Karls - Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Carlo Stresemann

aus Bad Gandersheim

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Präklinische und klinische Charakterisierung  
von DNA-Methyltransferase Inhibitoren  
als Wirkstoffe für die Tumorthherapie

Gutachter: Prof. Dr. Lutz Gissmann

Prof. Dr. Frank Lyko

## **Zusammenfassung**

Veränderte Methylierungsmuster spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebserkrankungen. Insbesondere die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen ist ein häufiges Ereignis, das die Stilllegung von Genen verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) mit DNMT-Inhibitoren zur Reaktivierung von epigenetisch stillgelegten Genen führen kann. Die beiden DNA-Methyltransferase Inhibitoren 5-Azacytidin und Decitabin haben bereits zu einer klinischen Verbesserung in der Behandlung von Myelodysplastischen Syndromen (MDS) geführt. Beide Substanzen wurden von der FDA (Food and Drug Administration) für die Behandlung dieser Erkrankungen zugelassen. Nichtsdestotrotz sind die demethylierenden Eigenschaften dieser Substanzen bisher nicht gut charakterisiert worden. Daher war das Ziel meiner Arbeit die demethylierenden und wachstumsinhibierenden Eigenschaften von DNMT Inhibitoren genauer zu charakterisieren. Für diesen Zweck wurde ihre Wirkung in therapiebezogenen präklinischen Modellsystemen untersucht. Ausserdem wurden klinische Proben aus MDS-Patienten analysiert, die mit 5-Azacytidin behandelt wurden. Ich konnte in Zellkulturmodellen zeigen, dass eine Behandlung mit 5-Azacytidin oder mit Decitabin, im Vergleich mit anderen DNMT-Inhibitoren die stärkste Inhibition der DNA-Methylierung zeigte. Überdies war auch die wachstumsinhibierende Wirkung dieser Substanzen am stärksten ausgeprägt. In weiteren Experimenten wurde die Rolle von Transporterproteinen für die inhibitorischen Wirkungen der Azanukleoside untersucht. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen ergaben, dass die erleichterte Aufnahme von 5-Azacytidin und Decitabin in einer erhöhten Sensitivität gegenüber den demethylierenden und wachstumsinhibierenden Wirkungen dieser DNMT Inhibitoren resultierte. Ein wichtiger Aspekt für die klinische Charakterisierung von DNMT Inhibitoren war die Analyse der Methylierungsveränderungen in MDS-Patienten. Die Methylierungsuntersuchung von Blut und Knochenmarksproben aus MDS-Patienten, die mit 5-Azacytidin behandelt wurden, ergab erhebliche Unterschiede in der DNA-Demethylierung zwischen individuellen Patienten. In drei von sechs Patienten konnte eine signifikante und transiente genomweite DNA-Demethylierung nachgewiesen werden. Eine detaillierte Array-basierte Analyse ergab, dass viele hypermethylierte Einzelgene demethyliert werden konnten. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten leukämische Krebszellen bemerkenswerte Unterschiede in der durch die Behandlung induzierten Verringerung der DNA-Methyltransferasen. Diese Verringerung korreliert jeweils mit den beobachteten Methylierungsänderungen in den jeweiligen Zelllinien. Insgesamt konnte in dieser Arbeit ein wichtiger Nachweis der demethylierenden Aktivität von 5-Azacytidin in MDS Patienten erbracht werden. Zusätzlich konnte die Existenz von zuvor unbekanntem Faktoren aufgedeckt werden, die die Wirkungen von DNMT Inhibitoren beeinflussen.

**Summary:**

Aberrant DNA hypermethylation patterns play an important role in the pathogenesis of cancer. In particular, the methylation of tumor suppressor genes is a common event which often results in gene silencing. It has been shown that the inhibition of DNA methyltransferases (DNMTs) with DNMT inhibitors can lead to the reactivation of epigenetically silenced genes. The DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and decitabine already have shown significant clinical benefits in the treatment of myelodysplastic syndromes (MDS) and have received FDA approval for this indication. Nevertheless drug-induced DNA methylation changes have remained poorly characterized. Therefore the aim of my work was to characterize demethylating and growth inhibiting effects of DNMT inhibitors. For this purpose I used therapy-related preclinical model systems and clinical samples from MDS patients undergoing azacytidine therapy. In cellular model systems I could show that, in comparison to other DNMT inhibitors, treatment with 5-azacytidine or decitabine resulted in the strongest inhibition of DNA methylation combined with the most significant effects on cancer cell growth. In an additional set of experiments I could characterize the role of transport proteins in the inhibitory effects of these drugs. These results showed that facilitated import of 5-azacytidine or decitabine resulted in a significant sensitization of the cells towards the demethylating and growth inhibiting effects of these DNMT inhibitors. An important part for the clinical characterization of DNMT inhibitors was the analysis of methylation changes in MDS patients. DNA methylation analysis of blood and bone marrow samples from MDS patients undergoing azacytidine therapy revealed substantial differences in the epigenetic responses of individual patients. Significant, transient genomic DNA demethylation could be observed in three out of six patients. A detailed array-based analysis revealed that many hypermethylated genes could be demethylated. In agreement to these results, leukemic cell lines showed remarkable differences in the drug-induced depletion of DNA methyltransferases that coincided with their demethylation responses. Taken together, this work provides important proof of mechanism data for the demethylating activity of azacytidine in MDS patients. Additionally the results of this work clearly reveal the existence of previously unknown modulating factors which influence the effects of DNMT inhibitors.

1	EINLEITUNG	8
1.1	Epigenetik und DNA Methylierung	8
1.2	DNA-Methyltransferasen und von ihnen vermittelte Funktionen	10
1.3	Epigenetische Veränderungen in der Krebsentstehung	11
1.4	Konzept der epigenetischen Krebstherapie	14
1.4.1	Wirkungsmechanismen verschiedener DNMT-Inhibitoren	15
1.4.2	Die DNMT-Inhibitoren 5-Azacytidin und Decitabin	17
1.5	Demethylierende Therapie mit Azanukleosiden in den myelodysplastischen Syndromen	18
1.5.1	Stellenwert und Pathophysiologie der myelodysplastischen Syndrome	18
1.5.2	Klinische Erfahrungen aus der Behandlung von MDS mit Azanukleosiden	20
1.5.3	Methylierungsänderungen in MDS-Patienten nach der Behandlung mit Azanukleosiden	22
2	ERGEBNISSE	23
2.1	Untersuchung der Wirkungsweisen von Azanukleosid-basierten DNMT-Inhibitoren in humanen Krebszelllinien	23
2.1.1	Charakterisierung der wachstumsinhibierenden Effekte von DNA-Methyltransferase Inhibitoren	23
2.1.2	Untersuchung der Methylierungsänderungen nach Behandlung mit Azanukleosiden im Vergleich mit anderen DNA-Methyltransferase Inhibitoren	25
2.2	Untersuchung der zellulären Aufnahme Azanukleosid-basierter DNMT-Inhibitoren als modulierender Faktor für die inhibitorische Aktivität	27
2.2.1	Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung der Aufnahme von Azanukleosiden	27
2.2.2	Charakterisierung der hCNT1 und hCNT3-vermittelten zellulären Aufnahme von 5-Azacytidin	28
2.2.3	Untersuchung der wachstumsinhibierenden Wirkung von 5-Azacytidin auf hCNT1 bzw. hCNT3-transfizierte MDCK-Zellen	28
2.2.4	Analyse des Einflusses der hCNT-vermittelten Aufnahme von Azanukleosiden auf die Inaktivierung der DNA-Methyltransferase 1 und die genomweite Methylierung der DNA	29
2.3	Charakterisierung der 5-Azacytidin induzierten Effekte in myelodysplastischen Syndromen	31
2.3.1	Detaillierte Analyse der Veränderungen in der Gesamtmethylierung in Blut- und Knochenmarkszellen von MDS-Patienten	32
2.3.2	Analyse der Methylierungsänderungen in repetitiven Sequenzelementen und in Leukämie assoziierten Markergenen	34

2.3.3	Array-basierte Untersuchung der Methylierungsänderungen in Krebs assoziierten Einzelgenmarkern nach Behandlung mit 5-Azacytidin	37
2.3.4	Charakterisierung der molekularen Effekte von 5-Azacytidin in myeloiden Krebszelllinien und ex vivo kultivierten Knochenmarkszellen von MDS/AML-Patienten	40
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>49</b>
3.1	5-Azacytidin und Decitabin sind die bisher effektivsten DNMT-Inhibitoren	49
3.2	Azanukleoside können transient die genomweite DNA- Methylierung in Patienten reduzieren	51
3.3	Identifizierung von Genmarkern für die 5-Azacytidin vermittelte Demethylierung in MDS-Patienten	54
3.4	Proteine der CNT-Transporterfamilie ermöglichen den Transmembrantransport von Azanukleosiden	58
3.5	Die CNT- vermittelte Aufnahme ist ein modulierender Faktor für die inhibitorische Aktivität von Azanukleosiden	59
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>61</b>
4.1	Material	61
4.1.1	MDS Patienten der Studie	61
4.1.2	Behandlung der Patienten	61
4.1.3	Aufarbeitung der Blutproben der Patienten	62
4.1.4	DNA-Methyltransferase-Inhibitoren	62
4.1.5	Synthese des radioaktiv markierten [ <sup>14</sup> C]-5-Azacytidin	62
4.1.6	Chemikalien	62
4.1.7	Zellkulturmaterialien	63
4.1.8	Verbrauchsmaterialien	64
4.1.9	Enzyme und molekularbiologische Arbeitsmaterialien	64
4.1.10	Geräte	65
4.1.11	Verwendete Antikörper	65
4.1.12	Verwendete Primer	66
4.1.13	Lösungen	66
4.2	Methoden	67
4.2.1	Allgemeine Labortechniken	67
4.2.1.1	Extraktion genomischer DNA	67
4.2.1.2	Messung der DNA-Konzentration	68
4.2.1.3	Auftrennung und Visualisierung von DNA	68
4.2.1.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	68
4.2.1.5	Aufreinigung von DNA	68
4.2.1.6	Bisulfit-Behandlung von DNA	69
4.2.1.7	Restriktionsverdau von DNA mit Endonukleasen	70

4.2.1.8	Präparation von RNA	71
4.2.1.9	cDNA Synthese	71
4.2.1.10	Real-time-PCR	71
4.2.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	72
4.2.1.12	Präparation von Zelllysaten	72
4.2.1.13	Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode	72
4.2.1.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli	73
4.2.1.15	Immunoblotting-Verfahren (Western-Blot)	74
4.2.2	Techniken für Methylierungsuntersuchungen	75
4.2.2.1	Enzymatische Hydrolyse und Derivatisierung von genomischer DNA für die micellare Kapillar-Elektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz (CE- LIF)	75
4.2.2.2	COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)	76
4.2.2.3	Bisulfit-Sequenzierung	77
4.2.2.4	Array-basierte Untersuchung der Methylierung von Einzelgenmarkern	78
4.2.3.	Zellkulturtechniken	79
4.2.3.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	79
4.2.3.2	Kultivierung der HCT116-Zellen	79
4.2.3.3	Kultivierung der TK-6, HEL, HL-60 und K562-Zellen	79
4.2.3.4	Kultivierung der Madin-Darby canine kidney (MDCK)-Zelllinien	79
4.2.3.5	Kultivierung primärer Zellen aus dem Knochenmark von AML/MDS-Patienten	80
4.2.3.6	Passagieren der Zelllinien	80
4.2.3.7	Bestimmung der Zellzahl	80
4.2.3.8	Behandlung und Ernte von Zellen	80
4.2.3.9	Bestimmung der IC50 Konzentrationen	81
4.2.3.11	Stabile Expression der CNT-Transporter in MDCK-Zellen	82
4.2.3.12	Untersuchungen der zellulären Aufnahme verschiedener radioaktiv-markierter Nukleoside	82
4.2.3.10	Weichagar-Koloniebildungstest	82
4.2.3.11	Nicoletti-Methode zum Nachweis von apoptotischen Zellen	83
4.2.3.12	Zytometrische Zellzyklusanalyse	84
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	85
6	LITERATURVERZEICHNIS	87
	DANKSAGUNG	103

# 1 Einleitung

## 1.1 Epigenetik und DNA Methylierung

Der Begriff Epigenetik beschreibt den Wissenschaftsbereich in der Biologie, die erbliche Veränderungen in der Genexpression untersucht, die nicht in der Gensequenz selbst codiert sind. Wesentliche Fragestellungen in der Epigenetik richten sich auf die Faktoren, die eine zelltypspezifische Interpretation des genetischen Codes ermöglichen. Jede einzelne Zelle eines Organismus besitzt bis auf wenige Ausnahmen die gleiche genetische Information. Epigenetische Mechanismen ermöglichen es einer Zelle ein spezifisches Expressionsmuster zu entfalten und über nachfolgende Zellgenerationen hinaus aufrecht zu erhalten oder zu modifizieren. So kann durch die epigenetische Interpretation der gleiche genetische Code zu funktionell völlig unterschiedlichen Zelltypen führen.

Mehrere interagierende Systeme vermitteln die epigenetische Regulation der Expressionsmuster (5). Die Struktur des Chromatins ist dabei essentiell für die Regulation der Genexpression. Die fundamentale sich wiederholende Einheit im Chromatin ist das Nukleosom. Es wird gebildet aus einem kurzen Stück genomischer DNA (146 Basenpaare), welches um einen Kern von acht Histonproteinen (H2A, H2B, H3 und H4) gewunden ist. Über die Modifikationen spezifischer Histon-Aminosäurereste an den N-terminalen Domänen, oder das Verschieben der Histone auf der DNA wird eine Verdichtung oder eine Auflockerung des Chromatins erreicht. Dadurch ergibt sich wiederum eine unterschiedliche Zugänglichkeit der DNA für z.B. Transkriptionsfaktoren. Die am besten untersuchte Histonmodifikation ist die Acetylierung, die von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) gesteuert wird (6). Neben der Acetylierung sind die Modifikationsmöglichkeiten der N-terminalen Histondomänen sehr vielschichtig und beinhalten die Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung, ADP-Ribosylierung, Glykosylierung, Biotinylierung und die Carboxylierung (7). Bereits frühe cytologische Studien unterschieden zwei verschiedene Zustände des Chromatins. Das verdichtete, kompakte Heterochromatin repräsentiert dabei einen stillgelegten Zustand der Genexpression, im Gegensatz zu dem aufgelockerten Euchromatin. Zwei Histonmodifikationen, die mit diesen verschiedenen Zuständen des Chromatins in Beziehung gebracht werden, ist dabei die Acetylierung von Histon H4-Lysin16-Resten, die mit einer Aktivierung von Genen in Verbindung gebracht wird und die Methylierung von Histon H3-Lysin9-Resten, die mit einer Inaktivierung von Genen assoziiert ist (8). Insgesamt entscheidet die Gesamtheit der Modifikationen eines Sequenzabschnittes der DNA über die Struktur des Chromatins. Aufgrund der Komplexität dieses Systems wurde ein „Histon-Code“(9) postuliert. D.h. das bestimmte Kombinationen von Modifikationen mit spezifischen expressionellen Zuständen des Chromatins assoziiert sind.

Als ein weiterer Mechanismus der epigenetischen Genregulation sind nicht-kodierende RNAs von Bedeutung, die sowohl auf die Translation, als auch auf die Transkription unterschiedlich einwirken können (10-13). Eine gut untersuchte epigenetische Regulation ist hierbei die Dosiskompensation durch die Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms bei den Säugetieren. Die X-chromosomale Inaktivierung ist unter anderem abhängig von der Expression von *Xist* (X inactive specific transcript), einem nichtkodierenden Transkript, welches an das inaktivierte X-Chromosom anbindet und dadurch Chromatinveränderungen induziert (14).

Der am besten untersuchte epigenetische Mechanismus ist die Methylierung der DNA an Cytosinbasen, die sich benachbart in 5'-Richtung zu Guaninen befinden (15). Die Methylierung dieser sogenannten CpG-Dinukleotide ist symmetrisch auf beiden DNA-Strängen zu finden (16) und ist schon lange als ein Mechanismus für die transkriptionelle Stilllegung von Genen bekannt (17, 18). Statistisch sind CpG-Dinukleotide im Genom unterrepräsentiert. Das hängt mit dem hohen Mutationspotential dieser Sequenzen zusammen, da durch spontane Deaminierung aus einem methylierten Cytosin ein Thymidin entstehen kann. Diese Veränderung in der DNA-Sequenz kann nur schwer durch das Reparatursystem als Fehler erkannt werden, da Thymidin ein normaler Bestandteil der DNA ist. Im Gegensatz zu dieser generellen Unterrepräsentation im Genom gibt es in ca. 70% aller Gene kurze Sequenzabschnitte in, oder in der Nähe von Promotoreregionen, die einen hohen Anteil (>55%; Gesamtgenom ca. 40%) an CpG-Dinukleotiden aufweisen (19). Diese sogenannten CpG-Inseln (20) sind sowohl in exprimierenden als auch in nicht-exprimierenden Zellen meist nicht methyliert und dienen als normale Promotorelemente (21). Ausnahme von diesem unmethylierten Zustand von CpG-Inseln in normalen Zellen sind die gezielte Methylierung dieser Sequenzen bei der Prägung von Genen (22), der X-chromosomalen Inaktivierung (14, 23) und die gezielte Methylierung von keimbahn-spezifischen oder gewebs-spezifischen Genen (15, 24-26). Insgesamt sind je nach Gewebe zwischen 3-5% der Cytosine der genomischen DNA methyliert (27, 28). Daraus resultiert, dass ca. 80% der CpG-Dinukleotide im Genom methyliert sind. Diese Methylierungen liegen aber zumeist in nicht-kodierenden Bereichen der DNA, in promotorfernen Genabschnitten, in repetitiven Sequenzelementen, in Sequenzen viralen Ursprungs und in transponierbaren Elementen (28, 29). Die Methylierung dieser Sequenzen verhindert die Transkription dieser Elemente und ist deshalb ein wichtiger Mechanismus, der die Integrität des Genoms gewährleistet (30, 31). Die Demethylierung des Genoms führte zusätzlich in einem transgenen Mausmodell zu Chromosomendefekten (32), was zeigt, dass neben der Stilllegung von unerwünschten Transkripten die Methylierung auch eine wichtige Funktion für die Organisation der Chromosomenstruktur erfüllt.

## 1.2 DNA-Methyltransferasen und von ihnen vermittelte Funktionen

Die DNA-Methylierung wird von verschiedenen Cytosin-5 DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. Es können bei der Methylierung der DNA zwei unterschiedliche Aufgaben unterschieden werden. Zum einen müssen während der Replikation der DNA bei der Zellteilung bereits etablierte Methylierungsmuster stabil auf den unmethylierten Tochterstrang übertragen werden. Die CpG-Nukleotidfolge ist symmetrisch und kann auf beiden DNA-Strängen gefunden werden. In der G0/G1-Phase des Zellzyklus ist diese Nukleotidfolge entweder auf beiden Strängen methyliert oder unmethyliert. Die semikonservative Replikation der DNA resultiert aber zuerst einmal in zwei hemimethylierten DNA-Strängen. Die Methylierung des parentalen Stranges wird von den DNA-Methyltransferasen als Signal erkannt, um die Methylierungsmuster auf den neuen Tochterstrang zu übertragen. Dies führt letztlich zur symmetrischen Methylierung des CpG-Dinukleotids auf beiden Strängen. Diese Funktion der Methylierungserhaltung wird hauptsächlich der im Säugetiergenom zuerst identifizierten DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) zugeordnet. DNMT1 besitzt eine ca. 5 bis 30-fache Präferenz für hemimethylierte DNA-Doppelstränge und gilt daher als Erhaltungsmethylase (33-35). Während der Säugetierentwicklung ist die DNA-Methylierung nicht statisch, sondern ist dramatischen Änderungen unterworfen (36, 37). Die Entwicklung der Keimzellen und die frühe embryonale Entwicklung benötigen fundamentale Umprogrammierungen der epigenetischen Muster. Es wird ein Großteil der Methylierungssignale durch aktive und passive Mechanismen entfernt (38-40). Während der Embryogenese und der Entwicklung der Keimzellen werden gezielt die Methylierungsmuster durch eine sogenannte de-novo Methylierungsaktivität wieder etabliert. Es wird vermutet, dass die DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b diese Funktion übernehmen. Beide Enzyme wurden über EST (Expressed Sequence Tags)-Datenbankensuche als DNMT identifiziert (41, 42). DNMT3a zeigt eine DNA-Methyltransferase-Aktivität in vivo und in vitro (43, 44) und es konnte zusammen mit dem Cofaktor DNMT3-like (DNMT3L) eine essentielle Rolle in der Etablierung von maternalen bzw. paternalen Prägungsmustern nachgewiesen werden (45, 46). Hypomorphe Keimbahnmutationen im DNMT3b-Gen sind für zwei Drittel der ICF-Syndrom-Erkrankungen (Immundefekt, Centromer-Instabilität und faciale Dysmorphien (47, 48)), einer schweren autosomal-rezessiv vererblichen Erkrankung, verantwortlich. Detaillierte Expressionsanalysen in betroffenen Patienten zeigten verschiedene Methylierungsveränderungen in entwicklungsspezifischen Genen (49). Insgesamt gibt es aber Hinweise darauf, dass die Aufgaben der Erhaltungsmethylierung und der de-novo Methylierung kooperativ von allen drei Methyltransferasen erfüllt werden. So konnte gezeigt werden, dass

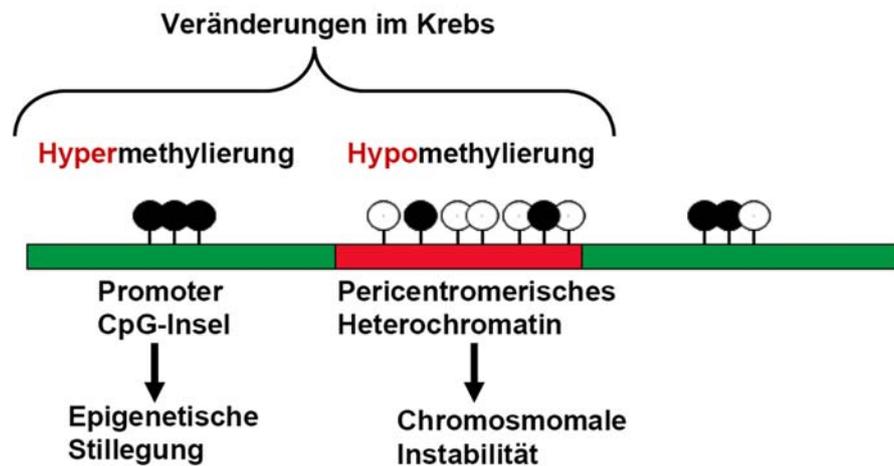
z.B. DNMT3a und DNMT3b ebenso an der Erhaltungsmethylierung beteiligt sein können (50, 51).

In vergleichenden Analysen der Aminosäuresequenzen von fünfzig bekannten DNA-Methyltransferasen wurde herausgefunden, dass alle DNMTs hoch konservierte Sequenzmotive besitzen, die für die katalytische Aktivität essentiell sind (52). Die generelle Architektur der Cytosin-Methyltransferasen besteht aus einer hoch konservierten Domäne, die die Bindungsstelle für den Cofaktor S-Adenosylmethionin und die Sequenzmotive des aktiven Zentrums beinhaltet (53). Im Gegensatz dazu gibt es noch eine weitere Domäne, die zwischen den einzelnen DNMTs nur einen geringen Grad an Konservierung aufweist und hauptsächlich durch die Zielerkennungsdomäne und weiteren regulativen Domänen repräsentiert wird.

Die DNA-Methyltransferasen können die Transkription von Genen durch verschiedene Mechanismen stilllegen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die DNA-Methylierung von spezifischen CpG-Dinukleotiden in Promotorbereichen von Genen zu einer sterischen Blockade der Anbindung von Transkriptionsfaktoren führen kann (54, 55). Die transkriptionelle Repression wird aber vor allem von Proteinen vermittelt, die eine Methyl-Bindedomäne besitzen und somit spezifisch an methylierte Sequenzen binden können (56, 57). Diese Methyl-Bindedomäne Proteine (MBDs) können direkt die Transkription durch ihre Bindung inhibieren, oder sie rekrutieren andere Proteinkomplexe, die eine Ummodellierung des Chromatins vermitteln können, welches die Expression stilllegt (58, 59). DNA-Methyltransferasen können zusätzlich neben ihrer methylierenden Aktivität selbst als transkriptionelle Repressoren fungieren oder als Bindeelemente, um andere transkriptionelle Repressoren, wie Histon-Deacetylasen oder Histon-Methyltransferasen zu rekrutieren (60-62).

### 1.3 Epigenetische Veränderungen in der Krebsentstehung

Es gab bereits vor über 20 Jahren Hinweise darauf, dass Veränderungen in der DNA-Methylierung in der Krebsentstehung eine bedeutende Rolle spielen (63). Mittlerweile ist bekannt, dass Änderungen in den Methylierungsmustern zu den frühesten Ereignissen während der Krebsentstehung gehört und mindestens genauso so häufig zur Stilllegung eines Tumorsuppressorgens führen kann, wie eine klassische genetische Mutation (64). Es können insgesamt zwei unterschiedliche Veränderungen in den Methylierungsmustern von Krebszellen unterschieden werden, die jeweils funktionell verschiedene Auswirkungen auf die Zelle haben können: Genomweite Hypomethylierung und die Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorbereichen von Tumorsuppressorgenen (Abb. 1).



**Abbildung 1.** Epigenetische Veränderungen im Krebs. Hypermethylierung von Promotor assoziierten CpG-Inseln führt zur epigenetischen Stilllegung von Tumorsuppressorgenen. Genomweite Hypomethylierung z.B. in Sequenzen des pericentromerischen Heterochromatins fördert die chromosomale Instabilität.

In verschiedenen Krebsgeweben konnte nachgewiesen werden, dass die genomweite Methylierung im Vergleich zu den korrespondierenden gesunden Geweben um 20-60% reduziert sein kann (65). Diese genomweite Hypomethylierung konnte vor allem in den repetitiven DNA-Sequenzen, in nichtcodierenden Genbereichen und den Genabschnitten, die keine Promotorfunktion erfüllen, nachgewiesen werden (66). Die genomweite Hypomethylierung beeinträchtigt die strukturelle Stabilität der Chromosomen (32) und führt potentiell zur Reaktivierung von transponierenden Elementen (30, 31). Es konnte beobachtet werden, dass Hypomethylierung zu mitotischen Rekombinationsereignissen führt und somit chromosomale Neuarrangements gefördert werden können (67, 68). In einer Studie in Mäusen, mit nur einem hypomorphen DNMT1 Allel, entwickelten diese aggressive Lymphome, in denen in hoher Frequenz zytogenetische Veränderungen nachgewiesen werden konnten (32). Genomweite Hypomethylierung verändert außerdem die normalen Methylierungsmuster geprägter Gene (69, 70) und kann zusätzlich auch direkt zu einer erhöhten Expression von Onkogenen führen. Dies konnte unter anderem für die Leukämie-assoziierten Gene *cyclin D2*, *Bcl-2* und *H-Ras* gezeigt werden (63, 71, 72). In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Mikro-RNAs häufig methyliert sind (73). Mikro-RNAs können viele verschiedene Gene über den RNA-Interferenz-Mechanismus regulieren und spielen eine spezifische Rolle in der Entwicklung und Differenzierung (74). Es wurde beobachtet, dass eine Hypomethylierung der Mikro-RNA *let-7a-3* zu einer erhöhten Expression dieser RNA führte (75). Somit könnte auch die Hypomethylierung dieser Gene im Krebs zur Fehlregulation von sehr vielen verschiedenen Genen führen (76).

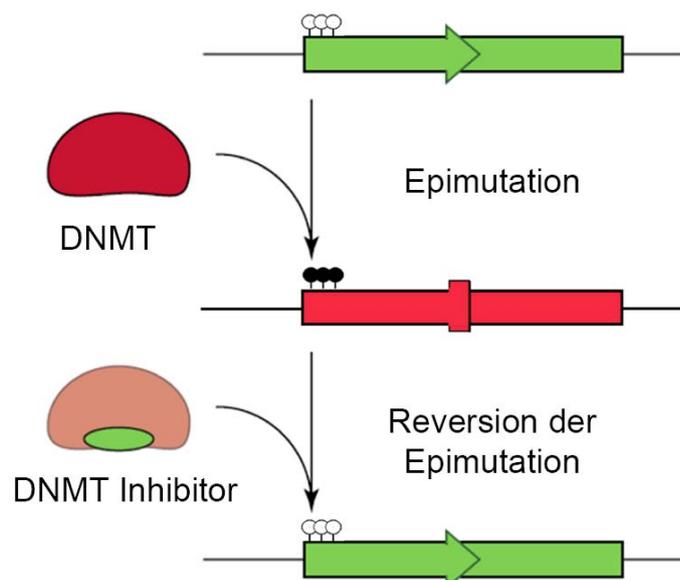
Neben der globalen Hypomethylierung konnten in allen bisher untersuchten Krebsgeweben Hypermethylierungen in Promotor assoziierten CpG-Inseln nachgewiesen werden (77, 78). Die Hypermethylierung dieser CpG-Inseln ist mit der transkriptionellen Stilllegung von Tumorsuppressorgenen verbunden und repräsentiert somit einen wichtigen

Mechanismus der Gen-Inaktivierung in der Pathogenese von Neoplasien. Die Stilllegung eines Tumorsuppressorgens erfordert häufig die komplette Inaktivierung beider Genkopien im Genom (79). Die epigenetische Inaktivierung einer Genkopie hat hierbei den gleichen Effekt wie eine klassische genetische Mutation oder Deletion. Um in der Krebsentstehung eine oder beide Allele eines Gens zu inaktivieren, kann daher die epigenetische Inaktivierung als ein gleichwertiger Mechanismus angesehen werden (64, 80). Die Methylierung bestimmter CpG-Inseln in Promotoren von Tumorsuppressorgenen scheint dabei zusätzlich in enger Verbindung zum Gewebsursprung des Tumors zu stehen (81). So wurde die Hypothese aufgeworfen, dass es ein spezifisches Methylierungsmuster für verschiedene Krebserkrankungen gibt. Dieses Muster sei dadurch determiniert, dass durch statistisch auftretende Veränderungen, gewebspezifische Wachstumsvorteile erlangt werden. D.h. um zu entarten, benötigen unterschiedliche Gewebe die Stilllegung von jeweils spezifischen Genen (82, 83).

Genspezifische Methylierungsänderungen können einen wichtigen Beitrag in bereits sehr frühen Schritten der Krebsentstehung spielen und in weiteren genetischen Veränderungen resultieren. Zwei gut untersuchte Beispiele für die epigenetische Stilllegung von solchen „Schlüsselgenen“ sind die Inaktivierung der Gene *hMLH1* (human mutL homolog 1) und der O<sup>6</sup>-Methylguanin DNA-Methyltransferase (*O<sup>6</sup>MGMT*), zwei wichtigen DNA-Reparaturgenen. Die Stilllegung des *hMLH1* Gens verursacht eine Mikrosatelliten-Instabilität, eine Form der genomischen Instabilität in kolorektalen Karzinomen und anderen Tumorarten (84-86). Eine hohe Frequenz von G zu A Mutationen ist hingegen bei der Inaktivierung von *O<sup>6</sup>MGMT* zu beobachten, wobei unter anderem in kolorektalen Karzinomen das *K-ras* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, isoform 4B) Protoonkogen und das *p53* (protein 53) Tumorsuppressorgen betroffen sein können (87, 88). Neben der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen können auch Gene hypermethyliert werden, die eine Schlüsselrolle in der Differenzierung haben. So konnte in der chronischen myeloiden Leukämie ein direkter Zusammenhang zwischen der Hypermethylierung von Genen der HOX-Familie nachgewiesen werden und dem Fortschreiten der Erkrankung zu einem Stadium mit hauptsächlich undifferenzierten Blasten im Blut (89, 90). Eine ektopische Reexpression von HOX Genen in Zellkulturexperimenten führte dabei wieder zur Induktion von differenzierungsspezifischen Markern. Durch genomweite und genspezifische Veränderungen in den Methylierungsmustern konnte in vielen verschiedenen Krebserkrankungen gezeigt werden, dass potentiell alle zellulären Prozesse verändert werden können, die zu der Entstehung der Krankheit führen. Dies unterstreicht die fundamentale Rolle epigenetischer Veränderungen in der Entwicklung von Krebs und eröffnet neue Ansatzpunkte für die Krebstherapie.

## 1.4 Konzept der epigenetischen Krebstherapie

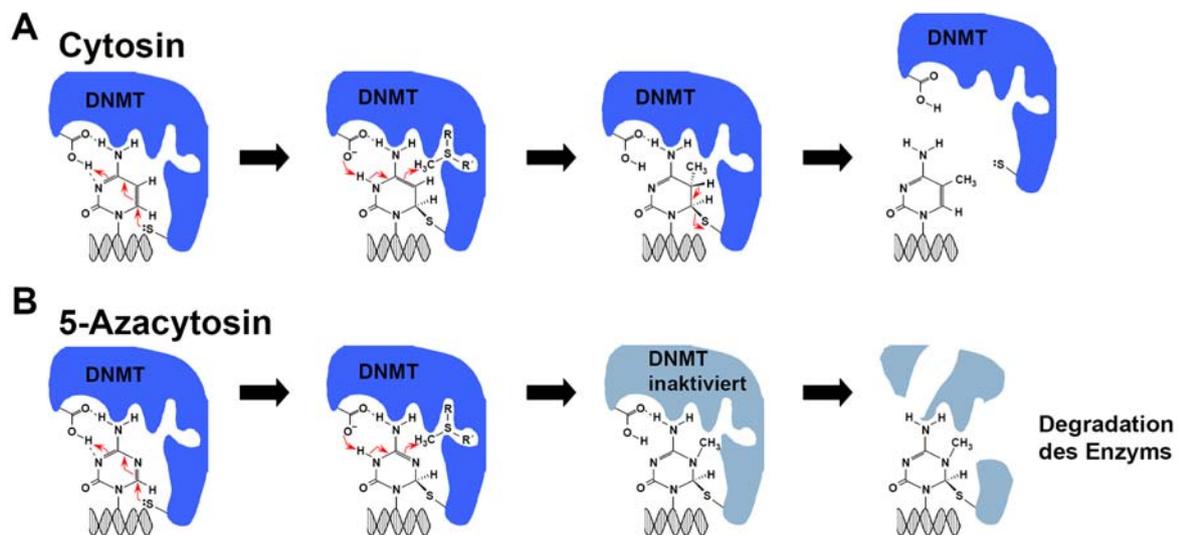
Die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen führt meist zur transkriptionellen Stilllegung und hat somit, wie bei einer genetischen Mutation, den Verlust der normalen Funktion der betroffenen Gene zur Folge. Der Unterschied zu genetischen Mutationen besteht darin, dass die epigenetischen Veränderungen auf eine kontinuierliche Aktivität von DNA-Methyltransferasen angewiesen sind, um stabil bei der Zellteilung erhalten zu bleiben. Somit besteht ein wichtiger Unterschied zwischen diesen epigenetisch vermittelten „Epimutationen“ und genetischen Mutationen. Die Möglichkeit einer gezielten Inhibition der Methyltransferasen führt dazu, dass veränderte Methylierungsmuster wieder verlorengehen und der ursprüngliche Methylierungszustand wieder hergestellt werden kann (Abb. 2). Dadurch könnte die Kontrolle der Zellvermehrung, die Apoptose-Sensitivität oder die normale Differenzierung in krebsartig veränderten Zellen wiederhergestellt werden. Diese Möglichkeit ist der zentrale Ansatzpunkt für einen epigenetischen Therapieansatz (91). Zusätzlich sind veränderte Methylierungsmuster an den CpG-Inseln von Tumorsuppressorgenen ausschließlich in krebsartig veränderten Zellen zu finden (28). Dies könnte die demethylierende Krebstherapie zu einer spezifischen Therapie machen, da so vor allem in Tumorzellen die DNA-Demethylierung in Veränderungen der Genexpression resultiert. Des Weiteren sind die biochemischen Eigenschaften und molekularen Effekte der DNA-Methyltransferasen auf die DNA schon detailliert untersucht worden, wodurch deren Inhibition für die Krebstherapie einen weiteren attraktiven Ansatzpunkt bietet (52, 92, 93).



**Abbildung 2.** Der Einsatz von DNA-Methyltransferase Inhibitoren in der Krebstherapie. In der Krebsentstehung werden Tumorsuppressorgene aberrant methyliert und stillgelegt. Diese sogenannten Epimutationen können durch den Einsatz von DNMT-Inhibitoren rückgängig gemacht werden. Die Methylierung kann nach der Inhibition aufrechterhalten werden und die Funktionalität des Gens kann wiederhergestellt werden. Modifiziert übernommen aus (4)

1.4.1 Wirkungsmechanismen verschiedener DNMT-Inhibitoren

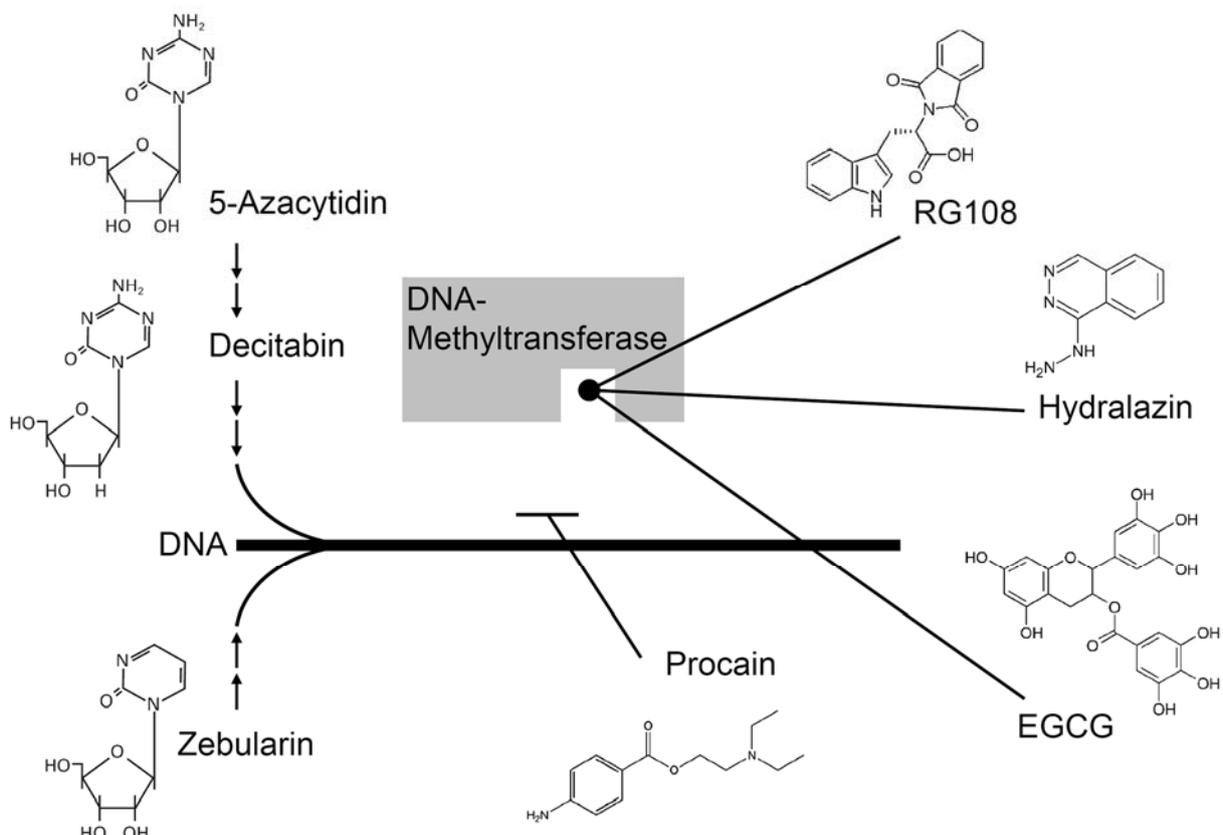
Es konnte für verschiedene Substanzen eine inhibitorische Aktivität auf die katalytische Funktion von DNA-Methyltransferasen nachgewiesen werden (94). Die Wirkungsmechanismen dieser strukturell sehr verschiedenen Substanzen unterscheiden sich aber erheblich. Eine Gruppe der Inhibitoren sind hierbei verschiedene Cytosin-Analoga wie Azacytidin (95), Decitabin (96), Zebularin (97), 5,6-dihydro-5-Azacytidin (98) und 5-fluoro-2'-Deoxycytidin (99). Alle diese Nucleoside sind Mechanismus-basierte Inhibitoren (100). Sie werden von der Zelle aufgenommen und müssen in die entsprechenden Deoxynucleotid-Triphosphate umgewandelt werden, bevor sie während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA anstelle für Cytosin eingebaut werden können. Für die Entfaltung ihrer inhibitorischen Aktivität sind sie also auf den Einbau in die DNA angewiesen. Diese Nucleosid-basierten Inhibitoren werden von den DNA-Methyltransferasen im Kontext mit Guanin als natürliches Substrat erkannt und die Methylierungsreaktion wird über einen nukleophilen Angriff (101) einer katalytischen Thiol-Gruppe des Enzyms initiiert (Abb. 3A). Während der Methylierungsreaktion wird ein kovalenter Komplex zwischen der Base und dem Enzym gebildet, der bei dem Cytosin nach Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin über eine  $\beta$ -Eliminierungsreaktion aufgelöst wird (Abb. 3A). Bei den Nucleosid-basierten DNMT-Inhibitoren wie z.B. bei 5-Azacytosin kann diese



**Abbildung 3.** Inhibitionsmechanismus der Nucleosid-basierten Inhibitoren am Beispiel von 5-Azacytosin. **(A)** Durch den nukleophilen Angriff einer Thiol-Gruppe des DNMT-Enzyms auf die C6-Position des Cytosins wird die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin ermöglicht. Diese Übertragungsreaktion verläuft über einen Zwischenschritt, bei dem eine kovalente Bindung zwischen der C6-Position und dem DNMT-Protein besteht. Diese Verbindung wird über eine  $\beta$ -Eliminierungsreaktion wieder gelöst, wodurch die aktive DNA-Methyltransferase von der DNA abgelöst wird. **(B)** Mechanismus-basierte Inhibition der DNMTs bei DNA in der 5-Azacytosin enthalten ist. Die kovalente Bindung zwischen dem Enzym und der DNA kann nicht über eine  $\beta$ -Eliminierungsreaktion aufgelöst werden, da sich an der Position 5 der Base ein Stickstoff befindet. Die kovalent an die DNA gebundenen DNMTs werden degradiert, wodurch eine Verringerung der aktiven zellulären DNMTs erreicht wird.

$\beta$ -Eliminierungsreaktion aufgrund des Stickstoff an der C5-Position nicht ablaufen und die DNA-Methyltransferase bleibt kovalent an der DNA gebunden (97, 102, 103). Die kovalente Verknüpfung der DNMT führt zur Inaktivierung der Methyltransferase-Aktivität und späteren Degradation des Enzyms (Abb. 3B). Somit werden die Methylierungen der DNA während der Replikation nicht mehr vollständig kopiert, was letztlich zu einer passiven Demethylierung führt. Es wird angenommen, dass die kovalente Verknüpfung des Enzyms mit der DNA die Funktionalität der DNA beeinträchtigt und somit auch zytotoxische Effekte in der Zelle verursacht (104).

Neben den Nukleosid-basierten DNMT-Inhibitoren gibt es eine Anzahl an Substanzen, die unabhängig von dem Wirkungsmechanismus der DNA-Methyltransferasen in verschiedenen experimentellen Systemen eine inhibitorische Aktivität gezeigt haben (Abb. 4). Im Gegensatz zu den Nukleosid-basierten Inhibitoren führt deren Verwendung nicht zu Protein-DNA-Addukten. Vielmehr beruht ihr Wirkungsprinzip auf der Blockierung der Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und dem katalytischen Zentrum der DNA-Methyltransferase. So konnte für Procain und das Derivat Procainamid in einer Brustkrebszelllinie demethylierende Effekte beobachtet werden (105, 106). Die Inhibition



**Abbildung 4.** Die Strukturen verschiedener DNA-Methyltransferase-Inhibitoren und deren Zielort für die inhibitorische Wirkung. Die Nukleosid-basierten Inhibitoren werden nach Metabolisierung in die DNA inkorporiert. Sie wirken über einen reaktionsabhängigen Mechanismus (vergl. Abb.3). Procain bindet spezifisch an CpG-Dinukleotidfolgen in der DNA und blockiert die Substrat-Enzym Wechselwirkung. RG108, Hydralazin sowie EGCG ((-)-Epigallocatechin-Gallat) blockieren das katalytische Zentrum des Enzyms.

beruht vermutlich auf einer Blockierung der DNA, da demonstriert werden konnte, dass Procain die Fähigkeit besitzt an CpG-reiche DNA zu binden (106). Für EGCG ((-)-Epigallocatechin-3-Gallat), ein Polyphenol aus grünem Tee, wurde eine Inhibition der DNA-Methyltransferasen in Zellkernextrakten und Krebszelllinien beschrieben (107). Aufgrund der chemischen Struktur von EGCG wird vermutet, dass das aktive Zentrum der DNA-Methyltransferasen von EGCG gebunden und blockiert wird. Ähnliches wird auch von Hydralazin angenommen (108). Basierend auf dem gleichen Inhibitionskonzept, der Blockierung des aktiven Zentrums der Enzyme, wurde RG108 identifiziert. RG108 wurde in einem *in silico* Screen nach Substanzen, die gut in ein dreidimensionales Strukturmodell des katalytischen Zentrums der humanen DNMT1 passten, isoliert (109). In Experimenten konnte für RG108 die transkriptionelle Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen und eine genomweite Demethylierung beobachtet werden (110). Neben diesen Substanzen, die allgemein DNMTs inhibieren können, gibt es auch Versuche durch Oligonukleotide und der RNA-Interferenz-Methode einzelne DNMT-Enzyme spezifisch zu deaktivieren. Eines dieser Oligonukleotide ist MG98, das in Zellkulturexperimenten die Expression von DNMT1 auf mRNA und Proteinebene inhibieren konnte (111).

#### 1.4.2 Die DNMT-Inhibitoren 5-Azacytidin und Decitabin

Die bisher am besten untersuchten Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen sind 5-Azacytidin und Decitabin. Beide finden im Labor, als auch mittlerweile in der Klinik bei der Behandlung von myelodysplastischen Syndromen (MDS) (112), breite Verwendung. 5-Azacytidin und Decitabin wurden bereits vor 40 Jahren als klassische chemotherapeutische Substanzen entwickelt (95). Es stellte sich bald heraus, dass beide Azanukleoside die Fähigkeit besitzen, in Zelllinien die DNA-Methyltransferasen zu inhibieren und in embryonalen Mauszellen Differenzierung zu induzieren (100, 113, 114). Gerade für Leukämien konnte für diese Substanzen schon in sehr frühen Experimenten in verschiedenen experimentellen Systemen krebsinhibierende Effekte nachgewiesen werden, die denen von klassischen Nukleosid-basierten Chemotherapeutika überlegen waren (115-120). In Zellkultursystemen wurde später die Reaktivierung hypermethylierter, stillgelegter Gene nach der Behandlung mit Azanukleosiden bewiesen (121, 122), wodurch das Interesse an diesen Substanzen als epigenetische Wirkstoffe geweckt wurde. In frühen Studien mit Leukämiepatienten wurden 5-Azacytidin und Decitabin in sehr hohen Dosen verwendet, die nahe an der maximal tolerierbaren Dosis lagen. Dies führte in den Patienten häufig zu schweren toxischen und myelosuppressiven Nebenwirkungen (123, 124). Verbesserungen in der Dosierung und in der Darreichungsform haben schrittweise den klinischen Gebrauch beider Substanzen verbessert (1, 125). Dies führte dazu, dass beide Substanzen von der

FDA (Food and Drug Administration) für die Behandlung von Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS; siehe 1.5.1) zugelassen wurden.

Decitabin ist das Deoxyribose-Analog von 5-Azacytidin und wird im Gegensatz zu 5-Azacytidin nur in die DNA eingebaut. Azacytidin hingegen wird neben der DNA zu ca. 80% in die RNA eingebaut und kann hier mit der Biogenese der RNA, der Transkription und der Proteinsynthese interferieren (126-130). Beide Substanzen sind in wässriger Lösung relativ instabil. Die Halbwertszeit in neutralen Lösungen liegt bei einer Temperatur von 37°C bei 7 Stunden für Azacytidin und 20 Stunden für Decitabin (131, 132). Insgesamt müssen beide Azanukleoside durch mehrere Enzyme des Nukleotid-Stoffwechselweges chemisch modifiziert werden, um während der S-Phase in die DNA inkorporiert zu werden. Es gibt daher Hinweise darauf, dass bestimmte Schlüsselenzyme für die metabolische Aktivierung der Azanukleoside einen modulierenden Einfluss auf die Wirksamkeit dieser Substanzen haben könnten. So wurde z.B. in einer Selektionsstudie ein direkter Zusammenhang zwischen der Resistenz gegenüber Decitabin und Mutationen in der Deoxycytidinkinase nachgewiesen (133). Gerade für 5-Azacytidin ist auch die Ribonukleotidreduktase von besonderer Bedeutung, da dieses Enzym die Konvertierung der Ribonukleotide zu den Deoxyribonukleotiden katalysiert (134).

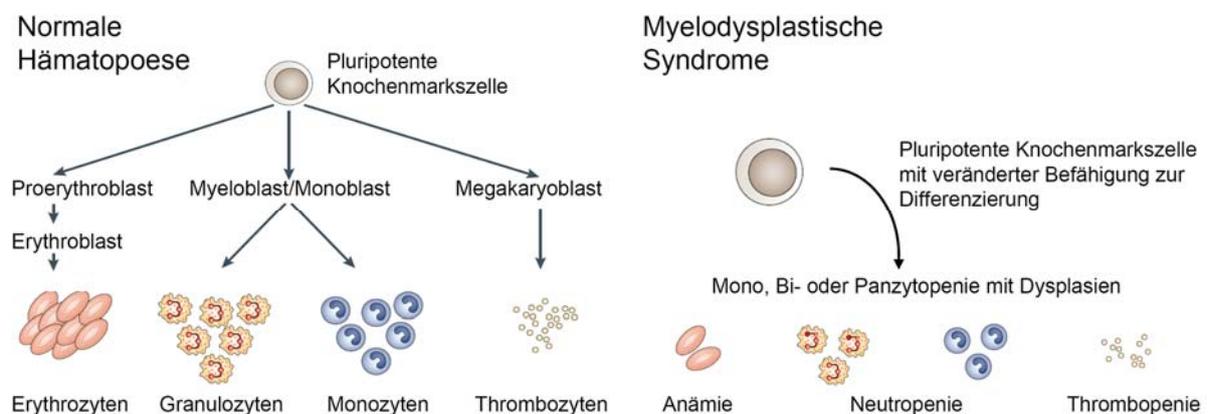
Ein wichtiger Faktor für die Wirksamkeit von therapeutischen Substanzen ist die Aufnahme in das Zielgewebe. Überraschenderweise ist bisher relativ wenig über die zelluläre Aufnahme von Azanukleosiden bekannt. Ein direkter funktioneller Nachweis der beteiligten Transporter für die Aufnahme konnte bisher nicht erbracht werden. Es wurden lediglich korrelative Daten zwischen den Expressionsniveaus einzelner Transporter in primären Zellen von Leukämiepatienten und Krebszelllinien und der Sensitivität gegenüber Azanukleosiden ermittelt (135, 136). Zusammen mit Erfahrungen in der Behandlung von Leukämien mit anderen Nukleosid-basierten Wirkstoffen konnten die Proteine für die konzentrierte Aufnahme von Nukleosiden (CNTs/SLC28A) und für den äquilibrierenden Austausch (ENTs/SLC29A) als Kandidaten für den Transmembrantransport von Azanukleosiden identifiziert werden. Die Rolle der Transporter für die inhibitorische Aktivität dieser Substanzen ist jedoch weiterhin unklar.

## 1.5 Demethylierende Therapie mit Azanukleosiden in den myelodysplastischen Syndromen

### 1.5.1 Stellenwert und Pathophysiologie der myelodysplastischen Syndrome

Die myelodysplastischen Syndrome gehören zu den häufigsten hämatologischen Erkrankungen. Es handelt sich um eine heterogene Gruppe von Stammzellerkrankungen, die durch eine gestörte Proliferation und Reifung hämatopoetischer Zellen charakterisiert sind.

Pathophysiologisch findet man in MDS periphere Zytopenien mit einem normo- bzw. hyperzellulären Knochenmark. Bei den Zytopenien können eine oder mehrere Linien des Knochenmarks betroffen sein. Zusätzlich ergibt die Untersuchung des Knochenmarks häufig Dysplasien in den differenzierten Zellen oder deren Vorläuferzellen. Man unterscheidet bei MDS zwischen verschiedenen morphologischen Untergruppen. Zudem wurden verschiedene Klassifikationen eingeführt, die die Syndrome in verschiedene Kategorien einteilt. Grundlage der Unterscheidung sind hierbei morphologische Veränderungen, Linienzugehörigkeiten der Dysplasien oder auch gefundene Karyotypveränderungen (137-140). Es wird angenommen, dass die MDS Erkrankungen auf eine gestörte Differenzierung von Vorläuferzellen im Knochenmark zurückzuführen sind. D.h. die Differenzierung erscheint bei MDS erst normal abzulaufen, doch die terminale Differenzierung der Zellen ist durch Störungen wichtiger Signalwege der Differenzierung, Proliferation sowie Angiogenese beeinträchtigt. Die nicht vollständig differenzierten Zellen gehen in Apoptose und die Folge ist eine Anämie bzw. Bi- oder Panzytopenie (112) (Abb. 6). Zytogenetische Veränderungen findet man in etwa in 50% der MDS Fälle, und in ca. 80% der Patienten mit einer sekundären MDS-Erkrankung. Die häufigsten Veränderungen sind teilweise oder komplette Deletionen der Chromosomen 5 oder 7 (141). Zytogenetische Veränderungen spielen auch eine wichtige Rolle für die Prognose der verschiedenen Syndrome. Hierbei hat sich klinisch das IPSS (International Prognostic Scoring System) durchgesetzt (142). Über genetische und epigenetische Ursachen der Entstehung der myelodysplastischen Syndrome ist wenig bekannt, aber es wurden dennoch verschiedene Theorien über die Entstehung von MDS postuliert (143-146). Die bisher gefundene Inzidenz der myelodysplastischen Syndrome ist altersabhängig. Sie liegt durchschnittlich bei 2-12 Neuerkrankungen pro 100.000 Menschen, steigt aber auf 50 Fälle bei den über 70-jährigen (147). Die tatsächliche Inzidenz könnte noch deutlich höher liegen, da MDS häufig nur schwer von akuten myeloiden Leukämien



**Abbildung 6.** Normale Hämatopoese und die Veränderungen in myelodysplastischen Syndromen. MDS ist charakterisiert durch periphere Zytopenien mit einem normo- bzw. hyperzellulären Knochenmark, ausgelöst durch Veränderungen in den blutbildenden, pluripotenten Knochenmarkszellen. Die Untersuchung des Knochenmarks ergibt außerdem häufig Dysplasien in den differenzierten Zellen oder deren Vorläuferzellen.

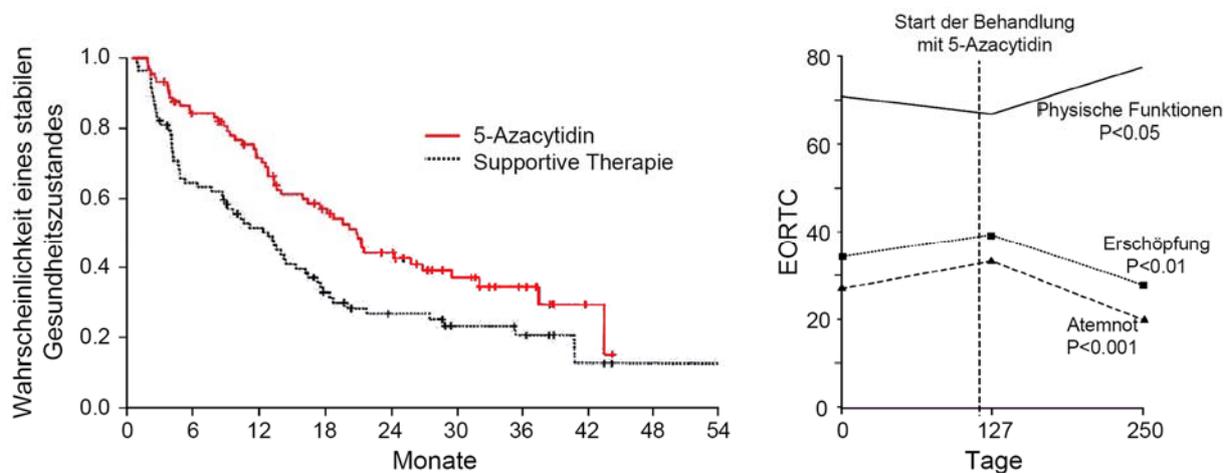
(AML) zu unterscheiden sind. Generell entwickeln 35% bis 40% der MDS-Patienten im späteren Krankheitsverlauf eine AML. Generell kann MDS als eine altersbezogene Krankheit angesehen werden, da das Durchschnittsalter der erkrankten Personen bei über 70 Jahren liegt. Somit ist zu erwarten, dass aufgrund des demographischen Wandels diese Erkrankungen in der Zukunft an Bedeutung zunehmen werden. Eine MDS-Erkrankung kann de novo entstehen oder auch aus einer vorherigen Chemo- oder Strahlentherapie (sekundäre MDS; sMDS) resultieren. Es gibt Hinweise darauf, dass Rauchen, immunsuppressive Therapien und der Kontakt mit Lösungsmitteln weitere Risikofaktoren für eine MDS-Erkrankung sein könnten (112).

### 1.5.2 Klinische Erfahrungen aus der Behandlung von MDS mit Azanukleosiden

Häufig steht bei der Therapie von MDS die Erhaltung bzw. Verbesserung der Lebensqualität im Vordergrund. Grundlage der Therapien ist dabei die unterstützende Therapie, die Bluttransfusionen und die Gabe von Antibiotika beinhaltet. Durch die unterstützende Therapie werden vor allem die Symptome der Erkrankung gemildert, die sich aufgrund der jeweiligen Zytopenien u.a. in Erschöpfungszuständen, Leistungsminderung, Hämorrhagien, Fieber und rezidivierenden Infektionen äußern kann. Aufgrund des durchschnittlich hohen Alters der Patienten ist eine Chemotherapie, wegen der daraus resultierenden Toxizitäten und hohen Mortalität nicht anwendbar. Das einzige kurative Therapiekonzept stellt die allogene Stammzelltransplantation dar (148). Aber auch hierbei besteht bei den älteren Patienten eine sehr hohe behandlungsbezogenen Mortalität. Außerdem limitiert die Verfügbarkeit von adäquaten Spendern die Anwendung dieser Behandlungsmethode. Die Behandlung mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, Differenzierungsinduktoren, immunmodulatorischen Substanzen oder TNF- $\alpha$  Inhibitoren führte in bestimmten MDS-Patientengruppen teilweise zu vorübergehenden Besserungen des Gesundheitszustandes (149-151). Für die Evaluierung verschiedener Therapieformen und deren Weiterentwicklung war es von entscheidender Wichtigkeit Kriterien einzuführen, die eine Aussage über den Therapieerfolg zulassen. Hierbei haben sich die IWG-Kriterien (International Working Group) durchgesetzt (152).

In vielen grundlegenden Phase I/II Studien konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von MDS-Patienten mit 5-Azacytidin oder Decitabin zu vielversprechenden Verbesserungen in der Therapie dieser Erkrankungen führte (115, 119, 153-158). Die ersten Studien beschäftigten sich hierbei vor allem mit der Optimierung der Dosierungsstrategien und Darreichungsformen dieser Substanzen (155, 157, 159, 160). Gerade bei den anfänglich hohen Dosen limitierten starke toxische Nebenwirkungen deren Einsatz im Patienten. Letztlich wurden für 5-Azacytidin und Decitabin randomisierte Phase III Studien durchgeführt,

die in der Zulassung beider Substanzen für die Behandlung von MDS resultierten (1, 159, 161). Für 5-Azacytidin konnte in dieser Phase III Studie ein generelles Ansprechen (nach IWG-Kriterien) auf die Therapie in 63% der Patienten beobachtet werden, wobei in der Patientengruppe die mit einer unterstützenden Therapie behandelt wurde nur 7% der Patienten eine Verbesserung zeigten. Die Behandlung war dabei mit einer nur sehr geringen behandlungsabhängigen Mortalität von <1% verbunden. Patienten, die mit 5-Azacytidin behandelt wurden entwickelten durchschnittlich nach 22 Monaten eine AML oder starben. Bei der unterstützenden Therapie trat eines dieser Ereignisse hingegen bereits nach durchschnittlich 12 Monaten ein (Abb. 7A). Außerdem war die Wahrscheinlichkeit eine AML zu entwickeln durchschnittlich 2.8-fach erhöht. Ein weiterer wichtiger Vorteil der Behandlung mit 5-Azacytidin ist die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Die Symptome der Erkrankung und die Zeit der Klinikaufenthalte konnten durch die Behandlung mit 5-Azacytidin deutlich verringert werden ((2); Abb. 7B). Eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität ist hierbei, dass viele der Patienten nach der Behandlung mit 5-Azacytidin in der Lage sind auf sonst nötige Bluttransfusionen zu verzichten. Ähnlich positive Ergebnisse wurden auch zur Behandlung mit Decitabin gewonnen, bei der sogar in 80% der Patienten ein Ansprechen auf die Therapie beobachtet wurde (159).



**Abbildung 7.** Ergebnisse einer randomisierten Phase III Studie zur Behandlung von MDS-Patienten mit 5-Azacytidin im Vergleich zur unterstützenden Therapie. **(A)** Kaplan-Meier Diagramm der durchschnittlichen Wahrscheinlichkeit der Patienten, ohne Verschlechterung im Krankheitsverlauf zu bleiben. Als Verschlechterung wird hier die Transformation zu einer akuten myeloiden Leukämie (AML) oder der Todesfall berücksichtigt. **(B)** Evaluierung der Auswirkungen der Behandlung auf die Lebensqualität der Patienten. Auswirkungen auf die physischen Funktionen, Erschöpfung und Atemnot wurden durch Fragebögen ausgewertet. 30 MDS-Patienten wurden befragt, die von einer unterstützenden Therapie zu dem Behandlungsarm mit 5-Azacytidin gewechselt sind. Physische Funktionen: Hohe Werte repräsentieren eine Verbesserung der Funktionen; Erschöpfung und Atemnot: Niedrige Werte geben eine Verbesserung in den Symptomen wieder. Abbildung wurde modifiziert übernommen von (1, 2)

### 1.5.3 Methylierungsänderungen in MDS-Patienten nach der Behandlung mit Azanukleosiden

Die Demethylierung und Reaktivierung epigenetisch stillgelegter Gene nach Behandlung mit Azanukleosiden konnte in verschiedenen in vitro Systemen gezeigt werden (162-165). Da in den früheren Studien vor allem das klinische Ansprechen auf die Therapie von Interesse war, sind die Untersuchungen zu den epigenetischen Effekten in behandelten Leukämiepatienten erst in neueren Untersuchungen in den Fokus der Forschung gerückt. Es konnte für Decitabin eine genomweite demethylierende Aktivität in einem Teil der untersuchten MDS-Patienten u.a. von 4% auf 2% beobachtet werden (166). Ein entsprechender direkter, biochemischer Nachweis für die genomweite demethylierende Wirkung von 5-Azacytidin in MDS-Patienten konnte hingegen noch nicht erbracht werden. Es wurde lediglich eine leichte Demethylierung der genomischen LINE-1 Sequenzen von 63% auf 58% in 5-Azacytidin behandelten MDS-Patienten gezeigt (167). Bisherige Untersuchungen zur genspezifischen Demethylierung in Leukämiepatienten beschränkten sich auf die epigenetischen Veränderungen an wenigen Genen (168, 169). Epigenetische Biomarker, an denen der Erfolg der epigenetischen Behandlung im Patienten nachvollzogen werden kann, sind bislang noch nicht etabliert.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung von DNA-Methyltransferase Inhibitoren in der Tumorthherapie charakterisiert werden. Es wurden die Unterschiede zwischen den schon in der Krebstherapie verwendeten Substanzen 5-Azacytidin und Decitabin zu anderen DNMT Inhibitoren im Zellkultursystem getestet. Es sollten hierbei die wachstumshemmenden und DNA demethylierenden Eigenschaften der verschiedenen Substanzen charakterisiert und verglichen werden. Im Rahmen der präklinischen Charakterisierung von Azanukleosid-Inhibitoren wurde der Transmembrantransport von 5-Azacytidin untersucht. In zwei Zellmodellen für den Transport von Nukleosiden sollte erstmalig der Frage nachgegangen werden, ob eine verstärkte Aufnahme von DNMT-Inhibitoren einen modulierenden Einfluss auf die Wirkung dieser Substanzen hat. Ein wichtiger Versuchteil dieser Arbeit war schließlich die Analyse von klinischen DNA-Proben aus MDS-Patienten. Diese Patienten wurden nach Standardprotokoll mit 5-Azacytidin behandelt und mit Hilfe von verschiedenen Methylierungsanalysen sollten die genomweiten und genspezifischen Veränderungen in den jeweiligen Methylierungsmustern charakterisiert werden. In ergänzenden Experimenten in leukämischen Krebszelllinien sollten dabei schließlich zusätzliche Hinweise auf die Wirkungsweise von DNMT-Inhibitoren in Leukämien gesammelt werden. Dabei sollte vor allem der Zusammenhang zwischen zytotoxischen und DNA demethylierenden Effekten genauer untersucht werden.

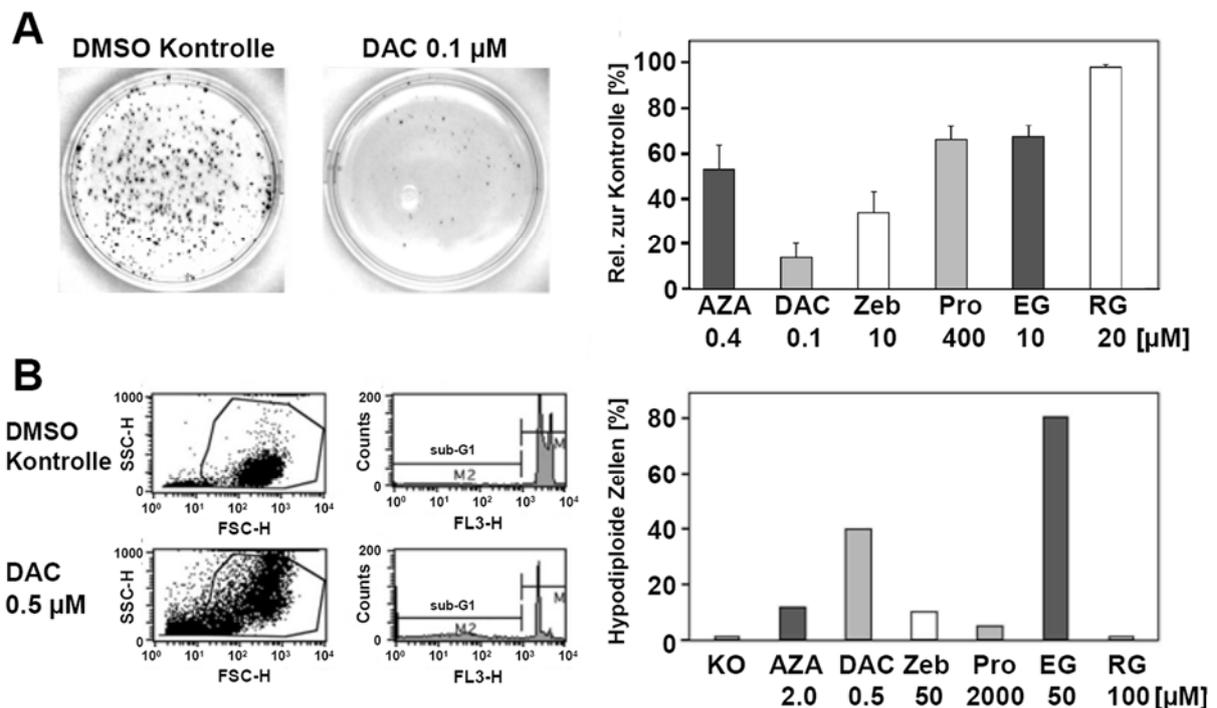
## 2 Ergebnisse

### 2.1 Untersuchung der Wirkungsweisen von Azanukleosid-basierten DNMT-Inhibitoren in humanen Krebszelllinien

#### 2.1.1 Charakterisierung der wachstumsinhibierenden Effekte von DNA-Methyltransferase Inhibitoren

Die biologische Aktivität von Azanukleosiden in Zellen wird von verschiedenen Parametern bestimmt, wobei die demethylierende Wirkung nur einer von diesen ist. Azanukleoside unterscheiden sich strukturell und mechanistisch von anderen bekannten DNA-Methyltransferase Inhibitoren wie Procain/Procainamid, EGCG und RG108. Im Gegensatz zu diesen DNMT-Inhibitoren, die nach Aufnahme in die Zelle über eine direkte Inhibition des katalytischen Zentrums der Methyltransferase wirken, müssen Azanukleoside in die DNA eingebaut werden, um ihre inhibitorische Aktivität entfalten zu können. Die wachstumsinhibierende Wirkung von DNA-Methyltransferase Inhibitoren kann auf eine verlangsamte Zellteilung oder erhöhte Zytotoxizität zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit wurde in verschiedenen zellulären Versuchsmodellen getestet, wie Azanukleoside das Wachstum von Krebszellen beeinflussen. Es wurden auch andere Methyltransferase-Inhibitoren in die Tests integriert, um die verschiedenen Wirkungen der einzelnen Inhibitoren vergleichen zu können (165). Um die Effekte auf das Wachstum zu charakterisieren wurde zunächst ein Weichagar-Koloniebildungstest durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Standardtest, mit dem man Substanzen untersuchen kann, die das dreidimensionale Wachstum in Weichagar inhibieren können. Autonomes Wachstum ist eine Eigenschaft vieler Krebszellen und der Weichagar-Koloniebildungstest ist somit ein Versuchsmodell, um krebshemmende Substanzen identifizieren zu können. Es wurde der Einfluss der Inhibitoren auf das verankerungsunabhängige Wachstum der HCT116 Kolonkarzinomzellen untersucht (Abb. 8A). Hierzu wurden gleiche Zellmengen im Weichagar ausgesät und mit den jeweiligen IC<sub>20</sub>-Konzentrationen der verschiedenen Inhibitoren behandelt. Die Anzahl der gebildeten Kolonien wurde nach vier Wochen ausgezählt und ausgewertet.

Der Koloniebildungstest ergab eine starke Reduktion der Kolonienzahl für die Nukleosidanaloga Decitabin (-86%), 5-Azacytidin (-46%) und Zebularin (-65%). Die beiden Substanzen EGCG und Procain zeigten eine schwächere Reduktion der Kolonienzahl (jeweils -33%) und RG108 zeigte keinen signifikanten Einfluss. Neben der Reduktion der Kolonienanzahl wurde auch die Größe der Kolonien, vor allem nach Behandlung mit den Nukleosidanaloga und Procain, reduziert.

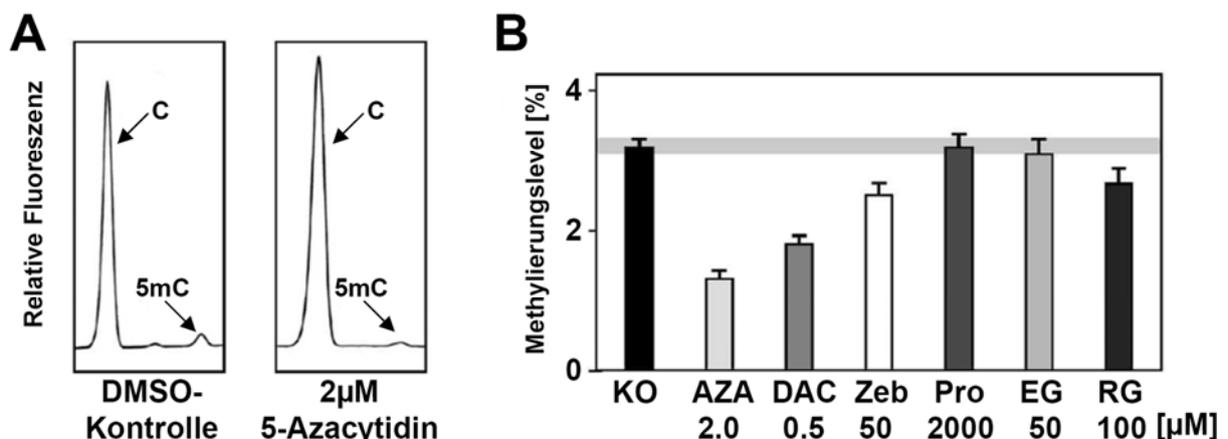


**Abbildung 8.** Charakterisierung von induzierten wachstumshemmenden Effekten nach Behandlung mit verschiedenen DNMT-Inhibitoren. **(A)** Weichagar-Koloniebildungstest. HCT116 Zellen wurden in Agar mit Inhibitor ausgesät und die gebildeten Kolonien wurden ausgezählt. Balkendiagramm Kolonienzahl relativ bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Es wurden jeweils drei Platten je Behandlung ausgesät. **(B)** Zytometrischer Nachweis von Zellen mit hypodiploiden DNA-Gehalt. Balkendiagramm Durchschnittliches Auftreten hypodiploider Zellen aus zwei unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: KO, DMSO Kontrolle; AZA, 5-Azacytidin; DAC, Decitabin; Zeb, Zebularin; Pro, Procain; EG, (-)-Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG); RG, RG108.

In einem weiteren Versuchsmodell wurde nun die wachstumshemmende Wirkung der Substanzen in TK6-Lymphoblastoid-Zellen detaillierter untersucht. Dabei wurden fünffach höhere Konzentrationen als die IC<sub>20</sub>-Konzentrationen eingesetzt und die Zellen wurden jeweils für drei Tage behandelt, da so die deutlichsten Unterschiede detektiert werden konnten. Es wurde der Anteil der Zellen bestimmt, die nach Behandlung einen hypodiploiden DNA-Gehalt aufwiesen. In dieser Untersuchung konnten Zellen detektiert werden, die sich in einer späten Phase der Apoptose befinden, da hier indirekt die Fragmentierung der DNA im Zellkern nachgewiesen werden kann. Es zeigte sich, dass die mit Decitabin oder EGCG behandelten Zellen einen großen Anteil (40-80%) an Zellen mit hypodiploiden DNA-Gehalt aufwiesen, wobei mit 5-Azacytidin, Zebularin und Procain behandelte Zellen nur zu einem geringen Anteil (1-10%) hypodiploid waren (Abb. 8B). RG108 zeigte hier keine Anzeichen für die, durch Apoptose induzierte, Fragmentierung der DNA. Von allen analysierten Substanzen zeigten die Nukleosid-basierten Inhibitoren Decitabin, Azacytidin und Zebularin die signifikantesten wachstumshemmenden Effekte in Krebszellen. Als eine Ursache der Hemmung des Wachstums konnte die Induktion von Apoptosen nachgewiesen werden.

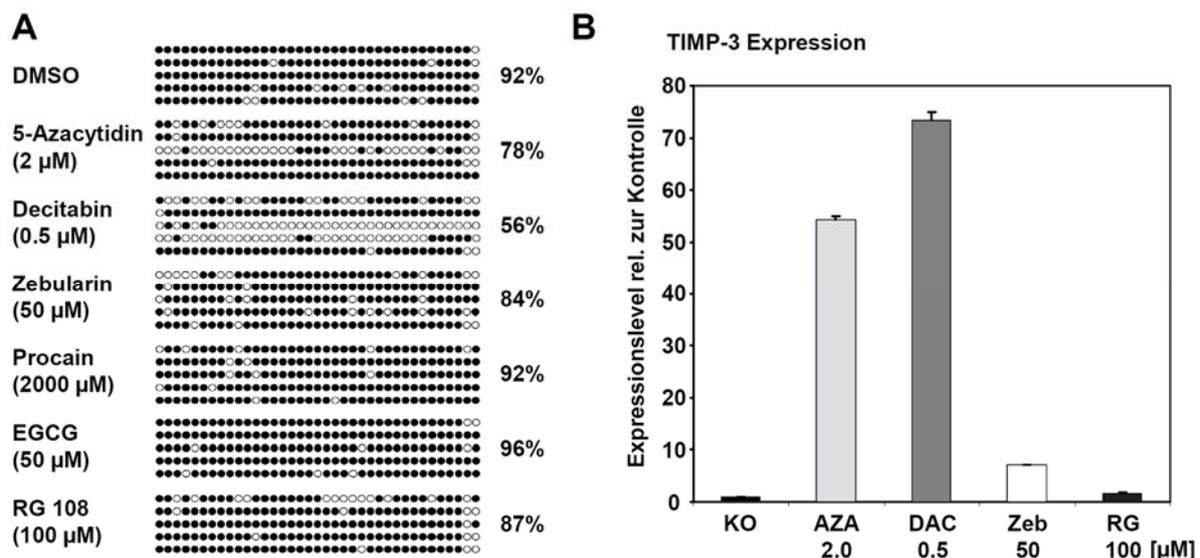
### 2.1.2 Untersuchung der Methylierungsänderungen nach Behandlung mit Azanukleosiden im Vergleich mit anderen DNA-Methyltransferase Inhibitoren

Es wird angenommen, dass die wachstumsinhibierende Wirkung der DNMT-Inhibitoren auf Krebszellen insbesondere auch eine Folge der Demethylierung und damit möglichen Reaktivierung von epigenetisch stillgelegten Tumorsuppressoren ist (170). Tumorzellen könnten also ihre während des Transformationsprozesses erworbenen epigenetischen Veränderungen verlieren und durch diese „Umprogrammierung“ zu einer durch Wachstumskontrollmechanismen gesteuerten Zellteilung zurückfinden, oder apoptotisch werden. Um die Methylierungs-inhibitorische Wirkung der Substanzen zu untersuchen, wurde der globale Methylierungslevel (Anteil der methylierten Cytosine in Relation zur Gesamtmenge an Cytosinen in der untersuchten genomischen DNA) in den TK6-Zellen nach Behandlung mit den Konzentrationen getestet, die auch in den Experimenten zur Wachstumsinhibition die deutlichsten Effekte zeigten. Es wurde die genomweite DNA-Methylierung mit Hilfe der elektrokinetischen micellaren Kapillarelektrophorese bestimmt (Abb. 9A). Hierbei ergab die Behandlungen der Zellen mit 5-Azacytidin und Decitabin die stärkste Reduktion der globalen Methylierung: 60% bzw. 40% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abb. 9B). Auch Zebularin und RG108 konnten jeweils die Methylierung um 20% verringern, wobei nach der Behandlung mit Procain oder EGCG kein demethylierender Effekt zu beobachten war. Eine wichtige weitere Fragestellung war nun, ob die Substanzen, die unter diesen Bedingungen zu einer globalen Demethylierung führten, auch Tumorsuppressorgene demethylieren und diese dadurch reaktivieren können. Zu diesem Zweck wurde der Methylierungszustand des Gens *TIMP-3* (Tissue inhibitor of



**Abbildung 9.** Inhibition der Methyltransferase-Aktivität durch verschiedene Substanzen. **(A)** Repräsentative Elektropherogramme von TK-6 Zellen behandelt mit DMSO (*links*) und mit 2 µM 5-Azacytidin (*rechts*). **(B)** Wirkung der Substanzen auf die globale Methylierung von TK-6-Zellen. Abkürzungen: C, Cytidin; 5mC, 5-Methylcytosin; KO, DMSO Kontrolle; AZA, 5-Azacytidin; DAC, Decitabin; Zeb, Zebularin; Pro, Procain; EG, (-)-Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG); RG, RG108

metalloproteinases 3) in behandelten HCT116-Zellen mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung bestimmt. Die Sequenzierung von jeweils fünf unabhängigen Klonen ergab eine nahezu vollständige Methylierung (92%) der CpG-Dinukleotide des *TIMP-3* Promotors in unbehandelten HCT116-Zellen (Abb. 10A). Die Behandlung mit 5-Azacytidin und Decitabin führte zu einer Reduktion der Methylierung auf 78% bzw. 56%. Alle anderen Substanzen zeigten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Ob die Veränderungen in den Methylierungsmustern im Promotorbereich von *TIMP-3* auch zur einer Expressionsinduktion von *TIMP-3* in den HCT116-Zellen führte, wurde mittels Real-Time-PCR überprüft. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, wurde eine stark erhöhte Expression, nach Normierung auf das Haushaltsgen *Lamin b* bei der Behandlung mit 5-Azacytidin und Decitabin detektiert (Abb. 10B). Demnach ist in den untersuchten Zellen die Demethylierung des *TIMP-3*-Promotors mit einer stark erhöhten Expression des Gens verbunden. Nach Behandlung mit Zebularin und RG108 konnten hingegen nur geringe Änderungen in der Expression nachgewiesen werden. Dies passt zur Beobachtung, dass keine signifikante Demethylierung des Promotors in den mit RG108 behandelten Zellen detektiert werden konnte. Für die Behandlung mit Procain oder EGCG konnte in einem früheren Versuch ebenfalls keine Expressionsinduktion von *TIMP-3* nachgewiesen werden (165). Diese Experimente zeigen, dass die Azanukleosid-basierten DNMT-Inhibitoren 5-Azacytidin und Decitabin unter diesen Bedingungen die einzigen Substanzen waren, die



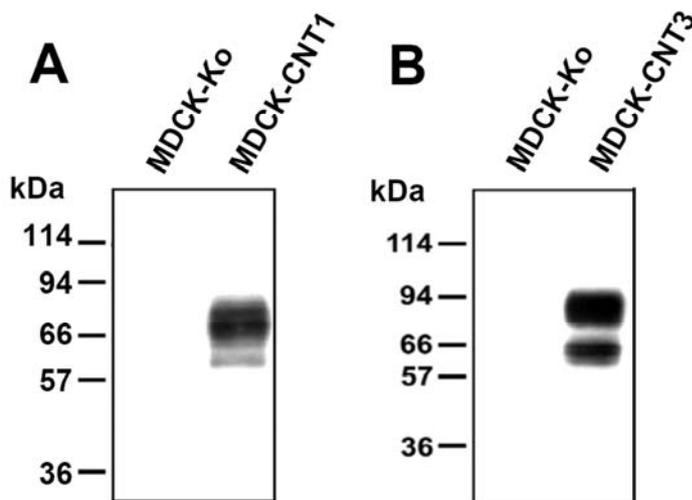
**Abbildung 10.** Methylierungsänderungen am Promotor des *TIMP-3* Tumorsuppressorgens und Änderungen der mRNA-Expression. **(A)** Bisulfit-Sequenzierung des *TIMP-3* Promotors. Offene Kreise, unmethyliertes CpG-Dinukleotid; Schwarze Kreise, methyliertes CpG-Dinukleotid. Die angegebenen Prozentzahlen geben den Anteil an methylierten CpG-Dinukleotiden, an der Gesamtzahl der CpG-Dinukleotide von jeweils fünf sequenzierten Allelen wieder. **(B)** Real-Time-PCR Analyse der mRNA-Expression von *TIMP-3*. Expression wurde normiert auf die Expression des Haushaltsgens *Lamin b*. Expressionslevel werden relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Abkürzungen: KO, DMSO Kontrolle; AZA, 5-Azacytidin; DAC, Decitabin; Zeb, Zebularin; RG, RG108

zu einer ausreichenden Reduktion der Methylierung führten, so dass das epigenetisch stillgelegte Tumorsuppressorgen *TIMP-3* reaktiviert werden konnte. Alle anderen Inhibitoren konnten die genspezifische Methylierung von *TIMP-3* nicht signifikant reduzieren. Der in diesen Experimenten für 5-Azacytidin und Decitabin verwendete Konzentrationsbereich konnte bereits in Untersuchungen im Plasma behandelter Patienten erreicht werden (171, 172). Dies verdeutlicht, dass Azanukleoside die einzigen bisher verfügbaren Inhibitoren sind, die im Patienten eine potentiell für die DNA-Methylierung inhibitorische Konzentration erreichen können.

## 2.2 Untersuchung der zellulären Aufnahme Azanukleosid-basierter DNMT-Inhibitoren als modulierender Faktor für die inhibitorische Aktivität

### 2.2.1 Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung der Aufnahme von Azanukleosiden

Um den Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Azanukleosiden und der Demethylierung zu gewinnen, wurden im Rahmen eines Kooperationsprojekts von Frau Dr. Maria Rius (DKFZ) zwei Transport-Modellsysteme etabliert (173). Die gezielte konzentrierte Aufnahme von Nukleosiden in das Zielgewebe könnte bezogen auf die klinische Anwendung von Azanukleosiden von entscheidender Bedeutung sein, da diese Substanzen im Plasma der Patienten nur eine relativ kurze Halbwertszeit haben (131). Die Membrantransporter der CNT-Familie (konzentrierte Aufnahme von Nukleosiden) waren hierbei von besonderem Interesse und wurden als erste Kandidaten für den Transport von Azanukleosiden ausgewählt. Es wurden drei stabil-transfizierte MDCK (Madin-Darby canine kidney)-Zelllinien etabliert, die die cDNA des humanen CNT1 (MDCK-CNT1) bzw. hCNT3 (MDCK-CNT3) Transporters oder den leeren Transfektionsvektor (MDCK-Ko) enthielten (Abb. 11). MDCK Zellen, die humane Transporter exprimieren, sind ein wohl etabliertes und viel genutztes Zellsystem, da hier die funktionelle Charakterisierung unabhängig von der gewebsspezifischen Expression der Transporter durchgeführt werden kann. Die Expression der jeweiligen Transporter wurde mit Hilfe der Immunoblotting-Methode und polyklonalen Antikörpern gegen hCNT1 (AEI-Antikörper) und hCNT3 (NTS-Antikörper) nachgewiesen. Beide Transporter zeigten jeweils zwei charakteristische Banden (Abb 11A+B), was vermutlich auf Protein-Glykosylierung zurückzuführen ist.



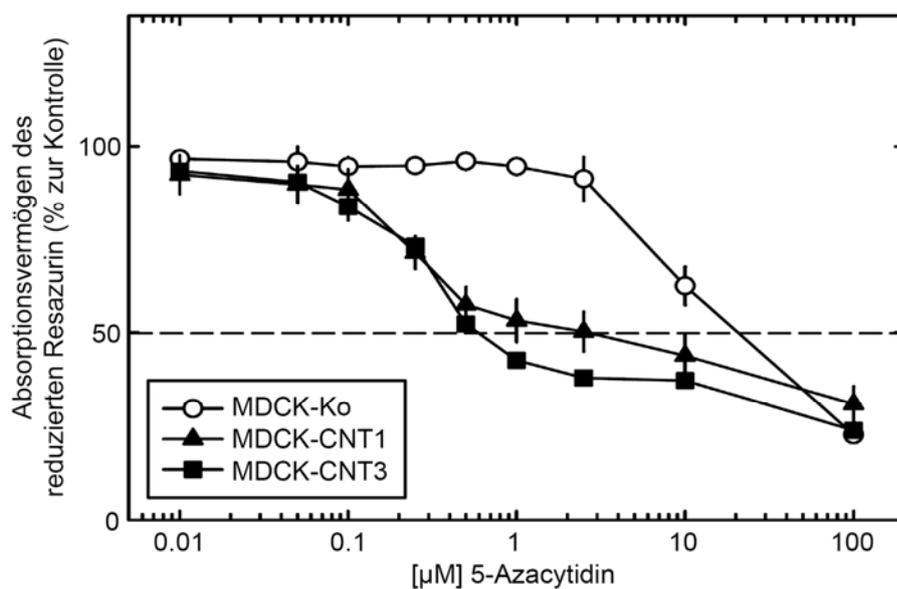
**Abbildung 11.** Expression von hCNT-1 und hCNT3 in MDCK Zellen. (A+B) Nachweis von hCNT-1 in Protein-Lysaten präpariert von MDCK-Zellen, stabil-transfiziert mit dem Kontrollvektor (MDCK-Ko) oder mit der *hCNT1* bzw. *hCNT3* cDNA (MDCK-CNT1 bzw. MDCK-CNT3).

### 2.2.2 Charakterisierung der hCNT1 und hCNT3-vermittelten zellulären Aufnahme von 5-Azacytidin

Um weiter untersuchen zu können, ob hCNT1 oder hCNT3 die gerichtete Aufnahme von 5-Azacytidin über die Plasmamembran vermitteln können, wurde  $^{14}\text{C}$ -markiertes 5-Azacytidin als Tracer benutzt. Die Versuche ergaben, dass beide Transporter [ $^{14}\text{C}$ ]5-Azacytidin unidirektional, Zeit- und  $\text{Na}^+$ -abhängig transportierten (173). Somit konnten hCNT1 und hCNT3 als die ersten Transporter identifiziert werden, die spezifisch die zelluläre Aufnahme von 5-Azacytidin vermitteln können.

### 2.2.3 Untersuchung der wachstumsinhibierenden Wirkung von 5-Azacytidin auf hCNT1- bzw. hCNT3-transfizierte MDCK-Zellen

In einem Zellvitalitätsversuch wurde untersucht, ob die erleichterte Aufnahme von 5-Azacytidin in den mit hCNT1- bzw. hCNT3-transfizierten Zellen zu einer Veränderung der wachstumsinhibierenden Wirkung führt. Hierzu wurden jeweils zehntausend Zellen für vierundzwanzig Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an 5-Azacytidin behandelt und anschließend die Vitalität mit Hilfe eines Resazurin-Tests bestimmt. Die Vitalität der behandelten Zellen wird über die Aktivität der zellulären Dehydrogenasen bestimmt. Es konnten jeweils  $\text{IC}_{50}$ -Konzentrationen für die Behandlung der Zellen für 24 Stunden bestimmt werden. Die  $\text{IC}_{50}$ -Konzentration ist hierbei die Konzentration, bei der eine um 50% verminderte Vitalität der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erreicht wurde. Bei den MDCK-Kontrollzellen lag der  $\text{IC}_{50}$ -Wert mit  $\sim 20 \mu\text{M}$  deutlich höher als bei den hCNT3-transfizierten Zellen ( $\sim 0.55 \mu\text{M}$ ) (Abb. 12). Dies bedeutet, dass die hCNT3-exprimierenden Zellen eine sechsdreißigfach erhöhte Sensitivität gegenüber 5-Azacytidin zeigten. Auch



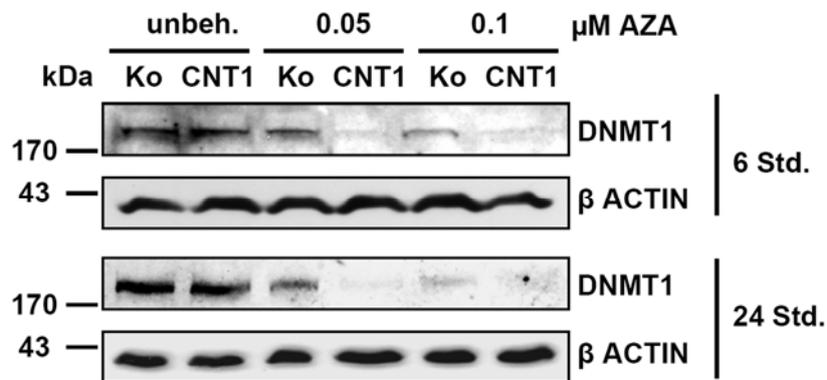
**Abbildung 12.** Expression von hCNT1 bzw. hCNT3 erhöht die Sensitivität gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung von 5-Azacytidin. Jeweils 10000 Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Konzentrationen an 5-Azacytidin behandelt. Vitalität wurde mit Hilfe eines Resazurin-Tests bestimmt. Die Datenpunkte zeigen die Vitalität relativ zu der unbehandelten Kontrolle (n=8). *Gestrichelte Linie:* IC<sub>50</sub>-Konzentrationen.

bei den MDCK-CNT1 Zellen war der IC<sub>50</sub> Wert mit 2,5 µM signifikant geringer. Diese Versuche demonstrieren, dass eine erleichterte Aufnahme von 5-Azacytidin durch die Expression von hCNT1 bzw. hCNT3 zu einer erhöhten relativen Sensitivität der Zellen gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung dieser Substanz führt.

#### 2.2.4 Analyse des Einflusses der hCNT-vermittelten Aufnahme von Azanukleosiden auf die Inaktivierung der DNA-Methyltransferase 1 und die genomweite Methylierung der DNA

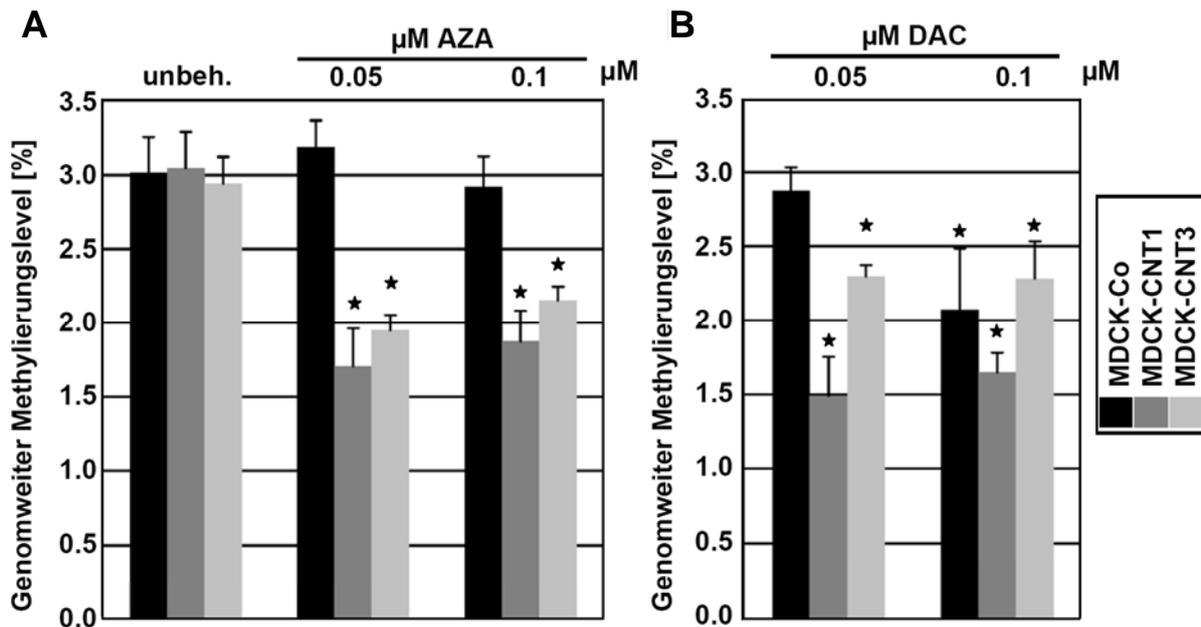
Der Einbau von Azanukleosiden in die DNA führt zu kovalenten Bindungen zwischen den DNA-Methyltransferasen und der DNA, was in der Degradation der gebundenen Enzyme resultiert. Durch den Nachweis von DNMT1 in den Proteinlysaten von behandelten MDCK-CNT1-Zellen und den MDCK-Kontrollzellen sollte untersucht werden, ob die hCNT1-vermittelte Aufnahme von 5-Azacytidin auch zu einer Veränderung der nachweisbaren DNMT1 Proteinmenge in den Lysaten führt. Es besteht ein hoher Grad an Konservierung der DNMT1 Proteine zwischen den einzelnen Säugtierspezies. Es konnte daher auch das hundespezifische DNMT1 in dieser Zelllinie mit dem gegen das menschliche DNMT1 gerichteten polyklonalen Antikörper nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an 5-Azacytidin (50 nM und 100 nM) und für 6 Stunden bzw. 24 Stunden behandelt. Die Behandlung der MDCK-CNT1-Zellen mit 50 nM 5-Azacytidin zeigte in den Lysaten kein detektierbares DNMT1 mehr, wohingegen in den Lysaten der behandelten Kontrollzellen DNMT1 deutlich nachweisbar war (Abb. 13). Auch bei einer Konzentration von 100 nM, war in den Kontrollzellen bei beiden Behandlungszeiten DNMT1

detektierbar, nicht aber in den MDCK-CNT1 Zellen. Das zeigte, dass die CNT-vermittelte erleichterte Aufnahme von Azacytidin zu einer effizienteren Degradation von DNMT1 führt.



**Abbildung 13.** Nachweis von DNMT1-Protein in Lysaten behandelter MDCK-Zellen mit Hilfe von Western-Blots. MDCK-CNT1-Zellen und MDCK-Kontrollzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen mit 5-Azacytidin für 6 Stunden oder 24 Stunden behandelt.  $\beta$ -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

In weiteren Versuchen sollte nun analysiert werden, ob die beobachtete unterschiedliche Effizienz in der Degradation von DNMT1 zu einer nachweisbaren Veränderung in der genomweiten Methylierung der DNA führte. Hierzu wurden die MDCK-CNT1 bzw. MDCK-CNT3-Zellen, sowie die MDCK-Kontrollzellen für 24 Stunden mit 5-Azacytidin behandelt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil an methylierten Cytosinen in der genomischen DNA der Zellen mit Hilfe der elektrokinetischen micellaren Kapillarelektrophorese bestimmt. Der genomweite Cytosin-Methylierungslevel wurden in den MDCK-CNT1 und in den MDCK-CNT3-Zellen durch eine Behandlung mit 50 nM Azacytidin signifikant reduziert (von ~3% auf 1.7% für die MDCK-CNT1 bzw. 1.9% für die MDCK-CNT3-Zellen;  $P < 0.01$ ), wobei die MDCK-Kontrollzellen mit 3.2% in ihrer Methylierung sich nicht signifikant von den unbehandelten MDCK-Zellen unterschieden (Abb. 14A). Vergleichbare Resultate wurden auch mit einer höheren Konzentration von 100 nM 5-Azacytidin erzielt. Somit unterstreicht das Ergebnis der genomweiten Methylierungsanalyse auch die Beobachtungen der DNMT1-Proteinmenge und bestätigt somit einen direkten Zusammenhang zwischen der Degradation von DNMT1 und den beobachteten Methylierungsänderungen (Abb. 13, 14A). Um zu klären, ob die bisherigen Beobachtungen zu 5-Azacytidin auch für Decitabin gelten, wurden in parallelen Experimenten auch die DNA-Methylierung nach Behandlung mit Decitabin untersucht. Auch hier konnte eine Demethylierung (auf 1.5% bzw. 2.3%;  $P < 0.01$ ) bei Behandlung mit 50 nM Decitabin in beiden Transportmodellen nachgewiesen werden (Abb. 14B). Der Methylierungslevel in den MDCK-Kontrollzellen (2.9%) unterschied sich bei dieser Konzentration nicht signifikant zu den unbehandelten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass auch Decitabin ein Substrat für die CNT-vermittelte Aufnahme von Nukleosiden darstellt. Darüber hinaus konnte in diesen Versuchen ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Azanukleosiden und der



**Abbildung 14.** Bestimmung der genomweiten Methylierungslevel in den MDCK-Zelllinien. (A) Zellen wurden mit angegebenen Konzentrationen an 5-Azacytidin für 24 Stunden behandelt. Globaler Methylierungslevel wurde aus der rel. Menge an 5-Methylcytosin zur Gesamtmenge an Cytosin mit Hilfe der elektrokinetischen micellaren Kapillarelektrophorese bestimmt. (B) Bestimmung der Methylierungslevel nach Behandlung der Zelllinien mit Decitabin.

pharmakologischen Aktivität dieser Substanzen hergestellt werden. Eine erhöhte aktive Aufnahme von 5-Azacytidin und Decitabin in den CNT-transfizierten MDCK-Zellen führte, zum einen zu zytotoxischen Effekten, und zum anderen zu einer Inaktivierung von DNMT1 und einer daraus folgenden Demethylierung der genomischen DNA.

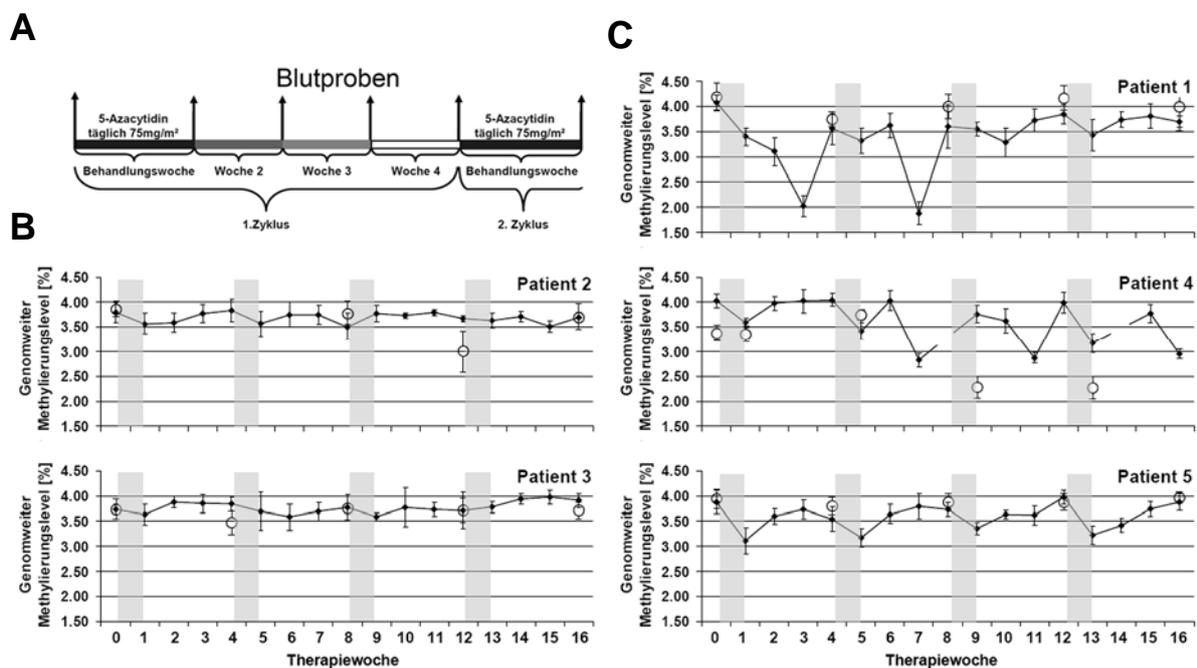
### 2.3 Charakterisierung der 5-Azacytidin induzierten Effekte in myelodysplastischen Syndromen

Die DNA-Methyltransferase Inhibitoren 5-Azacytidin (Vidaza) und 5-aza-2'-deoxycytidin (Decitabin) haben in der klinischen Behandlung von MDS-Patienten zu signifikanten Verbesserungen geführt (1, 161). Beide Substanzen erhielten demzufolge die Zulassung der FDA (Food and Drug Administration) und finden mittlerweile routinemäßige Verwendung in der Klinik. Die demethylierenden Effekte dieser Substanzen in einzelnen Patienten wurden bisher jedoch nur oberflächlich charakterisiert. Um den Anteil epigenetischer Effekte an den Verbesserungen des Gesundheitszustandes der Patienten bestimmen zu können, ist es aber grundsätzlich notwendig, die demethylierenden Effekte in den Patienten auf der molekularen Ebene zu charakterisieren. Detaillierte Untersuchungen in MDS-Patienten und leukämischen Zelllinien, sollten daher in den weiteren Versuchen neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise dieser Substanzen liefern.

### 2.3.1 Detaillierte Analyse der Veränderungen in der Gesamtmethylierung in Blut- und Knochenmarkszellen von MDS-Patienten

Um die demethylierenden Effekte von 5-Azacytidin im Blut und in Knochenmarkszellen von MDS-Patienten untersuchen zu können, wurden von 10 Patienten (siehe Kapitel 4.1.1) in jeder Therapiewoche, sowie in einer Woche vor Therapiestart, eine Blutprobe entnommen (Abb.15A). Nach bisheriger Erfahrung aus der Behandlung von MDS-Patienten wird empfohlen, dass mindestens vier komplette Zyklen für ein optimales Ansprechen auf die Therapie benötigt werden. Alle Patienten die in diese Methylierungsuntersuchung miteinbezogen wurden (Patient 1-6), haben daher jeweils vier komplette 5-Azacytidin-Behandlungszyklen durchlaufen. Sie zeigten während der Behandlung eine hämatologische Verbesserung des Blutbildes oder zumindest eine Stabilisierung des Gesundheitszustandes (siehe Kapitel 4.1.1).

In einer ersten Untersuchung wurden die genomweiten Anteile an methylierten Cytosinen aller Patientenblutproben über den gesamten Therapiezeitraum mit Hilfe der elektrokinetischen micellaren Elektrophorese bestimmt. Vor Therapiestart lagen die jeweiligen Anteile an 5-Methylcytosin in den Blutproben zwischen 3.7% und 4.0%



**Abbildung 15.** Bestimmung der genomweiten DNA-Methylierung von 5-Azacytidin behandelten MDS-Patienten. **(A)** Darstellung des Behandlungsschemas mit 5-Azacytidin sowie der Zeitpunkte der Entnahme von Blutproben. Vor dem Therapiestart („Woche 0“) und jeweils vor jeder Therapiewoche wurde zur weiteren Analyse eine Blutprobe entnommen. 5-Azacytidin wurde in den untersuchten Patienten mindestens für 4 komplette Zyklen verabreicht. **(B+C)** Analyse der genomweiten DNA-Methylierungslevel im Blut und im Knochenmark. **(B)** Im Patienten 2 und 3 veränderte sich der DNA-Methylierungslevel nicht signifikant. **(C)** Patienten 1, 4 und 5 zeigten signifikante ( $P < 0.01$ ), zyklische Demethylierungen im Blut nach Behandlung mit 5-Azacytidin. In den Knochenmarksproben des Patienten 4 konnte außerdem eine signifikante Abnahme der genomweiten Methylierung nach dem 3. und 4. Zyklus nachgewiesen werden. (◆) Blutprobe; (○) Knochenmarkspröbe; *Graue vertikale Balken:* Behandlungswochen

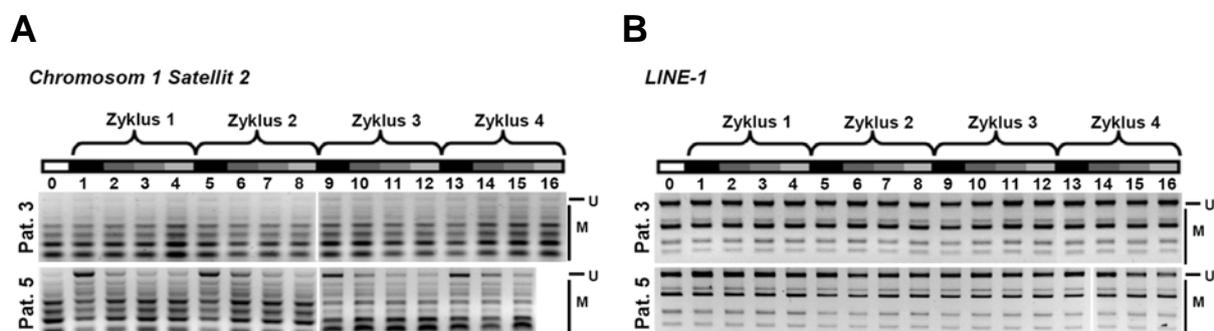
(MW=3.9%; m.F.=0.2%), bzw. zwischen 3.4% und 4.1% (MW=3.9%; m.F.=0.3%) in den Knochenmarkspalten. Sie unterschieden sich somit nur geringfügig voneinander in den individuellen Patienten. Dieses Ergebnis bestätigt Forschungsergebnisse zur DNA-Methylierung in Knochenmarkspalten von AML/MDS Patienten, in denen gezeigt werden konnte, dass die genomweite DNA-Methylierung in MDS-Patienten und gesunden Spendern keine signifikanten Unterschiede aufwies und zwischen 3.7% und 4% lagen (166). Die Auswertung der Blutproben während des Therapieverlaufs ergab eine signifikante ( $P < 0.01$ ) Verringerung in der genomweiten DNA-Methylierung in 3 von 6 Patienten. In den Patienten 2 und 3 konnten keine Veränderungen der genomweiten Methylierung nachgewiesen werden (Abb. 16B). Ebenso wie bei dem Patienten 6, in dem aber mit der CE nur die erste Therapiewoche untersucht werden konnte. Der Grund hierfür war, dass bei diesem Patienten nur sehr wenig DNA aus den Blutproben gewonnen werden konnte. Die Patienten 1, 4 und 5 zeigten im Gegensatz zu den anderen Patienten eine signifikante Verringerung der genomweiten DNA-Methylierung (Abb. 16C). Die nachgewiesene Verringerung in der DNA-Methylierung war hierbei jeweils transient und die genomweiten DNA-Methylierung vor Therapiestart wurden während der Behandlungszeit der einzelnen Patienten wiederhergestellt. Die Demethylierungen wurden hierbei besonders in den Wochen beobachtet, die auf eine jeweilige Behandlungswoche (Abb. 16C; graue Balken) mit 5-Azacytidin folgten (siehe z.B. Patient 5 in der Woche 1, 5, 9 und 13). Diese Ergebnisse lassen auf einen direkten Zusammenhang zwischen den einzelnen Behandlungszyklen und der beobachteten Demethylierung schließen.

Die Auswertung der Methylierung in den vorhandenen Knochenmarkspalten der Patienten ergab in allen Patienten, bis auf Patient 4, keine signifikanten Änderungen in der Methylierung im Vergleich zum Therapiestart. Im Gegensatz zu den anderen Patienten, bei denen vier Wochen nach der jeweiligen Behandlungswoche Knochenmarkszellen entnommen werden konnten, ermöglichte die hohe gesundheitliche Stabilität des Patienten 4 eine Entnahme bereits eine Woche nach der Behandlung. In diesen Patienten konnte im Knochenmark nach dem dritten und dem vierten Behandlungszyklus eine signifikante ( $P < 0.01$ ) Abnahme der Methylierung von 3.4% (Woche 0) auf 2.3% (Woche 9) bzw. 2.2% (Woche 13) nachgewiesen werden. Dies war eine wichtige Bestätigung der demethylierenden Wirkung von 5-Azacytidin im Knochenmark, dem eigentlichen tumorbildenden Gewebe in MDS-Patienten. Insgesamt konnte somit erstmalig in MDS-Patienten eine demethylierende Aktivität von 5-Azacytidin in der genomweiten Cytosin-Methylierung nachgewiesen werden.

### 2.3.2 Analyse der Methylierungsänderungen in repetitiven Sequenzelementen und in Leukämie assoziierten Markergenen

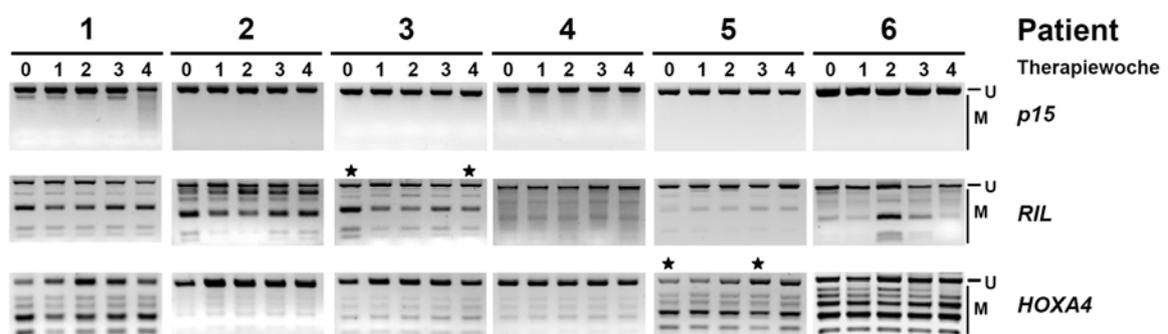
Neben der genomweiten Cytosin-Methylierung, wurde in den Blutproben der Patienten das Methylierungsmuster von zwei repetitiven Sequenzelementen mit Hilfe der COBRA-Methode untersucht. Die Methylierung der *LINE-1* (Long Interspersed Nuclear Element 1) Sequenzen wurden in einer anderen Studie als ein Surrogatmarker für genomweite Methylierungsänderungen vorgeschlagen (174). Die Methylierung der Satelliten 2-Sequenzen auf dem Chromsom 1 (C1S2) wurden in einer Untersuchung in MDS Patienten von DNA-Methylierungsänderungen nach der Behandlung mit Decitabin als ein Marker für Azanukleosid-induzierte Demethylierung etabliert (166). Die Analyse der chromosomalen Satelliten 2-Sequenzen auf dem Chromsom 1 ergab bei den Patienten, die in der genomweiten Cytosin-Methylierung eine Abnahme zeigten, eine signifikante zyklische Demethylierung (Abb. 16A, Patient 5). Im Gegensatz dazu, zeigten die restlichen untersuchten Patienten keine nachweisbaren Veränderungen in der Methylierung dieser repetitiven Sequenzen (Abb. 16A, Patient 3). In den *LINE-1* Elementen wurde in allen Patienten ein gemischtes Methylierungsmuster aus nicht-methylierten und methylierten Epiallelen nachgewiesen (Abb. 16B). Die Behandlung mit 5-Azacytidin führte zu signifikanten Änderungen in der DNA-Methylierung in den Satelliten 2-Sequenzen auf dem Chromsom 1, wohingegen die *LINE-1* Sequenzen in der DNA-Methylierung kaum verändert wurden. Genomweiten Veränderungen in der DNA-Methylierung spiegelten sich in signifikanten Änderungen in der Methylierung der C1S2 Sequenzen wieder. Die C1S2 Sequenzen sind daher ein Ziel für durch 5-Azacytidin induzierte Methylierungsänderungen.

Um die Wirksamkeit dieser Substanzen als epigenetische Therapeutika zu prüfen, war in den weiteren Methylierungsanalysen besonders der Methylierungszustand von CpG-Inseln, die die Expression von Tumorsuppressorgenen regulieren, von Interesse.



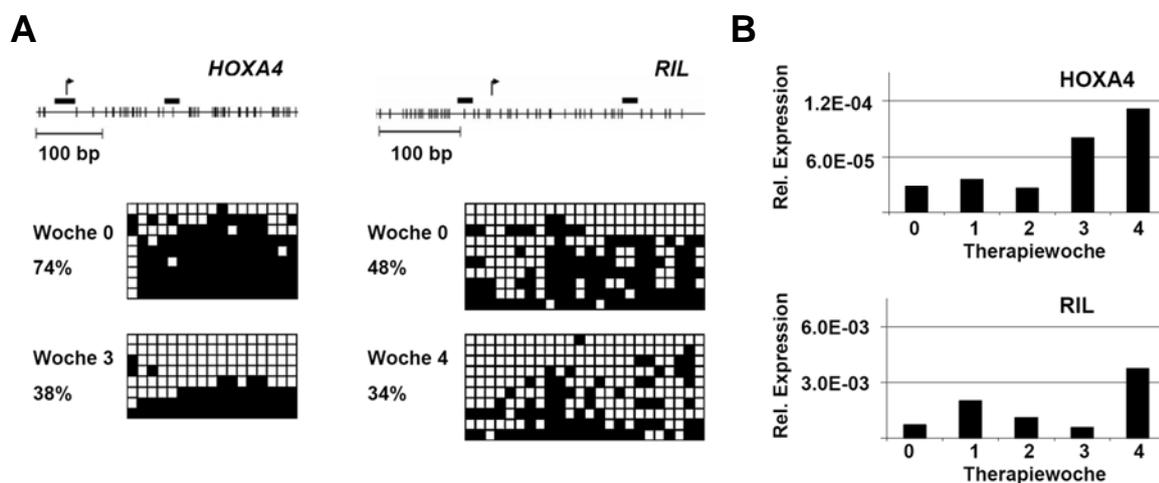
**Abbildung 16.** Repräsentative Methylierungsergebnisse von zwei repetitiven Sequenzelementen der Blutproben des Patienten 3 und 5. **(A)** Methylierungsmuster der Satelliten 2-Sequenzen des Chromosoms 1. **(B)** Methylierungsmuster der *LINE-1* (Long Interspersed Nuclear Element 1) Sequenzen. Unverdaute PCR-Amplifikate repräsentieren unmethylierte Allele (U); Verdaute Fragmente weisen methylierten Allele (M) nach.

Es wurden dazu drei Tumorsuppressorgene (*p15*, *HOXA4*, *RIL*) ausgewählt. Auswahlkriterium für diese Gene war, dass frühere Untersuchungen eine häufige Hypermethylierung verbunden mit der transkriptionellen Inaktivierung in leukämischen Zelllinien und in Leukämiepatienten für diese Gene nachweisen konnten (89, 175, 176). Das Tumorsuppressorgen *p15* ist ein wichtiger Regulator in der Wachstumskontrolle und kontrolliert den G1/S-Übergang im Zellzyklus über die Blockierung der Cyclin-CDK (Cyclin-abhängige Kinase) Komplexe 4 und 6 (176). *HOXA4* gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren mit wichtigen Funktionen in der Embryogenese und Differenzierung von Blutzellen (89). Für *RIL* konnte eine wichtige Rolle in der Apoptose nachgewiesen werden (175). Die Untersuchung der Methylierungsmuster der CpG-Inseln für diese Tumorsuppressorgene ergab in den untersuchten Patienten zum Teil stark unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 17). Während in keinem der 6 Patienten zu keinem Therapiezeitpunkt mit der COBRA Methylierungen im Promotorbereich des Gens *p15* nachweisbar waren, so konnten für *RIL* und *HOXA4* Patienten identifiziert werden, die teilweise oder komplette Methylierungen der CpG-Inseln in diesen Genen aufwiesen. So wurden in den Blutproben der Patienten 1-3 eine in der COBRA sichtbare Anzahl an methylierten Allelen für *RIL* nachgewiesen und für *HOXA4* in den Patienten 1, 5 und 6. Insgesamt konnten jedoch in dem *RIL*-Gen während des Therapieverlaufs nur geringe Unterschiede in der Methylierung beobachtet werden (Abb. 17; z.B. Patient 3 Woche 0 und 4). Diese Änderungen wurden teilweise nur in Einzelproben und auch in Patienten ohne genomweite Methylierungsänderungen beobachtet. Deshalb konnten diese Methylierungsveränderungen nicht eindeutig auf die Behandlungszyklen mit 5-Azacytidin zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu konnte nachgewiesen werden, dass die Methylierung der *HOXA4*-CpG-Inseln in den Patienten 1 und 5 im Laufe der Behandlung deutlich verringert wurde (Abb.17).



**Abbildung 17.** COBRA der CpG-Inseln des Promotorbereichs der Tumorsuppressorgene *p15*, *RIL* und *HOXA4*. Ungeschnittene PCR-Amplifikate repräsentieren unmethylierte Allele (U); Geschnittene Fragmente weisen methylierte Allele nach (M). Sterne Proben zeigen visuelle Unterschiede und wurden zur Validierung der Ergebnisse weiter untersucht.

Dieser Effekt konnte jeweils nach dem ersten Behandlungszyklus nachgewiesen werden. Um diese Unterschiede mit einer zweiten Methode validieren zu können, wurden ausgewählten Proben (Abb. 17, mit Sternen markierte Proben) mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Methylierung des *HOXA4*-Promotors in den Blutproben des Patienten 5 nach der dritten Therapiewoche im Vergleich zum Therapiestart um 36% verringert werden konnte (Abb. 18A). Auch für den Patienten 3 war die für die 4. Woche nachgewiesene Methylierung für *RIL* um 14% leicht reduziert (Abb. 18A). Somit konnten in der COBRA sichtbare Unterschiede mit der Bisulfit-Sequenzierung bestätigt werden.



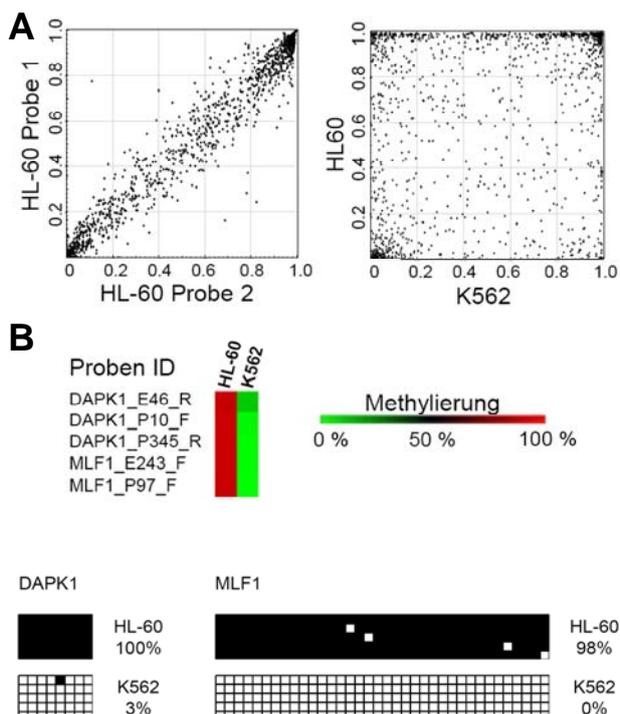
**Abbildung 18.** Validierung der COBRA-Ergebnisse. **(A)** Bisulfit-Sequenzierungen von Einzelproben des Patienten 5 (*HOXA4*) und Patienten 3 (*RIL*). Promotorregionen der beiden Tumorsuppressorgene sind schematisch dargestellt. Primersequenzen für die Bisulfit-Sequenzierungen (*schwarze horizontale Balken*) umspannen den jeweiligen Transkriptionsstart der Gene (*Pfeile*). Einzelne CpG-Dinukleotide (*vertikale Striche*) der jeweiligen CpG-Inseln wurden in jeweils 8-10 unabhängigen Klonen untersucht. Die Prozentzahl gibt den jeweiligen Anteil der methylierten CpG-Dinukleotide (■) an der Gesamtzahl der untersuchten CpG-Dinukleotide wieder. Unmethylierte CpG-Dinukleotide (□). **(B)** Relative mRNA-Expression wurde mit der Real-Time-PCR-Methode untersucht. Die Expression von *Timp-3* wurde auf das Gen *GAPDH* normiert. Die Real-Time-PCR wurde im Rahmen einer Kooperation von Frau Dr. Imke Bokelmann (Medizinische Uniklinik Heidelberg) durchgeführt (3).

Weiterhin wurde nun untersucht, ob die beobachteten Methylierungsänderungen dieser Tumorsuppressorgene zu Unterschieden in der mRNA-Expression führten. Untersuchungen mit Hilfe der Real-Time-PCR-Methode zeigten eine dreifache Induktion der *HOXA4* mRNA-Expression nach Demethylierung in der 3. Woche des Patienten 5 und eine fünffache Induktion für *RIL* in der 4. Woche des Patienten 3. Dies war ein wichtiger Hinweis auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Demethylierung dieser Gene und deren Reaktivierung, da die Veränderung in den Methylierungsmustern auch zu Expressionsänderungen führte. Im Gegensatz dazu waren einzelne Ergebnisse zur Expression in anderen Zeiträumen und Patienten nicht eindeutig (3). So waren beobachtete Veränderungen in der Expression einzelner Gene in den Patienten nicht immer mit

Methylierungsänderungen verbunden, was darauf hindeutet, dass mehrere Faktoren die Expression im Einzelfall beeinflussen könnten (3).

### 2.3.3 Array-basierte Untersuchung der Methylierungsänderungen in Krebs assoziierten Einzelgenmarkern nach Behandlung mit 5-Azacytidin

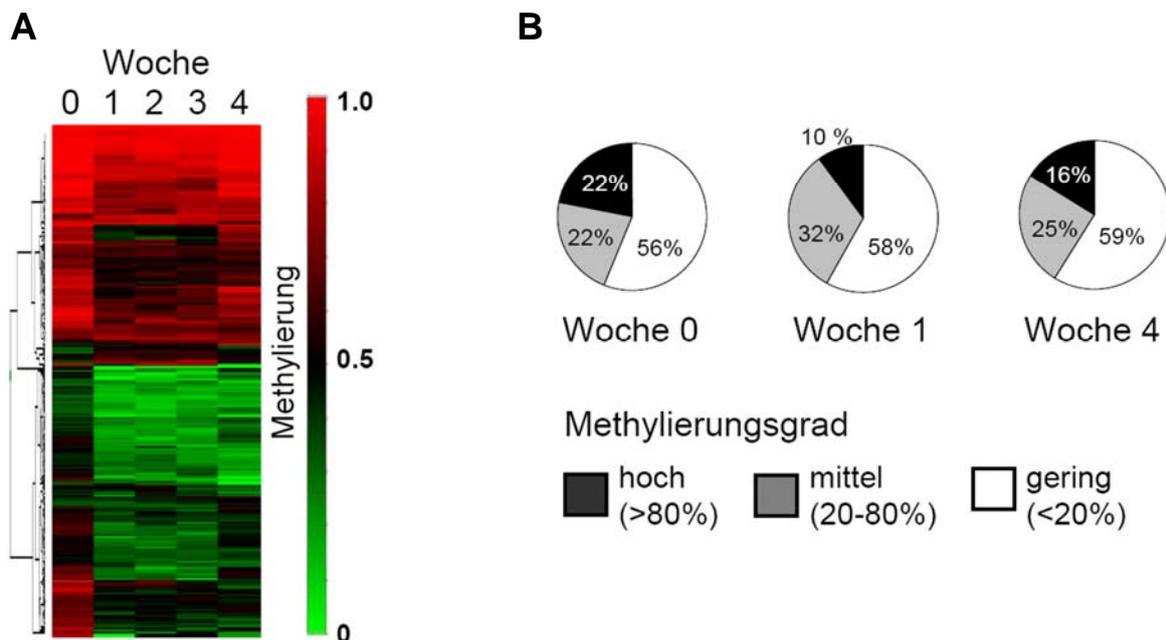
Die Untersuchung der genomweiten und der lokusspezifischen DNA-Methylierung selektierter Einzelgene bestätigte eine demethylierende Aktivität von 5-Azacytidin im Patienten. Im Gegensatz zu den Unterschieden in den CE-Ergebnissen über die genomweite DNA-Methylierung, waren die beobachteten Methylierungsänderungen der untersuchten Einzelgene nicht vergleichbar stark ausgeprägt. Mit Hilfe einer Array-basierten Technologie wurde daher die Analyse der Einzelgenmethylierung auf 807 Gene ausgedehnt, um den epigenetischen Effekt von 5-Azacytidin detaillierter charakterisieren zu können. Es war aufgrund der CE-Ergebnisse zu vermuten, dass letztlich viele unterschiedliche Demethylierungen auf Einzelgenebene im Patienten stattfinden. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Identifizierung von Markergenen, die eine prognostische Aussage über die Behandlung mit Azanukleosiden im Patienten geben könnten in der Zukunft ein wichtiges Ziel. Die Identifizierung von neuen Markern ist jedoch nur durch experimentelle Ansätze realisierbar, die eine große Zahl an Kandidatengenen untersuchen können. In einem ersten Schritt zu diesem Forschungsziel wurden die Blutproben der Patienten 1, 4 und 5 mit einem Array-basierten Ansatz (siehe 4.2.2.4) untersucht, der quantitative Aussagen über den Methylierungszustand von 807 mit Krebs assoziierten Genmarkern lieferte.



**Abbildung 19.** Validierung der Array-basierten Untersuchungsmethode von Einzelgenmarkern. (A) Punktdiagramme zum Kreuzvergleich der Methylierungsmuster in den DNA-Proben aus myeloiden Zelllinien. Jeder Einzelpunkt repräsentiert einen Einzelgenmarker des Arrays. Methylierung wird für diese in einem Wert zwischen 1 (100% methyliert) und 0 (0% methyliert) angegeben. (B) Bisulfit-Sequenzierungen der CpG-Inseln von *DAPK1* und *MLF1*. Heatmap von fünf Genmarkern des Arrays repräsentieren das DNA-Methylierungsergebnis der CpG-Inseln der beiden Gene in den HL-60 und K562-Zellen. Die Prozentzahl gibt den jeweiligen Anteil der methylierten CpG-Dinukleotide (■) an der Gesamtzahl der untersuchten CpG-Dinukleotide wieder. Unmethylierte CpG-Dinukleotide (□).

Diese Gene wurden durch insgesamt 1505 CpG-Dinukleotide repräsentiert, deren Methylierungsgrad untersucht wurde. Da es sich um eine relativ neue Anwendung dieser Technologie handelte, wurde diese Methode in einem ersten Test mit DNA-Proben von myeloiden Krebszellen validiert (Abb. 19). Ein biologisches Replikat der DNA aus HL-60-Zellen ergab nach der Untersuchung mit dieser Technologie bei einem Kreuzvergleich der Methylierungsmuster einen hohen Korrelationskoeffizienten von 0.96, wohingegen der Vergleich der Methylierungsmuster der DNA aus HL-60-Zellen mit der DNA aus K562-Zellen einen Koeffizienten von lediglich 0.16 ergab (Abb. 19A). Dies belegte die Reproduzierbarkeit der mit dieser Methode erlangten Ergebnisse und zeigte, dass die im Versuch enthaltenen Genmarker für eine differenzierte Analyse von unterschiedlichen Zellen geeignet waren. Zusätzlich wurden zwei willkürlich gewählte Markergene des Arrays (*DAPK1* und *MLF1*) mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung untersucht, wodurch die Ergebnisse des Arrays zu dem Methylierungszustand dieser Gene bestätigt werden konnten (Abb. 19B).

In einer ersten Analyse wurden nun die Blutproben des ersten Behandlungszyklus des Patienten 1 untersucht. Dieser Patient zeigte auf genomweiter Ebene eine signifikante Demethylierung in den Wochen 1-3 und einen erneuten Anstieg der Methylierung in der 4. Woche der Therapie (Abb. 15C). Da ein Großteil der Cytosin-Methylierung in repetitiven Sequenzen und in nicht Promotor assoziierten Regionen von Genen liegt (28), sollte nun untersucht werden, ob die beobachteten genomweiten Methylierungsveränderungen auch durch genspezifische Methylierungsänderungen reflektiert wurden. Von besonderem Interesse waren hierbei die Gene, die mit einer CpG-Insel assoziiert sind, da hier selten Methylierung zu finden ist und man aus diesem Grund meist eine krankheitsbezogene, fehlgeleitete Methylierung vermutet. In dem Patienten 1 waren 297 in einer CpG-Insel befindlichen Genmarker mehr als 20% methyliert (Abb. 20A; Woche 0). Während der Therapiewochen 1-3 wurden von diesen Markern 81 (27%) um mehr als 20% demethyliert (Abb. 20A). Eine Unterteilung aller untersuchten Genmarker in Gruppen mit einem hohen (>80%), mittleren (20-80%) und geringen (>20%) Grad an Methylierung ergab eine Halbierung des Anteils an hoch methylierten Genmarkern in der ersten Woche von 22% auf 10% (Abb. 20B). In der vierten Woche stieg der Anteil dieser Gruppe wieder auf 16%. Der Beobachtete Anstieg in der globalen DNA-Methylierung konnte somit auch in der genspezifischen DNA-Methylierung nachgewiesen werden (vergl. Abb. 15C). Diese Ergebnisse belegten eine demethylierende Aktivität von 5-Azacytidin in Patienten, die sich nicht nur auf wenige Einzelgene beschränkte, sondern einen breiten Einfluss auf einen großen Anteil der hypermethylierten Loci hatte. Die beobachtete Demethylierung der Einzelgenmarker korrelierte hierbei vor allem mit der genomweiten Demethylierung in dem Anteil der Gruppe der hochgradig (>80%) methylierten Genmarker.

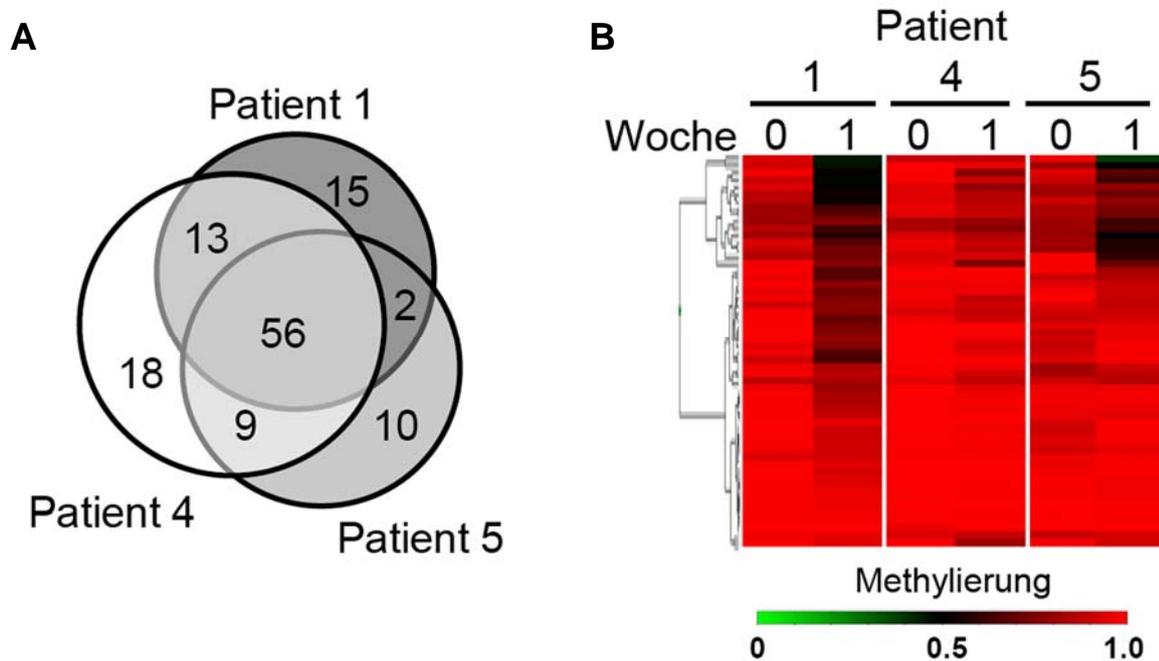


**Abbildung 20.** Array-basierte Methylierungsanalyse von Einzelgenmarkern der Blutproben des ersten Behandlungszyklus des Patienten 1. **(A)** Heatmap der Methylierung der CpG-Insel assoziierten Genmarker, die mindestens 20% Methylierung vor Therapiestart aufwiesen. Die Methylierung wird in einem Wert zwischen 1 (100% methyliert) und 0 (0% methyliert) angegeben. **(B)** Untersuchung aller untersuchten Genmarker gruppiert nach dem Grad der Methylierung. Genmarker wurden gruppiert nach hochgradiger (>80%), mittlerer (20-80%) oder geringer (<20%) Methylierung.

Für eine genauere Charakterisierung der demethylierenden Wirkung von 5-Azacytidin wurde nun untersucht, ob Genmarker isoliert werden konnten, bei denen eine Demethylierung in allen Patienten nach der Behandlung nachweisbar war. Hierzu wurden die Proben der drei Patienten untersucht, bei denen eine Reduktion in der globalen Methylierung nachweisbar war (1, 4 und 5; siehe Abb. 15C). Insgesamt waren 123 (12%) Genmarker, die in einer CpG-Insel lagen, zumindest in einem der drei Patienten vor der Behandlung hochgradig methyliert (>80% Methylierung) (Abb. 21A). Ein Kreuzvergleich der Methylierung dieser Marker in allen drei Patienten ergab, dass von diesen 56 Marker übereinstimmend in allen drei untersuchten Patienten hochgradig methyliert (>80% Methylierung) waren. In Bezug auf die 123 hypermethylierten Marker wiesen die untersuchten Patienten untereinander somit eine Übereinstimmung in den Methylierungsmustern von 46% auf (Abb. 21A).

Diese in allen drei Patienten hochgradig methylierten Genmarker wurden nun auf Veränderungen in der DNA-Methylierung nach Behandlung mit 5-Azacytidin untersucht. Der Vergleich der Methylierungsmuster nach der Behandlung ergab, dass viele der untersuchten Marker in den einzelnen Patienten demethyliert wurden (Abb. 21B). Ein Kreuzvergleich zwischen den Patienten zeigte, dass insgesamt 5 (9%) dieser Gene übereinstimmend in allen drei Patienten um mehr als 20% demethyliert werden konnten. Trotz einer vergleichbaren Abnahme in der genomweiten DNA-Methylierung nach der Behandlung mit 5-Azacytidin zu den untersuchten Zeitpunkten (vergl. Abb. 15C), wurde in der Demethylierung

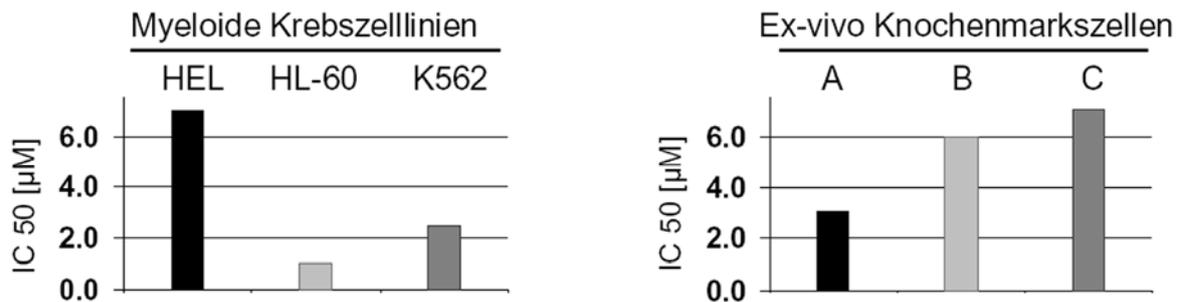
von hochgradig methylierten Genmarkern nur eine Übereinstimmung von 9% in der Demethylierung festgestellt. Diese geringe Übereinstimmung in den genspezifischen Methylierungsänderungen liefert daher einen Hinweis auf eventuelle zellspezifische Faktoren in den Patienten, die die durch 5-Azacytidin induzierte Demethylierung beeinflussen könnten.



**Abbildung 21.** Vergleichende Analyse der Methylierung der Genmarker in den Patienten 1, 4 und 5. (A) Venn-Diagramm der Schnittmengen der hochgradig (>80%) methylierten CpG-Insel assoziierten Genmarker. (B) Untersuchung der Methylierungsänderungen in den 56 Genmarkern die in allen drei Patienten vor der Therapie über 80% Methylierung aufwiesen.

#### 2.3.4 Charakterisierung der molekularen Effekte von 5-Azacytidin in myeloiden Krebszelllinien und ex vivo kultivierten Knochenmarkszellen von MDS/AML-Patienten

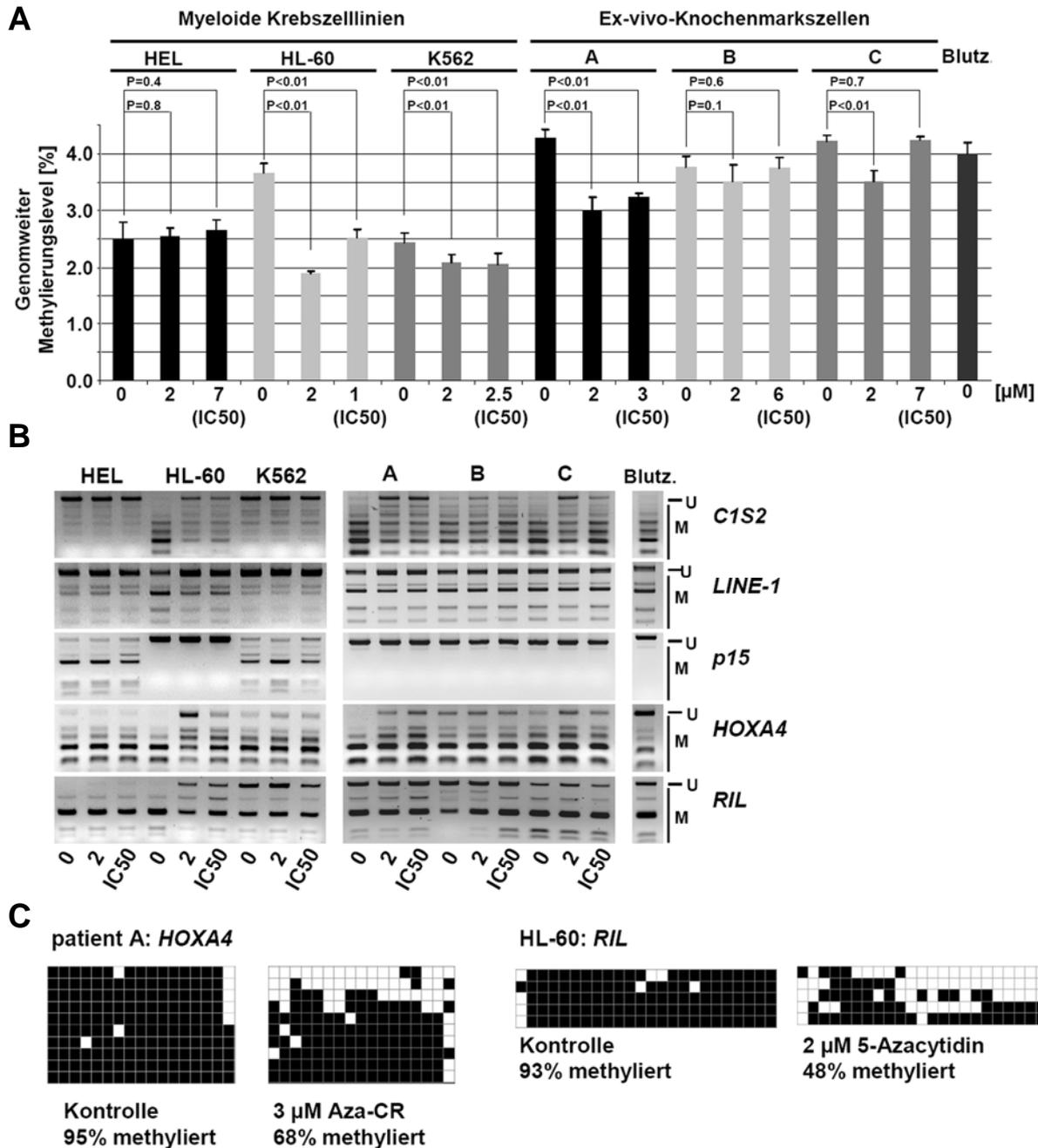
Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wirkungsweise von Azanukleosiden in einzelnen Patienten wahrscheinlich stark von individuellen Faktoren beeinflusst wird, die eine detaillierte Analyse der molekularen Wirkungsweise dieser Substanzen stark erschwert. In dieser Arbeit konnte bereits in dem Zellkultur-basierten Modell zu den CNT-Transportern die Befähigung des Zielgewebes Nukleosidanaloga aufzunehmen als ein Faktor identifiziert werden, der die Effizienz der Demethylierung durch 5-Azacytidin auf zellulärer Ebene stark beeinflusst (siehe Kapitel 2.2). Um weitere grundsätzliche Erkenntnisse über die molekulare Wirkungsweise von Azanukleosiden gewinnen zu können, wurden in verschiedenen Zellkultursystemen 5-Azacytidin unter kontrollierten Bedingungen weiter analysiert. Somit wurden unter anderem die komplexen pharmakodynamischen Faktoren der Substanzverteilung und Beseitigung im Plasma der Patienten als Einflussgröße in den Untersuchungen ausgeschlossen. Es wurden in drei myeloiden Krebszelllinien (HEL, HL-60



**Abbildung 22.** IC<sub>50</sub> Konzentrationen der myeloiden Krebszelllinien und ex vivo Knochenmarkszellen. IC<sub>50</sub> Konzentrationen für eine 72-stündige Behandlung mit 5-Azacytidin wurden durch Vitalitätsbestimmungen mit Hilfe von Resazurin ermittelt.

und K562-Zellen) und in ex vivo kultivierten Knochenmarkszellen aus drei AML/MDS-Patienten (A-C) die demethylierende Wirkung von 5-Azacytidin untersucht. Es wurden zuerst in zytotoxischen Untersuchungen (basierend auf Resazurin), die jeweiligen Konzentrationen bestimmt, die verglichen zur Kontrolle, nach einer 72-stündigen Behandlung zu einer Reduktion der Zellvitalität um 50% führten (IC<sub>50</sub>-Konzentrationen; Abb. 22). In den weiteren Experimenten wurde dann diese Konzentration verwendet, um die Zellen unter vergleichbaren zytotoxischen Bedingungen untersuchen zu können. Eine Behandlung mit 2 µM 5-Azacytidin wurde als zusätzliche Konzentration in die Untersuchungen integriert, um auch eine von den toxischen Effekten unabhängige Konzentration testen zu können. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Konzentrationen für die wachstumsinhibierende Wirkung von 5-Azacytidin variierten zwischen 1-7 µM (Abb. 22). Somit war keine der untersuchten Zelllinien resistent gegenüber dieser Substanz. Die Konzentrationen waren für die myeloiden Krebszelllinien als auch für die ex vivo kultivierten Knochenmarkszellen in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich, der in Untersuchungen zur klinischen Anwendung bereits in Plasma von Patienten nachgewiesen werden konnte (171, 172). Somit wurden in den weiteren Zellkulturversuchen mit Konzentrationen an 5-Azacytidin gearbeitet, die prinzipiell auch in der therapiebezogenen Anwendung im Patienten erreicht werden können.

In einer ersten Untersuchung wurde die genomweite Methylierung der verschiedenen Zellen nach Behandlung mit 5-Azacytidin untersucht. Insbesondere der Zusammenhang zwischen den zytotoxischen Effekten und der Demethylierung in den unterschiedlichen Zellen war hierbei von besonderem Interesse. Nach Behandlung mit den IC<sub>50</sub> Konzentrationen zeigten die HL-60 und K562 Zelllinien eine signifikante Abnahme der genomweiten Methylierung, wobei die HL-60-Zellen die stärkste Demethylierung nach Behandlung von 3,7% auf 2,5% zeigten (Abb. 23). Im Gegensatz dazu zeigten die HEL-Zellen keine signifikante Änderung in der genomweiten Methylierung. Die Behandlung mit 2 µM 5-Azacytidin führte bei der Behandlung zu vergleichbaren Effekten in den unterschiedlichen Zelllinien.

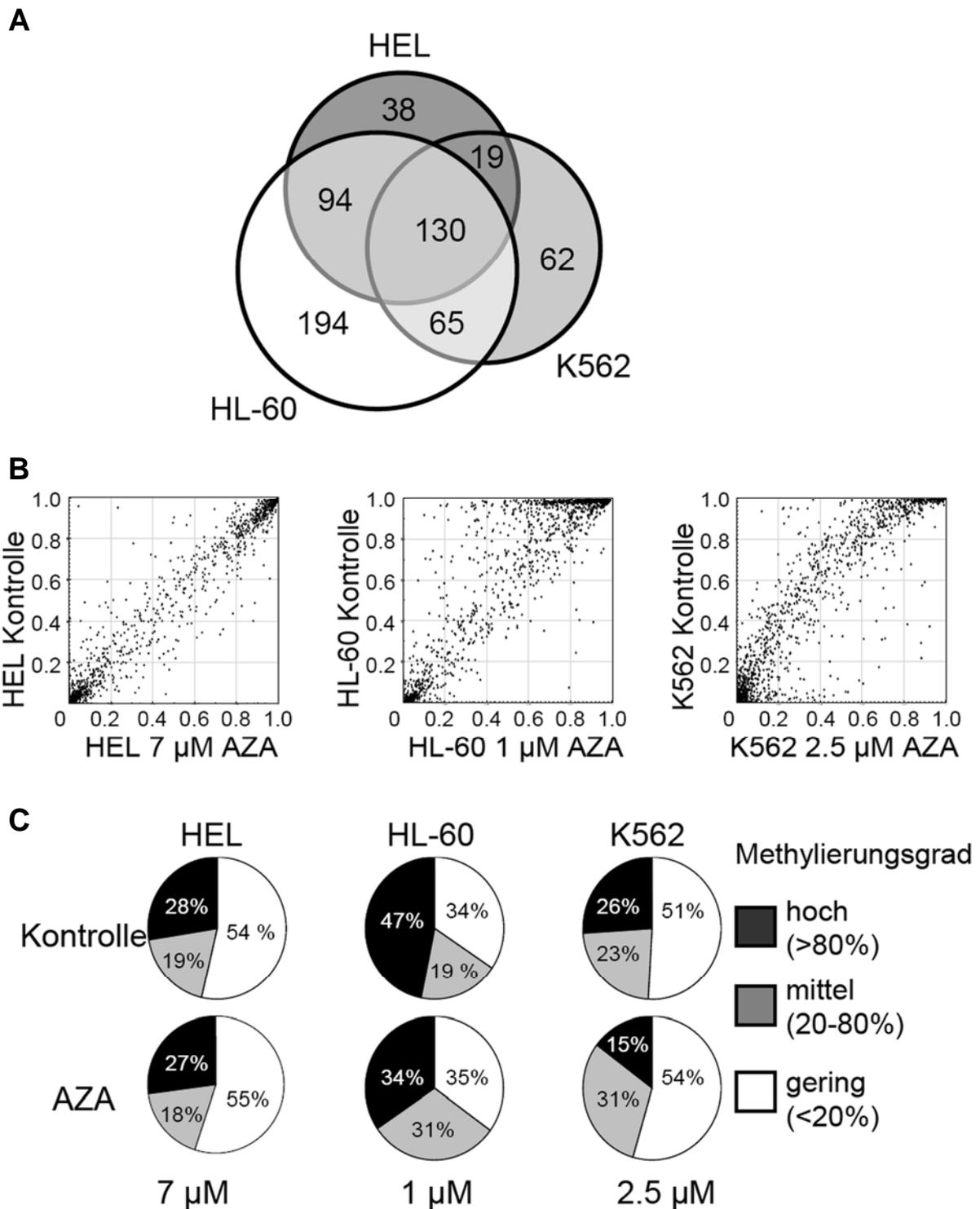


**Abbildung 23.** CE und COBRA der Methylierungsänderungen in ex vivo kultivierten Knochenmarkszellen und myeloiden Krebszelllinien. (A) Zellen wurden mit angegebenen Konzentrationen an 5-Azacytidin für 72 Stunden behandelt. Globaler Methylierungslevel wurde aus der relativen Menge an 5-Methylcytosin zur Gesamtmenge an Cytosin mit Hilfe der elektrokinetischen micellaren Kapillarelektrophorese bestimmt. (B) COBRA verschiedener Gene: *p15*, *RIL*, *HOXA4*, *LINE-1* und der Satelliten 2-Sequenzen des Chromosoms 1. Unverdaute PCR-Amplifikate repräsentieren nicht methylierte Allele (U); Verdaute Fragmente weisen methylierten Allele (M) nach. (C) Bisulfit-Sequenzierungen der Promotorregionen der beiden Tumorsuppressorgene *HOXA4* und *RIL*. Methylierungsmuster der jeweiligen CpG-Inseln wurden in jeweils 5-10 unabhängigen Klonen untersucht. Die Prozentzahl gibt den jeweiligen Anteil der methylierten CpG-Dinukleotide (■) an der Gesamtzahl der untersuchten CpG-Dinukleotide wieder. Unmethylierte CpG-Dinukleotide (□)

Die Untersuchung der ex vivo kultivierten Knochenmarkszellen aus den Patienten ergab eine signifikante Verringerung der Methylierung in den Zellen des Patienten A (bei der IC50 Konzentration). Zusätzlich konnten in den Zellen des Patienten C, wie auch in denen des Patienten A, durch eine Behandlung mit 2  $\mu$ M 5-Azacytidin die genomweiten Methylierung reduziert werden. Die Zellen des Patienten B zeigten sich jedoch resistent gegenüber der Demethylierung durch Azacytidin. Zusammenfassend führte die Behandlung mit 5-Azacytidin in den Zelllinien und in den Knochenmarkszellen zu zytotoxischen Effekten, die aber nicht bei allen Zellen durch eine Demethylierung der DNA begleitet wurde.

Neben den genomweiten Methylierungsuntersuchungen wurden auch genspezifische Methylierungsänderungen mit Hilfe der COBRA analysiert (Abb. 23B). Die Untersuchung der Methylierungsmuster in den repetitiven Elementen (Satelliten 2-Sequenzen auf dem Chromosom 1 und die *LINE-1* Sequenzen) bestätigten die Ergebnisse der CE-Untersuchungen. Sie zeigten eine Abnahme der Methylierung in den HL-60-Zellen und in den ex vivo kultivierten Knochenmarkszellen des Patienten A und C, bei den Behandlungskonzentrationen, die bereits in der genomweiten Methylierungsanalyse eine Abnahme zeigten. In den HEL und K562-Zellen war eine Methylierung des Tumorsuppressorgens *p15* nachweisbar. Dieses Methylierungsmuster blieb allerdings nach der Behandlung unverändert. Eine leichte Demethylierung von *HOXA4* und *RIL* nach der Behandlung mit 5-Azacytidin war in den HL-60-Zellen und in den ex vivo Zellen des Patienten A und C nachweisbar. Diese detektierten Unterschiede konnten exemplarisch mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung bestätigt werden (Abb. 23C). Die K562-Zellen zeigten trotz einer signifikanten Demethylierung in der genomweiten Methylierung keine detektierbaren Unterschiede in der Methylierung der COBRA-Untersuchungen. Auch in den HEL-Zellen und in den Zellen des Patienten B wurde durch die Behandlung mit 5-Azacytidin die Methylierung in den Markergenen nicht verändert. Diese COBRA Ergebnisse bestätigten erneut, dass zytotoxische Effekte von 5-Azacytidin in Zellen nicht direkt mit der Demethylierung verknüpft sind, da alle untersuchten Zellen zumindest bei den IC50-Konzentrationen Schädigungen zeigten, aber nicht unbedingt eine Demethylierung der DNA.

Durch eine Array-basierte Untersuchung der Einzelgenmethylierung in den myeloiden Krebszelllinien, sollte der demethylierende Effekt von 5-Azacytidin genauer untersucht werden. Die Krebszelllinien waren im Vergleich zu den Knochenmarkszellen hierfür besser geeignet, da hier ein homogenes Methylierungsmuster innerhalb der Gesamtpopulation zu erwarten war. Somit war zu erwarten, dass selektive Einflüsse auf die Methylierungsmuster aufgrund der zytotoxischen Effekte von 5-Azacytidin hier keine oder nur eine sehr geringe Rolle spielten. Für diese Untersuchung wurden die Zelllinien mit den spezifischen IC50 Konzentrationen für 72 h behandelt. Anschließend wurden die, durch die Array-Analyse beobachteten Methylierungsmuster vor und nach Behandlung der Zellen

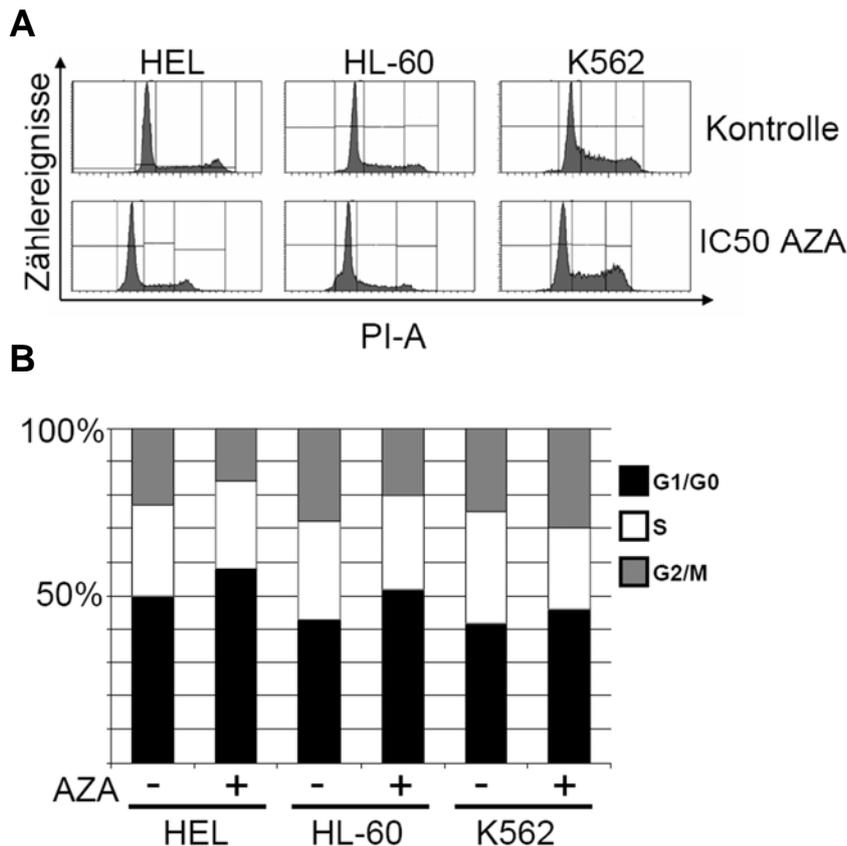


**Abbildung 24.** Array-basierte Methylierungsanalyse von Einzelgenmarkern in drei myeloiden Krebszelllinien vor und nach der Behandlung mit 5-Azacytidin. Zellen wurden für 72 Stunden mit den IC50-Konzentrationen behandelt. (A) Venn-Diagramm der hochgradig methylierten (>80% Methylierung) CpG-Insel assoziierten Genmarker. 130 Genmarker waren in allen drei Zelllinien übereinstimmend hochgradig hypermethyliert. (B) Punktdiagramme der Methylierung der Einzelgene zeigen die Veränderung der Methylierungsmuster nach der Behandlung mit 5-Azacytidin. HEL-Zellen blieben unverändert, wohingegen in den HL-60 und K562-Zellen viele Genmarker demethyliert wurden. Die Methylierung wird in einem Wert zwischen 1 (100% methyliert) und 0 (0% methyliert) angegeben. (C) Analyse aller untersuchten Genmarker gruppiert nach dem Grad der Methylierung. Scheibendiagramme zeigen die Veränderungen der Anteile der hochgradig (>80%) mittel (20-80%) oder gering (<20%) methylierten Genmarkern an allen untersuchten Markern.

miteinander verglichen. Ein Kreuzvergleich der Einzelgenmethylierung ergab, dass 130 CpG-Insel assoziierte Genmarker des Arrays in allen drei Zelllinien über 80% Methylierung aufwiesen (Abb. 24A). Insgesamt waren von den 1044 untersuchten CpG-Insel assoziierten Markern 58% (602) zumindest in einer der drei Zelllinien hochgradig methyliert (>80% Methylierung). Verglichen zu den Blutproben der Patienten (vergl. Abb. 21A), waren in den Krebszelllinien ca. 5-mal mehr Genmarker nachweisbar, die hochgradig methyliert (>80% Methylierung) waren. Die erhöhte Anzahl an hypermethylierten Genen in diesen Zelllinien könnte dabei auf Effekte der Zellkultivierung zurückzuführen sein. Es gibt Untersuchungen, die eine längere Kultivierung von Zellen aufgrund von Selektionseinflüssen zur Hypermethylierung von Genen führt, die in der Zellkultur nicht für das Wachstum benötigt werden (177). Bei den Zelllinien waren 22% (130 von 602 Genmarkern) der identifizierten hochgradig methylierten Genmarker bei allen Zelllinien methyliert (Abb. 24A). Das bedeutet, dass die Methylierungsmustern in den einzelnen Zelllinien sehr stark voneinander abwichen.

Der Vergleich der Methylierung der Genmarker nach der Behandlung mit 5-Azacytidin ergab in den HL-60-Zellen und in den K562-Zellen eine nachweisbare Demethylierung vieler, auf dem Array vertretenen Genmarker. Im Gegensatz dazu blieben die HEL-Zellen in ihrer Methylierung unverändert (Abb. 24B). Die Auswertung der Anzahl an Markern mit hochgradigen (>80%), mittlerem (20-80%) und geringem Methylierungsgrad ergab bei den HL-60-Zellen eine Abnahme in der Gruppe der hochgradig methylierten Genmarker von 47% auf 34% und bei den K562-Zellen von 26% auf 15% (Abb. 24C). Die HEL-Zellen blieben in ihrer Verteilung der Methylierung unverändert. Somit konnten Ergebnisse der CE-Messungen auch auf Einzelgenebene bestätigt werden. Die HEL-Zellen zeigten weder auf genomweiter, noch auf genspezifischer Ebene Methylierungsveränderungen, wohingegen die HL-60-Zellen, als auch die K562-Zellen nach Behandlung mit 5-Azacytidin demethyliert wurden. In diesen Zellen war die Demethylierung nicht auf wenige Einzelgene beschränkt. Die Ergebnisse zu den HEL-Zellen lieferten außerdem weitere Hinweise auf mögliche modulierende Faktoren hinsichtlich der inhibierenden Wirkung auf die DNA-Methylierung von 5-Azacytidin, da hier bei beobachteter zytotoxischer Wirkung keine Inhibition der Methylierung zu beobachten war. Der schon gezeigte modulierende Einfluss des aktiven Transports (siehe Kapitel 2.2) von Azanukleosiden in die Zellen kann jedoch ausgeschlossen werden, da zytotoxische Schädigungen bei den Zellen nachweisbar waren. 5-Azacytidin wurde in die HEL-Zellen aufgenommen und führte zu zytotoxischen Effekten in der Zelle aber ohne, dass dies zu einer Veränderung in den Methylierungsmustern führte. Faktoren die die Metabolisierung von 5-Azacytidin steuern könnten hier einen Einfluss auf die demethylierende Wirkung von 5-Azacytidin gehabt haben.

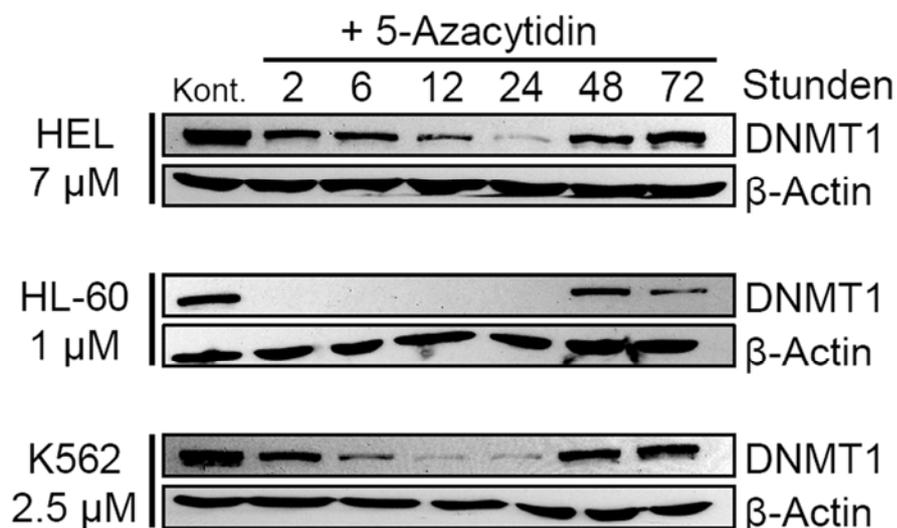
Die beobachtete Demethylierung in den Zellen kann durch unterschiedliche Ursachen beeinflusst worden sein. Es konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass die



**Abbildung 25.** Zytometrische Zellzyklusanalyse (A) Zelllinien wurden für 24 h mit der jeweiligen IC50 Konzentration für eine Behandlung mit 5-Azacytidin inkubiert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen analysiert. (B) Diagramm zeigt die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren 3 unabhängige Ansätze.

Expression der DNA-Methyltransferasen zellzyklusabhängig ist (178). Zusätzlich wird 5-Azacytidin S-Phasen spezifisch, bei der Replikation der DNA eingebaut (179). D.h. Beeinträchtigungen des Zellzyklus könnten auch den Einbau dieser Substanzen in die DNA beeinflussen. Um nun zu untersuchen, ob die beobachteten Unterschiede in der Demethylierung der Zelllinien möglicherweise auf unterschiedliche Verschiebungen in den Zellzyklusprofilen der verschiedenen Zelllinien zurückzuführen sind, wurden zytometrische Zellzyklusanalysen durchgeführt. Hierfür wurden die Zelllinien für 24 Stunden mit 5-Azacytidin (IC50-Konzentrationen) behandelt. Die Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen wurde anschließend anhand einer Propidiumiodidfärbung zytometrisch ausgewertet (Abb. 25). Die Auswertung der Verteilung ergab, dass alle drei Zelllinien eine leichte Zunahme von 4-9% der in der G1/G0-Phase befindlichen Zellen zeigten (Abb. 25B). Des Weiteren konnte eine entsprechenden Abnahme der Zellen beobachtet werden, die sich in der S- bzw. G2-Phase befanden (Abb. 25B). Insgesamt aber variierten die Zellzyklusverteilungen zwischen den unterschiedlichen Zelllinien nach der Behandlung mit 5-Azacytidin nur geringfügig. Daher konnten zellzyklusabhängige Unterschiede in der Expression der DNMTs als Erklärung für die verschiedenen Effekte von Azacytidin auf die DNA-Methylierung in diesen Zellen ausgeschlossen werden.

Es wird generell angenommen, dass die Demethylierung nach Behandlung mit Azanukleosiden eine Konsequenz aus der kovalenten Bindung und der damit einhergehenden Inaktivierung der DNA-Methyltransferasen an der DNA ist (siehe Kapitel 1.4.1). Daher sollte nun überprüft werden, ob sich die gezeigten Unterschiede in der Methylierungsinhibition nach der Behandlung mit 5-Azacytidin in den myeloiden Krebszelllinien auch in den Proteinmengen der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) widerspiegelt. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien für unterschiedliche Zeiten mit den entsprechenden IC50-Konzentrationen behandelt und anschließend DNMT1 in den Proteinlysaten dieser Zellen mit Hilfe von Immunoblotting nachgewiesen. Es konnte in allen drei Zelllinien nach der Behandlung mit 5-Azacytidin eine Abnahme in der Proteinmenge an DNMT1 ermittelt werden (Abb. 26). Ein grundsätzlicher Defekt in einem Stoffwechselweg, der für den Einbau in die DNA notwendig ist, konnte daher in den untersuchten Zelllinien ausgeschlossen werden. Dennoch unterschieden sich die Stärke und die Zeitdauer der Abnahme an DNMT1 zwischen den unterschiedlichen Zelllinien zum Teil erheblich. In den HL-60-Zellen war bereits nach zwei Stunden kein DNMT1 mehr nachweisbar und erst nach 48 Stunden war hier die nachweisbare Proteinmenge an DNMT1 wieder auf dem Niveau der Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu waren in den HEL-Zellen und in den K562-Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten DNMT1 nachweisbar. Hierbei zeigten die K562-Zellen nach 6 Stunden eine geringe Abnahme in der DNMT1 Proteinmenge und erreichten nach 12 und 24 Stunden das niedrigste Niveau. In den HEL-Zellen konnte eine relativ hohe Resistenz gegenüber der Abnahme der in der DNMT1 Proteinmenge nachgewiesen werden. Hier war nach 12 Stunden noch immer eine zwar reduzierte, aber dennoch deutlich sichtbare Menge an DNMT1 detektierbar. Somit konnte ein Hinweis darauf gefunden werden, dass die Abnahme an DNA-Methyltransferasen ein direkter Indikator für die Effizienz der Demethylierung durch Azanukleoside ist. Die beobachtete Abnahme in der Proteinmenge



**Abbildung 26.** Nachweis von DNMT1-Protein in Lysaten behandelter Zellen mit Hilfe der Immunoblot-Technik. Verschiedene Zelllinien wurden mit den angegebenen IC50-Konzentrationen an 5-Azacytidin für verschiedene Zeitdauern behandelt.  $\beta$ -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

der DNA-Methyltransferase 1 spiegelte sich direkt in der Demethylierbarkeit der einzelnen Zelllinien wieder.

### 3. Diskussion

Die Cytidinanaloga 5-Azacytidin und Decitabin eröffnen durch ihre Eigenschaft, DNA-Methyltransferasen zu inhibieren, einen völlig neuen Therapieansatz für die Krebstherapie. Die eigentlich ursprünglich für den Gebrauch als Chemotherapeutika synthetisierten Substanzen (95), können im Krebs epigenetisch stillgelegte Gene wieder reaktivieren (121, 122). Diese Umprogrammierung von Zellen steht im Gegensatz zu anderen Therapieformen wie z.B. der Strahlen- und Chemotherapie, die eher auf ein zytotoxisches Abtöten der Tumorzellen beruhen. 5-Azacytidin und Decitabin haben in der Therapie von MDS-Patienten und in Tiermodellen ihre krebshemmende Wirksamkeit bewiesen (1, 2, 158, 161, 180, 181). Die demethylierende Aktivität ist in Patienten und krebsrelevanten Modellen bisher aber noch nicht im Detail untersucht worden. Es ist bekannt, dass 5-Azacytidin und Decitabin intensiv im zellulären Stoffwechsel modifiziert werden müssen, um schließlich in die Nukleinsäuren eingebaut werden zu können (131). Nichtsdestotrotz sind die Zusammenhänge, inwieweit z.B. eine veränderte Aufnahme der Substanzen oder einzelne Reaktionswege des Nukleotidstoffwechsels dabei die Aktivität der Azanukleoside in Patienten beeinflussen können, noch nicht geklärt. Darüber hinaus haben Azanukleoside sowohl eine zytotoxische als auch demethylierende Wirkung (165). Auf welche Weise diese unterschiedlichen Wirkungen miteinander verknüpft sind und zu den positiven Effekten in der Therapie von MDS-Patienten beitragen, sind entscheidende Fragestellungen für die Weiterentwicklung der epigenetischen Therapie mit Azanukleosiden.

#### 3.1 5-Azacytidin und Decitabin sind die bisher effektivsten DNMT-Inhibitoren

Für die Therapie von Krebserkrankungen ist das Abstoppen des unkontrollierten Wachstums von Krebszellen eine Grundvoraussetzung, die eine Substanz erfüllen muss. Substanzen können z.B. direkte zytotoxische Effekte haben, die präferentiell Krebszellen im Patienten schädigen. Zu diesen Substanzen gehören u.a. Zytostatika wie die Nukleoside Gemcitabin, Fludarabin oder 5-Fluorouracil. Eine neue Eigenschaft für die Krebstherapie, die epigenetisch wirkenden Substanzen besitzen, ist eine modulierende Wirkung auf Krebszellen. Das unkontrollierte Wachstum wird durch Umprogrammierungen der im Krebs veränderten epigenetischen Muster gestoppt oder inhibiert (94, 182, 183).

Neben 5-Azacytidin und Decitabin konnte für verschiedene andere Substanzen eine demethylierende und wachstumshemmende Wirkung auf Krebszellen beobachtet werden. Das Nukleosid Zebularin wurde in Nacktmäusen getestet und zeigt hier eine Verringerung der DNA-Methylierung und eine Verringerung des Tumorwachstums (184). Die Behandlung mit Procain führte in Brustkrebszellen zu einem Arrest in der M-Phase verbunden mit einer

genomweiter Demethylierung (105, 106). Eine inhibierende Wirkung von EGCG auf das Wachstum von Krebszellen konnte in zahlreichen Untersuchungen bestätigt werden (185-189). Zusätzlich konnte in Krebszelllinien durch die Behandlung mit EGCG eine Inhibition der DNMT-Aktivität und die Reaktivierung der durch DNA-Methylierung stillgelegter Gene *RAR $\beta$*  und *p16* nachgewiesen werden (107). Im Gegensatz zu den anderen Inhibitoren konnte für RG108 eine genomweit demethylierende Wirkung auf die DNA beobachtet werden, ohne aber, dass das Krebszellwachstum signifikant beeinflusst wurde (110). In dieser vorliegenden Arbeit wurde erstmalig unter vergleichbaren Bedingungen untersucht, inwiefern die wachstumsinhibierende Wirkung von verschiedenen DNMT-Inhibitoren mit den demethylierenden Eigenschaften dieser Substanzen in Beziehung steht. Dabei konnte gezeigt werden, dass 5-Azacytidin und Decitabin im Vergleich zu den anderen Substanzen die jeweils signifikantesten Effekte auf die DNA-Methylierung und das Wachstum der Zellen haben (165). Es konnten somit die Ergebnisse einer anderen Studie bestätigt werden, in der die demethylierende Wirkung verschiedener nicht Nukleosid-basierter DNMT-Inhibitoren mit Decitabin verglichen wurde (164). Auch diese Untersuchung kam zu der Schlussfolgerung, dass Decitabin im Vergleich zu den anderen untersuchten Inhibitoren deutlich effektiver die DNA-Methylierung inhibieren kann. Nur Decitabin konnte in drei untersuchten Zelllinien die genomweite DNA-Methylierung reduzieren, wohingegen nach der Behandlung mit Procainamid, EGCG und Hydralazin keine Unterschiede in der genomweiten DNA-Methylierung nachweisbar waren.

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit erweitern den Erkenntnisstand zu den DNMT-Inhibitoren zusätzlich mit Betrachtungen zu den Wirkungen auf das Krebszellwachstum. Dabei deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Demethylierung der genomischen DNA nicht ausschließlich für die Inhibition des Wachstums verantwortlich ist. Eine Behandlung mit Procain und EGCG führten zu keiner Veränderung in der DNA-Methylierung. Die verwendeten Konzentrationen lagen dabei aber im selben Bereich wie in anderen Untersuchungen in denen Effekte auf das Wachstum von Krebszellen (106, 107) nachgewiesen werden konnten. Nach einer Behandlung mit RG108 wurde eine Verringerung in der genomweiten DNA-Methylierung beobachtet. Dies hatte aber, jeweils verglichen zu den Azanukleosiden und Zebularin, keine signifikante Wirkung auf das Wachstum der Krebszellen. Es ist daher anzunehmen, dass auch ein Großteil der wachstumsinhibierenden Wirkung der Nukleosid-basierten DNMT-Inhibitoren nicht ausschließlich auf die Demethylierung der DNA zurückzuführen ist. Für Decitabin und 5-Azacytidin sind zahlreiche Wirkungen in Zellen bekannt, die jeweils nicht direkt mit der Demethylierung in Verbindung gebracht werden können. Es konnte in Mäusen und embryonalen Stammzellen mit einer geringeren Expression an DNA-Methyltransferasen gezeigt werden, dass die kovalente Verknüpfung der DNMTs an die DNA selbst zu toxischen Nebenwirkungen führt (104). Eine

geringere Expression der DNMTs resultierte in diesen Untersuchungen in einer höheren Resistenz gegenüber den zytotoxischen Wirkungen von Decitabin. Weitere Untersuchungen in Zelllinien mit unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber Azanukleosiden bestätigten, dass der Einbau von 5-Azacytosin in die DNA zu einer generellen Bildung von Protein-DNA Komplexen führt. Die Bildung dieser Komplexe konnte dabei direkt mit der Sensitivität gegenüber Decitabin in Verbindung gebracht werden (190). 5-Azacytidin wird zu 80% in die RNA eingebaut (126) und interferiert mit der RNA-Biogenese und der Proteinbiosynthese, was zu einer erheblichen Beeinträchtigung des Zellwachstums führen kann (127, 129). Inwieweit die Demethylierung der DNA direkt in einer Inhibition des Wachstums von Krebszellen resultiert, ist also aufgrund der verschiedenen Effekte auf zellulärer Ebene mit diesen Substanzen schwer zu bestimmen. Meine Untersuchungen können aber zeigen, dass 5-Azacytidin und Decitabin verglichen mit anderen DNMT-Inhibitoren die besten demethylierenden Eigenschaften besitzen. Da bisher keine spezifischeren Inhibitoren vorhanden sind, die auch zu einer vergleichbar starken Demethylierung führen, sind Decitabin und 5-Azacytidin die effektivsten Substanzen für die Verwendung als demethylierend wirkende Krebstherapeutika.

### 3.2 Azanukleoside können transient die genomweite DNA-Methylierung in Patienten reduzieren

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit war die Charakterisierung der Veränderungen der genomweiten DNA-Methylierung in MDS Patienten, die mit 5-Azacytidin behandelt wurden. Gerade die demethylierende Wirkung dieser Substanzen macht die Neuartigkeit in ihrer Verwendung für die Krebstherapie aus und sollte daher auch umfassend in Patienten untersucht werden. Für den Nachweis der genomweiten DNA-Methylierung wurde mit der Kapillarelektrophorese eine biochemische Methode verwendet, die direkt den Anteil der methylierten Cytosine in der DNA messen kann. In den bisherigen klinischen Studien in denen Leukämiepatienten mit 5-Azacytidin oder Decitabin behandelt wurden, stand für die Auswertung im Vordergrund, wie diese Substanzen die Gesundheit der Patienten verbessern können. In zwei randomisierten Phase III Studien zu der Behandlung von MDS Patienten mit 5-Azacytidin bzw. mit Decitabin wurden beispielsweise keine Daten zu den Methylierungsänderungen der genomischen DNA in Patienten erhoben (1, 161). Ein Grund für die bisher wenigen Daten über die genomweiten DNA-Methylierung in Patienten lag darin, dass die verfügbaren Methoden einen relativ hohen Arbeitsaufwand bzw. eine große Menge (>5 µg) an genomischer DNA benötigten (191-194).

Die Entwicklung von PCR-basierten Assays (174) führte zu den ersten Untersuchungen, in denen die Veränderungen in der DNA-Methylierung in einer größeren Zahl an Patienten nach Behandlung mit Azanukleosiden dokumentiert wurde. In diesen

Assays wurde der Methylierungszustand repetitiver Elemente, wie der der LINE-1 oder ALU Sequenzen, als Surrogatmarker für die genomweite Methylierung benutzt. Diese Sequenzen sind stark methyliert und kommen in einer großen Kopienzahl im Genom vor. In verschiedenen Studien zur Behandlung mit Decitabin in CML/MDS Patienten konnte nachgewiesen werden, dass die Methylierung der LINE-1 Sequenzen im peripheren Blut der behandelten Patienten um 8-27% verringert wurde (158, 195-197). Ähnliche Ergebnisse wurden auch während der Behandlung von MDS Patienten mit 5-Azacytidin erzielt (167). In dieser Studie konnte eine durchschnittliche Verringerung um 6% nachgewiesen werden. Mit diesen Ergebnissen wurde ein Hinweis erbracht, dass Azanukleoside in Patienten die DNA-Methylierung verringern können. Ein Nachteil dieser Methode ist aber, dass die Untersuchung der Demethylierung repetitiver Elemente keine quantitativen Aussagen zu den durch Azanukleoside induzierten genomweiten Veränderungen der DNA-Methylierung zulässt. In Studien zu Decitabin, die neben der Methylierung der LINE-1 bzw. ALU-Sequenzen auch biochemisch die genomweite DNA-Methylierung untersucht haben, konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen in der Methylierung der ALU und LINE-1 Sequenzen nicht mit den Änderungen in der genomweiten Methylierung übereinstimmten (166, 198). In der vorliegenden Arbeit wurden nach einer Behandlung mit 5-Azacytidin auch nur geringe Änderungen in der Methylierung der LINE-1 Sequenzen beobachtet, die nicht im gleichem Maße den mit der CE detektierten genomweiten Veränderungen in der DNA-Methylierung entsprachen.

Neben der bisher häufig verwendeten LINE-1 COBRA wurde in der vorliegenden Untersuchung auch eine COBRA für die Analyse der Methylierung der C1S2-Sequenzen verwendet. Frühere Ergebnisse von unabhängigen Versuchen in Zellkulturen konnten zeigen, dass pericentromerische repetitive Sequenzelemente durch die Behandlung mit Azanukleosiden gut demethyliert werden können (110). Die Untersuchung der Methylierungsmuster der C1S2-Sequenzen in Patienten zeigte eine in der COBRA sichtbare Übereinstimmung zu den genomweiten DNA-Methylierungsänderungen. Im Vergleich zu den Ergebnissen zur Methylierung der LINE1-Sequenzen, erscheinen die C1S2-Sequenzen sensitiver für die Demethylierung durch 5-Azacytidin zu sein. Zusammen mit vergleichbaren, früheren Ergebnissen zu Decitabin (166) konnten die C1S2-Sequenzen als ein Marker für durch Azanukleoside induzierten Methylierungsänderungen etabliert werden, an dem gut Tendenzen in den Veränderungen der globalen Methylierungen in Patientenproben abgelesen werden können.

Die Ergebnisse der PCR-basierten Assays in dieser Arbeit zeigen aber, dass letztlich direkte biochemische Analysen nicht zu ersetzen sind, um quantitativ genomweite Veränderungen in der DNA-Methylierung nachweisen zu können. In einer Studie in Patienten mit soliden Tumoren konnte in einem Teil der untersuchten Proben erstmals mit Hilfe einer

HPLC-basierten Untersuchungsmethode (194) die genomweite demethylierende Wirkung von Decitabin quantitativ nachgewiesen werden. Es wurde in dieser Untersuchung eine durchschnittliche Verringerung der genomweiten DNA-Methylierung im Blut um ~20% gemessen. In einer späteren Studie, in der zwei verschiedene Konzentrationen Decitabin in MDS-Patienten untersucht wurden, konnte eine vergleichbare durchschnittliche Verringerung der genomischen DNA-Methylierung im peripheren Blut beobachtet werden (198). Die Analyse von Knochenmarksproben in einer weiteren Untersuchung konnte den Nachweis erbringen, dass die demethylierende Wirkung von Decitabin auch in dem eigentlichen Tumor der MDS-Patienten nachweisbar ist (166). Hier wurde in 5 von 7 untersuchten Patienten eine Verringerung der DNA-Methylierung beobachtet. Entsprechende Untersuchungen zu einer Behandlung mit 5-Azacytidin fehlten bisher, so dass mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, erstmalig eine genomweite demethylierende Wirkung von 5-Azacytidin im Blut und im Knochenmark demonstriert werden konnte. Die gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen außerdem, dass Decitabin und 5-Azacytidin zu ähnlichen Veränderungen in der DNA-Methylierung führen. Beide Substanzen können transient die DNA-Methylierung in einem vergleichbaren Maß verringern. Die große zeitliche Auflösung in der vorliegenden Untersuchung, gibt aber zusätzlich zu früheren Untersuchungen, wichtige Erkenntnisse über die Dauer der Demethylierung im Blut. Die bisherigen Studien zu Decitabin haben selektiv einzelne und nur wenige Zeitpunkte während des Therapieverlaufs untersucht. Die vorliegende Arbeit liefert mit einer nahezu lückenlose Analyse der wöchentlichen Veränderungen der DNA-Methylierung im Blut der Patienten, kombiniert mit Daten über die DNA-Methylierung des Knochenmarks neue Ergebnisse, die das Verständnis über die pharmakodynamischen Eigenschaften dieser Substanzen erweitern. So konnte in einigen Patienten ein zyklischer Zusammenhang zwischen der Behandlung und der transienten Verringerung der DNA-Methylierung hergestellt werden. Die Abnahme der genomweiten DNA-Methylierung wurde 1-2 Wochen nach den jeweiligen Behandlungen detektiert und der normale Grad an DNA-Methylierung wurde nach dieser Zeit wieder erreicht.

Dieses Ergebnis ist dabei von besonderem Interesse für Sicherheitsaspekte bei der Verwendung von Azanukleosiden für eine demethylierende Therapie. In Tiermodellen mit Mäusen, die eine verringerte DNMT-Aktivität besaßen, konnte die Bildung von T-Zell-Lymphomen beobachtet werden (32). Diese Lymphome wurden mit der Demethylierung und Aktivierung von endogenen, retroviralen Sequenzen in Verbindung gebracht. Daher ist eine langfristige Demethylierung der genomischen DNA aus Sicherheitsaspekten in Patienten nicht das Ziel. Es ist anzunehmen, dass im Menschen vergleichbare Effekte hervorgerufen werden könnten. Die in dieser vorliegenden Arbeit erlangten Hinweise auf eine nur zeitlich begrenzte Demethylierung der genomischen DNA, relativieren daher die in den Mausversuchen aufgeworfenen Sicherheitsbedenken. Es bleibt aber bisher ungeklärt,

inwiefern ein kurzer Zeitraum einer geringeren Gesamtmethylierung der DNA zu Veränderungen im Krankheitsverlauf der MDS-Patienten führen kann.

### 3.3 Identifizierung von Genmarkern für die 5-Azacytidin vermittelte Demethylierung in MDS-Patienten

Ein langfristiges Ziel für die epigenetische Therapie ist die Identifizierung von Genmarkern, die genutzt werden können, um prädiktive Aussagen über den Behandlungsverlauf mit Azanukleosiden im Patienten machen zu können. Ein solcher Genmarker für MDS sollte dabei idealerweise bestimmte Voraussetzungen erfüllen: Der Genmarker sollte häufig in der MDS-Erkrankung methyliert vorliegen, nach der Behandlung mit Azanukleosiden demethyliert werden können und dabei eine funktionelle Relevanz für den Verlauf der Erkrankung besitzen (199).

Es wurden bisher verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt, um prädiktive Biomarker in Leukämie-Patienten zu finden. Ein Ansatz ist hierbei über die Induktion der Genexpression nach einer Behandlung mit Azanukleosiden Kandidaten zu identifizieren. In einer Untersuchung in AML und MDS-Zellen konnte mit diesem Ansatz in 81 von 22000 Genen eine mindestens um den Faktor zwei erhöhte Expression beobachtet werden (162). 50% dieser identifizierten Gene besaßen eine CpG-Insel in dem 5'-Promotorbereich. Fünf Gene mit einer CpG-Insel von den 81 identifizierten Kandidaten wurden mit der Bisulfit-Sequenzierung untersucht, wobei letztlich für ein Gen eine Hypermethylierung der CpG-Insel gefunden werden konnte. Analysen der Unterschiede in der Genexpression für die Identifizierung von Genmarkern erscheinen daher nur bedingt verwendbar zu sein, da die Behandlung mit Azanukleosiden zu vielen expressionellen Veränderungen führt, die nicht unbedingt mit der DNA-Methylierung zusammenhängen.

Ein anderer Ansatz ist es, Tumorsuppressorgene für weitere Untersuchungen in Patienten zu selektieren, für die schon Hinweise zu epigenetischen Veränderungen aus Zellkulturlinien gesammelt werden konnten. Diese Kandidatengene werden dann in Patienten gezielt auf DNA-Methylierung des Promotors hin untersucht. In einer Studie mit dieser Strategie, in der Methylierungsmuster von 14 krebsrelevanten Genen in Knochenmarksproben von 36 AML-Patienten untersucht wurden, konnten für die untersuchten Gene eine Häufigkeit in der Methylierung von 6-64% gefunden werden. In dieser Studie wurden die Gene ab einer Methylierungsdichte von mindestens 10% als methyliert eingeordnet und eine signifikante Stilllegung der Genexpression konnte in drei der untersuchten Gene beobachtet werden (200). Daten zu der Veränderung in der Methylierung nach einer Behandlung mit Azanukleosiden wurden jedoch nicht gewonnen, so dass diese frühe Studie lediglich Hinweise zu verschiedenen Methylierungsmustern in AML-Patienten liefern konnte. Für die Validierung von Markern sind Untersuchungen nötig, die die

Veränderungen in der Methylierung nach einer Behandlung mit Azanukleosiden untersuchen, um überprüfen zu können, ob das zu untersuchende Gen überhaupt durch die Behandlung in der Methylierung verändert werden kann.

Eines der am besten untersuchten Kandidatengene ist das Tumorsuppressorgen *p15* (*p15/INK4b*). Es kontrolliert den G1/S-Übergang im Zellzyklus über die Blockierung der Cyclin-CDK (Cyclin-abhängige Kinase) Komplexe 4 und 6. Das Gen repräsentiert somit einen wichtigen Regulator in der Wachstumskontrolle (201) und war daher ein interessantes Gen für Methylierungsanalysen. In verschiedenen Untersuchungen konnte eine häufige Methylierung zuerst in Krebszelllinien und später auch in Leukämiepatienten nachgewiesen werden (169, 202, 203). Des Weiteren wurde postuliert, dass eine Hypermethylierung von *p15* begleitend mit einem Fortschreiten der MDS- und AML-Erkrankungen zu finden ist (176, 204). Diese Ergebnisse haben das Interesse an *p15* als ein *in vivo* Zielgen für demethylierende Therapien mit Azanukleosiden geweckt. Schließlich konnte die Demethylierung und expressionelle Induktion nach 5-Azacytidin bzw. Decitabin-Behandlung in Leukämiepatienten nachgewiesen werden (205, 206). Ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Demethylierung des *p15* Gens und einem Ansprechen auf die Therapie mit 5-Azacytidin oder Decitabin besteht ist dabei aber bisher umstritten. In einer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass in 9 von 12 mit Decitabin behandelten MDS-Patienten die Hypermethylierung des *p15* Promotors reduziert werden konnte (205). In dieser Studie war die Demethylierung direkt assoziiert mit der hämatologischen Verbesserung in allen 9 Patienten. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer anderen Untersuchung in 6 MDS-Patienten beobachtet, in der eine Demethylierung von *p15* in Knochenmarkszellen zusammen mit einem klinischen Ansprechen auf die Therapie nachgewiesen werden konnte (206). Verschiedene Untersuchungen mit einer jeweils größeren Anzahl an Patienten konnten aber keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den Methylierungsänderungen des *p15* Gens und einem klinischen Ansprechen auf die Therapie mit Azanukleosiden beobachten (157, 159, 195, 198). Neuere Untersuchungen deuten außerdem darauf hin, dass die Methylierung des *p15* Gens in MDS-Patienten nicht so verbreitet ist, wie in vorherigen Studien angenommen wurde (196, 198). Mögliche Gründe für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten evtl. in den verwendeten Nachweismethoden und/oder in der Anzahl und Auswahl der untersuchten Patienten liegen.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde das Tumorsuppressorgen *p15* gezielt mit einer COBRA untersucht. Für *p15* konnte in keiner der untersuchten Patientenproben eine Hypermethylierung der Promotorregion von *p15* nachgewiesen werden. Es wurde in bisherigen Studien zu *p15* eine durchschnittliche Dichte der Methylierung von 12-25% beobachtet. Der Nachweis einer Hypermethylierung von *p15* erscheint daher mit COBRA im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressorgenen, die meist eine nahezu komplette

Methylierung der CpG-Insel aufweisen schwierig zu sein. Interessanterweise deuten weitere Ergebnisse zur Expression darauf hin, dass *p15* unabhängig von der Promotormethylierung während der Differenzierung der Blutzellen differenziell exprimiert wird (207). Untersuchungen in leukämischen Krebszelllinien und ex vivo kultivierten Zellen aus AML/ALL-Patienten zeigten außerdem, dass mindestens eine Methylierungsdichte von 30-40% erreicht werden muss, um die Expression von *p15* stillzulegen (208). Die Methylierungsuntersuchung von *p15* in Patienten erscheint daher nicht geeignet zu sein, um prädiktive Aussagen über die Behandlung mit Azanukleosiden machen zu können. Der Zusammenhang zwischen der Methylierung des Promotors, der Expression und dem klinischen Ansprechen der Patienten konnte trotz zahlreicher Untersuchungen nicht eindeutig belegt werden.

Neben *p15* wurde die Einzelgenmethylierung von *RIL* und *HOXA4* untersucht. *RIL* wurde als ein epigenetisch stillgelegtes Gen über eine Methode gefunden, die es erlaubt methylierte CpG-Inseln über einen methylierungsabhängigen Restriktionsverdau mit einer anschließender PCR-Amplifikation und Klonierung zu identifizieren (209). *HOXA4* wurde aufgrund der Beobachtung, dass in vielen Leukämien Gene der HOX-Familie eine veränderte Expression aufweisen (89, 90), näher auf die Methylierung des Promotorbereichs analysiert. In den bisherigen Untersuchungen konnten für *HOXA4* als auch für *RIL* in MDS-Patienten eine Hypermethylierung in 60% der Patienten nachgewiesen werden (89, 175). In der vorliegenden Arbeit konnte für beide Gene in einem zu diesen früheren Ergebnissen vergleichbaren Anteil der untersuchten Patienten eine Methylierung des Promotors nachgewiesen werden. Erstmals konnte in der vorliegenden Arbeit in MDS-Patienten begleitend zu der Demethylierung auch eine erhöhte Expression nach der Behandlung mit 5-Azacytidin nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist eine wichtige Bestätigung für das Konzept der epigenetischen Therapie, da die Demethylierung der CpG-Inseln im Patienten in einer erhöhten Expression und Reaktivierung dieser Tumorsuppressorgene resultierte. Bisherige Studien zu diesen Genen konnten dies bisher nur in Zellkulturexperimenten nachweisen (89, 175).

Zusätzlich zu bisherigen Methylierungsuntersuchungen in Patienten, in denen ausschließlich entweder nur wenige Einzelgenmarker oder repetitive DNA-Elemente untersucht wurden (167, 174, 197, 198, 206), konnten in dieser vorliegenden Arbeit genspezifische DNA-Methylierungsänderungen mit den genomweiten verglichen werden. Dieser Vergleich ergab, dass die Demethylierung von *HOXA4* und *RIL* zeitlich nicht zusammen mit der am stärksten ausgeprägten, genomweiten Demethylierung beobachtet werden konnte. Teilweise wurde auch eine Verringerung in der Methylierung der CpG-Inseln von *RIL* oder *HOXA4* beobachtet, zu einem Zeitpunkt, zu dem die genomweite Methylierung keine Unterschiede zum Therapiestart aufwies. Dies ist ein Hinweis darauf, dass

Veränderungen in der Einzelgenmethylierung nicht unbedingt Veränderungen in der genomweiten DNA-Methylierung reflektieren. Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass die Blutproben der Patienten aus einem Gemisch verschiedener Zelltypen bestehen. Es kann daher bei den Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Methylierungsänderungen auch durch Verschiebungen in der Zellzusammensetzung des Blutes aufgrund von zytotoxischen Wirkungen der Substanzen hervorgerufen werden könnten. Die Ergebnisse zu den Einzelgenuntersuchungen in dieser Arbeit illustrieren daher, dass für die Identifizierung neuer prädiktiver Marker für die Behandlung mit Azanukleosiden Studien notwendig sind, die einerseits die Methylierung von einer großen Anzahl an Genen erfassen können und gleichzeitig die genomweite DNA-Methylierung untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer experimenteller Ansatz aus der Kombination einer biochemischen Methylierungsanalyse zusammen mit einer umfangreichen Array-basierten Einzelgenuntersuchung für die Identifizierung potentieller Genmarker etabliert. Mit Hilfe der detaillierten Array-basierten Analyse von 807 Einzelgenen in den Proben der Patienten konnten Daten zu den spezifischen Methylierungsmustern vor und nach der Behandlung mit Azacytidin erstellt werden. Da in den bisherigen Patientenstudien vor allem lediglich Einzelgenmarker oder repetitive DNA-Elemente untersucht wurden (167, 174, 197, 198, 206), konnte bisher in Patienten nur ein unvollständiges Bild der demethylierenden Wirkung von Azanukleosiden ermittelt werden. Es wurde mit unserem experimentellen Ansatz nachgewiesen, dass eine Vielzahl von Genen in den einzelnen Patienten durch die Behandlung mit 5-Azacytidin demethyliert werden konnten. Für die Identifizierung von Biomarkern wird es in der Zukunft notwendig sein, den verwendeten experimentellen Ansatz dieser Arbeit auf Studien mit einer größeren Anzahl an Patienten anzuwenden. Die geringe Anzahl der Patienten ließ keine statistisch auswertbare Identifizierung von Biomarkern zu. Es konnten nur fünf Genmarker in den drei Patienten gefunden werden, die übereinstimmend nach Behandlung demethyliert wurden. Dennoch wurde durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine Vielzahl von Genen nach der Behandlung in MDS-Patienten epigenetisch verändert werden können. Somit konnten Hinweise für eine möglicherweise stattfindende epigenetische Umprogrammierung in MDS-Patienten gesammelt werden.

In Hinblick auf die Identifizierung von Biomarkern könnte die Untersuchung der Methylierungsmuster von Mikro-RNAs an Bedeutung zunehmen. Mikro-RNAs sind kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle, die die Genexpression einer Vielzahl von Genen über Degradation der mRNA oder der Inhibition der Translation regulieren können. Sie erfüllen kritische Funktionen in der Zelldifferenzierung und in der Entwicklung. Zusätzlich konnte eine Fehlregulation von Mikro-RNA in vielen Krebszelllinien und Tumoren nachgewiesen werden

(76, 210-212). Neuere Untersuchungen zeigen außerdem, dass microRNAs in ihrer Expression durch die Methylierung von CpG-Inseln reguliert werden können (75, 213, 214) und ungefähr 50% aller bisher identifizierten Mikro-RNA-Gene mit CpG-Inseln assoziiert sind (73). In dem in dieser Arbeit verwendeten Array-basierten Untersuchungssystem waren keine Marker zur Methylierungsanalyse von Mikro-RNAs enthalten. Aufgrund der Schlüsselrolle in der Genexpression, könnte die Untersuchung der Methylierungsmuster von Mikro-RNAs von einer größeren prognostischen Aussagekraft sein, als die Analyse von Tumorsuppressorgenen. Die Verwendung weiterentwickelter Array-Systeme, die auch Marker für die Methylierung von microRNA Genen enthalten, würde daher die Suche nach prognostischen Biomarkern wahrscheinlich entscheidend voranbringen.

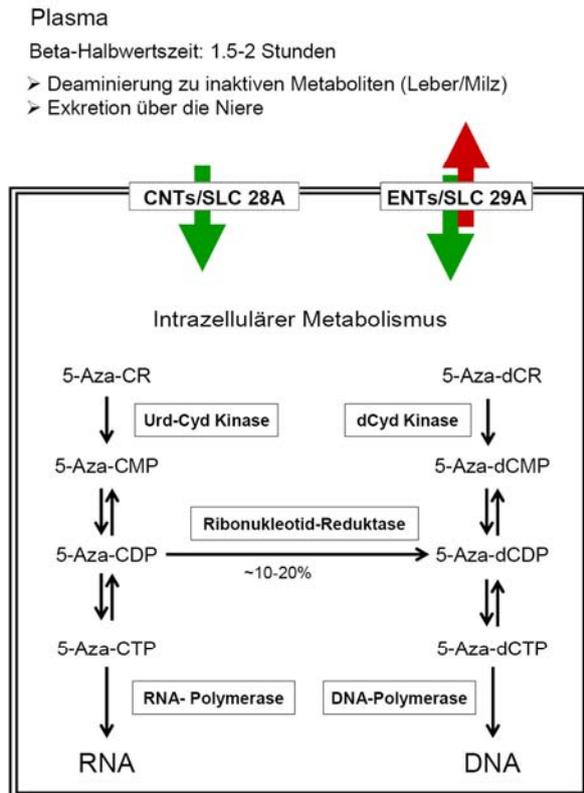
### 3.4 Proteine der CNT-Transporterfamilie ermöglichen den Transmembrantransport von Azanukleosiden

Ein wichtiger Faktor für die Wirksamkeit von Substanzen in der Krebstherapie, ist deren Aufnahme in das entsprechende Zielgewebe (136, 215). Bisherige Untersuchungen, die die Aufnahme von Azanukleosiden untersucht haben, beschränkten sich auf korrelative Expressionsuntersuchungen. Es konnte beispielsweise ein negativen Zusammenhang zwischen der Resistenz gegenüber Decitabin und der Expression von ENT1 in ex vivo kultivierten Zellen aus 50 AML-Patienten beobachtet werden (135). Eine Array-basierte Untersuchung in 60 menschlichen Krebszelllinien konnte einen ähnlichen Zusammenhang zwischen der Expression von ENT1 und 5-Azacytidin nachweisen (136). Es wurde auch gezeigt, dass die Behandlung von Zellen mit einem ENT1-Inhibitor (Nitrobenzylthioinosin) die Resistenz gegenüber den zytotoxischen Effekten von 5-Azacytidin erhöhte (136). Untersuchungen in denen mit Hilfe eines Zellmodells die Aufnahme von Azanukleosiden studiert werden kann, fehlten bisher. In dieser Arbeit wurden zwei Zellmodelle untersucht, in denen die Transporter CNT1 und CNT3 den direkten Transmembrantransport von 5-Azacytidin vermitteln. Diese beiden Transporter gehören zur der SLC28A Familie, die eine konzentrierte,  $\text{Na}^+$ -abhängige Aufnahme von verschiedenen Nukleosiden vermitteln. Es wurden für beide Proteine  $K_m$  und  $V_{max}$ -Werte für den Transport von Azacytidin ermittelt, die vergleichbar waren zu denen anderer Nukleoside wie z.B. Cytidin (173). Die Identifizierung der Transporter für die Aufnahme von Azanukleosiden ist für das Verständnis der Wirkungsweise dieser Substanzen von wichtiger Bedeutung, da für andere chemotherapeutisch wirkende Nukleoside bereits ein Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit in Krebszellen und der Expression bestimmter Transporterproteine beobachtet werden konnte (216).

### 3.5 Die CNT vermittelte Aufnahme ist ein modulierender Faktor für die inhibitorische Aktivität von Azanukleosiden

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ektopische Expression von dem CNT1- oder CNT3-Transporter zu einer erhöhten Sensitivität der transfizierten Zellen gegenüber den Effekten von Azanukleosiden führt. Erstmals wurde somit auf molekularer Ebene ein direkter Zusammenhang zwischen der Aufnahme der Azanukleoside und deren Wirkung nachgewiesen. Für die Zellen mit einem ektopisch exprimierten CNT-Transporter sind die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen für eine Behandlung mit 5-Azacytidin signifikant verringert. Zusätzlich konnte die Inaktivierung von DNMT1 und daraus resultierende passive Demethylierung der Zellen mit niedrigeren Konzentrationen erreicht werden. Diese Ergebnisse erweitern entscheidend die bisherige Sichtweise zu den Faktoren, die die Wirkung dieser Substanzen modulieren könnten. In unserer Studie zur klinischen Wirkung von 5-Azacytidin konnte nicht in allen Patienten eine Demethylierung der DNA nachgewiesen werden. In früheren Untersuchungen zu Decitabin behandelten MDS-Patienten konnten vergleichbare Beobachtungen erzielt werden (166). Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass auch in Krebszelllinien das Ansprechen auf die demethylierende Wirkung von Azanukleosiden von Zelllinie zu Zelllinie sehr unterschiedlich sein kann. Die Charakterisierung zellulärer Faktoren, die die Wirkungsweise von Azanukleosiden beeinflussen, könnte daher wichtige Hinweise zur Aufklärung der zugrundeliegenden Zusammenhänge für das unterschiedliche Ansprechen der Patienten liefern.

Vermutlich könnte die kurze Beta-Halbwertszeit (Substanzeeliminierung) der Azanukleoside im Plasma ein entscheidender limitierender Faktor für deren Wirksamkeit in Patienten sein. Sie liegt für 5-Azacytidin und Decitabin bei 1,5-2 Stunden (217, 218). D.h. beide Substanzen werden in kurzer Zeit aus dem Blutkreislauf entfernt. Die Beseitigung der Substanzen ist dabei schneller, als es durch eine reine glomeruläre Filtration der Niere erreicht werden könnte. Es wird vermutet, dass die hohe Aktivität der Cytidin-Deaminase in der Leber und der Milz für den Abbau dieser Substanzen verantwortlich sind (219, 220). Zusätzlich konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass eine Mindestinkubationszeit benötigt wird, um eine demethylierende Wirkung erzielen zu können (131). Die kurze Plasma-Halbwertszeit beschränkt somit entscheidend das Zeitfenster, in dem die Azanukleoside in das Zielgewebe aufgenommen werden können. Der Transmembrantransport steuert somit die Substratmenge an Azanukleosiden, die dann für den intrazellulären Metabolismus zur Verfügung steht (Abb. 27). Dadurch könnte das Vorhandensein entsprechender Transporter, die zielgerichtet die Aufnahme in die Krebszellen vermitteln, ein kritischer Faktor für die Effizienz der Behandlung sein. Eine



**Abbildung 27.** Verschiedene Einflußgrößen regulieren den Einbau der Cytidin-Analoga 5-Azacytidin (5-Aza-CR) und Decitabin (5-Aza-dCR) in die DNA. Der Membrantransport vermittelt hierbei zwischen der Plasmastabilität und dem intrazellulären Metabolismus der Azanukleoside. Es konnten in dieser Arbeit Transporter verantwortlich für die konzentrierte Aufnahme (CNTs/SLC28A) von Azanukleosiden untersucht werden. Andere korrelativen Studien weisen darauf hin, dass die Transporter für den equilibrierenden Austausch (ENTs/SLC29A) von Nukleosiden ebenfalls für die Aufnahme von Azanukleosiden in Frage kommen. Nach der Aufnahme werden 5-Azacytidin und Decitabin von verschiedenen Enzymen des Nukleosid/Nukleotidstoffwechsels modifiziert, bevor sie in die DNA eingebaut werden können. Es wird angenommen, dass 80-90% des 5-Azacytidin in die RNA eingebaut wird, da die Ribonukleotidreduktase die Umwandlung der Ribonukleotide zu den Deoxyribonukleotiden limitiert.

signifikante Verbesserung in der Effizienz einer Behandlung mit Azanukleosiden, bei einem verbesserten Transport von 5-Azacytidin und Decitabin konnte in unserem Modellsystem demonstriert werden. Der Transport dieser Substanzen könnte daher auch in Patienten ein wichtiger modulierender Faktor für die Behandlung mit Azanukleosiden sein. Zukünftige Studien werden zeigen, ob spezifische Expressionsmuster von Transportern als prädiktive Biomarker für den therapeutischen Einsatz von Azanukleosiden verwendet werden können.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 MDS Patienten der Studie

Es wurden insgesamt 10 Patienten für die Behandlung mit 5-Azacytidin ausgewählt. Alle Patienten erfüllten hierbei die Kriterien der WHO für eine MDS-Erkrankung. Die Klassifizierung der Patienten in Risikogruppen erfolgte nach den Vorgaben des IPSS (International Prognostic Scoring System) (142). Die Einverständniserklärungen für die Behandlung, Probennahme und die anschließende Untersuchung der Proben für wissenschaftliche Zwecke wurde von allen Patienten erhalten.

Tabelle 1: Patienten-Charakteristika

Patient	Geschlecht	Alter	WHO-Klassifizierung	Zytogenetik	IPSS-Klassifizierung	Behandlungszyklen	IWG Bewertung	Überlebenszeit [Monate]
1	f	65	RAEB-2	normaler Karyotype	HR (2.5)	10+	Verbesserung	27+
2	m	76	RA	Y-	IM-1 (0.5)	4+	Verbesserung	27+
3	f	68	RAEB-2	normaler Karyotype	IM-2 (2.0)	4	Verbesserung	10+
4	m	79	RAEB-2	partielle Monosomy 7	HR (3.0)	4	Verbesserung	5+
5	f	70	5q- Syndrom	5q-	IM-1 (1.0)	4	stabile Erkrankung	47+
6	m	71	RCMD	normaler Karyotype	IM-1 (0.5)	4	stabile Erkrankung	27+
7	m	69	RAEB-2	Y-, Inv(9), +12q13	HR (3.0)	3	Progress der Erkrankung	>48+
8	f	60	RAEB-2	keine Angabe	HR (2.5)	3	Progress der Erkrankung	25+
9	m	76	RARS	normaler Karyotype	LR (0)	3	Progress der Erkrankung	37
10	f	75	RAEB-2	keine Angabe	HR (2.5)	2	Progress der Erkrankung	6

Abkürzungen: RA (Refraktäre Anämie), RARS (Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten), RAEB (Refraktäre Anämie mit Blastenexzess), RCMD (Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie), IPSS (International Prognostic Scoring System), IWG (International Working Group), WHO (World Health Organization), LR (low risk), IM (intermediate risk), HR (high risk). Überlebenszeit: Bezeichnet die Überlebenszeit seit der Diagnose; "+" Patient ist am Leben. Die IWG Bewertung wurde nach den Kriterien der International Working Group (IWS) getroffen (152).

#### 4.1.2 Behandlung der Patienten

5-Azacytidin (Vidaza™, Pharmion) wurde subkutan in einer Dosis von 75 mg/m<sup>2</sup> für 7 zusammenhängende Tage verabreicht. Die Behandlungen wurden alle vier Wochen wiederholt. Zusätzlich wurde dem Patienten mit jeder Injektion 2 mg Granisetron p.o. als antiemetische Prophylaxe verabreicht. Alle Patienten wurden klinisch von Herrn Prof. Ullrich Mahlkecht in der Universitätsklinik Heidelberg betreut.

#### 4.1.3 Aufarbeitung der Blutproben der Patienten

Die peripheren mononukleären Zellen des Blutes wurden durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation (Biocoll Separating Solution) isoliert. Anschließend wurden die Zellen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die Blutproben wurden im Rahmen der Kooperation mit der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg von Frau Diplom-Biologin Imke Bokelmann (Arbeitsgruppe Prof. Ullrich Mahlkecht) aufgearbeitet.

#### 4.1.4 DNA-Methyltransferase-Inhibitoren

Die Stammlösungen der Inhibitoren wurden in folgenden Konzentrationen hergestellt. Alle weiteren für die einzelnen Versuche benötigten Verdünnungsschritte wurden mit ddH<sub>2</sub>O durchgeführt. Die Stammlösungen lagerten im Gefrierschrank bei -80°C. Spätestens nach zweieinhalb Monaten wurden neue Stammlösungen hergestellt.

Tabelle 2: DNA-Methyltransferase-Inhibitoren

Substanz	Lösungsmittel	MG	Konzentration der Stammlösung	Bezugsquelle
5-Azacytidin	ddH <sub>2</sub> O	244,2	5 mM	Sigma
5-Aza-2'-Deoxycytidin (Decitabin)	ddH <sub>2</sub> O	228,2	5 mM	Calbiochem
EGCG	ddH <sub>2</sub> O	458,4	50 mM	Sigma
Procain	ddH <sub>2</sub> O	272,2	100 mM	Sigma
RG108	DMSO	334,3	100 mM	Synthese von Regine Garcia Boy
Zebularin	DMSO	228,2	50 mM	Calbiochem

#### 4.1.5 Synthese des radioaktiv markierten [<sup>14</sup>C]-5-Azacytidin

Die Synthese des [<sup>14</sup>C]-5-Azacytidin wurde von Frau Dr. Esther Schirmacher durchgeführt (173).

#### 4.1.6 Chemikalien

Agarose	Sigma
Acrylamidlösung (30%)	Roth
Ammoniumacetat	Sigma
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma

Bodipy FL EDA®	Molecular Probes
Borsäure	Fluka
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Fisher Chemikals
Coulter® Clenz®	Beckman Coulter
Coulter® Isoton® II Diluent	Beckman Coulter
Deoxynukleotid-Mix (25 mM je NTP)	Stratagene
DEPC	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
EDC	Sigma
Ethanol	Riedel de Haen
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth
Formaldehyd	J.T. Baker
Glycerol	J.T. Baker
Glycin	AppliChem
Glykogen	Arcos Organics
Hefeextrakt	AppliChem
HEPES	Sigma
Hydrochinon	Sigma
Isopropanol	Merck
Kristallviolett	Sigma
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
Mineralöl	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Fluka
Natriumhydroxid-Perlen	Applichem
Natriumhydroxid-Lsg. (1 mol/l)	J.T. Baker
Natriumpyrosulfit	Sigma
Propidiumiodid-Lösung	Roth
Rinder-Serum-Albumin (10 mg/ml)	New England BioLabs
Saccharose	Merck
SDS (Sodiumdodecylphosphat)	Merck
TEMED	Serva
Tris-HCl	Merck
TritonX 100	Gerbu
Trizma/Tris	Applichem
TRizol®	Invitrogen
Tryptone	AppliChem

#### 4.1.7 Zellkulturmaterialien

Amphotericin B	Gibco
Biocoll Separating Solution	Biochrom
CellTiter-Blue® Viability Assay	Promega
Dulbecco's-PBS	Gibco
Fötals-Kälber-Serum (FKS)	Gibco
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
McCoy's 5 A Medium	Gibco
MEM Medium	Gibco
Metafectene Transfektions-Reagenz	Biontex
100x Penicillin G /Streptomycin	Gibco
15 ml Reaktionsgefäße	BD-Biosciences

50 ml Reaktionsgefäße	BD-Biosciences
Humaner Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF)	Invitrogen
Humanes Interleukin-3 (IL-3)	Invitrogen
Humaner Stammzellofaktor (SCF)	Invitrogen
RPMI1640 Medium	Gibco
Serologische Pipetten	Sarstedt
Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	Gibco
„6-well“-Platten adhärenente Zellen	BD-Biosciences
„6-well“-Platten Suspensionszellen	Greiner
Zellkulturflaschen adhärenente Zellen	BD-Biosciences
Zellkulturflaschen Suspensionszellen	Greiner
Zellkultuschalen Ø 10 cm	BD-Biosciences

#### 4.1.8 Verbrauchsmaterialien

Einwegskalpelle	Feather
FACS-Röhrchen	BD-Biosciences
Falcon-Röhrchen 15 ml/50ml	Greiner
Filterpapier 3 MM	Whatman
Einwegspritzen (5, 10, 20, 100 ml)	BD-Biosciences
Glasflaschen (div. Größen)	Fisher Scientific GmbH
Klebeband	Tesa AG
Untersuchungshandschuhe	Meditrade
Labortücher	Kimberly-Clark
Nitrozellulosemembran	Scleicher&Schuell
Nitrilhandschuhe	Microflex
PCR-Tubes	Steinbrenner
Reaktionsgefäße 1.5/2 ml	Steinbrenner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastikküvetten	Greiner
Real time PCR Platten	Roche
Real time PCR Deckelstreifen	Roche
Röntgenfilme (Super RX)	Fujifilm
Sterilfilter	Sartorius
UV-Plastikküvetten	Eppendorf

#### 4.1.9 Enzyme und molekularbiologische Arbeitsmaterialien

BstU I	New England Biolabs
Hinf I	New England Biolabs
Taq I	New England Biolabs
EcoRI	New England Biolabs
HhaI	New England Biolabs
RNase, Dnase free	Sigma
DNeasy Blood and Tissue <sup>®</sup> Kit	Qiagen
GENECLEAN <sup>®</sup> Kit	Q-Biogene
GoldenGate <sup>®</sup> Methylierungschip	Illumina
HyperLadder I	BioLine
Mikrokokken Nuclease 200 U	Sigma
Orange G	J.T.Baker
Phosphodiesterase Typ II 10 U	Calbiochem
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy <sup>®</sup> Kit	Qiagen
Superscript III reverse Transkriptase	Invitrogen
Thermoprime Plus <sup>®</sup>	ABgene

Thermoscript® RT-PCR System	Invitrogen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction® Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification® Kit	Qiagen
QuantiFast™ SYBR® Green PCR Kit	Qiagen
QuantiTect® Kit	Qiagen
EpiTect® Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen
Western Lightning®	Perkin Elmer

#### 4.1.10 Geräte

Analysenwaage	Sartorius
Absorptionsmessgerät	BMG Labtechnologies
Bakterieninkubator	New Brunswick Scientific
Brutschrank	Heraeus
Eismaschine	Scotsman
FACSCanto II	Becton Dickinson
Gefrierschrank	Liebherr, Heraeus
Gel-Dokumentation	Herolab
Gelelektrophoresekammern	BioRad
Kühlschrank	Liebherr
LightCycler® 480	Roche
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop	Zeiss
Mikrowellengerät	Bosch
P/ACE™ MDQ Molecular Characterization System	Beckman Coulter
PCR-Maschine	Biozym
Photometer	Eppendorf
SDS-PAGE-Elektrophoresekammer	BioRad
Sterilbank	Heraeus
Spannungsquellen	Stratagene, Consort
Tank-Blot System	BioRad
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge	Eppendorf,
Transilluminator	HeroLab
Überkopfschüttler	Heidolph
Wasserbad	Julabo, Haake
Vortex	Heidolph
Z1-Zellcounter	Beckman Coulter

#### 4.1.11 Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Organismus	Verdünnung (Immuno-Blotting)	Epitop	Hersteller
anti-hDNMT1 (C-17)	Ziege	1:500	C-Terminus hDNMT1	Santa Cruz Biotechnology
anti-β-Actin (C4)	Maus	1:10000		Santa Cruz Biotechnology
anti-hCNT1 (AEI)	Kaninchen	1:80000	die 23 aminoproximalen Aminosäuren der hCNT1 Sequenz (NP_004204)	Dr. Maria Rius (DKFZ)

anti-hCNT3 (NTS)	Meer- schweinchen	1:80000	die 24 aminoproximalen Aminosäuren der hCNT3 Sequenz (NP_071410)	Dr. Maria Rius (DKFZ)
anti-Kaninchen IgG HRP-gekoppelt	Ziege	1:10000		Jackson Immuno Research
anti-Maus IgG HRP- gekoppelt	Ziege	1:10000		Jackson Immuno Research
anti-Ziege IgG HRP- gekoppelt	Esel	1:10000		Santa Cruz Biotechnology
anti-Meerschweinchen IgG HRP-gekoppelt	Ziege	1:10000		Jackson Immuno Research

#### 4.1.12 Verwendete Primer

Primername	Sequenz	Annealing Temperatur (°C)	Verwendungszweck
C1S2 sense	ATGGAATTTTTATGAAATTGAAATG	51	Satelliten-COBRA
C1S2 anti	CATTCCATTAATAATTCCATTC		
DAPK1 sense	AGTTTTAATAAAGGGTGTTTTTTTT	55	Bisulfit-Sequenzierung
DAPK anti	ACATCAATCTCCAATCCTTTAAAA		
HOXA4 sense	TACACTTCACAAATTAATAACCATAAACTC	57	HOXA4-COBRA/ Bisulfit- Sequenzierung
HOXA4 antisense	GTTGTTGTAG(CT)GGTAGGTGTTG		
Laminb1_11	CTGGAAATGTTTGCAATCGAAGA	60	Lamin B real Time-PCR
Laminb1_12	GCCTCCCATTGGTTGATCC		
LINE-1 sense	TTGAGTTGTGGTGGGTTTTATTAG	51	LINE-1-COBRA
LINE-1 anti	TCATCTCACTAAAAATACCAAACA		
MLF1 sense	TTTGGTTTAAATTTTGATTTTTTTT	56	Bisulfit-Sequenzierung
MLF1 anti	AACTACTATTCAACATCCTAAACA		
P15 outer sense	TAGGTTTTTTGGTTAGTTGAAAA	57	
P15 outer anti	CTCCTTCCTAAAAACCTAACTCAAC		P15-COBRA
P15 inner sense	TTTGTAGTTGGTTTTTTTATTTTGTTA	57	
P15 inner anti	AAACCTAACTCAACTTCATTACCCT		
RIL sense	TAGAGTT(CT)GGTTTAGGTT	52	RIL-COBRA/ Bisulfit-Sequenzierung
RIL anti	ACAAAAATCTAAATCCC		
TIMP-3 sense	AATCCCCCAAACCTCAACTAC	55	Bisulfit-Sequenzierung
TIMP-3 anti	TTTGTTTTTTTAGTTTTTTGTTTTT		
TIMP-3 RT sense	GCTGTGCAACTTCGTGGAGAGG	60	TIMP3 real Time-PCR
TIMP-3 RT anti	CTCGGTACCAGCTGGAGTAGCC		

#### 4.1.13 Lösungen

Name	Zusammensetzung
Blockpuffer (Immuno-Blotting)	5 % Magermilchpulver in 1x PBS
Bodipy-Lösung (je Einzelprobe)	0.3 mg Bodipy 33 µl HEPES-Puffer
CE-Trennpuffer	75 mM SDS 17 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH=9,0) 15% (v/v) Methanol
EDC-Lösung (je Einzelprobe)	11.2 mg EDC 32.5 µl HEPES-Puffer
HEPES-Puffer	0.8 M HEPES in ddH <sub>2</sub> O, pH=6.5
6x Ladepuffer	30% Glycerol 2 mg/ml Orange G 2% 1x TBE

MN/SPD-Lösung:	2.5 mU/µl Kalbs-Milz-Phosphodiesterase 150 mU/µl Microkokken Nuklease
MN/SPD Verdau-Puffer	250 mM HEPES 100 mM CaCl <sub>2</sub> · 2 ddH <sub>2</sub> O pH= 6.0 (eingestellt mit NaOH-Lösung)
10x TBE-Puffer	0.89 M Tris 0.89 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8.3
Transferpuffer	25 mM Borsäure (pH 8.8) 2 mM EDTA pH 8.0 1 mM DTT 20% Methanol (v/v)
10x Tris-Glycin Laufpuffer (1 Liter)	30.3 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS ad 1 l ddH <sub>2</sub> O
10x PBS	80 g NaCl <sub>2</sub> 2 g KCl 14.4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l ddH <sub>2</sub> O
Probenpuffer (6x Laemmli-Puffer)	2 ml 2 M Tris HCl pH 6.83. 2.06 g SDS 7.2 ml Glycerol 1 ml β-Mercaptoethanol 2.4 mg Bromphenolblau ad 20 ml ddH <sub>2</sub> O
Ponceau S Lösung	0.1% Ponceau S in 5% Essigsäure

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Allgemeine Labortechniken

#### 4.2.1.1 Extraktion genomischer DNA

Für die Extraktion genomischer DNA aus Zelllinien wurde das DNeasy<sup>®</sup> Tissue-Kit von Qiagen benutzt. Hierbei wurden je nach Wachstum der Zellen, maximal ca. 6x10<sup>6</sup> Zellen für die Extraktion aufgearbeitet. Bei der Gewinnung der DNA wurde nach dem mitgelieferten Handbuch (03/2004), bis auf folgende Modifikationen gearbeitet: Vor der Aufarbeitung der Proben wurde ein RNase-Verdau durchgeführt. Es wurden hierzu 10 µl RNase A (10 mg/ml) eingesetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde jeweils mit 100 µl Wasser (pH 7.5) eluiert und bei -20°C gelagert. Die Extraktion der genomischen DNA aus den Patientenproben (Knochenmark bzw. Blutproben) erfolgte in Kooperation mit der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg und wurde von Frau Diplom-Biologin Imke Bokelmann (Arbeitsgruppe Prof. Ullrich Mahlkecht) durchgeführt. Hierzu wurde das TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz von Invitrogen benutzt.

#### 4.2.1.2 Messung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentrationen wurden mittels Absorptionsspektrometrie bestimmt. Das bei einer Wellenlänge von 260 nm von der DNA-Lösung absorbierte ultraviolette Licht ist hierbei der DNA-Konzentration direkt proportional. Der  $OD_{260}$ -Wert von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Über den Extinktions-koeffizienten von  $A_{260/280}$  wurden Proteinkontaminationen nachgewiesen. Eine proteinfreie DNA-Lösung sollte ein Verhältnis von 1.8-2.0 aufweisen.

#### 4.2.1.3 Auftrennung und Visualisierung von DNA

Die Auftrennung der DNA erfolgte je nach erwarteten Bandengrößen in 1-3 prozentigen Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1xTBE eingewogen und anschließend in der Mikrowelle aufgeköcht, um die Agarose zu lösen. Die flüssige Agarose wurde auf etwa 50°C abgekühlt und mit 1.5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 50 ml TBE/Agarose versetzt, um die DNA später unter UV-Licht visualisieren zu können. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA und kann durch UV-Licht angeregt werden, so dass die DNA hellrot erscheint. Die DNA-Proben wurden für den Gellauf mit 6x Ladepuffer versetzt, um das Absinken der Proben in die Geltasche zu gewährleisten. In dieser Arbeit wurden 100 ml bis 250 ml Gele gegossen. Die für die Auftrennung der DNA benötigte Spannung war hierbei maximal 150 V.

#### 4.2.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) benutzt. Für die Extraktionen wurde eine Tischzentrifuge benutzt. Es wurden die im Handbuch (07/2002) auf Seite 23-24 beschriebenen Schritte 1-13 durchgeführt. Für die COBRA-Untersuchungen wurde immer mit 30 µl Gesamtvolumen eluiert.

#### 4.2.1.5 Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von DNA für die Derivatisierung der DNA für CE-Messungen wurde das GENE CLEAN® II Kit (Qbiogene) benutzt. Es wurde bis auf folgende Änderungen nach dem zugehörigen Handbuch (Revision # 1001-999-3E01) auf Seite 10-12 gearbeitet. In dem Schritt 6 wurden die Proben mind. für zwei Stunden auf einem Überkopfschüttler gemischt, um eine optimale Bindung der DNA an die Glasmilch zu erreichen. Zur Elution wurden zweimal 100 µl Wasser (pH 7.5) verwendet.

#### 4.2.1.6 Bisulfit-Behandlung von DNA

Über eine Bisulfit-Behandlung der DNA können methylierungsabhängige Polymorphismen in die DNA eingeführt werden. Dies ist die Grundlage für genspezifische Untersuchungen wie MSP, COBRA oder die Bisulfit-Sequenzierung. Bei der Bisulfit-Behandlung werden chemisch alle nicht methylierten Cytosinnukleotide zu Uracilnukleotiden deaminiert. Nach PCR-Amplifikation der zu untersuchenden Sequenzen wurden auf diese Weise alle ursprünglichen C:G Basenpaare umgewandelt in T:A Basenpaare. Nur methylierte Cytosine bleiben in der Behandlung erhalten, worauf letztlich die Unterscheidbarkeit von methyliert zu nicht methyliert in den erwähnten Methoden beruht. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden für die Bisulfit-Behandlung benutzt. Für die Untersuchungen der Patientenproben sowie den myeloiden Zelllinien wurde das EpiTect<sup>®</sup>-Kit (Qiagen) benutzt. Für die Charakterisierung der verschiedenen DNA-Methyltransferase-Inhibitoren wurde ein eigenes Protokoll verwendet:

Ablauf der Bisulfit-Behandlung:

- Lösen von maximal 800 ng DNA in 50 µl ddH<sub>2</sub>O
- Hinzufügen von 5.5 µl frisch angesetzter 3M NaOH-Lösung und Inkubation für 20 Minuten bei 37° C
- Ansetzen einer 10 mM Hydrochinon-Lösung
- Ansetzen einer Hydrochinon-Bisulfit-Lösung: Lösen von 2.16 g Natriumbisulfit in 3.5 ml ddH<sub>2</sub>O. Einstellen des pH-Werts auf 5.0 mit 10M NaOH-Lösung. Es wurden 250 µl der Hydrochinon-Lösung zu den der Bisulfit-Lösung hinzugegeben. Danach wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf insgesamt 5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, um die Hydrochinon-Bisulfit-Lösung zu erhalten.
- 600 µl der Hydrochinon-Bisulfit-Lösung wurden zur denaturierten DNA gegeben und kurz durch Vortexen gemischt.
- Proben wurden mit 200 µl Mineralöl überschichtet
- Inkubation der Proben für 14 Stunden bei 55°C im Wasserbad
- Abpipettieren des Mineralöls
- Aufreinigung der DNA von dem Bisulfit wie unter 4.2.1.5 beschrieben
- Zur 100 µl DNA-Lösung der ersten Elution wurden 11 µl einer 3 M NaOH-Lösung gegeben. Inkubation für 20 Minuten bei 37°C führte zur Desulfonierung.

- Es wurden nun 2 µl Glykogen als Träger hinzugefügt
- Ausfällen der DNA: Es wurden 35 µl einer 10 M Ammoniumacetat-Lösung und drei Volumina eiskalter 100% Ethanol zugegeben
- Es wurde über Nacht oder für mindestens 1 Stunde bei -20°C gefällt
- Das Abzentrifugieren der DNA erfolgte bei maximaler Umdrehungszahl für 30 min in einer Tischzentrifuge
- Der Überstand wurde verworfen
- Danach wurde das Präzipitats mit 70% Ethanol gewaschen
- Hiernach wurde das Präzipitat nach erneutem Abzentrifugieren bei maximaler Umdrehungszahl und Abpipettieren des Überstandes luftgetrocknet
- Das Lösen des Präzipitats erfolgte in 20 µl 0.5 mM TrisCl (pH 8,0)
- Die behandelte DNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 4.2.1.7 Restriktionsverdau von DNA mit Endonukleasen

Es wurden verschiedene Restriktionsendonukleasen je nach experimentellem Ansatz verwendet. Es wurde bei allen Ansätzen 20 U des jeweiligen Enzyms eingesetzt. Der Verdau wurde für mindestens 3 Stunden inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einer PCR-Maschine mit beheiztem Deckel. Verwendete Restriktionsansätze dieser Arbeit:

Restriktionsansatz für Enzyme ohne BSA:

30 µl DNA-Lösung  
3.6 µl zugehöriger NEB-Puffer (10X)  
2 µl Enzym (entspricht 20 U)

Restriktionsansatz für Enzyme mit BSA:

30 µl DNA-Lösung  
4 µl zugehöriger NEB-Puffer (10X)  
4 µl BSA (1 mg/ml)  
2 µl Enzym (entspricht 20 U)

Restriktionsansatz für den Kontrollverdau von Plasmid-Präparationen zur Sequenzierung:

2 µl Plasmidlösung  
1.5 µl EcoRI-Puffer  
1 µl EcoRI-Enzym (entspricht 20 U)  
10.5 µl steriles destilliertes Wasser

#### 4.2.1.8 Präparation von RNA

RNA wurde mit Hilfe des Rneasy Kits (Qiagen) nach dem mitgelieferten Handbuch präpariert. Für die Homogenisierung der lysierten Zellen wurden QIAshredder-Säulchen benutzt. Nach dem Bindungsschritt der DNA auf der Säule (Schritt 4 im Handbuch) wurde ein DNA-Verdau auf der Säule durchgeführt. Hierzu wurde mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) gearbeitet. Die RNA wurde in jeweils 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei –80°C gelagert. RNA aus dem Patientenproben wurde in Kooperation mit der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg von Frau Diplom-Biologin Imke Bokelmann (Arbeitsgruppe Prof. Ullrich Mahlkecht) präpariert. Hierzu wurde das TRIzol®-Reagenz benutzt.

#### 4.2.1.9 cDNA Synthese

Die Synthese der cDNA wurde mit der reversen Transkriptase Superscript III oder dem Thermoscript® RT-PCR System durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 3 µg an RNA eingesetzt. Es wurde jeweils nach dem Handbuch gearbeitet.

#### 4.2.1.10 Real-time-PCR

Die Real-Time PCR-Reaktionen für die Untersuchung der Expression von *TIMP-3* wurden in PCR-Platten mit 388 Vertiefungen durchgeführt. Die Ansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt, wobei das QuantiFast™ SYBR® Green PCR Kit benutzt wurde. Die jeweiligen Primer wurden jeweils in einer Endkonzentration von 1 pmol/µl eingesetzt. Jede zu untersuchende Probe wurde in Triplikaten angesetzt und gemessen. In dem Programm wurden jeweils 50 Zyklen (je 15 Sekunden 95°C, 1 min 60°C) für die Amplifikation programmiert. Es wurde ein LightCycler® 480 (Roche) für die Experimente benutzt. Die Daten wurden mit der LightCycler® 480 Software (Version 1.2.0.0625) ausgewertet. Zur Normalisierung wurde die *Lamin b1*-Expression verwendet. Die Expressionellen Untersuchungen der Patientenproben wurde im Rahmen der Kooperation mit der Universitätsklinik Heidelberg von Frau Diplom-Biologin Imke Bokelmann (Arbeitsgruppe Prof. Mahlkecht) durchgeführt (3). Hierzu wurde das TaqMan-System mit etablierten Assay-Systemen (Applied Biosystems) verwendet:

*GAPDH*: assay ID 4333764F  
*HOXA4*: assay ID Hs00427089\_m1  
*RIL*: assay ID Hs00184792\_m1

#### 4.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für alle COBRA-Experimente wurden genomische Sequenzen mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert. Für die PCR wurde das Thermoprime-Plus Taq-Polymerase-System benutzt. Der PCR-Ansatz wurde immer auf Eis pipettiert. Für eine COBRA wurden ca. 20-30 ng genomische DNA pro Reaktion eingesetzt.

Einzelansatz:

Reddy-Mix (10x)	2	µl
Primer A (10 mM)	2	µl
Primer B (10 mM)	2	µl
dNTP's (10 mM)	2	µl
ddH <sub>2</sub> O	9.7	µl
Thermoprime	0.3	µl
DNA-Lösung	2	µl
Gesamtvolumen	20	µl

#### 4.2.1.12 Präparation von Zelllysaten

Für die Präparation von Zelllysaten wurden die adhärent wachsenden Zellen mit einem Zellschaber von dem Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Zellen die in Suspension in Kultur gehalten wurden, konnten direkt überführt werden. Die Zellen wurden dann für 5 Minuten bei 800 rpm abzentrifugiert und das Medium wurde verworfen. Danach wurde einmal in eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und dann erneut für 5 min bei 800 rpm abzentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 200 µl eiskaltem PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 Sekunden im Ultraschallbad sonifiziert. Hiernach wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Nach einer weiteren Zentrifugation (13000 rpm) für fünf Minuten in einer Kühlzentrifuge (4°C), wurde der Überstand, der alle löslichen Protein enthielt in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lysate bei -80°C gelagert.

#### 4.2.1.13 Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode

Die Konzentrationen der Proteinlysate wurden nach der Bradford-Methode bestimmt. Das Bradford-Reagenz enthält in saurer Lösung den Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau G250, dessen Absorptionsmaximum sich durch Bindung an Proteinen von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Die Veränderung des Absorptionsmaximums kommt dabei durch Bindung des Farbstoffs an basische (speziell Arginin) und aromatische Aminosäuren der Proteine zustande. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine

Eichgerade mit bekannten Konzentrationen an Rinder-Serum-Albumin (BSA) erstellt.  
Durchführung eines Probenansatzes:

2 µl	Proteinlösung
798 µl	Wasser
200 µl	Bradford-Reagenz (Biorad)

Nach einer Inkubationszeit von ca. 3 Minuten wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Anhand der aus der BSA-Standardreihe erstellten Eichgerade wurden die Konzentrationen der untersuchten Proben ermittelt.

#### 4.2.1.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli

In der SDS-Page werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteine werden durch Inkubation mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und Substanzen, die die Schwefelbrücken reduzieren können ( $\beta$ -Mercaptoethanol) vollständig denaturiert und dissoziiert. Das SDS bindet an die hydrophoben Regionen des Proteins und verschafft ihnen somit eine einheitliche, von der Größe des Proteins abhängige Ladung. Somit wird ein direkter Zusammenhang zwischen Ladung und Größe der Proteine erzielt. Die Proteine können danach in einer Gelmatrix aus Polyacrylamid im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Hierbei wird ein zweiphasiges Acrylamidgel benutzt. In dem niedrig konzentrierten Sammelgel (5% Acrylamid) erfolgt die Focussierung, da hier die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine sich nicht signifikant unterscheidet. Im Trenngel (5-10% Acrylamid) werden die Proteine danach nach ihrer Größe aufgetrennt. Für den Nachweis von DNMT1 in Proteinlysaten wurden ausschließlich Trenngele mit einer 8% Acrylamidkonzentration benutzt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde jeweils in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde anschließend mit einem Tris-Glycin-Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben wurden mit 6X-Laemmli SDS-Proben-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Hiernach wurden sie auf Eis abgekühlt und anschließend für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Es wurden jeweils nach den Ergebnissen der Bradford-Proteinbestimmung (4.2.1.13) gleiche Mengen auf das Gel aufgetragen. Für den Nachweis von DNMT1 in den humanen Zelllinien wurden jeweils 150 µg an Protein geladen. Für den Nachweis von DNMT1 in den MDCK-Zelllinien wurden 200 µg an Protein aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei einem kleinen Gel (14 cm x 8.5 cm) bei 25 mA für ca. 1 Stunde. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel wurde für den Proteintransfer im Western-Blot-Verfahren (4.2.1.15) verwendet.

Die SDS-PAGE-Versuche für den Nachweis der CNT-Proteine wurden von Frau Dr. Maria Rius im Deutschen Krebsforschungszentrum (Abteilung Prof. Keppler) im Rahmen einer Kooperation durchgeführt.

Sammelgel (5%)	
ddH <sub>2</sub> O	3.4 ml
30% Acrylamidlösung	0.83 ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.63 ml
10% SDS	0.05 ml
10% Ammoniumpersulfat	0.05 ml
TEMED	5 µl

Trenngel (8%)	
ddH <sub>2</sub> O	9.3 ml
30% Acrylamidlösung	5.3 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	5.0 ml
10% SDS	0.2 ml
10% Ammoniumpersulfat	0.2 ml
TEMED	15 µl

#### 4.2.1.15 Immunoblotting-Verfahren (Western-Blot)

In dem Immunoblotting-Verfahren wird ein in der SDS-Page aufgetrenntes Proteingemisch durch das Anlegen von elektrischem Strom vom Gel auf eine Trägermembran (z.B. aus Nitrocellulose) übertragen. Im anschließenden immunologischen Nachweis kann dann ein Protein aus diesem Proteingemisch durch einen spezifisch bindenden Antikörper nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde ein Tank-Blot-System (Bio-Rad) verwendet:

Vor dem Transfer wurden die Gele für mindestens 5 Minuten im Transferpuffer equilibriert. Während dieser Zeit wurden für jedes Gel 2-3 MM Filterpapiere in der Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere und die Elektrophorese-Schwämme wurden dann ebenfalls in Transferpuffer gelegt. Anschließend wurde die Transfereinheit in der folgenden Reihenfolge zusammengebaut:

Anodenseite > Schwamm > 3 MM Filterpapier > Nitrozellulosemembran > Polyacrylamidgel > 3 MM Filterpapier > Schwamm > Kathodenseite

Die Transfereinheit wurde dann in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer überführt, nachdem alle Komponenten gründlich mit Transferpuffer getränkt worden waren. Der Transfer erfolgte dann bei 400 mA für insgesamt 75 Minuten. Nach dem Transfer wurden die auf dem Filter überführten Proteine in Ponceau-S-Lösung für 1 Minute gefärbt. Nach mehrmaligem Entfärben des Hintergrundes mit Wasser wurde so die Effizienz des Transfers überprüft. Die Membran wurde daraufhin über Nacht in 15 ml Blocklösung bei 4°C zum Absättigen der nicht besetzten Bindestellen der Membran inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper (verdünnt in Blocklösung) auf den Filter gegeben und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Lösung mit dem Erstantikörper abgenommen und die Membran wurde für 3x20 Minuten mit PBS auf dem Schüttler gewaschen. Daraufhin wurde dann der Zweitantikörper in Blockerlösung auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur auf

dem Schüttler, wurde der Blot abermals für 3x20 Minuten mit PBS gewaschen. Der Nachweis der enzymatischen Aktivität des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers erfolgte über die ECL (enhanced chemiluminescence)-Reaktion nach den Angaben des Herstellers (Western Lightning®; Perkin Elmer) mit Hilfe von Röntgenfilmen.

#### 4.2.2 Techniken für Methylierungsuntersuchungen

##### 4.2.2.1 Enzymatische Hydrolyse und Derivatisierung von genomischer DNA für die micellare Kapillar-Elektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz (CE-LIF)

Für die Bestimmung der genomweiten DNA-Methylierung wurde eine Methode benutzt, die auf micellarer Kapillar-Elektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz (CE-LIF) beruht. Die DNA wurde hierzu mit einem Enzymmix zu 2'-Deoxynukleosid-3'-Phosphaten verdaut und danach mit einem Fluoreszenzmarker (Bodipy FL EDA, Molecular Probes) kovalent verknüpft. Dies ermöglichte die Detektion der markierten Einzelnukeotide durch laserinduzierte Fluoreszenz nach der Auftrennung mit der micellaren elektrokinetischen Kapillar-Elektrophorese (221). Bei der Kapillar-Elektrophorese werden geladene Proben in einer Kapillare (Innendurchmesser: 50 µm) elektrophoretisch aufgetrennt. Die micellare elektrokinetische Kapillar-Elektrophorese ermöglicht die Auftrennung von ungeladenen Molekülen. Hierbei befindet sich in dem Puffer SDS, das bei einer Konzentration von 200 mM Micellen bildet. Die gelösten markierten Einzelnukeotide interagierten aufgrund der unterschiedlichen Lipophilie mit den Micellen. Nukleotide die lipophiler sind und dadurch stärker mit den Micellen interagierten, erreichten den Detektor später, als diejenigen die zu einem geringeren Grade wechselwirkten. Somit ist diese Methode eine Mischung aus Elektrophorese und Chromatographie. Am Detektor wurden die fluoreszenzmarkierten Nukleotide mit einem Laser (Anregungswellenlänge: 488 nm) angeregt und die induzierte Fluoreszenz konnte bei einer Wellenlänge von 510 nm detektiert und am Computer ausgewertet werden. Vorgehensweise bei der CE-LIF in Einzelschritten:

##### 1) Enzymatische Hydrolyse der DNA

- Ca. 3 µg genomischer DNA wurden mit angelegtem Vakuum einrotiert
- 3 µg trockene DNA wurden in 5 µl ddH<sub>2</sub>O wieder gelöst
- Zugabe von 5 µl der Verdauungslösung und Inkubation für 3 Stunden bei 37°C

Verdaulösung:  
5 µl MN/SPD-Lösung  
1 µl MN/SPD Verdau-Puffer

MN/SPD-Lösung:  
2.5 mU/µl Kalbs-Milz-Phosphodiesterase  
150 mU/µl Microkokken Nuklease

MN/SPD Verdau-Puffer  
250 mM HEPES  
100 mM CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O  
pH= 6.0 (eingestellt mit NaOH-Lösung)

## 2) Derivatisierung der Einzelnukleotide

Folgende Komponenten wurden danach zu den 10 µl Nukleotidlösung der Hydrolyse gegeben. Der Derivatisierungsansatz inkubierte für 25 Stunden bei 25°C in einem Eppendorf Thermomixer. Nach der Derivatisierung wurden die Proben im Dunkeln bei -20°C gelagert. Zur CE-Messung wurden die Proben 1:100 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

Ansatz:

Nukleotidlösung	10 µl
Bodipy- Lösung	15 µl
EDC- Lösung	15 µl
HEPES-Puffer	10 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Lösungen:

HEPES-Puffer: 0.8 M HEPES in ddH<sub>2</sub>O, pH=6.5

Bodipy-Lösung: 0.3 mg Bodipy in 33 µl 0.8 M HEPES-Lösung

EDC-Lösung: 11.2 mg EDC in 32.5 µl 0.8 M HEPES-Lösung

## 3) Kapillar-Elektrophorese

Die Messung mittels Kapillar-Elektrophorese wurde mit dem P/ACE™ MDQ Molecular Characterization System (Beckman Coulter) durchgeführt. Die Trennung erfolgte in einem Puffer mit 75 mM SDS in 17 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH=9.0) mit 15% (v/v) Methanol. Benutzt wurde eine Kieselglas-Kapillare mit einer Gesamtlänge von 64 cm und einen Innendurchmesser von 50 µm. Die Trennung erfolgte mit einem Proben-Injektionsdruck von 20 p.s.i bei 25°C und einer anliegenden Spannung von 20 kV. Die Nukleotide wurden über Laser induzierte Fluoreszenz mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm gemessen. Die Elektropherogramme wurden mit der 32 Karat Software (Version 7.0) (Beckman Coulter) ausgewertet.

### 4.2.2.2 COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)

Die COBRA-Methode (222) beruht auf der chemischen Modifizierung der DNA nach einer Bisulfit-Behandlung (siehe 4.2.1.6). Die Methode ermöglicht die Untersuchung des

Methylierungszustandes von ausgewählten CpG-Dinukleotiden einer bestimmten Sequenz in der gesamten DNA der Probe. Für die COBRA-Untersuchungen wurde zuerst eine PCR mit Bisulfit-behandelter DNA als Matrize durchgeführt (siehe 4.2.1.6). Die für die jeweiligen Sequenzen benutzten Primer wurden so gestaltet, dass diese nur eine Sequenz amplifizieren können, wenn die DNA vorher Bisulfit-behandelt wurde. D.h. bei Gestaltung der 3'-Bereiche der Primer wurden in die genomische DNA eingefügte Uracil berücksichtigt. Falsch-positive Ergebnisse wurden so verhindert, da mit nicht behandelter genomischer DNA als Matrize, diese Primer keine Sequenz amplifizieren konnten. Soweit nicht anders angegeben wurden alle COBRA-Primer in dieser Arbeit mit Hilfe der online Software der Internetseite: <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html> erstellt. Die Primer wurden daraufhin mit Hilfe einer Gradienten-PCR hinsichtlich ihrer Bedingungen in der PCR optimiert und ihre Spezifität auf genomischer und Bisulfit-behandelter DNA getestet. In der COBRA wurde jeweils nach der PCR das Produkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf die erwartete Bandengröße hin überprüft. Danach wurde das Produkt aus dem Gel extrahiert (siehe 4.2.1.4). Es erfolgte ein Restriktionsverdau der Sequenz mit einer Endonuklease, welche in der Sequenz des Restriktionsschnittes ein CpG-Dinukleotid enthält. Die Schnittstelle ist nach der Bisulfit-Behandlung nur erhalten geblieben, wenn eine Methylierung der genomischen Sequenz vorlag. Nach elektrophoretischer Auftrennung des Verdau im Agarosegel, konnten aus den Intensitäten der Fragmente, die keine Schnittstelle mehr enthalten in Beziehung zu den geschnittenen Fragmente, Informationen über den Methylierungszustand aller untersuchten Allele des Zielgens gewonnen werden. Je mehr Fragmente nicht geschnitten wurden, desto weniger methyliert war die Gensequenz in der untersuchten Probe. Die in dieser Arbeit im einzelnen für die COBRA verwendeten Restriktionsenzyme waren: BstU I (p15), Hinf I (C1S2 und LINE-1), Taq I (HOXA4) und Hha I (RIL)

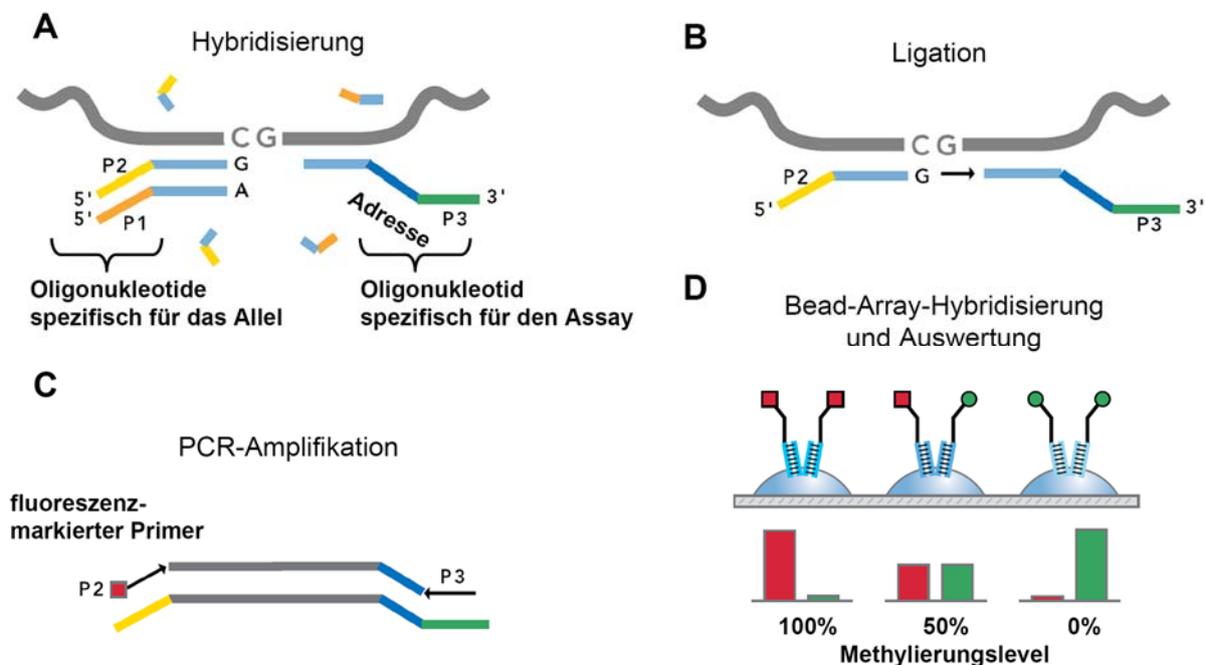
### 4.2.2.3 Bisulfit-Sequenzierung

Die Bisulfit-Sequenzierung ermöglicht die detaillierte Methylierungsuntersuchung einer längeren DNA-Sequenz. Bei dieser Methode kann jedes CpG-Dinukleotid einer Sequenz auf eine Methylierung hin untersucht werden. Bezogen auf die Sequenz hat die Methode somit die größte Auflösung. Der Nachteil der Methode liegt darin, dass jede einzelne Sequenzierung ein Epiallel aus der gesamten Population repräsentiert. Um daher statistische Aussagen über die gesamte DNA der Probe machen zu können, müssen daher entsprechend viele Allele sequenziert werden. Für die Bisulfit-Sequenzierung wurde eine PCR (siehe 4.2.1.11) auf vorher deaminierter, genomischer DNA (siehe 4.2.1.6) durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (4.2.1.3) und aus dem Gel ausgeschnitten. Daraufhin wurde das zu

untersuchende Reaktionsprodukt mit Hilfe des TA-TOPO Cloning Kit (Invitrogen) nach den Anweisungen des Herstellers subkloniert. Es wurde dann plasmidiale DNA aus gewachsenen Einzelkolonien präpariert und mit Hilfe eines Restriktionsverdau dahingehend überprüft, ob sie das gewünschte Fragment enthielten. Es wurden dann für jede subklonierte PCR-Reaktion Plasmide aus mindestens fünf Einzelklonen zur Sequenzierung verschickt. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

#### 4.2.2.4 Array-basierte Untersuchung der Methylierung von Einzelgenmarkern

Für die Array-basierte Untersuchung der Methylierung von Einzelgenmarkern wurde der GoldenGate<sup>®</sup>-Assay (Cancer Panel I) kombiniert mit dem BeadArray<sup>™</sup>-System (jeweils von der Firma Illumina) benutzt. Mit dieser Technologie kann in gemultiplexten Einzelassays der Methylierungszustand von 1505 CpG-Dinukleotiden quantifiziert werden. Die untersuchten CpG-Dinukleotide repräsentieren hierbei insgesamt 807 krebsbezogene Einzelgene. Die Methode beruht auf der Konvertierung der genomischen Proben-DNA nach einer Bisulfit-Behandlung. Nach der Konvertierung der unmethylierten Cytosine zu Uracil werden vom Methylierungszustand abhängige Polymorphismen an den CpG-Dinukleotiden in die DNA eingeführt. Hier bleiben die methylierten Cytosine nach der Behandlung erhalten, wobei die nicht methylierten zu Uracil umgewandelt werden können. Danach werden allelspezifische (von der Methylierung am Zielort abhängig) und assaypezifische Oligonukleotide mit der



**Abbildung 28.** GoldenGate<sup>®</sup>-Assay. Schematische Darstellung der Abläufe nach der Bisulfit-Konvertierung der genomischen DNA. (A) Hybridisierungsschritt der Oligonukleotide, spezifisch für das Allel bzw. für den jeweiligen Assay. (B) Ligation der beiden Oligonukleotide. (C) PCR-Amplifikationsschritt mit fluoreszenzmarkierten Primern. (D) PCR Produkte hybridisieren an den entsprechenden Beads. Der Methylierungszustand des Markergens kann dann über die Auswertung der Fluoreszenz ausgewertet werden.

genomischen DNA hybridisiert (Abb. 28A). Nach einer Ligation dieser beiden Oligonukleotide (Abb. 28B), bilden diese nun das DNA-Template für einen PCR-Amplifikationsschritt (Abb. 28C). Bei dieser PCR-Amplifikation werden fluoreszenzmarkierte PCR-Primer verwendet. Die Reaktionsprodukte können dann über eine in den amplifizierten Fragmenten enthaltene Adresse an Beads, spezifisch für die jeweiligen Einzelassays hybridisieren (Abb. 28D). Aus dem Verhältnis der Fluoreszenzsignale kann dann die Methylierung bestimmt werden. Für die Auswertung der Daten wurde die BeadStudio Software (Version 3) von Illumina benutzt. Die Hybridisierung, PCR-Amplifikation, und die Bildauswertung der Bead-Arrays wurde von der Genomics und Proteomics Core Facility des DKFZ durchgeführt.

#### 4.2.3 Zellkulturtechniken

##### 4.2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungs-Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer S2-Werkbank durchgeführt. Alle Materialien für die Zellkultur waren steril verpackte Einmalmaterialien. Alle Medien sowie das PBS wurden vor dem Gebrauch auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

##### 4.2.3.2 Kultivierung der HCT116-Zellen

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte in McCoy's 5A Medium (mit 2 mM Glutamin, 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FKS) in oberflächenbehandelten Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche: 25 cm<sup>2</sup>).

##### 4.2.3.3 Kultivierung der TK-6, HEL, HL-60 und K562-Zellen

Diese in Suspension wachsenden Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium (mit 2 mM Glutamin, 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FKS, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin) in Kultur gehalten. Es wurden unbehandelte Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche: 25 cm<sup>2</sup>) für Suspensionszellen benutzt.

##### 4.2.3.4 Kultivierung der Madin-Darby canine kidney (MDCK)-Zelllinien

Die MDCK-Zellen wurden in MEM (minimum essential medium) (mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin) in Kultur gehalten. Die Kultivierung der MDCK-Zelllinien wurde im Rahmen des Kooperationsprojektes von Frau Dr. Maria Rius (DKFZ, Abteilung Prof. Keppler) durchgeführt.

#### 4.2.3.5 Kultivierung primärer Zellen aus dem Knochenmark von AML/MDS-Patienten

Primäre Knochenmarkszellen aus den Patienten wurden nach der Entnahme in RPMI1640 Medium (mit 2 mM Glutamin, 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FKS, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin und einer Kombination aus den Wachstumsfaktoren IL-3 + SCF (jeweils 20 ng/ml) und GM-CSF (100 ng/ml) (223, 224)) kultiviert.

#### 4.2.3.6 Passagieren der Zelllinien

Zum Passagieren von adhärent wachsenden Zellen wurden die konfluent gewachsenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und für ca. 2 bis 5 Minuten mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (1x) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen von der Zellkulturflasche gelöst. Nach Zugabe von 5 ml frischem Medium wurden die Zellen durch mehrfaches Pipettieren vereinzelt. Es wurde nun 1 ml dieser Zellen (ungefähr  $1 \times 10^6$  Zellen) zu 6 ml frischen Medium in eine neue Zellkulturflasche gegeben.

Die in Suspension wachsenden Zellen wurden mit Medium in ein steriles Falcon-Gefäß überführt und abzentrifugiert (4 Minuten 900 rpm, RT). Das alte Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 10 ml frischem Medium durch Pipettieren vereinzelt. Ein Milliliter dieser Zellen (ungefähr  $1 \times 10^6$  Zellen) wurde dann in 8 ml frisches Medium in einer neuen Zellkulturflasche gegeben. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage.

#### 4.2.3.7 Bestimmung der Zellzahl

Für die Zellzahl-Bestimmung wurden Zellen in Suspension in einer Verdünnung von 1:40 mit Hilfe eines Z1-Zellcounter (Beckman Coulter) gezählt. Als untere Ausschlussgrößen wurden hierbei 5 µm gewählt.

#### 4.2.3.8 Behandlung und Ernte von Zellen

Beim Passagieren der Zellen für eine Behandlung wurde der Zelltiter bestimmt und dann die gewünschte Menge an Zellen in frischem Medium in die Zellkulturflasche überführt. Die Behandlung erfolgte bei Suspensionszellen direkt nach dem Aussäen der Zellen. Das 5-Azacytidin wurde hierbei aus einer sterilen 0.5 mM Stammlösung bis zur gewünschten Endkonzentration direkt mit einer Pipette ins Medium gegeben. Bei den adhären Zellen wurden die Zellen für 24 Stunden anwachsen gelassen. Die Zellen wurden darauf im Brutschrank für die jeweilige Behandlungszeit ohne weitere Behandlung oder einen

Mediumwechsel wachsen gelassen. Nach der Inkubationszeit wurden die Suspensionszellen mit Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 4 Minuten bei 900 rpm abzentrifugiert. Das alte Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden in 5 ml PBS gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren (4 Minuten bei 900 rpm), wurde das PBS abgenommen und die Zellen wurden in einem Dewar mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung lagerten die Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Zum Ernten der adhären Zellen wurden sie mit Hilfe eines Zellschabers im Medium abgelöst. Dann wurden sie in ein Falcon-Gefäß überführt, abzentrifugiert (4 Minuten bei 900 rpm) und das alte Medium wurde verworfen. Nach dem Waschen in 5 ml PBS und erneutem Abzentrifugieren (4 Minuten bei 900 rpm), wurde das PBS abgenommen. Die Zellsedimente wurden dann in einen Dewar mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Zellpellets lagerten bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank.

#### 4.2.3.9 Bestimmung der IC<sub>50</sub> Konzentrationen

Die IC<sub>50</sub> Konzentrationen für die Behandlung mit 5-Azacytidin wurden über die Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des CellTiter-Blue Viability Assay (Promega) durchgeführt. Diese Methode beruht auf eine wässrige Resazurinlösung, einem ungiftigen, blauen Redoxfarbstoff. Dieser wird entsprechend zu ihrer proliferativen Aktivität und der Viabilität der Zellen allmählich durch NADPH/NADH-abhängige Dehydrogenasen zum pinkfarbenen, fluoreszierenden Resorufin reduziert. Die entstehende Farbentwicklung kann dann bei 570/600 nm spektrophotometrisch ausgewertet werden. Die gemessene Absorption ist hierbei proportional zur der Anzahl der lebenden Zellen und somit zur Zellviabilität. Die Versuche wurden wie in dem Handbuch des Herstellers beschrieben durchgeführt. Die Versuche wurden mit jeweils 15000 Zellen pro Ansatz in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Dabei war jeder Ansatz auf der Platte dreimal vorhanden. Für die Bestimmung der IC<sub>50</sub> Konzentrationen wurden die Zellen für 72 Stunden behandelt. Es wurde für die Bestimmung der IC<sub>50</sub> Konzentrationen ein Konzentrationsbereich von 500-10000 nM 5-Azacytidin untersucht. Die Versuche wurden durch Absorptionsmessungen bei 560 nm und 595 nm ausgewertet. Die IC<sub>50</sub> Konzentrationen wurden aus den Ergebnissen von mindestens vier unabhängigen Versuchen festgelegt.

Die Versuche zur Zellviabilität der MDCK-Zelllinien führte Frau Dr. Maria Rius (DKFZ; Abteilung Prof. Keppler) im Rahmen einer Kooperation durch.

#### 4.2.3.11 Stabile Expression der CNT-Transporter in MDCK-Zellen

Die stabil-transfizierten CNT-MDCK-Zelllinien wurden im Rahmen einer Kooperation von Frau Dr. Maria Rius (DKFZ; Abteilung Prof. Keppler) etabliert. Die MDCK-Zellen wurden hierzu mit dem pcDNA3.1(+)-*hCNT1* Konstrukt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Marçal Pastor-Anglada (Universität Barcelona, Spanien)) bzw. mit dem pcDNA3.1(+)-*hCNT3* Konstrukt, oder dem leeren Vektor mit Hilfe des Metafectene Transfektions-Reagenz (Biontex) transfiziert. Das pcDNA3.1(+)-*hCNT3* Konstrukt wurde hergestellt durch die Klonierung der *hCNT3* cDNA (NCBI: NM\_022127) in den pcDNA3.1(+) Expressionsvektor (Invitogen). Stabile Transfektanten wurden in Medium mit G418 (0.5 mg/ml) selektioniert. Die Resistenten Klone wurden mit Hilfe der Immunoblotting-Methode und der Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf die Expression von *hCNT1* bzw. *hCNT3* hin untersucht.

#### 4.2.3.12 Untersuchungen der zellulären Aufnahme verschiedener radioaktiv-markierter Nukleoside

Die Versuche zur Untersuchung der Aufnahme verschiedener Nukleoside wurde im Rahmen einer Kooperation von Frau Dr. Maria Rius (DKFZ; Abteilung Prof. Keppler) durchgeführt. MDCK-Zelllinien wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. Nach einer Wachstumszeit von 24 Stunden hatten die Zellen die Konfluenz erreicht und wurden für weitere 24 Stunden mit 10 mM Natriumbutyrat induziert, um die Expression des rekombinanten Proteins zu verstärken. Für die Untersuchungen der Aufnahme wurden zwei verschiedene Puffer verwendet. Für die  $\text{Na}^+$ -abhängige Aufnahme wurde ein  $\text{Na}^+$ -haltiger Puffer (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 10 mM HEPES, pH 7.5) verwendet. In dem  $\text{Na}^+$ -freien Puffer wurde NaCl durch equimolare Konzentrationen an Cholinchlorid ersetzt. Vor den Aufnahmeversuchen wurden die Zellen dreimal mit  $\text{Na}^+$ -freiem Puffer gewaschen, bevor die Zellen mit jeweils 1 ml  $\text{Na}^+$ -haltigem Puffer mit den entsprechenden Substraten bei 37°C inkubiert wurden. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen erneut mit eiskaltem  $\text{Na}^+$ -freiem Puffer gewaschen. Die intrazelluläre Radioaktivität wurde mit Hilfe der flüssigen Szintillationsmessung bestimmt, nachdem die Zellen mit 0.2% SDS lysiert wurden.

#### 4.2.3.10 Weichagar-Koloniebildungstest

Viele Krebszelllinien wie z.B. die HCT116-Zellen besitzen die Eigenschaft des verankerungsunabhängigen Wachstums. D.h. sie können im Gegensatz zu nicht krebsartig veränderten Zellen unabhängig von einer Trägermatrix im Weichagar Kolonien bilden. Um die wachstumshemmende Wirkung der DNA-Methyltransferase-Inhibitoren auf Krebszellen zu testen, wurde das verankerungsunabhängige Wachstum im Agar untersucht. Hierzu

wurden jeweils 20000 Zellen pro Versuchsansatz in einer 6 cm durchmessenden Kulturschale in 0.3% Agarose ausgesät. Diese niedrigprozentige Agaroseschicht mit den Zellen wurde über eine Schicht aus 0.5% Agarose gegossen. Ansatz für die obere und untere Schicht eines Koloniebildungstests:

Untere Schicht (für 5 Ansätze):

FKS	3	ml
Penicillin G (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)	0.15	ml
Amphotericin B (250 µg/ml)	0.15	ml
McCoy's 5A Medium	9.2	ml
3% Agarose in H <sub>2</sub> O angesetzt (steril)	2.5	ml
Gesamt::	15	ml (5 Ansätze jeweils 3 ml)

Obere Schicht (für 5 Ansätze):

FKS	1.5	ml
Penicillin G (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)	0.075	ml
Amphotericin B (250 µg/ml)	0.075	ml
McCoy's 5A Medium	5.1	ml
3% Agarose in H <sub>2</sub> O angesetzt (steril)	0.75	ml
Zellsuspension (1x10 <sup>6</sup> /ml)	0.1	ml
Gesamt::	7.6	ml (5 Ansätze jeweils 1.5 ml)

Alle benutzten Inhaltsstoffe, bis auf die 3% Agarose wurden vor dem Gießen der Schichten im Wasserbad auf 45°C vorgewärmt. Die Agarose wurde in der Mikrowelle aufgeköcht und auf etwa 50°C abkühlen gelassen. Die Agarose wurde vor dem Gießen der jeweiligen Schichten zuletzt zu den Ansätzen hinzugegeben und gut durchmischt. Ein zu frühes polymerisieren der Mischung wurde hierbei durch zügiges Arbeiten vermieden. Zuerst wurde jeweils die untere Schicht der Platten gegossen und für 10 Minuten aushärten gelassen. Dann folgte die obere Schicht, wobei insbesondere hier darauf geachtet wurde, zügig zu arbeiten. Die Zellen sollten hierbei nicht zu lange bei 45°C verweilen, da ansonsten die Effizienz der Kolonienbildung sehr gering war, da viele Zellen starben. Nach dem Gießen der Platten wurden zu den Zellen im Weichagar 2 ml Medium mit Amphotericin B (1:100) zugegeben. Außerdem wurde in diesen 2 ml Medium die zu untersuchende Substanz für die entsprechende Endkonzentration, bezogen auf das Gesamtvolumen des Ansatzes, zugegeben. Alle zwei Wochen erfolgte die Zugabe von 2 ml frischem Medium mit Amphotericin B (1:100) zu den Ansätzen. Nach 4 Wochen wurden die Platten mit 200 µl Iodnitrotetrazoliumchlorid (5 mg/ml in doppelt-destillierten H<sub>2</sub>O) angefärbt. Die Platten wurden dann fotografiert und die gebildeten Kolonien wurden ausgezählt.

#### 4.2.3.11 Nicoletti-Methode zum Nachweis von apoptotischen Zellen

Mit der Nicoletti-Methode (225) können apoptotische Zellkerne nachgewiesen werden. Die Methode misst den durch DNA-Fragmentierung hypoploiden DNA-Gehalt apoptotischer Kerne nach der Auswaschung der Chromosomenspaltfragmente in hypotonem Puffer. Die fragmentierte DNA kann aus den von einem Detergenz (z.B. Triton-X100) perforierten

Zellkern ausgewaschen werden. Bei der Färbung mit Propidiumiodid haben die Zellkerne apoptotischer Zellen daher eine geringere Fluoreszenz, als Zellkerne aus nicht apoptotischen Zellen. Für den Versuch wurden jeweils 200000 Zellen in einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen (jeweils 9.6 cm<sup>2</sup>) in 3 ml Medium ausgesät und für 72 Stunden behandelt. Bei adhärent wachsenden Zellen wurden die im Medium befindlichen Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß abgenommen. Die noch festhaftenden Zellen wurden abtrypsinisiert und mit den Zellen, die sich schon abgelöst hatten vereinigt. Bei den Suspensionszellen wurde das gesamte Volumen der Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden dann bei 1100 rpm in einer Zellkulturzentrifuge abzentrifugiert. Die Zellsedimente wurden dann mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe trockengesaugt. Danach erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 100 µl Nicoletti-Puffer durch Vortexen (für wenige Sekunden). Nach einer Inkubationszeit für mindestens 4 Stunden oder über Nacht im Dunkeln bei 4°C wurden die Zellkerne zytometrisch mit Hilfe des FACS-Geräts (FACSCanto II; Becton Dickinson) ausgewertet.

#### 4.2.3.12 Zytometrische Zellzyklusanalyse

Die Analyse des Zellzyklusprofils einer Zellpopulation wird erreicht durch die zytometrische Auswertung der fluoreszenzgefärbten Zellkerne. Die jeweilige Fluoreszenzintensität spiegelt dabei direkt die Zellzyklushase der untersuchten Zelle wieder. Ruhende oder in der G1-Phase befindliche Zellen besitzen eine Einzelkopie der genomischen DNA, wohingegen Zellen, die sich in der G2/M-Phase des Zellzyklus befinden den doppelten DNA-Gehalt haben. D.h. sie haben proportional dazu in der zytometrischen Analyse auch eine doppelt so große Fluoreszenzintensität. Für die Zellzyklusuntersuchung wurden jeweils 1x10<sup>6</sup> Zellen für 24 Stunden behandelt. Zellen wurden nach der Behandlungszeit in einem 15 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1100 rpm für 5 Minuten) und das Medium wurde verworfen. Anschließend wurden sie für 60 Minuten bei 4°C mit 2 ml eiskaltem Ethanol (-20°C) fixiert. Hierzu wurden die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und dann Tropfen für Tropfen zu dem Ethanol in einem neuen 15 ml Reaktionsgefäß zugegeben. Nach der Fixierung wurden die Zellen abzentrifugiert (1100 rpm für 5 Minuten) und der Überstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde dann in 400 µl Propidiumiodidlösung (50 µg/ml Propidiumiodid mit 50 µg/ml RNase in PBS) für ca. 45 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die zytometrische Analyse erfolgte dann anschließend an einem FACSCanto II FACS-Gerät (Becton Dickinson). Die Durchflussrate wurde hierbei auf niedrig gestellt und Zellaggregate (Zelldoubletten) wurden bei der Auswertung durch die Analyse der Fluoreszenz-Amplitude (FL2-A) und der Fluoreszenz-Breite (FL2-W) ausgeschlossen. Insgesamt wurden jeweils 10000 Zählereignisse betrachtet, wobei die apoptotischen Zellen (Sub-G1-Phase) nicht gewertet wurden.

## 5 Abkürzungsverzeichnis

A	Adsorption
Abb.	Abbildung
AZA	5-Azacytidin
5-Aza	5-Azacytidin
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre Deoxyribonukleinsäure
CDP	Cytidindiphosphat
CE	Kapillarelektrophorese
CE-LIF	Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz
cm	Zentimeter
CMP	Cytidinmonophosphat
COBRA	combined bisulfite restriction analysis
CpG	Cytosin-Phosphor-Guanosin
CTP	Cytidintriphosphat
Cyd	Cytidin
dCMP	Desoxy-Cytidinmonophosphat
dCDP	Desoxy-Cytidindiphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dCyd	Desoxycytidin
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt-destilliertes Wasser
DAC	Decitabin
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dUrd	Deoxyuridin
EDC	N (3-Dimethylaminopropyl)N-Ethylcarboimid
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EST	Expressed Sequence Tag
et al.	et alii
FDA	U S Food and Drug Administration
FKS	Foetales Kälberserum
g	Gravitation
G	Guanosin
HEPES	N(2Hydroxyethyl)pierazin-N'(2Ethanesulfonicacid)
Konz.	Konzentration
LINE-1	Long interspered nuclear elements type 1
M	Molar
mA	Milliamper
m.F.	mittlerer Fehler
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
NEB	New England Biolab
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge x

PBS	Phosphat gepuffertes Salin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
p.s.i	pressure per square inch
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RT	Raumtemperatur
SAT-2	Satelliten 2 Sequenz
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TIMP-3	Tissue inhibitor of metalloproteinase-3
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	units
Urd	Uridin
UV	Ultraviolett
V	Volt
x	Wiederholungen
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
w/v	Masse/Volumen
v/v	Volumen/Volumen
Ø	Durchschnitt

## 6 Literaturverzeichnis

1. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, *et al.* Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2002 May 15; **20**(10): 2429-2440.
2. Kornblith AB, Herndon JE, 2nd, Silverman LR, Demakos EP, Odchimar-Reissig R, Holland JF, *et al.* Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2002 May 15; **20**(10): 2441-2452.
3. Bokelmann I. Epigenetische Therapieansätze am Beispiel der Chronischen Lymphatischen Leukämie und des Myelodysplastischen Syndroms. *Inaugural-Dissertation* 2008.
4. Brueckner B, Lyko F. DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2004 Nov; **25**(11): 551-554.
5. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003 Mar; **33 Suppl**: 245-254.
6. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 1998 Mar 1; **12**(5): 599-606.
7. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000 Jan 6; **403**(6765): 41-45.
8. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 2000; **406**(6796): 593-599.
9. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; **293**(5532): 1074-1080.
10. Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 2004 Aug 27; **305**(5688): 1289-1292.
11. Rougeulle C, Heard E. Antisense RNA in imprinting: spreading silence through Air. *Trends Genet* 2002 Sep; **18**(9): 434-437.
12. Panning B, Jaenisch R. RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell* 1998 May 1; **93**(3): 305-308.
13. Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG, *et al.* Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet* 2003 Jun; **34**(2): 157-165.
14. Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* 2001; **2**: 59-67.

15. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; **16**(1): 6-21.
16. Clark SJ, Harrison J, Frommer M. CpNpG methylation in mammalian cells. *Nat Genet* 1995; **10**: 20-27.
17. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 1975; **187**: 226-232.
18. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 1975; **14**: 9-25.
19. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Jan 31; **103**(5): 1412-1417.
20. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Mar 19; **99**(6): 3740-3745.
21. Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 1992 Aug; **13**(4): 1095-1107.
22. Ferguson-Smith AC, Surani MA. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* 2001 Aug 10; **293**(5532): 1086-1089.
23. Panning B, Jaenisch R. DNA hypomethylation can activate *Xist* expression and silence X-linked genes. *Genes Dev* 1996; **10**: 1991-2002.
24. van der Ploeg LH, Flavell RA. DNA methylation in the human gamma delta beta-globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. *Cell* 1980 Apr; **19**(4): 947-958.
25. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986 May 15-21; **321**(6067): 209-213.
26. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 Jul 9; **93**(14): 7149-7153.
27. Gama-Sosa MA, Midgett RM, Slagel VA, Githens S, Kuo KC, Gehrke CW, *et al.* Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. *Biochim Biophys Acta* 1983; **740**(2): 212-219.
28. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, *et al.* Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 1982; **10**(8): 2709-2721.
29. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, *et al.* DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 2006 Dec; **38**(12): 1378-1385.
30. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 1998; **20**: 116-117.
31. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997; **13**: 335-340.

32. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, *et al.* Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003 Apr 18; **300**(5618): 489-492.
33. Yoder JA, Soman NS, Verdine GL, Bestor TH. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* 1997; **270**: 385-395.
34. Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. 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 Oct 20; **203**(4): 971-983.
35. Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, *et al.* DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 2003; **33**: 61-65.
36. Jaenisch R. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet* 1997; **13**: 323-329.
37. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007 May 24; **447**(7143): 425-432.
38. Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M, Matsui Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol* 2005 Feb 15; **278**(2): 440-458.
39. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2002 Jan 1; **241**(1): 172-182.
40. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, *et al.* Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 2000 Apr 20; **10**(8): 475-478.
41. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* 1999; **99**: 247-257.
42. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998; **19**: 219-220.
43. Lyko F, Ramsahoye BH, Kashevsky H, Tudor M, Mastrangelo MA, Orr-Weaver TL, *et al.* Mammalian (cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in *Drosophila*. *Nat Genet* 1999; **23**: 363-366.
44. Aoki A, Suetake I, Miyagawa J, Fujio T, Chijiwa T, Sasaki H, *et al.* Enzymatic properties of *de novo*-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 3506-3512.
45. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001 Dec 21; **294**(5551): 2536-2539.
46. Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, *et al.* Essential role for *de novo* DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 2004 Jun 24; **429**(6994): 900-903.

47. Brown DC, Grace E, Sumner AT, Edmunds AT, Ellis PM. ICF syndrome (immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies): investigation of heterochromatin abnormalities and review of clinical outcome. *Hum Genet* 1995; **96**(4): 411-416.
48. Smeets DF, Moog U, Weemaes CM, Vaes-Peeters G, Merkx GF, Niehof JP, *et al.* ICF syndrome: a new case and review of the literature. *Hum Genet* 1994; **94**(3): 240-246.
49. Jin B, Tao Q, Peng J, Soo HM, Wu W, Ying J, *et al.* DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function. *Hum Mol Genet* 2008 Mar 1; **17**(5): 690-709.
50. Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, *et al.* DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002 Apr 4; **416**(6880): 552-556.
51. Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, *et al.* Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 2002 Jan; **22**(2): 480-491.
52. Kumar S, Cheng X, Klimasauskas S, Mi S, Posfai J, Roberts RJ, *et al.* The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 1-10.
53. Cheng X, Roberts RJ. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res* 2001 Sep 15; **29**(18): 3784-3795.
54. Becker PB, Ruppert S, Schutz G. Genomic footprinting reveals cell type-specific DNA binding of ubiquitous factors. *Cell* 1987 Nov 6; **51**(3): 435-443.
55. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993 Apr; **3**(2): 226-231.
56. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998; **18**(11): 6538-6547.
57. Wade PA. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 2001 Dec; **23**(12): 1131-1137.
58. Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; **23**: 62-66.
59. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, *et al.* Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; **19**: 187-191.
60. Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 2000; **25**(3): 338-342.
61. Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000; **25**(3): 269-277.

62. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 2003 May 1; **31**(9): 2305-2312.
63. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983 Jan 6; **301**(5895): 89-92.
64. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; **3**(6): 415-428.
65. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, *et al.* The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 1983; **11**(19): 6883-6894.
66. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002; **21**(35): 5400-5413.
67. Wong N, Lam WC, Lai PB, Pang E, Lau WY, Johnson PJ. Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with q-arm copy gain in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2001 Aug; **159**(2): 465-471.
68. Ehrlich M. DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J Nutr* 2002 Aug; **132**(8 Suppl): 2424S-2429S.
69. Feinberg AP. Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. *Cancer Res* 1999 Apr 1; **59**(7 Suppl): 1743s-1746s.
70. Plass C, Soloway PD. DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur J Hum Genet* 2002 Jan; **10**(1): 6-16.
71. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993 Sep 15; **82**(6): 1820-1828.
72. Oshimo Y, Nakayama H, Ito R, Kitadai Y, Yoshida K, Chayama K, *et al.* Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2003 Dec; **23**(6): 1663-1670.
73. Weber B, Stresemann C, Brueckner B, Lyko F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* 2007 May 2; **6**(9): 1001-1005.
74. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004 Jul; **5**(7): 522-531.
75. Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, Mund C, Musch T, Meister M, *et al.* The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res* 2007 Feb 15; **67**(4): 1419-1423.
76. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006 Apr; **6**(4): 259-269.
77. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; **16**(4): 168-174.

78. Herman JG, Baylin SB. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; **249**: 35-54.
79. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001 Nov; **1**(2): 157-162.
80. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003 Nov 20; **349**(21): 2042-2054.
81. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, *et al.* Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000; **24**: 132-138.
82. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; **61**(8): 3225-3229.
83. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 2007 Apr 15; **16 Spec No 1**: R50-59.
84. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 8681-8686.
85. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, *et al.* Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Jun 9; **95**(12): 6870-6875.
86. Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, *et al.* Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999 Mar 1; **59**(5): 1090-1095.
87. Esteller M, Risques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, *et al.* Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001 Jun 15; **61**(12): 4689-4692.
88. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, *et al.* Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2000 May 1; **60**(9): 2368-2371.
89. Stratthdee G, Holyoake TL, Sim A, Parker A, Oscier DG, Melo JV, *et al.* Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2007 Sep 1; **13**(17): 5048-5055.
90. Stratthdee G, Sim A, Soutar R, Holyoake TL, Brown R. HOXA5 is targeted by cell-type-specific CpG island methylation in normal cells and during the development of acute myeloid leukaemia. *Carcinogenesis* 2007 Feb; **28**(2): 299-309.
91. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004 May 27; **429**(6990): 457-463.
92. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; **9**(16): 2395-2402.

93. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2005; **74**: 481-514.
94. Lyko F, Brown R. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J Natl Cancer Inst* 2005 Oct 19; **97**(20): 1498-1506.
95. Sorm F, Piskala A, Cihak A, Vesely J. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* 1964 Apr 15; **20**(4): 202-203.
96. Sorm F, Vesely J. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma* 1968; **15**(4): 339-343.
97. Zhou L, Cheng X, Connolly BA, Dickman MJ, Hurd PJ, Hornby DP. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Mol Biol* 2002 Aug 23; **321**(4): 591-599.
98. Curt GA, Kelley JA, Fine RL, Huguenin PN, Roth JS, Batist G, *et al.* A phase I and pharmacokinetic study of dihydro-5-azacytidine (NSC 264880). *Cancer Res* 1985 Jul; **45**(7): 3359-3363.
99. Boothman DA, Briggles TV, Greer S. Exploitation of elevated pyrimidine deaminating enzymes for selective chemotherapy. *Pharmacol Ther* 1989; **42**(1): 65-88.
100. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980; **20**(1): 85-93.
101. Chen L, MacMillan AM, Chang W, Ezaz-Nikpay K, Lane WS, Verdine GL. Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry* 1991 Nov 19; **30**(46): 11018-11025.
102. Santi DV, Norment A, Garrett CE. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 6993-6997.
103. Schermelleh L, Spada F, Easwaran HP, Zolghadr K, Margot JB, Cardoso MC, *et al.* Trapped in action: direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells. *Nat Methods* 2005 Oct; **2**(10): 751-756.
104. Juttermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**(25): 11797-11801.
105. Cornacchia E, Golbus J, Maybaum J, Strahler J, Hanash S, Richardson B. Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J Immunol* 1988 Apr 1; **140**(7): 2197-2200.
106. Villar-Garea A, Fraga MF, Espada J, Esteller M. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res* 2003 Aug 15; **63**(16): 4984-4989.
107. Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, *et al.* Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 2003 Nov 15; **63**(22): 7563-7570.

108. Segura-Pacheco B, Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Mariscal I, Chavez A, *et al.* Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003 May; **9**(5): 1596-1603.
109. Siedlecki P, Boy RG, Comagic S, Schirmacher R, Wiessler M, Zielenkiewicz P, *et al.* Establishment and functional validation of a structural homology model for human DNA methyltransferase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Jun 27; **306**(2): 558-563.
110. Brueckner B, Boy RG, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, *et al.* Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res* 2005 Jul 15; **65**(14): 6305-6311.
111. Yan L, Nass SJ, Smith D, Nelson WG, Herman JG, Davidson NE. Specific inhibition of DNMT1 by antisense oligonucleotides induces re-expression of estrogen receptor-alpha (ER) in ER-negative human breast cancer cell lines. *Cancer Biol Ther* 2003 Sep-Oct; **2**(5): 552-556.
112. Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JC, Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer* 2007 Feb; **7**(2): 118-129.
113. Constantinides PG, Taylor SM, Jones PA. Phenotypic conversion of cultured mouse embryo cells by aza pyrimidine nucleosides. *Dev Biol* 1978 Sep; **66**(1): 57-71.
114. Constantinides PG, Jones PA, Gevers W. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* 1977 May 26; **267**(5609): 364-366.
115. Momparler RL, Rivard GE, Gyger M. Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia. *Pharmacol Ther* 1985; **30**(3): 277-286.
116. Momparler RL, Momparler LF, Samson J. Comparison of the antileukemic activity of 5-AZA-2'-deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-azacytidine against L1210 leukemia. *Leuk Res* 1984; **8**(6): 1043-1049.
117. Wilson VL, Jones PA, Momparler RL. Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer Res* 1983 Aug; **43**(8): 3493-3496.
118. Hrodek O, Vesely J. 5-azacytidine in childhood leukemia. *Neoplasma* 1971; **18**(5): 493-503.
119. Karon M, Sieger L, Leimbrock S, Finklestein JZ, Nesbit ME, Swaney JJ. 5-Azacytidine: a new active agent for the treatment of acute leukemia. *Blood* 1973 Sep; **42**(3): 359-365.
120. Vogler WR, Miller DS, Keller JW. 5-Azacytidine (NSC 102816): a new drug for the treatment of myeloblastic leukemia. *Blood* 1976 Sep; **48**(3): 331-337.
121. Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, *et al.* Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 1999 Feb 15; **59**(4): 798-802.

122. Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, *et al.* A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2003 Mar 1; **63**(5): 1114-1121.
123. von Hoff DD, Slavik M. 5-azacytidine--a new anticancer drug with significant activity in acute myeloblastic leukemia. *Adv Pharmacol Chemother* 1977; **14**: 285-326.
124. Rivard GE, Momparler RL, Demers J, Benoit P, Raymond R, Lin K, *et al.* Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia. *Leuk Res* 1981; **5**(6): 453-462.
125. Marcucci G, Silverman L, Eller M, Lintz L, Beach CL. Bioavailability of azacitidine subcutaneous versus intravenous in patients with the myelodysplastic syndromes. *J Clin Pharmacol* 2005 May; **45**(5): 597-602.
126. Li LH, Olin EJ, Buskirk HH, Reineke LM. Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res* 1970 Nov; **30**(11): 2760-2769.
127. Cihak A, Weiss JW, Pitot HC. Effects of 5-azacytidine on hepatic polyribosomes and maturation of ribosomal RNA. *Acta Biol Med Ger* 1974; **33**(5-6): 859-865.
128. Cihak A. Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology* 1974; **30**(5): 405-422.
129. Lu LW, Chiang GH, Medina D, Randerath K. Drug effects on nucleic acid modification. I. A specific effect of 5-azacytidine on mammalian transfer RNA methylation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1976 Feb 23; **68**(4): 1094-1101.
130. Lu LJ, Randerath K. Effects of 5-azacytidine on transfer RNA methyltransferases. *Cancer Res* 1979 Mar; **39**(3): 940-949.
131. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* 2008 Jul 1; **123**(1): 8-13.
132. Yoo CB, Jeong S, Egger G, Liang G, Phiasivongsa P, Tang C, *et al.* Delivery of 5-aza-2'-deoxycytidine to cells using oligodeoxynucleotides. *Cancer Res* 2007 Jul 1; **67**(13): 6400-6408.
133. Stegmann AP, Honders MW, Willemze R, Landegent JE. De novo induced mutations in the deoxycytidine kinase (dck) gene in rat leukemic clonal cell lines confer resistance to cytarabine (AraC) and 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC). *Leukemia* 1995 Jun; **9**(6): 1032-1038.
134. Choi SH, Byun HM, Kwan JM, Issa JP, Yang AS. Hydroxycarbamide in combination with azacitidine or decitabine is antagonistic on DNA methylation inhibition. *Br J Haematol* 2007 Sep; **138**(5): 616-623.
135. Hubeek I, Stam RW, Peters GJ, Broekhuizen R, Meijerink JP, van Wering ER, *et al.* The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 2005 Dec 12; **93**(12): 1388-1394.
136. Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z, *et al.* Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res* 2004 Jun 15; **64**(12): 4294-4301.

137. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982 Jun; **51**(2): 189-199.
138. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick H, *et al.* The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br J Haematol* 1994 Aug; **87**(4): 746-754.
139. Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Aul C. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res* 2000 Dec; **24**(12): 983-992.
140. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002 Oct 1; **100**(7): 2292-2302.
141. Fenaux P. Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 2001 Jun; **73**(4): 429-437.
142. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997 Mar 15; **89**(6): 2079-2088.
143. Greenberg PL. Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. *Leuk Res* 1998 Dec; **22**(12): 1123-1136.
144. Greenberg PL, Young NS, Gattermann N. Myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002: 136-161.
145. Rosenfeld C, List A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. *Leukemia* 2000 Jan; **14**(1): 2-8.
146. Liesveld JL, Jordan CT, Phillips GL, 2nd. The hematopoietic stem cell in myelodysplasia. *Stem Cells* 2004; **22**(4): 590-599.
147. Aul C, Giagounidis A, Germing U. Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. *Int J Hematol* 2001 Jun; **73**(4): 405-410.
148. Deeg HJ, Shulman HM, Anderson JE, Bryant EM, Gooley TA, Slattery JT, *et al.* Allogeneic and syngeneic marrow transplantation for myelodysplastic syndrome in patients 55 to 66 years of age. *Blood* 2000 Feb 15; **95**(4): 1188-1194.
149. Kuendgen A, Knipp S, Fox F, Strupp C, Hildebrandt B, Steidl C, *et al.* Results of a phase 2 study of valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid in 75 patients with myelodysplastic syndrome and relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2005 Dec; **84** Suppl 1: 61-66.
150. Raza A, Qawi H, Lisak L, Andric T, Dar S, Andrews C, *et al.* Patients with myelodysplastic syndromes benefit from palliative therapy with amifostine, pentoxifylline, and ciprofloxacin with or without dexamethasone. *Blood* 2000 Mar 1; **95**(5): 1580-1587.
151. Hellstrom-Lindberg E, Negrin R, Stein R, Krantz S, Lindberg G, Vardiman J, *et al.* Erythroid response to treatment with G-CSF plus erythropoietin for the anaemia of

- patients with myelodysplastic syndromes: proposal for a predictive model. *Br J Haematol* 1997 Nov; **99**(2): 344-351.
152. Cheson BD, Bennett JM, Kantarjian H, Pinto A, Schiffer CA, Nimer SD, *et al.* Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000 Dec 1; **96**(12): 3671-3674.
153. Petti MC, Mandelli F, Zagonel V, De Gregoris C, Merola MC, Latagliata R, *et al.* Pilot study of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in the treatment of poor prognosis acute myelogenous leukemia patients: preliminary results. *Leukemia* 1993 May; **7 Suppl 1**: 36-41.
154. Cheson BD. Standard and low-dose chemotherapy for the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1998 May; **22 Suppl 1**: S17-21.
155. Saiki JH, Bodey GP, Hewlett JS, Amare M, Morrison FS, Wilson HE, *et al.* Effect of schedule on activity and toxicity of 5-azacytidine in acute leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Cancer* 1981 Apr 1; **47**(7): 1739-1742.
156. Chitambar CR, Libnoch JA, Matthaeus WG, Ash RC, Ritch PS, Anderson T. Evaluation of continuous infusion low-dose 5-azacytidine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 1991 Jun; **37**(2): 100-104.
157. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, *et al.* Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 2004 Mar 1; **103**(5): 1635-1640.
158. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Faderl S, Issa JP, *et al.* Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2003 Aug 1; **98**(3): 522-528.
159. Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, Huang X, O'Brien S, Cortes J, *et al.* Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2007 Jan 1; **109**(1): 52-57.
160. Kantarjian HM, Issa JP. Decitabine dosing schedules. *Semin Hematol* 2005 Jul; **42**(3 Suppl 2): S17-22.
161. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, *et al.* Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006 Apr 15; **106**(8): 1794-1803.
162. Schmelz K, Sattler N, Wagner M, Lubbert M, Dorken B, Tamm I. Induction of gene expression by 5-Aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and -independent mechanisms. *Leukemia* 2005 Jan; **19**(1): 103-111.
163. Qin T, Youssef EM, Jelinek J, Chen R, Yang AS, Garcia-Manero G, *et al.* Effect of cytarabine and decitabine in combination in human leukemic cell lines. *Clin Cancer Res* 2007 Jul 15; **13**(14): 4225-4232.
164. Chuang JC, Yoo CB, Kwan JM, Li TW, Liang G, Yang AS, *et al.* Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Cancer Ther* 2005 Oct; **4**(10): 1515-1520.

165. Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2006 Mar 1; **66**(5): 2794-2800.
166. Mund C, Hackanson B, Stresemann C, Lubbert M, Lyko F. Characterization of DNA demethylation effects induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer Res* 2005 Aug 15; **65**(16): 7086-7090.
167. Soriano AO, Yang H, Faderl S, Estrov Z, Giles F, Ravandi F, *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 Oct 1; **110**(7): 2302-2308.
168. Tien HF, Tang JH, Tsay W, Liu MC, Lee FY, Wang CH, *et al.* Methylation of the p15(INK4B) gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br J Haematol* 2001 Jan; **112**(1): 148-154.
169. Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, Nakahara Y, Saito H, Hotta T, *et al.* Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997 Aug 15; **90**(4): 1403-1409.
170. Brueckner B, Lyko F. DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2004; **25**(11): 551-554.
171. van Groenigen CJ, Leyva A, O'Brien AM, Gall HE, Pinedo HM. Phase I and pharmacokinetic study of 5-aza-2'-deoxycytidine (NSC 127716) in cancer patients. *Cancer Res* 1986 Sep; **46**(9): 4831-4836.
172. Rudek MA, Zhao M, He P, Hartke C, Gilbert J, Gore SD, *et al.* Pharmacokinetics of 5-azacytidine administered with phenylbutyrate in patients with refractory solid tumors or hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2005 Jun 10; **23**(17): 3906-3911.
173. Rius M, Stresemann C, Keller D, Brom M, Schirmacher E, D. K, *et al.* Human Concentrative Nucleoside Transporter 1-mediated Uptake of 5 Azacytidine Enhances DNA Demethylation. *Cancer Research* 2008, under review.
174. Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004 Feb; **32**(3): e38.
175. Boumber YA, Kondo Y, Chen X, Shen L, Gharibyan V, Konishi K, *et al.* RIL, a LIM gene on 5q31, is silenced by methylation in cancer and sensitizes cancer cells to apoptosis. *Cancer Res* 2007 Mar 1; **67**(5): 1997-2005.
176. Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R, Wattel E, Preudhomme C, Bauters F, *et al.* Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 1998 Apr 15; **91**(8): 2985-2990.
177. Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 1990 Aug 10; **62**(3): 503-514.
178. Szyf M, Bozovic V, Tanigawa G. Growth regulation of mouse DNA methyltransferase gene expression. *J Biol Chem* 1991 Jun 5; **266**(16): 10027-10030.

179. Bouchard J, Momparler RL. Incorporation of 5-Aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase. *Mol Pharmacol* 1983 Jul; **24**(1): 109-114.
180. Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, *et al.* Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 1995 Apr 21; **81**(2): 197-205.
181. Eads CA, Nickel AE, Laird PW. Complete genetic suppression of polyp formation and reduction of CpG-island hypermethylation in Apc(Min/+) Dnmt1-hypomorphic Mice. *Cancer Res* 2002 Mar 1; **62**(5): 1296-1299.
182. Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 2007 Mar; **28**(3): 560-571.
183. Szyf M. Therapeutic implications of DNA methylation. *Future Oncol* 2005 Feb; **1**(1): 125-135.
184. Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, *et al.* Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* 2003 Mar 5; **95**(5): 399-409.
185. Moyers SB, Kumar NB. Green tea polyphenols and cancer chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials. *Nutr Rev* 2004 May; **62**(5): 204-211.
186. Shamma MA, Neri P, Koley H, Batchu RB, Bertheau RC, Munshi V, *et al.* Specific killing of multiple myeloma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate extracted from green tea: biologic activity and therapeutic implications. *Blood* 2006 Oct 15; **108**(8): 2804-2810.
187. Spinella F, Rosano L, Decandia S, Di Castro V, Albini A, Elia G, *et al.* Antitumor effect of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate in ovarian carcinoma cells: evidence for the endothelin-1 as a potential target. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006 Jun; **231**(6): 1123-1127.
188. Baliga MS, Meleth S, Katiyar SK. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. *Clin Cancer Res* 2005 Mar 1; **11**(5): 1918-1927.
189. Shanafelt TD, Lee YK, Call TG, Nowakowski GS, Dingli D, Zent CS, *et al.* Clinical effects of oral green tea extracts in four patients with low grade B-cell malignancies. *Leuk Res* 2006 Jun; **30**(6): 707-712.
190. Michalowsky LA, Jones PA. Differential nuclear protein binding to 5-azacytosine-containing DNA as a potential mechanism for 5-aza-2'-deoxycytidine resistance. *Mol Cell Biol* 1987 Sep; **7**(9): 3076-3083.
191. Wagner I, Capesius I. Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1981 Jun 26; **654**(1): 52-56.
192. Bestor TH, Hellewell SB, Ingram VM. Differentiation of two mouse cell lines is associated with hypomethylation of their genomes. *Mol Cell Biol* 1984 Sep; **4**(9): 1800-1806.

193. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, *et al.* A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Apr 16; **99**(8): 5606-5611.
194. Gehrke CW, McCune RA, Gama-Sosa MA, Ehrlich M, Kuo KC. Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of major and modified nucleosides in DNA. *J Chromatogr* 1984 Sep 28; **301**(1): 199-219.
195. Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Sanchez-Gonzalez B, Yang H, Rosner G, Verstovsek S, *et al.* Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood* 2006 Nov 15; **108**(10): 3271-3279.
196. Oki Y, Kantarjian HM, Gharibyan V, Jones D, O'Brien S, Verstovsek S, *et al.* Phase II study of low-dose decitabine in combination with imatinib mesylate in patients with accelerated or myeloid blastic phase of chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2007 Mar 1; **109**(5): 899-906.
197. Issa JP, Gharibyan V, Cortes J, Jelinek J, Morris G, Verstovsek S, *et al.* Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. *J Clin Oncol* 2005 Jun 10; **23**(17): 3948-3956.
198. Yang AS, Doshi KD, Choi SW, Mason JB, Mannari RK, Gharybian V, *et al.* DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. *Cancer Res* 2006 May 15; **66**(10): 5495-5503.
199. Claus R, Almstedt M, Lubbert M. Epigenetic treatment of hematopoietic malignancies: in vivo targets of demethylating agents. *Semin Oncol* 2005 Oct; **32**(5): 511-520.
200. Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, Jair KW, Willman CL, Issa JP. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001 May 1; **97**(9): 2823-2829.
201. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994 Sep 15; **371**(6494): 257-261.
202. Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res* 1996 Feb 15; **56**(4): 722-727.
203. Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997 Mar 1; **57**(5): 837-841.
204. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003 Sep; **17**(9): 1813-1819.
205. Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, Guldberg P, Kohler G, Wijermans P, *et al.* Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* 2002 Oct 15; **100**(8): 2957-2964.
206. Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, *et al.* Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res* 2006 Jun 15; **66**(12): 6361-6369.

207. Guo Y, Engelhardt M, Wider D, Abdelkarim M, Lubbert M. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on proliferation, differentiation and p15/INK4b regulation of human hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 2006 Jan; **20**(1): 115-121.
208. Cameron EE, Baylin SB, Herman JG. p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood* 1999 Oct 1; **94**(7): 2445-2451.
209. Liang G, Salem CE, Yu MC, Nguyen HD, Gonzales FA, Nguyen TT, *et al.* DNA methylation differences associated with tumor tissues identified by genome scanning analysis. *Genomics* 1998 Nov 1; **53**(3): 260-268.
210. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, *et al.* A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005 Oct 27; **353**(17): 1793-1801.
211. Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, *et al.* MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Dec 11; **104**(50): 19971-19976.
212. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005 Jun 9; **435**(7043): 834-838.
213. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setien F, *et al.* Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007 Feb 15; **67**(4): 1424-1429.
214. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, *et al.* Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006 Jun; **9**(6): 435-443.
215. Pastor-Anglada M, Cano-Soldado P, Molina-Arcas M, Lostao MP, Larrayoz I, Martinez-Picado J, *et al.* Cell entry and export of nucleoside analogues. *Virus Res* 2005 Feb; **107**(2): 151-164.
216. Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, *et al.* Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 1998 Oct 1; **58**(19): 4349-4357.
217. Liu Z, Marcucci G, Byrd JC, Grever M, Xiao J, Chan KK. Characterization of decomposition products and preclinical and low dose clinical pharmacokinetics of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) by a new liquid chromatography/tandem mass spectrometry quantification method. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; **20**(7): 1117-1126.
218. Zhao M, Rudek MA, He P, Hartke C, Gore S, Carducci MA, *et al.* Quantification of 5-azacytidine in plasma by electrospray tandem mass spectrometry coupled with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004 Dec 25; **813**(1-2): 81-88.
219. Chabot GG, Bouchard J, Momparler RL. Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymidine or uracil arabinoside. *Biochem Pharmacol* 1983 Apr 1; **32**(7): 1327-1328.

220. Chabot GG, Rivard GE, Momparler RL. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 5-Aza-2'-deoxycytidine in rabbits and dogs. *Cancer Res* 1983 Feb; **43**(2): 592-597.
221. Stach D, Schmitz OJ, Stilgenbauer S, Benner A, Dohner H, Wiessler M, *et al.* Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: e2.
222. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997 Jun 15; **25**(12): 2532-2534.
223. Bruserud O, Gjertsen BT, Foss B, Huang TS. New strategies in the treatment of acute myelogenous leukemia (AML): in vitro culture of aml cells--the present use in experimental studies and the possible importance for future therapeutic approaches. *Stem Cells* 2001; **19**(1): 1-11.
224. Bruserud O, Gjertsen BT, von Volkman HL. In vitro culture of human acute myelogenous leukemia (AML) cells in serum-free media: studies of native AML blasts and AML cell lines. *J Hematother Stem Cell Res* 2000 Dec; **9**(6): 923-932.
225. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991 Jun 3; **139**(2): 271-279.

Teile dieser vorliegenden Doktorarbeit wurden in den folgenden wissenschaftlichen Artikeln veröffentlicht:

Mund C, Hackanson B, Stresemann C, Lubbert M, Lyko F. Characterization of DNA demethylation effects induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer Res*. 2005;65:7086-7090.

Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2006;66:2794-2800.

Stresemann C., Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int. J. Cancer*. 2008;123:8-13

Stresemann C, Bokelmann I, Mahlkecht U, Lyko F. Azacytidine causes complex DNA methylation responses in myeloid leukemia. *Mol. Cancer Ther.* (submitted)

Rius M, Stresemann C, Keller D, Brom M, Schirmacher E, Keppler D, Lyko F. Human Concentrative Nucleoside Transporter 1-mediated Uptake of 5-Azacytidine Enhances DNA Demethylation. *Cancer Res.* (submitted)

## Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Frank Lyko, für das Ermöglichen und die Betreuung dieser Arbeit, die kritischen Diskussionen und besonders für die gute wissenschaftliche Ausbildung.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Lutz Gissmann für die Übernahme der Aufgabe als Gutachter meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern für die immer nette und zuverlässige Zusammenarbeit bedanken:

Dr. Maria Rius, Dr. Imke Bokelmann, Prof. Dr. Dietrich Keppler, Prof. Dr. Ulrich Mahlkecht, Dr. Esther Schirmmacher, Prof. Dr. Helga Stopper

Mein Dank gilt auch allen meinen Laborkollegen, die trotz meiner Beschallung mit nicht immer für sie leicht zu ertragener Musik, dennoch immer in einer guten Atmosphäre mit mir zusammengearbeitet haben. Ich möchte mich dabei besonders auch für die vielen vergnüglichen Momente bedanken, die auch nicht immer von "Wissenschaft" geprägt waren.

Einen besonderen Dank an Barbara Weber. Es war schön mit ihr nicht nur eine Laborkollegin, sondern vor allem eine gute Freundin im Labor gehabt zu haben.

Bei Dirk Kuck möchte ich mich für die vielen Gratis-Espressi und Gespräche in den Mittagspausen bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Bodo Brückner und Barbara Weber für das nicht einfache Korrekturlesen von Teilen meiner Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt bedanken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.