



KfK 4819
Januar 1991

**Theileria parva-induzierte
Transformation von
Rinderlymphozyten:
Das raf-Gen als DNA-Sonde
zum Nachweis von
Veränderungen im
Methylierungsmuster des
Rindergenoms**

I. Baumann
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik
und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 4819

***Theileria parva*-induzierte Transformation von Rinderlymphozyten:
Das raf-Gen als DNA-Sonde zum Nachweis von Veränderungen im
Methylierungsmuster des Rindergenoms**

Ina Baumann

Dissertation genehmigt von der Fakultät
für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

ZUSAMMENFASSUNG

Der protozoische Parasit *Theileria parva* verursacht in weiten Teilen Ostafrikas eine meist tödlich endende Rinderkrankheit, die als 'East Coast fever' oder Theileriosis bezeichnet wird. Der Parasit infiziert Rinderlymphozyten und induziert ein unkontrolliertes Wachstum, das allein von der Anwesenheit des Parasiten abhängig ist. Da die infizierten Lymphozyten als permanente immortalisierte Zelllinien in Gewebekultur gehalten werden können und typische Eigenschaften transformierter Zellen zeigen, eignen sie sich zum Studium allgemeiner Mechanismen der Krebsentstehung.

Im ersten Teil der Arbeit wurde das Protoonkogen c-raf-1 untersucht. Mit einer menschlichen DNA-Sonde wurden zunächst c-raf-1-Sequenzen des Rinds aus einer genomischen Rindergenbank und einer Rinder-cDNA-Bank isoliert. Eine Teilsequenzierung der isolierten cDNA zeigte, daß das C-terminale Ende des c-raf-1-Proteins von Rind und Mensch eine 100%ige Aminosäurehomologie aufweist und somit im Laufe der Evolution hochkonserviert wurde. Die isolierte cDNA wurde zur Untersuchung der Transkription und der DNA-Organisation des c-raf-1-Gens in theileriainfizierten Zellen eingesetzt. Mit Hilfe eines raf-spezifischen Antiserums wurde die Expression des Proteins untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß dieses Gen bei primären Ereignissen der Transformation der Lymphozyten nicht beteiligt ist, da bei den Untersuchungen auf DNA-, RNA- und Proteinebene keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und nichtinfizierten Zellen erhalten wurden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden mit den c-raf-1-Sequenzen als DNA-Sonde Unterschiede im Methylierungsmuster der DNA infizierter und nichtinfizierter Zellen in einem weiten Bereich um den c-raf-1-Genlocus (ca. 300kb) mittels selten schneidender CpG-Restriktionsenzyme identifiziert. In diesem chromosomalen Bereich treten in der DNA menschlicher Krebszellen häufig Translokationen und Deletionen auf. Die Untersuchung des Methylierungsmusters zeigte, daß bei einer Klonierung von Zellen in diesem Bereich vermehrt Demethylierungen auftreten. Unter normalen Kulturbedingungen waren in der DNA infizierter Zellen keine Demethylierungen, sondern de novo Methylierungen nachweisbar. Durch eine in vitro Infektion von Rinderlymphozyten wurde festgestellt, daß die zusätzlichen Methylierungen erst zu einem späten Zeitpunkt nach der Infektion mit dem Parasiten auftraten. Dies zeigte, daß die Veränderungen im Methylierungsmuster keine primäre Rolle bei der Transformation der Lymphozyten mit dem Parasiten spielen. Um zu untersuchen, ob durch Methylierungen überhaupt wichtige Zellfunktionen beeinflußt werden können, wurden künstlich Methylierungen entfernt. Es konnte gezeigt werden, daß eine wichtige Eigenschaft normaler aktivierter Lymphozyten, ein direkter Zell-Zellkontakt, vermindert wurde. Desweiteren wurde festgestellt, daß eine durch den Tumorpromotor TPA induzierte Signalkette und die Fähigkeit, in nackten Mäusen Tumore zu bilden, gehemmt wurde.

SUMMARY

***Theileria parva*-induced transformation of bovine lymphocytes: the raf-gene as a DNA probe to identify changes in the methylation pattern of the bovine genome**

The protozoan parasite *Theileria parva* causes a usually fatal disease in cattle called 'East Coast fever' or Theileriosis. The parasite infects bovine lymphocytes and induces an uncontrolled proliferation, strictly dependant on the presence of the parasite. Because infected lymphocytes can be maintained in cell culture as immortalized cell lines and because the cells show typical features of transformed cells they represent a useful model system to study mechanisms of cancer development.

In the first part of the work the protooncogene c-raf-1 was investigated. Using a human cDNA probe bovine c-raf-1 sequences were isolated from a bovine genomic and a cDNA library. By partial sequencing of the isolated cDNA, representing the C-terminal end of the raf-protein, a high conservation of the raf-protein between human and bovine amino acid sequence was identified (100% homology). The bovine cDNA was used as a DNA probe to study the transcription and DNA organization of the c-raf-1 gene in *Theileria*-infected cells. The expression of the raf protein was studied using a raf-specific antibody. No differences between infected and uninfected cells could be shown on the DNA-, RNA- and protein level. Therefore it can be assumed that the c-raf-1 gene plays no primary role in the transformation of infected lymphocytes.

In the second part of the work differences in the DNA methylation pattern between infected and uninfected lymphocytes were identified in the vicinity of the raf-gene region (approximately 300 kb) using rare cutter restriction enzymes. This chromosomal genomic region is known to be rearranged by translocations and deletions in certain forms of human cancer cells. It was shown that extensive demethylations took place during the cloning of cells in contrast to de novo methylations taking place under normal culture conditions. By in vitro infection of normal lymphocytes it was finally shown that de novo methylations occurred at relatively late time points after infection indicating that changes in the methylation pattern plays no primary role in the transformation of infected cells. To investigate whether changes in the DNA methylation pattern of infected cells could possibly influence important cell functions, methylated sites were removed. It could be shown that a direct cell-cell contact, a signal transduction pathway induced by the tumor promoter TPA and the ability to form tumors in nude mice were significantly suppressed.

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Theileria parva-induzierte Transformation von Rinderlymphozyten.....	1
1.2.	Tumorprogression.....	4
1.2.1.	Onkogene.....	4
1.2.2.	Tumorsuppressorgene.....	5
1.2.3.	Metastasenassoziierte Gene.....	6
1.2.4.	DNA-Methylierung und Tumorprogression.....	8
1.3.	Thematik und Ziel der Arbeit.....	12
1.3.1.	Mögliche Rolle des c-raf-1-Onkogens in infizierten Zellen.....	13
1.3.2.	Untersuchung von Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA infizierter Zellen und der Rolle der Methylierung für die Zelle.....	15
2.	MATERIAL	17
2.1.	Chemikalien, Radioisotope und Arbeitsmittel.....	17
2.2.	Zellen und Bakterien.....	19
2.3.	Gewebekultur-Medien.....	20
2.4.	Nährmedien für Bakterien.....	21
2.5.	Puffer und Lösungen.....	22
2.6.	Genbibliotheken und DNA-Sonden.....	25
3.	METHODEN	26
3.1.	Allgemeine Arbeitsmethoden mit Nukleinsäuren.....	26
3.1.1.	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	26
3.1.2.	Phenol/Chloroform-Extraktion einer Nukleinsäure-Lösung.....	26
3.1.3.	Fällung von Nukleinsäuren.....	26
3.1.4.	Restriktionsverdau.....	26
3.1.5.	Restriktionsverdau langkettiger DNA-Moleküle für Pulsfeldgelelektrophorese.....	27
3.2.	DNA-Klonierungstechniken.....	28
3.2.1.	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	28
3.2.2.	Präparation von Vektoren für die Subklonierung von DNA-Fragmenten.....	28
3.2.3.	Auffüllen von 5'-Überhängen.....	28
3.2.4.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	29
3.2.5.	Ligation.....	29
3.2.6.	Bal 31 Exonuklease-Verdau.....	29
3.2.7.	Transformation von Bakterienzellen.....	30
3.2.8.	Kolonie-Hybridisierung.....	31
3.3.	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen.....	31
3.3.1.	Auftrennung von DNA durch herkömmliche Gelelektrophorese.....	31
3.3.2.	Auftrennung von DNA durch Pulsfeldgelelektrophorese.....	32
3.3.3.	Auftrennung von DNA in Acrylamid/Harnstoff-Gelen: Sequenzier-Gel.....	32
3.3.4.	Auftrennung von RNA in Agarose-Gelen.....	33
3.3.5.	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	33
3.4.	Präparative Methoden.....	33
3.4.1.	Herstellung von Proteinlysaten aus Lymphozyten.....	33
3.4.2.	Präparation genomischer DNA aus Lymphozyten.....	34

3.4.3.	Präparation langkettiger DNA-Moleküle für die Pulsfeldgelelektrophorese.....	34
3.4.4.	Präparation von Gesamt-RNA aus Lymphozyten.....	35
3.4.5.	Präparation von PolyA-RNA aus Lymphozyten.....	36
3.4.6.	Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab.....	36
3.4.7.	Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab.....	37
3.4.8.	Präparation von Lambda-DNA in kleinem Maßstab.....	38
3.4.9.	Präparation von Lambda-DNA in großem Maßstab.....	38
3.5.	Isolierung eines Gens aus einer LAMBDA-Genbank ('Screening').....	39
3.5.1.	Ausplattieren der Phagenkulturen (Plaque-Hybridisierung).....	39
3.5.2.	Filterabdruck der Phagen-Plaques.....	40
3.5.3.	'Rescreening' der Lambda-Klone.....	40
3.6.	Präparation radioaktiv markierter Proben.....	40
3.6.1.	In vivo Markierung von Proteinen mit ³⁵ S-Methionin.....	40
3.6.2.	Markierung von DNA durch Nick-Translation.....	41
3.6.3.	Markierung von DNA durch Multiprime labeling.....	41
3.7.	Analytische Methoden.....	42
3.7.1.	Immunpräzipitation mit Proteinlysaten.....	42
3.7.2.	Transfer von DNA auf Nitrozellulosefilter bzw. Hybond N-Nylonfilter (Southern Blot).....	43
3.7.3.	Transfer von RNA auf Nitrozellulosefilter bzw. Hybond N-Nylonfilter (Northern Blot).....	44
3.7.4.	Hybridisierung der Northern- bzw. Southern Blots mit radioaktiv markierten DNA-Proben.....	44
3.7.5.	Autoradiographie.....	45
3.7.6.	Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	46
3.7.6.1.	Präparation von Einzelstrang-DNA aus M13-Phagen.....	46
3.7.6.2.	Sequenzierung von Nukleinsäuren nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger.....	46
3.8.	Zellkulturtechniken.....	47
3.8.1.	Zellkultivierung.....	47
3.8.2.	Bestimmung der Zelldichte.....	48
3.8.3.	Isolierung von Rinder-Lymphozyten.....	48
3.8.4.	Klonierung von Zellen.....	48
3.8.5.	Abtrennung toter Zellen.....	49
3.8.6.	Morphologische Untersuchung der Zellen.....	49
3.8.7.	Eliminierung des Parasiten in theileriainfizierten Zellen.....	49
3.8.8.	³ H-Thymidin-Pulsmarkierung von Zellen.....	49
4.	ERGEBNISSE	50
4.1.	Das c-raf-1-Gen wird in theileriainfizierten Lymphozyten in vergleichbaren Mengen exprimiert.....	50
4.1.1.	Die c-raf-1-cDNA des Rinds zeigt im isolierten Bereich eine 100%ige Amino- säurehomologie zur menschlichen c-raf-1-cDNA.....	50
4.1.2.	In 3' liegenden Sequenzen des c-raf-1-Gens treten in der DNA theileria- infizierter Rinderlymphozyten keine Strukturveränderungen auf.....	57
4.1.3.	c-raf-1 und c-myc werden in infizierten und nichtinfizierten Lymphozyten in gleichen Mengen transkribiert.....	59
4.1.4.	Das c-raf-1-Protein wird in infizierten und 720C-behandelten Lymphozyten in vergleichbaren Mengen exprimiert.....	61

4.2.	Die DNA infizierter Lymphozyten zeigt Hypermethylierungen in Schnittstellen selten schneidender CpG-Restriktionsenzyme.....	64
4.2.1.	Beim Vergleich der NotI-Restriktionsfragmente in der Nähe des c-raf-1-Gens resultierte in der DNA infizierter und nichtinfizierter Lymphozyten ein unterschiedliches Restriktionsmuster	64
4.2.2.	Der Unterschied im NotI-Restriktionsmuster ist auf eine veränderte Methylierung in der DNA infizierter Lymphozyten zurückzuführen.....	69
4.2.3.	Der Verdau mit anderen methylsensitiven CpG-Restriktionsenzymen zeigt, daß der DNA-Bereich um das c-raf-1-Gen eine hypermethylierte Region in der DNA infizierter Lymphozyten darstellen könnte.....	73
4.2.4.	Hypermethylierungen sind auch in anderen Bereichen der DNA infizierter Zellen nachweisbar.....	76
4.3.	Die Hypermethylierung im Bereich des c-raf-1-Gens ist für primäre Ereignisse der Transformation infizierter Zellen nicht essentiell	80
4.3.1.	Die Hypermethylierung tritt nicht in allen theileriainfizierten Zelllinien auf	80
4.3.2.	Das Methylierungsmuster erweist sich bei Klonierungen infizierter Zellen als sehr instabil.....	82
4.3.3.	Die Hypermethylierung ist nicht von der Anwesenheit des Parasiten abhängig	88
4.3.4.	Die Hypermethylierung ist erst zu einem späten Zeitpunkt nach der Infektion nachweisbar	90
4.4.	Demethylierungen führen zu einem verminderten Zellkontakt, einer veränderten Reaktion auf den Tumorpromotor TPA und einer veränderten Tumorgenität infizierter Zellen	95
4.4.1.	Das Wachstum von Zellen mit hypomethylierter DNA wird unter normalen Kulturbedingungen nicht beeinträchtigt	98
4.4.2.	Zellen mit hypomethylierter DNA zeigen eine veränderte Zellmorphologie und einen verminderten spontanen und TPA-induzierten Zellkontakt.....	100
4.4.3.	Demethylierungen führen zu einer verringerten Wachstumsstimulation durch den Tumorpromotor TPA	101
4.4.4.	Demethylierungen führen zu einer verringerten Tumorgenität.....	103
5.	DISKUSSION	106
5.1.	c-raf-1 und c-myc sind bei primären Ereignissen der Transformation von Lymphozyten durch Theileria parva nicht beteiligt.....	106
5.2.	Das Methylierungsmuster in Schnittstellen selten schneidender Restriktionsenzyme in der DNA infizierter Zellen erweist sich als instabil.....	106
5.2.1.	Nach einer Klonierung infizierter Zellen resultierten keine identischen Abkömmlinge; es traten vor allem Demethylierungen auf.....	107
5.2.2.	Nach einer Infektion traten vor allem de novo Methylierungen in der DNA infizierter Zellen auf	108
5.3.	Unspezifische Demethylierungen in der DNA nach 5-Aza-C-Behandlung führen zu veränderten Eigenschaften infizierter Zellen.....	110
5.4.	Ausblick	116
6.	LITERATUR	119

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
5-Aza-C	5-Aza-Cytidin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
BW 720C (720C)	Theilerizides Medikament
Con A	Concanavalin A
Ci	Curie
cpm	counts per minute
dCTP	Desoxy-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAse	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
FIGE	Field Inversion Gel Electrophoresis
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin
hrIL2	menschliches rekombinantes Interleukin 2
IL2	Interleukin 2
IL2R	Interleukin 2-Rezeptor
ILRAD	International Laboratory for Research on Animal Diseases
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaAc	Natriumacetat
NF- κ B	Nuklearer Faktor-kappa B
NRS	normales Kaninchenserum
OD	Optische Dichte
OFAGE	Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis
PEG	Polyethylenglycol
PFG	Pulsfeld-Gelelektrophorese
P/S	Penicillin/Streptomycin
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SV 40	Simian virus 40
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
TpM	<i>Theileria parva Muguga</i> infizierte Zellen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/ml	Enzymeinheit pro ml
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid

1. EINLEITUNG

Die Entwicklung und das Funktionieren eines vielzelligen Organismus ist durch ein komplexes Zusammenspiel vielfältiger biochemischer Prozesse gekennzeichnet, die auf Genebene gesteuert werden und meist verschiedenen Kontrollmechanismen unterliegen. Spontane Veränderungen in der DNA der Zelle oder durch externe Umweltfaktoren wie chemische Agentien, Strahlung, und bestimmte Virusinfektionen induzierte Veränderungen können die Regulation dieser Prozesse beeinflussen. Werden dabei Mechanismen gestört, die das Wachstum einer Zelle im Zellverband regulieren, so kann Krebs entstehen [1,2]. Viele der heutigen Erkenntnisse über Wachstum und Mechanismen der Krebsentstehung wurden durch systematische Untersuchung von Tumorzellen und von in vitro Modellsystemen erhalten. Trotzdem bleiben viele Fragen offen. Theileria-infizierte Lymphozyten sind in besonderem Maße dazu geeignet, weitere Aufschlüsse über die Wachstumskontrolle zu erhalten.

1.1. Theileria parva-induzierte Transformation von Rinderlymphozyten

Theileria parva verursacht in weiten Teilen Ostafrikas eine meist tödlich endende Rinderkrankheit, die als 'East-Coast fever' oder 'Theileriosis' bezeichnet wird [3,4]. Der protozoische Parasit durchläuft dabei einen komplizierten Generationszyklus, der über einen Zwischenwirt (die Zeckenart 'Rhipicephalus appendiculatus'), über Lymphozyten und Erythrozyten im Rind verläuft [5]. Inzwischen ist über den Verlauf der Krankheit und die Immunantwort einiges bekannt [6,7,8]. Eine durch den Parasiten induzierte starke Vermehrung infizierter Lymphozyten, führt in infizierten Rindern zunächst zum Anschwellen der Lymphknoten und zu Fieber. Parallel dazu wird auch eine Aktivierung des Wachstums nichtinfizierter Lymphozyten beobachtet. Durch eine unspezifische zellvermittelte Immunabwehr werden im späten Krankheitsstadium infizierte und auch nicht-infizierte Lymphozyten lysiert, was schließlich zum Tod der Rinder ungefähr 3 Wochen nach der Infektion führt. Der Tod tritt durch Ersticken infolge von Lungenödemen ein. Der Parasit infiziert B-, T- und Nullzellen, nicht aber Granulozyten und Monozyten oder Lymphozyten anderer Species, was seine Wirtsspezifität anzeigt [9]. In vivo werden vermutlich vor allem T-Zellen infiziert [9]. Aufgrund verschiedener Eigenschaften sind infizierte Lymphozyten für die Grundlagenforschung zum Studium von Mechanismen, die zur Entartung von Zellen führen, besonders geeignet:

- Lymphozyten können *in vitro* infiziert werden [10], sodaß relativ frühe Veränderungen, die bei der Transformation der Zellen eine Rolle spielen könnten, durch Vergleich mit nichtinfizierten Lymphozyten, untersucht werden können.
- Der immortalisierte und transformierte Zustand infizierter Zellen ist absolut von der Anwesenheit des Parasiten abhängig [11]. Tötet man den Parasiten mit dem theileri- ziden Medikament 'BW720C' (ein Naphtochinon-Derivat, im folgenden als '720C' bezeichnet), das spezifisch die Elektronentransportkette des Parasiten blockiert [12], so stellen die Zellen nach ungefähr 5 Tagen ihr Wachstum ein und zeigen in ihrer Morphologie typische Eigenschaften eines ruhenden Lymphozyten [11]. Durch diese Reversibilität des transformierten Zustands werden die Möglichkeiten zum Studium der Mechanismen der Transformation infizierter Zellen um vieles erweitert. Neben den Ereignissen, die nach einer *in vitro* Infektion untersucht werden können, kann auch analysiert werden, welche frühen Veränderungen nach einer Eliminierung des Parasiten stattfinden. In diesem Punkt unterscheidet sich dieses Modellsystem von anderen, in denen ein transformierter Zustand nach Infektion von Viren zwar induziert wird, aber danach auch ohne Anwesenheit der Viren aufrechterhalten wird [13].
- Zudem bietet dieses Modellsystem den Vorteil, daß für den Menschen keine Infektionsgefahr, wie beim Arbeiten mit anderen Modellsystemen besteht (z.B. Transformation von Zellen mit menschlichen Retroviren), da der Parasit wie erwähnt spezifisch Rinderzellen infiziert.

Die Reversibilität des transformierten Zustands ist eindeutig bewiesen, trotzdem sollte betont werden, daß 720C-behandelte Zellen gewisse Unterschiede zu normalen ruhenden Lymphozyten aufweisen. Sie können z.B. nicht wie ruhende Lymphozyten durch das Lektin Concanavalin A stimuliert werden [11]. Deshalb ist zu vermuten, daß bestimmte Signalketten, die bei ruhenden Lymphozyten zur Aktivierung der Zellen genutzt werden können, nach einer Infektion des Parasiten irreversibel blockiert sind. Eine weitere Kultivierung der Zellen ist bisher nur durch permanente Zugabe des Wachstumsfaktors Interleukin 2 (IL2) und des Phorbolesters 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acatat (TPA) möglich [14]. Aber auch diese Zellen sterben 6 bis 8 Wochen nach Abtötung des Parasiten ab.

Im folgenden werden einige Charakteristika infizierter Lymphozyten aufgeführt, die zeigen, daß nach Infektion der Zellen mit dem Parasiten molekulare Prozesse ablaufen, die bei der Aktivierung normaler Lymphozyten oder in transformierten Zellen auftreten. Alle Eigenschaften gelten nur in Zellen, in denen der Parasit anwesend ist und nicht durch das Medikament 720C abgetötet wurde.

Typische Eigenschaften einer aktivierten T-Zelle, die auch in infizierten Zellen auftreten, sind:

- lymphoblastoide Form [15,3]
- Bildung von Zellaggregaten durch direkten Zell-Zellkontakt [16,17]
- Expression des Wachstumsfaktors Interleukin 2 (IL2) und IL2-Rezeptoren [18,19,20,21]
- Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [22,23]
- Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) [24, für theileriainfizierte Zellen von Dr. A. Mastro und Mitarbeitern untersucht (Pennsylvania State University, USA,)]
- Hemmung des Wachstums durch Cyclosporin A [25,26]
- Wachstumsstopp bei Wegfall des stimulierenden Signals [27,11]

Zu den Eigenschaften, die den transformierten Zustand der infizierten Zellen anzeigen, gehören:

- Konstitutive Expression von IL2 [28,20] und IL2-Rezeptoren [21,29]
- Konstitutive Aktivierung von:
 - NF- κ B [23]
 - PKC [persönl. Mitteilung Dr.A.Mastro]
 im Gegensatz zur transienten Expression bzw. Aktivierung in normalen T-Zellen.
- keine vollständige Hemmung des Wachstums durch Cyclosporin A [27]
- erhöhte Teilungsrate (ca. 16-20 Stunden pro Zyklus) und unbegrenztes Wachstum (Immortalität) [4]
- autokrines Wachstum [14]
- Wachstum in Weichagar [persönliche Beobachtung]
- Bildung von Tumoren und Metastasen nach Injektion infizierter Zellen in nackte Mäuse (Tumorgenität und Metastasierungseigenschaften) [30,31]

Diese Aufzählungen sollten verdeutlichen, daß inzwischen einige Daten vorliegen, über welche Moleküle der Parasit die ungehemmte Proliferation der Zellen aufrechterhalten könnte. Das autokrine Wachstum könnte unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B verlaufen, der die IL2- und IL2-Rezeptor-Expression aktivieren könnte. Bei menschlichen T-Zellen, die mit dem menschlichen T-Tell-Leukämie-Virus-1 (HTLV-1) infiziert sind, aktiviert ein NF- κ B-ähnliches Virusprotein die genannten Gene [32,33,34]. Außerdem scheint in theileriainfizierten Zellen ein direkter Zell-Zellkontakt weitere wachstumsstimulierende Signale zu liefern, da das Wachstum durch Verhinderung des Zellkontakts (Schütteln der Kulturen) inhibiert, durch Verstärkung des Zellkontakts (Zugabe von abgetöteten Zellen) aber aktiviert werden kann [17]. Welche

Oberflächenmoleküle diesen Wachstumsstimulus vermitteln und wie die Signale zum Kern weitergeleitet werden, ist noch ungeklärt. Ob die Proteinkinase C (beteiligt bei der Signaltransduktion von der Zellmembran zum Zellkern [24]), dabei eine essentielle Rolle spielt, und durch welche molekularen Mechanismen der Parasit die Signalketten aktiviert, ist nicht bekannt.

Bevor die Thematik dieser Arbeit erläutert wird, werden einleitend einige allgemeine bereits bekannte Mechanismen genannt, die zur Entartung einer Zelle und der Entstehung maligner Tumore führen können. Bekannt ist, daß die Onkogenese meist einen Mehrstufenprozeß darstellt, was auch als Tumorprogression bezeichnet wird [35,36].

1.2. Tumorprogression

Mithilfe neuer Methoden der Molekularbiologie konnten einige Schritte der Tumorprogression identifiziert werden. Festgestellt wurde, daß sowohl bestimmte Gene aktiviert (Onkogene, metastasenassoziierte Gene) als auch negative Regulatorgene (als 'Tumorsuppressorgene' oder als 'Antionkogene' bezeichnet) inaktiviert werden [36]. Tumore entstehen meist aus den Abkömmlingen einer einzigen Zelle (klonaler Ursprung [37]), die die Fähigkeit erlangt, sich unbegrenzt zu teilen (Erlangung der Immortalität). Dabei sind Onkogene, aber z.B. auch Viren beteiligt, die Wachstumsfaktoren bzw. Wachstumsfaktorrezeptoren aktivieren [38,39]. Nach weiteren molekularen Veränderungen, durch die vermutlich die Aktivität von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und der metastasenassoziierten Gene beeinflußt wird [36], und durch Selektion können neue Varianten mit tumorigenen und metastasierenden Eigenschaften hervorgehen.

1.2.1. Onkogene

Onkogene sind veränderte Versionen normaler Gene (Protoonkogene), die durch verschiedene Mechanismen aktiviert werden können [40,41,42]. Die Proteine der Protoonkogene haben entscheidende Funktionen bei der Embryonalentwicklung, der Differenzierung und bei der Kontrolle des Zellwachstums [42]. Inzwischen sind ungefähr 50 verschiedene Onkogene bekannt. Je nach Lokalisation und Funktion der Proteine können sie in Gruppen eingeteilt werden. Cytoplasmatische und membranassoziierte Onkoproteine gehören funktionell zu Proteinkinasen (z.B. src, neu, raf), GTP-Bindungsproteinen (z.B. ras), Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. erbB, fms), und Wachstumsfaktoren (z.B. sis). Im Kern vorkommende Onkoproteine sind meist DNA-bindende Proteine, die als Trans-

kriptionsfaktoren wirken (z.B. jun, fos, erbA). Onkogene können somit in 3 entscheidende Prozesse, die bei der Regulation der Zellproliferation direkt miteinander verbunden sind, eingreifen: 1. Aufnahme der externen Signale durch Oberflächenmoleküle, wie z.B. Wachstumsfaktorrezeptoren. 2. Weiterleitung der Signale von der Membran zum Kern über Signalketten z.B. durch Proteinkinasen und 3. Regulation der Transkription von Genen im Kern durch Transkriptionsfaktoren. Vermutet wird, daß Kernonkogene wie z.B. das c-myc-Gen auch direkt bei der Replikation der DNA beteiligt sein könnten [43]. Die Einteilung nach der Lokalisation der Proteine ist nicht für alle Onkogene gültig, da gezeigt wurde, daß bestimmte Onkogene (SV40 large T-Onkogen) im Kern und im Cytoplasma wirken.

Es wurden allerdings Hinweise erhalten, daß die Aktivierung eines einzelnen Onkogens meist nicht ausreicht, um eine Zelle in einen transformierten Zustand zu überführen. Gezeigt wurde, daß verschiedene Onkogene bei der Transformation der Zelle synergistisch wirken und kooperieren [44,45,46]. Dies deutet wiederum darauf hin, daß die Onkogenese in mehreren Schritten abläuft, da mehrere Onkogene aktiviert werden müssen. Jedes Onkogen kann zu einer Veränderung in der Zelle führen, und gemeinsam können sie bestimmte Eigenschaften des Tumorphänotyps hervorrufen.

1.2.2. Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene können die Bildung von Tumoren unterdrücken. Umgekehrt kann der Verlust dieser Gene zur Tumorbildung führen. Daß ein Verlust eines Gens bzw. dessen Funktion ('loss of function') bei der Onkogenese eine Rolle spielt, hat die allgemeine Denkweise über die Entstehung von Krebs um viele Aspekte erweitert und ein neues Arbeitsgebiet eröffnet [36,47]. Die ersten Daten über die Existenz von Tumorsuppressorgen im Genom wurden durch Fusion von normalen Zellen mit tumorigenen Zellen erhalten [48,49,50]. Festgestellt wurde, daß bestimmte Chromosomen der normalen Zelle in der Hybridzelle vorhanden sein mußten, damit eine Tumorsuppression erfolgte. Ein Verlust der übertragenen Chromosomen während der Kultivierung der Hybridzellen führte zur Reexpression der Tumorigenität [51].

Bei verschiedenen rezessiv vererbaren Krankheiten (z.B. Retinoblastom (bösartiger Tumor der Netzhaut), Wilm's Tumor (bösartiges Nierengeschwulst)) des Menschen wird eine direkte Beteiligung von Tumorsuppressorgen bei der Onkogenese vermutet [52]. In vivo führt nach den bisherigen Ergebnissen erst der Verlust beider Allele ('loss of

heterozygosity') zur vollständigen Ausprägung des malignen Phänotyps [47,52]. Wird eine Deletion oder ein defektes Allel allerdings mit der Keimbahn vererbt, so besteht eine erhöhte Krebsanfälligkeit, da somatische Mutationen zum Funktionsverlust des gesunden Allels führen können.

Im Gegensatz zu Onkogenen wurden bisher nur wenige Tumorsuppressorgene kloniert [47]. Es wird vermutet, daß sie in ihrer Funktion genauso heterogen sind wie die Onkogene und in verschiedene Regulationsmechanismen des Zellwachstums eingreifen können. Die bisher klonierten Gene sollen z.B. bei der Signaltransduktion, der Differenzierung und der Regulation des Zellzyklus beteiligt sein [47]. Das am besten charakterisierte Tumorsuppressorgen ist das Retinoblastom-Gen Rb-1. Es handelt sich um ein Phosphoprotein, das DNA-Bindungseigenschaften besitzen [53] und direkt bei der Regulation der Zellproliferation (hemmender Einfluß auf den Zellzyklus) beteiligt sein soll [47]. Interessant ist die Beobachtung, daß das Rb-1-Protein mit Proteinen verschiedener transformierender Viren (SV40-T Antigen [54], Adenovirus E1A [55] und E7 des menschlichen Papilloma Virus HPV [56]) interagiert. Aufgrund dieser Daten wird vermutet, daß Tumorsuppressorgene als Gegenspieler von Onkogenen wirken können. Außerdem wurde deutlich, daß nicht nur der Verlust beider normaler Allele des Gens, sondern jeder Mechanismus, der mit der Funktion eines Tumorsuppressorgens interferiert, zur Inaktivierung des Proteins und somit zur Ausprägung des tumorigenen Phänotyps führen kann [55]. Der Verlust der Funktion von Tumorsuppressorgen soll auch bei häufig vorkommenden Krebskrankheiten des Menschen (wie z.B. Lungenkrebs) eine Rolle spielen [47].

1.2.3. Metastasenassoziierte Gene

Gene, die bei der Metastasierung einer Zelle essentiell sind, können eine normale Zelle nicht in eine Krebszelle überführen, sondern sie können dazu beitragen, daß sich die Krebszellen im Körper verteilen und Metastasen bilden. Es ist anzunehmen, daß sie eine sehr heterogene Gruppe von Genen beinhalten, deren Regulation durch Onkogene und vermutlich auch durch Tumorsuppressorgene beeinflusst werden kann [36,57]. Im folgenden werden einige Moleküle, die bei der Metastasierung beteiligt sein sollen, genannt:

- Proteolytische Enzyme (z.B. Kollagenase Typ I und IV): Proteolytische Enzyme werden zur Ablösung vom Muttertumor, zur Lysis der extrazellulären Bindegewebs-

matrix und Eindringen in die Bindegewebsmatrix zwischen den Zellen und zum Durchbrechen der Blutgefäßwand benötigt [57,58,59].

- Oberflächenmoleküle, die bei der Anheftung der Tumorzelle an die extrazelluläre Matrix benötigt werden: Dazu gehören Zelladhäsionsmoleküle, die auch als Integrine bezeichnet werden (z.B. Fibronectin, Laminin und Adhäsionsproteine von Leukozyten) [57,60,61].
- Oberflächenmoleküle, die bei der Anheftung der Tumorzelle an spezifische Organe beteiligt sind ('homing receptors'): Durch klinische Studien hat sich gezeigt, daß maligne Tumore eines bestimmten histologischen Typs sehr häufig Metastasen in bestimmten Organen bilden. Dieses 'homing'-Phänomen ist bereits von Lymphozyten bekannt, die durch eine spezifische Interaktion mit einem passenden Rezeptoren auf Endothelzellen in Lymphknoten eindringen können [57,62,63].
- Da Tumorzellen meist spezielle Tumorantigene auf der Zelloberfläche exprimieren, die das Immunsystem als 'fremd' erkennt, müssen metastasierende Zellen über einen Schutzmechanismus verfügen, um nicht vom Immunsystem eliminiert zu werden. Im Tiermodell wurde gezeigt, daß die Erkennung von Tumorzellen durch Killerzellen des Immunsystems durch MHC Klasse I-Oberflächenmoleküle der Tumorzellen beeinflusst wird [57,64,65].

Durch welche Mechanismen können Protoonkogene und metastasenassoziierte Gene aktiviert bzw. Tumorsuppressorgene inaktiviert werden?

In den meisten Tumorzellen werden in fortgeschrittenen Stadien der Tumorprogression Genomaberrationen identifiziert [66], die eine Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Folge haben können [36]. Protoonkogene können z.B. durch Punktmutationen (z.B. die ras-Gene) oder Deletionen im Gen (z.B. die raf-Gene), die die Struktur des Proteins verändern, aktiviert werden. Amplifikationen von Protoonkogenen (z.B. bei den myc-Genen) oder starke virale oder endogene Promotoren können zu einer Überexpression der Gene führen, die eine onkogene Wirkung mit sich bringt [40,41]. Tumorsuppressorgene können z.B. durch größere Deletionen im Genom verloren gehen [53] oder wie im Falle des Rb-1-Gens durch kleinere Deletionen innerhalb des Gens inaktiviert werden [47,67,68]. Neben diesen Veränderungen auf DNA-Ebene wird wie erwähnt eine Interaktion der Proteine der Onkogene mit den Proteinen der Tumorsuppressorgene und eine Aktivierung der metastasenassoziierten Genen durch Onkogene vermutet [55,57]. Ein weiterer Mechanismus, der die Expression der genannten Gene oder die Stabilität des Genoms verändern könnte, ist die DNA-Methylierung. Im nächsten Abschnitt wird beschrieben,

welche Evidenzen für eine Rolle der DNA-Methylierung bei der Tumorprogression vorliegen.

1.2.4. DNA-Methylierung und Tumorprogression

Die Vorgänge, die die Entwicklung eines Organismus regulieren, bezeichnet man als epigenetisch. Schon in sehr frühen Stadien der Embryonalentwicklung müssen in bestimmten Zellen bestimmte Gene an- oder abgeschaltet werden, damit eine Determinierung und Differenzierung in spezialisierte somatische Zellen erfolgt. Die chemische Modifikation von Cytosin zu 5-Methyl-Cytosin im Dinukleotid CpG stellt bei Vertebraten und Pflanzen einen epigenetischen Mechanismus der Genregulation dar [69,70]. Es wird vermutet, daß die DNA-Methylierung bei der Spermatogenese, der frühen Keimesentwicklung, der genomischen Prägung, der Differenzierung einer Zelle [71] und bei der Tumorprogression [72,73] eine Rolle spielt. Bevor auf den letzten Punkt eingegangen wird, werden einige Grundlagen zum Thema DNA-Methylierung erörtert.

Evidenzen für die Beeinflussung der Genregulation durch DNA-Methylierung

Verschiedene experimentelle Ansätze und die systematische Untersuchung des Methylierungsmusters spezifischer Gene in der DNA differenzierter Zellen lassen vermuten, daß die Genexpression durch DNA-Methylierung beeinflusst werden kann [70]. Dies gilt jedoch nicht für alle Gene und nicht für alle Organismen (bei *Drosophila* wurde bisher kein 5-Methylcytosin nachgewiesen). Bei Vertebraten wird durch Demethylierung die Expression verschiedener Gene aktiviert, während durch Methylierung bestimmte Gene inaktiviert werden können:

1. Verschiedene Zelltypen zeigen ein unterschiedliches Methylierungsmuster (Gewebespezifität), das relativ stabil von einer Generation zur anderen weitervererbt wird [74]. Bei Vertebraten beträgt der Anteil an 5-Methylcytosin-Basen im Genom ungefähr 3%; davon treten ca. 55-90% im CpG-Dinukleotid auf. Eine Erhaltungsmethylase erkennt bei der Replikation der DNA hemimethylierte CpG-Stellen auf dem parentalen DNA-Strang und fügt auf dem neusynthetisierten Tochterstrang Methylierungen in den komplementären CpG-Stellen hinzu. Das unterschiedliche Methylierungsmuster einer Zelle kann sowohl durch Setzen von Methylierungen (de novo Methylierungen) als auch durch Demethylierungen entstehen. De novo Methylierungen finden vermutlich hauptsächlich während der Spermatogenese und frühen Entwicklungsstadien statt [75,76]. Es wurde aber

gezeigt, daß exogene und endogene Sequenzen auch in somatischen Zellen und vor allem in permanenten und transformierten Zelllinien, wenn auch durch einen sehr viel langsameren Prozeß, methyliert werden können [77,78,79]. Der Mechanismus wie die Zelle erkennt, welche DNA-Sequenzen methyliert werden und welche vor Methylierungen geschützt werden müssen, ist noch nicht geklärt. In vitro Experimente mit isolierten Methylasen und Oligonukleotiden deuten darauf hin, daß die Erhaltungsmethylase, die für die Vererbung des Methylierungsmusters zuständig ist, auch de novo Aktivität besitzt (allerdings mit einer 30 bis 100-fach langsameren Kinetik) [80].

2. Die Genaktivität korreliert in den meisten Fällen mit Hypomethylierung. Typische gewebespezifische Gene sind sehr häufig während frühen Entwicklungsstadien und in allen somatischen Zellen, die das Gen nicht exprimieren, methyliert [81]. Nur in den spezialisierten Zellen, in denen sie exprimiert werden, findet eine Demethylierung statt [82,83]. Für das transposable Ac-Element der Maispflanze wurde gezeigt, daß eine Demethylierung unter Beteiligung eines spezifischen Proteinfaktors stattfindet [84]. Die konstitutiv exprimierten Haushaltsgene enthalten dagegen häufig Promotorbereiche mit einer Anhäufung an CpG-Nukleotiden ('CpG-Islands'), die im allgemeinen vollständig nichtmethyliert vorliegen [85].

3. Durch in vitro Methylierung bestimmter Gene kann die Expression in vivo unterdrückt werden. Festgestellt wurde, daß vor allem Methylierungen in 5' regulatorischen Sequenzen wirksam sind [86,87].

4. Eine Behandlung von Zellen mit dem Demethylierungsmittel 5-Azacytidin (5-Aza-C) kann zur Aktivierung stummer Gene und zur Differenzierung von Zellen führen [88,89]: 5-Aza-C ist ein Basenanalogue zu Cytosin, das bei der Replikation anstelle von Cytosin in die DNA eingebaut wird. Die Demethylierungen werden vermutlich durch eine Hemmung der DNA-Methylasen (Bildung eines Komplexes zwischen Enzym und modifizierter Base) verursacht.

Trotz dieser Evidenzen ist noch immer nicht geklärt, welche Rolle die DNA-Methylierung in der Zelle und speziell bei der Genexpression tatsächlich spielt. Die zum Teil hohen gewebespezifischen Unterschiede im Gesamtgehalt an 5-Methylcytosin (bis zu 10 Millionen Cytosin-Nukleotide), zeigen z.B., daß die überwiegende Anzahl an methylierten Stellen nicht die Genexpression beeinflussen kann [90]. Außerdem wurde gezeigt, daß das Methylierungsmuster einer Zelle einer gewissen Variabilität unterliegen kann [91,92]. Trotzdem gibt es Beispiele (siehe oben und unten), die eine Rolle der

Methylierung bei der Regulation der Expression bestimmter Gene nicht anzweifeln lassen. Deshalb wird angenommen, daß nur ein geringer Anteil der CpG-Nukleotide die Genexpression beeinflussen kann.

Wie könnte die Genexpression durch Methylierung beeinflußt werden?

Bis heute ist der Mechanismus, wie die Transkription von Genen durch DNA-Methylierung beeinflußt wird, noch nicht vollständig geklärt. Nachgewiesen wurde, daß eine Modifikation zu 5-Methylcytosin die DNA-Struktur beeinflussen kann [93], was sich auf die Interaktion zwischen spezifischen Proteinen mit der DNA auswirken kann. Im Falle eines Transkriptionsfaktors des Tyrosinaminotransferase-Gens und eines Transkriptionsfaktors von HeLa-Zellen wurde gezeigt, daß eine spezifische Methylierung die Protein-DNA-Interaktion verhindert [94,95]. Daß dies nicht für alle Transkriptionsfaktoren zutrifft, wurde bereits gezeigt [96]. Unklar ist noch, ob eine Demethylierung oder Methylierung ein primäres Ereignis zur Aktivierung oder Inaktivierung eines Gens darstellt. Es gibt Beispiele, die zeigen, daß eine Demethylierung zwar eine notwendige, aber keine ausreichende Voraussetzung für die Expression eines Gens sein kann [97] und daß eine Demethylierung erst nach der Induktion der Expression eines Gens erfolgt [98]. Es ist zu vermuten, daß bei der Regulation der überwiegenden Anzahl eukaryontischer Gene hauptsächlich und primär Transkriptionsfaktoren beteiligt sind. Eine darauffolgende Demethylierung könnte über die Beeinflussung der DNA-Struktur die weitere Expression der Gene erleichtern (offenes Chromatin), während durch Methylierung eine weitere Expression verhindert (geschlossenes Chromatin) wird [70]. Diskutiert wird auch eine Beeinflussung der RNA-Syntheserate, da auch Methylierungen innerhalb von Genen (in kodierenden Regionen) die Transkription hemmen können [99].

Welche Evidenzen gibt es für eine Beteiligung der DNA-Methylierung bei der Tumorprogression?

Es gibt verschiedene Hinweise, daß Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA bei der Entartung von Zellen beteiligt sein könnten. Vermutet wird eine Veränderung der Genexpression und ein Einfluß auf die Stabilität des Genoms:

- Bei der Untersuchung der DNA von Tumorzellen wurde festgestellt, daß sie meist einen niedrigeren Gesamtgehalt an 5-Methylcytosin besitzen als normale Gewebe [100] und daß spezifische Gene hypomethyliert vorliegen [101]. Demethylierungen wurden bereits in der DNA benigner Tumore identifiziert, und könnten somit bei der Initiation der Krebs-

entstehung durch Aktivierung von normalerweise stummen Genen eine Rolle spielen [102]. Neben möglicher Veränderungen in der Genexpression wird auch eine Beeinflussung der Stabilität des Genoms durch Hypomethylierungen diskutiert [103,47], da 5-Aza-Cytidin in höheren Konzentrationen zu Chromosomenumlagerungen führt [104]. Demethylierungen im Genom könnten somit zum Teil die primäre Ursache für Chromosomenaberrationen in Tumorzellen sein [103]. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß verschiedene chemische Carcinogene und UV-Licht Demethylierungen verursachen können [105,106]. Vermutet wird, daß Methylierungen durch Excisionsreparatur der DNA [107] oder durch eine Beeinflussung der Methylierungsenzyme verloren gehen [106]. Demethylierungen werden vermutlich auch durch Viren induziert. Nach Infektion und Integration der viralen DNA in das zelluläre Genom findet meist zunächst eine langsame de novo Methylierung viraler Sequenzen statt (z.B. Epstein-Barr-Virus [108], Adenovirus Typ12 [78,13], Herpes simplex [109], MMLV (Moloney murine leukemia virus) [110]), wobei auch angrenzende zelluläre Sequenzen methyliert werden können [111]. Vor der Aktivierung der Expression der viralen Gene werden die Sequenzen durch einen unbekanntem Mechanismus demethyliert, wobei auch Demethylierungen in angrenzenden (z.B. EBV [112], Ad12 [113]) oder anderen DNA-Bereichen (z.B. bei Herpes simplex [114]) des zellulären Genoms stattfinden. Es wird vermutet, daß die Demethylierung zellulärer Sequenzen zur Aktivierung von Genen führen kann, die bei der Transformation der Zelle von Bedeutung sind.

- Bis heute liegen nur wenige Daten über die Aktivierung von Onkogenen durch Demethylierungen vor. Eine Aktivierung der überwiegenden Anzahl an Onkogenen durch Demethylierung kann vermutlich ausgeschlossen werden, da viele Protoonkogene nur durch Veränderungen, die die Struktur des Proteins beeinflussen, ihre onkogene Wirkung zeigen. Bei Protoonkogenen, die nur in frühen Entwicklungsstadien und nur in bestimmten differenzierten Zellen eine Funktion übernehmen oder die durch eine Überexpression des Gens aktiviert werden, könnte eine Induktion oder Erhöhung der Expression durch Demethylierung bei der Onkogenese beteiligt sein. Für bestimmte Onkogene, c-myc [115], Ki-ras und Ha-ras [116] wurde festgestellt, daß sie in einigen Tumorzellen hypomethyliert (weniger methyliert) und in normalem Gewebe hypermethyliert (stärker methyliert) vorliegen. Im Falle des c-myc-Gens korrelierte eine spezifische Demethylierung in der DNA von Tumorzellen mit einer erhöhten Expression des Gens [115]. Nach Transfektion eines aktivierten und in vitro methylierten Ha-ras Onkogens wurde die tumorgene Aktivität des Gens unterdrückt, da keine Expression erfolgte [117,118].

- Über eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Methylierung liegen noch keine Daten vor. Es wurde lediglich festgestellt, daß in der DNA verschiedener Krebsarten (z.B. in Lungenkreb, T-Lymphomen) und nach Infektion von T-Zelllinien mit den Retroviren HTLV I und II ein hypermethylierter DNA-Bereich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 auftritt [119]. In diesem Bereich werden mindestens 3 Tumorsuppressorgene vermutet [120].

- Indirekte Hinweise, daß Onkogene, Tumorsuppressorgene oder metastasenassoziierte Gene durch DNA-Methylierung beeinflußt werden könnten, lieferten Experimente mit Aza-Cytidin. Untersucht wurde, ob die Tumorgenität nach Demethylierungen der DNA induziert werden kann, oder ob sich bestimmte Eigenschaften einer Krebszelle wie Tumorgenität und Malignität verändern. Es hat sich gezeigt, daß 5-Aza-C in vitro und in vivo wie ein Carcinogen wirken kann, d.h. es bildeten sich Tumore und Zellen wurden transformiert [121,122]. Durch 5-Aza-C verursachte Chromosomenaberrationen wurden bei den obengenannten Arbeiten jedoch nicht ausgeschlossen. Nach Zugabe von 5-Aza-C zu Zellen, die sich in verschiedenen Stadien der Tumorprogression befanden, zeigte 5-Aza-C unterschiedliche Wirkungen. Nach Behandlung tumorgener Zelllinien wurden z.B. nichttumorgene oder auch maligne metastasierende Varianten erhalten [103,123]. Nach Behandlung metastasierender Varianten resultierten nichtmetastasierende Varianten [123]. Daraus wurde geschlossen, daß sowohl Gene aktiviert werden, die bei einer fortschreitenden Progression beteiligt waren, als auch Gene, die die Progression reprimierten. Dies deutet darauf hin, daß die DNA-Methylierung in verschiedene Stadien der Tumorprogression eingreifen könnte und, daß der Prozeß durch Veränderung der Methylierung in einigen Tumorzellen reversibel sein kann [103,124]. Eine Instabilität metastasierender Eigenschaften wird auch bei der Kultivierung von Tumorzellen beobachtet, die nicht mit Aza-Cytidin behandelt wurden [103,125]. Aufgrund der Häufigkeit und Reversibilität ist dies vermutlich nicht auf Mutationsereignisse zurückzuführen [73,103].

1.3. Thematik und Ziel der Arbeit

Lymphozyten, die mit dem Parasiten *Theileria parva* infiziert wurden, eignen sich wie oben beschrieben in besonderer Weise als Modellsystem zum Studium der Mechanismen wichtiger Zellfunktionen, wie Wachstum, Immortalität, Tumorgenität und Malignität. In dieser Arbeit sollten durch Vergleich infizierter und nichtinfizierter Zellen Unterschiede auf molekularer Ebene nachgewiesen werden, um Rückschlüsse auf die obengenannten

Mechanismen ziehen zu können. Im ersten Teil der Arbeit wurde das c-raf-1-Gen untersucht, dessen Rolle als Onkogen aus anderen Modellsystemen bekannt war. Ausgehend von diesen Untersuchungen wurden im zweiten Teil der Arbeit Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA infizierter Zellen untersucht.

1.3.1. Mögliche Rolle des c-raf-1-Onkogens in infizierten Zellen

Das raf-Gen wurde ursprünglich als das transformierende Gen zweier Retroviren (3611-MSV, murine sarcoma virus [126] und MH2, avian acute lymphoma virus [127], enthält außerdem ein virales myc-Gen) identifiziert [128]. Homologe Sequenzen zum viralen raf-Onkogen wurden anschließend aus verschiedenen Organismen kloniert [129,130,131]. Beim Menschen wurden insgesamt 3 homologe aktive Gene (c-raf-1, A-raf, B-raf) nachgewiesen, die die raf-Genfamilie bilden [132,133]. Über das c-raf-1-Gen (es wird auch als Raf-1 bezeichnet) liegen bisher die meisten Daten vor:

Es handelt sich um eine cytoplasmatische serin-threonin-spezifische Proteinkinase [134,135], die primäre und sekundäre Strukturhomologie zur Liganden-Bindungsregion der Proteinkinase C bzw. aufgrund der ATP-Bindedomäne Strukturhomologie zur src-Familie der Onkogene aufweist [133,136]. Vermutet wird, daß die Kinaseaktivität nach Bindung spezifischer Liganden und/oder nach Phosphorylierung durch andere Kinasen aktiviert wird [133,137]. Eine Regulation des Gens auf Transkriptionsebene wurde bisher nicht nachgewiesen [133]. Das Transkript ist in geringem Maße in allen Zellen nachweisbar. Die genaue Funktion des Proteins ist noch nicht geklärt. Die Kinaseaktivität des c-raf-1-Proteins wird durch wachstumsstimulierende Signale, die an der Zellmembran erzeugt werden (nach Zugabe von Wachstumsfaktoren oder TPA, nach Transfektion des Onkogens v-src), aktiviert [137,133]. Deshalb wird vermutet, daß das c-raf-1-Protein bei der Übertragung wachstumsstimulierender Signale von der Zellmembran zum Kern beteiligt ist. Es gibt Hinweise, daß das Protein bei der Regulation von Genen eine Rolle spielen könnte, die durch den Transkriptionsfaktor AP1 reguliert werden [138]. AP1 setzt sich aus einem Proteinkomplex verschiedenener Proteine zusammen (aus den Onkoproteinen der c-jun - und c-fos-Genfamilie), der z.B. durch UV-Strahlen oder nach Applikation des Tumorpromotors TPA aktiviert wird und die Transkription verschiedener Gene anschaltet [139]. Vermutet wird, daß die Aktivierung der beiden Kernproteine c-fos und c-jun über die c-raf-1-Signalkette verlaufen könnte [138]. Für eine Aktivierung des c-fos-Gens liegen bereits Daten vor [140]. Das c-fos-Protoonkogen gehört zu den sog. 'early response' Genen, deren Transkription bei der Aktivierung von ruhenden Zellen z.B. kurz nach Zugabe von Wachstumsfaktoren transient aktiviert werden [141].

Wie wird das c-raf-1-Protoonkogen zu einem Onkogen aktiviert?

Das c-raf-1-Gen gehört zu den Protoonkogenen, deren onkogene Wirkung durch Strukturveränderungen des Proteins aktiviert wird. Neben Deletionen von 3'-liegenden kodierenden Sequenzen [142] enthalten die bisher isolierten aktivierten Varianten des Gens immer Deletionen in 5' kodierenden Sequenzen [130,143]. Fehlt dieser vermutlich regulatorische Bereich, so resultiert eine konstitutive Kinaseaktivität [133,143]. Desweiteren scheint die ATP-Bindedomäne für die Kinaseaktivität essentiell zu sein [133]. Durch Überexpression des normalen unveränderten Gens wurde bisher keine transformierende Wirkung nachgewiesen [133]. Eine Überexpression des Gens wurde aber bei verschiedenen Krankheiten des Menschen festgestellt [144,145,146]. c-raf-1 ist beim Menschen auf einem chromosomalen Bereich des Chromosoms 3 (p25) lokalisiert, in dem bei menschlichen Lungenkarzinomzellen häufig Deletionen identifiziert werden [147]. Ob das c-raf-1-Gen oder andere noch unbekannte Gene, die in der Nähe von c-raf-1 lokalisiert sind bei der Entartung der Zellen eine Rolle spielen, ist bisher nicht bekannt [145].

Im folgenden werden Charakteristika des c-raf-1-Gens aufgeführt, die verdeutlichen sollen, warum das Gen in dieser Arbeit untersucht wurde:

- Rolle des c-raf-1-Proteins bei der Weiterleitung wachstumsstimulierender Signale zum Kern: Wie erwähnt ist das c-raf-1-Protein wie die Proteinkinase C, ein cytoplasmatisches Protein mit serin-threonin-spezifischer Proteinkinase-Aktivität. Es wird vermutet, daß dieses Protein neben den Signalketten, die über die Proteinkinase C und andere Kinasen verlaufen, einen alternativen oder zusätzlichen Weg zur Weiterleitung von externen Signalen in den Kern darstellt [133,137].
- Rolle des c-raf-1-Proteins bei der Aktivierung von B- und T-Zellen: Das c-raf-1-Gen wird in mitogen-stimulierten B- und T-Zellen [148], in Burkitt-Lymphomzelllinien und in hyperaktivierten B- und T-Zellen von Patienten mit Autoimmunkrankheiten [146] verstärkt transkribiert, sodaß eine Rolle des Gens bzw. Proteins bei der Aktivierung von B- und T-Zellen vermutet wird.
- Rolle des c-raf-1-Gens bei der Tumorgenität von Zellen: In Kombination mit dem myc-Onkogen (Kooperation der beiden Onkogene [46]) erzeugt das virale raf-Onkogen im Tiermodell Lymphome der B- und T-Zelllinie [149,150].

Wie erwähnt sind bereits einige Moleküle bekannt, die nach einer Infektion konstitutiv exprimiert und aktiviert werden. Über welche Signalketten die wachstumsstimulierenden Signale schließlich zum Kern weitergeleitet werden, wurde noch nicht geklärt. Da infizierte Zellen typische Eigenschaften aktivierter und transformierter Lymphozyten aufweisen und das c-raf-1-Gen sowohl beim Wachstum als auch bei der Entartung von B- und T-Zellen beteiligt sein könnte, sollte dieses Gen in theileriainfizierten Zellen untersucht werden.

Zunächst mußte eine homologe Rinder-DNA-Probe für Hybridisierungsexperimente kloniert werden. Danach sollte die DNA-Organisation des Gens und umliegender Bereiche, die Transkription des Gens und die Expression des Proteins in nichtinfizierten, 720C-behandelten und infizierten Zellen untersucht werden. Folgende Fragen wurden gestellt:

- Treten in der DNA infizierter Zellen Strukturveränderungen in Sequenzen des raf-Gens oder im umliegenden DNA-Bereich auf?
- Treten in infizierten Zellen Unterschiede zu nichtinfizierten Zellen und 720C-behandelten Zellen auf RNA-Ebene auf?
- Treten in infizierten Zellen Unterschiede zu 720C-behandelten Zellen bezüglich des raf-Proteins auf?

Bei der Untersuchung, ob Strukturveränderungen in umliegenden DNA-Bereichen des c-raf-1-Gens auftreten, wurde nach Verdau mit einem methylsensitiven Restriktionsenzym ein unterschiedliches Restriktionsmuster in infizierten und nichtinfizierten Zellen erhalten, was auf einen Unterschied in der Methylierung der DNA infizierter Zellen zurückzuführen war. Im 2. Teil der Arbeit wurden deshalb Veränderungen des Methylierungsmusters in der DNA infizierter Zellen untersucht.

1.3.2. Untersuchung von Veränderungen in der Methylierung der DNA infizierter Zellen und der Rolle der Methylierung für die Zelle

Veränderungen in der Methylierung der DNA von Tumorzellen werden, wie erwähnt, häufig beobachtet und sollen bei der Tumorprogression eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde eine Hypermethylierung in Schnittstellen selten schneidender CpG-Restriktionsenzyme identifiziert. Diese Enzyme haben inzwischen eine besondere Bedeutung erlangt, da sie aufgrund ihrer längeren Erkennungssequenz (meist 6 oder 8 Basen) und ihrer Sensitivität gegenüber Methylierungen nur sehr selten, aber bevorzugt

in Promotorbereichen schneiden [151]. Aus diesem Grund werden die Enzyme zur Kartierung großer chromosomaler Bereiche und zur gezielteren Klonierung noch unbekannter kodierender Sequenzen eingesetzt [152,153,154].

Aufgrund der unterschiedlichen Methylierung in infizierten und nichtinfizierten Zellen wurde vermutet, daß die Methylierung eine Folge der Infektion der Lymphozyten sein könnte. Folgende Fragen wurden gestellt:

- Handelt es sich um eine spezifische Veränderung, die in allen infizierten Zelllinien auftritt?
 - Wird der Parasit zur Aufrechterhaltung der Methylierung benötigt?
 - Zu welchem Zeitpunkt wird die Methylierung nach einer Infektion gesetzt?
 - Können in anderen chromosomalen DNA-Bereichen Unterschiede festgestellt werden?
 - Welche Veränderungen treten nach 5-Aza-Cytidin-Behandlung infizierter Zellen auf?
- Wird die Tumorgenität der Zellen beeinflusst?

2. MATERIAL

2.1. CHEMIKALIEN, RADIOISOTOPE UND ARBEITSMITTEL

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Actinomycin D	Sigma, München
Agarose, Typ II, Typ VII	Sigma, München
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Amberlite	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Bio Rad, München
Ampicillin	Sigma, München
AMV-Reverse Transkriptase	Live Science, Genf
Aprotinin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienplatten 9cm	Greiner, Nürtingen
Bakterienplatten, 25cm	Gibco, Eggenstein
Bal 31-Exonuklease	New England Biolabs, Schwalbach
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Caesiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
Concanavalin A	P-L Biochemicals, Inc., Milwaukee
Coomassie Brilliant Blau	Bio Rad, München
desoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
dideoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, München
Dithiothreitol, DTT	Gibco, Eggenstein
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
DNase	Boehringer, Mannheim
E.coli DNA-PolymeraseI (Klenow)	New England Biolabs Schwalbach
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ficoll	Serva, Heidelberg
Ficoll Paque	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum, FCS	Gibco, Karlsruhe

Giemsa	Merck, Heidelberg
Glycerin	BRL Inc., Neu-Isenburg
Glyoxal	Sigma, München
Harnstoff	BRL (Gibco), Karlsruhe
Hepes	Sigma, München
Hybond N Nylonfilter	Amersham-Buchler, Braunschweig
hr Interleukin2 (ala-125)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Isoton	Coulter Electronics, Krefeld
Jodoacetamid	Sigma, München
Leupeptin	Sigma, München
Lysozym	Boehringer, Mannheim
L15	Gibco, Karlsruhe
Methionin-freies L15	Gibco, Karlsruhe
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Bio Rad Laboratories, München
Mikrotiterplatten	Linbro, Flow Lab.GmbH, Meckenheim
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
NACS-Prepac Säulen	BRL Inc, Neu-Isenburg
Natrium-Azid	Merck, Darmstadt
Nick-Translations-Kit	Amersham-Buchler, Braunschweig
Nitrocellulose Filter	Schleicher & Schüll, Dassel
Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
oligo-dT-Cellulose Typ 2	Collaborative Research Inc., Bedford
Protein-A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
PEG	Sigma, München
Proteinase K	Merck, Darmstadt
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva, Heidelberg
Quickszint	Zinsser, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	ABL, Basel
	Boehringer, Mannheim
	Promega Biotek, Heidelberg
	Pharmacia, Freiburg
	New England Biolabs, Schwalbach
	BRL Inc., Neu-Isenburg
RNase A	Boehringer Mannheim
RNASin	Promega, Biotec, Heidelberg
RPMI	Gibco, Karlsruhe

Rubidiumchlorid	Fluka, Neu-Ulm
Salicylsäure	Sigma, München
SDS	Serva, Heidelberg
Sepharose	Pharmacia, Freiburg
T4 DNA Ligase	Amersham Buchler, Braunschweig
TEMED	Bio Rad Laboratories, München
TPA	Sigma, Deisenhofen
TPCK	Sigma, München
transfer RNA (Hefe)	Boehringer, Mannheim
Tris	Sigma, München
Triton X 100	Bio Rad, München
Trypan Blau	Serva, Heidelberg
Tryptose Phosphate Broth	Gibco, Karlsruhe
Whatman GF/C -Filter	Bender & Hobein, Karlsruhe
Whatman 3MM-Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe
Whatman DE 81-Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Falcon, Heidelberg
	Greiner, Meckenheim

α -³²P-dCTP (370 MBq/ml, >15 TBq/mmol)
 α -³⁵S-dATP (296 MBq/ml, >14,8 TBq/mmol)
(methyl-³H) Thymidin (37MBq/ml>1.55TBq/mmol)
L-³⁵S-Methionin (555 MBq/ml, >49,1 TBq/mmol)
¹⁴C-methylierte Proteine (185 kBq/ml)

Die Radioisotope wurden von Amersham Buchler, Braunschweig bezogen. Chemikalien, soweit nicht gesondert aufgeführt, wurden von den Firmen Merck, Serva oder Sigma bezogen.

2.2. ZELLEN UND BAKTERIEN

Eukaryontische Zellen:

In vivo infizierte *Theileria parva* -infizierte Rinderlymphozyten:

-*Theileria parva* (Muguga) TpM Klon 803 [155]

-*Theileria parva* (Kilifi) TpK

In vitro infizierte *Theileria parva*-infizierte Rinderlymphozyten (erhalten von ILRAD, Nairobi):

-D409/T1 und D409/T4 (T-Zellen mit CD4/CD8 T-Zellmarkern)

-D409/N1 (Nullzellen, T-Zellen ohne CD4/CD8 T-Zellmarker)

-D409/B1 (B-Zellen mit B-Zellmarkern)

In vitro infizierte *Theileria parva*-infizierte Rinderlymphozyten (in dieser Arbeit nach in vitro Infektion ConA-stimulierter Lymphknotenzellen etabliert):

-In3 , In7, In9, In10 (T-Zellen mit CD4/CD8 T-Zellmarkern)

Nichtinfizierte Rinderlymphozyten isoliert aus Lymphknoten von Schlachtrindern: Die Lymphknoten wurden vom Schlachthof, Karlsruhe erhalten.

Bakterien :

- E. coli TG1 : Derivat von JM 101
 Genotyp Δ (lac pro) , supE , thi , hsd Δ 5 (r-m-)
 F' traD 36, proAB, lacI q Z , dN15
- E. coli C600 : F-, thi -1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44
- E. coli NM538 : Derivat von ED8654, supF, hsdR
- E. coli NM539 : Derivat von NM538, supF, hsdR (P2 cox)

2.3. GEWEBEKULTUR-MEDIEN

Complete Leibovitz 15-Medium (cL15):

10% FCS, 1h bei 56 °C inaktiviert
 10% Tryptose Phosphate Broth
 20 µg/ml L-Glutamin
 20 mM HEPES (pH 7,1)
 1% Penicillin/Streptomycin

Complete RPMI-Medium (cRPMI):

10% FCS, 1 h bei 56 °C inaktiviert
 20 µg/ml L-Glutamin
 20 mM HEPES (pH 7,1)
 50 µg 2-Mercaptoethanol

Nährmedium bei ³⁵S-Methionin-Markierung:

cRPMI ohne Methionin und
 mit deionisiertem FCS (über Nacht gegen PBS)

2.4. NÄHRMEDIEN FÜR BAKTERIEN

2 x YT Bakterienmedium:

0,8% Bacto-Trypton
 0,5% Bacto-Hefeextrakt
 0,5% NaCl

NZCYM-Medium:

10% NZ-Amin
 5% Bacto-Hefeextrakt
 5% NaCl
 1% Casaminosäuren
 2% MgSO₄·7H₂O
 mit NaOH auf pH 7,5 einstellen

SOB-Medium:

20% Bacto-Trypton
 5% Bacto-Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 2,5 mM KCl
 die Mg²⁺-Salze nach dem Autoklavieren
 steril filtriert zugeben

LB-Medium:

10% Bacto-Trypton
 5% NaCl
 5% Hefe-Extrakt
 1% Glukose

H-Medium:

10 % Bacto-Trypton
 8% NaCl

Alle Medien wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. Zur Herstellung fester Nährböden wurde 15% Agar, zur Herstellung von Top-Agar 7,5% Agar zugegeben.

SM-Medium:

5,8% NaCl
 2% MgSO₄x7H₂O
 50 ml/l 1M Tris, pH 7,5
 5 ml/l 2% Gelatine

2.5. PUFFER UND LÖSUNGEN

PBS (pH 7,3):

0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 M MgCl₂, 6,5 mM Na₂HPO₄,
 1,5 mM KH₂PO₄

Concanavalin A:

1 mg/ml in PBS

720C:

1mg/ml in Ethanol

TPA:

200 µg/ml in DMSO

1xTBE:

135 mM Tris, 7,5 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA pH 8,9

1xTE:

10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8

1xNTE:

10 mM Tris, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl pH 7,5

PiPpi:

200 mM NaH₂PO₄, 300 mM Na₂HPO₄, 1,5% Na₄P₂O₇

20xSSC:

3 M NaCl, 300 mm NaCitrat pH 6,5

50xDenhardt's-Lösung:

1% Ficoll, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% BSA

2xRNA-Bindungspuffer:

1M NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 2 mM EDTA, 0,2% SDS

RNA-Waschpuffer:

0,1 M NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,1% SDS

RNA-Elutionspuffer:

10 mM Tris pH7,4, 1 mM EDTA, 0,05% SDS

RNA-Denaturierungspuffer:

30 µl 30% deionisiertes Glyoxal, 105 µl DMSO, 4,2 µl 50xRNA Laufpuffer

RNA-Ladungspuffer:

50% Glycerin, 10 mM Na₂HPO₄, 0,4% Bromphenolblau

50xRNA-Laufpuffer:

500 mM Na₂HPO₄, pH 6,9

Zellysispuffer für ³⁵S-markierte Proteinextrakte:

10 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 5 mM Jodoacetamid, 0,5% NP40. Bei -20 °C unter Lichtabschluß aufbewahrt. Vor Gebrauch, Zugabe von Proteinase-Inhibitoren: 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml TPCK, 10 µg/ml PMSF.

Protein A-Sepharose-Puffer NET1:

50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% Na-Azid, 0,5% Triton X-100 oder 0,5% NP40, 1 mg/ml BSA : nach dem Ansetzten mit HCl auf pH 7,5 einstellen.

Protein A-Sepharose-Puffer NET2:

entsprechend NET1, aber mit 150 mM NaCl, ohne BSA

Proteinproben-Puffer:

80 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau. Zugabe von 5% 2-Mercaptoethanol vor Benutzung.

Elektrodenpuffer für SDS-Gelelektrophorese:

192 mM Glycin, 25 mM Tris pH 8.3, 0,1% SDS (Lämmli-Puffer)

Färbelösung für Proteingele:

50% Methanol, 10% Eisessig, 0,5% Coomassie Brilliant Blau
(Farbstoff zuerst in Methanol lösen)

Entfärbelösung für Proteingele:

25% Methanol, 7% Essigsäure

Kern-Lysis-Puffer für genomische DNA-Präparation:

10 mM Tris, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8

Kern-Lysis-Puffer für genomische DNA-Präparation (PFG-Elektrophorese):

0,5% EDTA, 10 mM Tris pH 8, 0,5% SDS, vor Gebrauch Zugabe von 0,5 mg/ml
Proteinase K

Restriktionspuffer:

10xlow, medium, high = 0, 500, 1000 mM NaCl, + jeweils 10 mM Tris pH 7,5, 10 mM
MgCl₂, 100 µg/ml BSA. Für die Restriktionsenzyme BssHIII, MluI, NotI, NaeI, NarI,
SacII, SfiI wurden jeweils die von der Lieferfirma angegebenen Restriktionspuffer
hergestellt.

5x DNA-Ladepuffer für DNA:

10 mM EDTA, 10% Glycerin, 0,1% SDS, 0,02% Bromphenolblau

5x Ligationspuffer:

250 mM Tris pH 7,4, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 5 mM Spermidin, 5 mM ATP

5xKinasierungspuffer:

50 mM ATP, 50 mM MgCl₂, 350 mM Tris pH 7,6

Lysozym-Lösung für Plasmid-Präparation:

2 mg/ml Lysozym, 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8

Sanger-Ladungspuffer:

100 ml deionisiertes Formamid, 4 ml 500 mM EDTA pH 8, 0,03 g Xylencyanol, 0,03 g
Bromphenolblau

2.6. GENBIBLIOTHEKEN UND DNA-SONDEN

Genbibliotheken:

- genomische Rinder-Genbibliothek: hergestellt aus Rinderleber-DNA, kloniert in Lambda EMBL3-Vektor, erhalten von Dr. G. Schütz (DKFZ, Heidelberg).
- Rinder-cDNA-Bibliothek: hergestellt aus RNA theileriainfizierter Rinderlymphozyten, kloniert in Lambda 1149-Vektor, erhalten von Dr. M. Carrington (IGT, Karlsruhe).

DNA-Sonden:

- menschliches c-raf-1: bezogen von Amersham Buchler, Braunschweig.
- Rinder Interleukin 2 und Interleukin 2-Rezeptor (Tac-Antigen): erhalten von Dr. R. Reeves (Washington State University).
- Rinder gamma-Interferon: erhalten von Ciba Geigy (Basel).
- Rinder CD3: erhalten von Dr. I. Morrison, ILRAD (Nairobi).
- Rinder Interleukin 4: erhalten von M. Eichhorn, (IGT, Karlsruhe).
- Rinder c-myc: erhalten von Dr. D. Dobbelaere, (IGT, Karlsruhe).
- Rinder invariante Kette: erhalten von Dr. D. Dobbelaere (IGT, Karlsruhe).
- Rinder Aktin und *Theileria* Aktin: erhalten von Dr. A. Ehrfeld (IGT, Karlsruhe).

3. METHODEN

3.1. ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN MIT NUKLEINSÄUREN

3.1.1. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration der in Wasser gelösten Nukleinsäuren wurde über die optische Dichte (OD) im Spektralphotometer bestimmt. Einer optischen Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprechen 50 µg/ml doppelsträngige DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Aus dem Verlauf der spektralen Absorption wird die Verunreinigung der Nukleinsäure-Lösung ersichtlich. Die OD sollte bei 280 nm höchstens zwischen 50 und 70% der OD bei 260 nm betragen.

3.1.2. Phenol/Chloroform-Extraktion einer Nukleinsäure-Lösung

Um Proteinverunreinigungen aus einer Nukleinsäure-Lösung zu entfernen, wurde diese mit Wasser auf mindestens 50 µl aufgefüllt. Nach Zugabe eines gleichen Volumens Phenol (TNE-gesättigt) und eines gleichen Volumens Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde kräftig gemischt und kurz zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige wässrige Oberphase wurde zweimal mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

3.1.3. Fällung von Nukleinsäuren

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit NaAcetat (pH 4,8) oder mit NaCl auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht und ein 2,5-faches Volumen an Ethanol zugegeben. Die Fällung erfolgte entweder 30 min bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C. Die ausgefallenen Nukleinsäuren wurden 10 min bei 10000 rpm abzentrifugiert und anschließend im Vakuum getrocknet.

3.1.4. Restriktionsverdau

Eine Enzymeinheit ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde vollständig verdaut. Pro µg zu schneidender DNA wurde ein Überschuß von 2-3 Einheiten Enzym in 20-100 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über mindestens 2 Stunden oder über Nacht unter den vom Hersteller angegebenen Temperatur- und Pufferbedingungen. Es wurde ein Satz von 3 Reaktionspuffern mit

unterschiedlichem Salzgehalt verwendet ('high', 'medium' und 'low'). Bei einem Verdau mit mehr als einem Enzym, die unterschiedliche Restriktionspuffer benötigen, wurde nacheinander im gleichen Reaktionsgefäß verdaut und die Puffer in der Reihenfolge von 'low' nach 'high' zugegeben.

3.1.5. Restriktionsverdau langkettiger DNA-Moleküle für Pulsfeldgelelektrophorese

Wie in 3.4.3. beschrieben wird, wurden alle Arbeitsschritte mit genomischer DNA, die in Agarose eingebettet vorliegt, durchgeführt. Die Agaroseblöcke wurden mit einem Skalpell (sauber!, EtOH benutzen) auf eine definierte Größe zurechtgeschnitten (möglichst Breite der Geltasche und variable Länge je nach einzusetzender DNA-Konzentration). Es wurde darauf geachtet, daß jeweils gleiche Mengen an DNA eingesetzt wurden, da DNA-Fragmente gleicher Größe bei unterschiedlicher Menge ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen. Die Gelstücke wurden zunächst 2 x 1 Stunde in 1ml T.E. (10mM Tris pH8, 0,1mM EDTA) bei Raumtemperatur inkubiert. Als Inkubationsgefäße wurden Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen (2ml Volumen / Vertiefung) verwendet, bei einem Wechsel der Lösung wurde die alte Lösung jeweils mit einer Pasteurpipette entfernt. Danach wurden die Gelstücke 2 x 1 Stunde bei Raumtemperatur in 0,5ml des entsprechenden Restriktionspuffers inkubiert. Für den folgenden Verdau wurden die Gelstücke in ein 2,5 ml Eppendorf-Röhrchen (mit konisch zugespitztem Boden und Schraubdeckel) überführt, und danach 75 µl 1x Restriktionspuffer zugegeben (bei diesem Volumen war ein Gelstück mit einer Größe von ungefähr 4 x 6mm gut mit Flüssigkeit bedeckt). Nach Zugabe des Restriktionsenzym (ca. 20U Enzym/Ansatz bzw. Verdau) wurde über Nacht bei der entsprechenden Temperatur verdaut. Das Eppendorf-Röhrchen wurde dabei vollständig im Wasserbad untergetaucht, um die Bildung von Kondensströpfchen am Deckel zu vermeiden. Der Schraubdeckel-Verschluss des Röhrchens wurde mit Parafilm abgedichtet. Nach dem Verdau wurde die Verdau-Lösung entfernt. Das Gelstück wurde bei anschließender Gelelektrophorese ungefähr 30 min im Elektrophorese-Puffer inkubiert oder mit TE versetzt und bei 4°C für eine spätere Elektrophorese aufbewahrt.

Wurde ein Doppelverdau durchgeführt, bei dem unterschiedliche Restriktionspuffer eingesetzt wurden, so wurde zuerst mit dem Enzym verdaut, das niedrigere Salzkonzentrationen benötigt. Nach diesem ersten Verdau wurde das Gelstück wieder in eine Vertiefung einer Zellkulturplatte überführt und vor dem zweiten Verdau zuerst 1 Stunde in 1ml T.E. und danach 2 x 1 Stunde in 0,5ml des zweiten Restriktionspuffers inkubiert.

3.2. DNA-KLONIERUNGSTECHNIKEN

3.2.1. Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die gewünschte Bande wurde durch UV-Bestrahlung lokalisiert. In einen mit dem Skalpell unterhalb der Bande eingeführten Schnitt wurde ein Stück DEAE-Zellulosepapier eingeführt. Die Elektrophorese wurde danach solange fortgesetzt, bis die Bande in den Papierstreifen hineingewandert war. Der Papierstreifen wurde aus dem Gel entfernt und in ein Eppendorf-Röhrchen mit 500 µl einer 1,5 M NaCl-Lösung überführt. Nach sehr kräftigem Schütteln (Vortex) und 20 min Inkubation bei 65 °C war die DNA in den Puffer eluiert. Das Papier wurde folgendermaßen abfiltriert: Ein Eppendorf-Röhrchen wurde an seinem konischen Ende mit einer Kanüle durchbohrt, eine Spatelspitze Quarzsand hineingegeben und auf ein intaktes Eppendorf-Röhrchen gesetzt. In das obere Röhrchen wurde die papierhaltige DNA-Lösung gegeben und beide Röhrchen aufeinandersitzend in der Eppendorf-Zentrifuge einige Sekunden zentrifugiert. Die eluierte DNA (im unteren Röhrchen) wurde gereinigt und gefällt.

3.2.2. Präparation von Vektoren für die Subklonierung von DNA-Fragmenten

5 µg der Vektor-DNA wurden mit dem gewünschten Enzym in einer 50 µl-Reaktion verdaut, wobei mit dieser Methode je nach verwendetem Enzym Vektoren mit stumpfen ('blunt') oder überstehenden ('sticky') Enden erzeugt werden konnten. Ein Aliquot von 500 ng wurde durch den Vergleich mit ungeschnittenem Vektor in einem Agarose-Minigel auf Vollständigkeit des Verdaus hin überprüft. Der verbleibende Rest der DNA wurde dephosphoryliert (s. 3.2.4.), Phenol/Chloroform-extrahiert, gefällt, zentrifugiert und das Sediment mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst.

3.2.3. Auffüllen von 5'-Überhängen

Etwa 1 µg des DNA-Fragmentes wurden mit 5 Einheiten DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) in Polymerase-Reaktionspuffer in einem Volumen von 20 µl für 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurden 2 µl einer 2 mM dNTP-Lösung zugegeben und weitere 30 min bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Die DNA wurde gefällt, zentrifugiert und das Sediment mit 80% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet.

3.2.4. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die DNA wurde in einem Endvolumen von 100 μ l Dephosphorylase-Puffer mit 4 Enzymeinheiten Alkalische Phosphatase versetzt. Nach 30 min Reaktionszeit bei 37 °C wurden weitere 4 Enzymeinheiten zugesetzt und noch einmal 30 min inkubiert. Anschließend erfolgten 10 min Inkubation bei 68 °C. Zur Entfernung des Enzyms wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

3.2.5. Ligation

Ligation in wässriger Lösung:

1 μ l 10x Ligase-Puffer wurde mit 1 μ l einer 10 mM ATP-Lösung und 50 ng Vektor-DNA gemischt. Dazu wurde soviel Insert-DNA gegeben, daß das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA etwa 2:1 betrug. Mit Wasser wurde auf 9 μ l aufgefüllt und 1 μ l T4 DNA-Ligase (2,5 U/ μ l) zugegeben. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 15 °C.

Ligation im Agarose-Gel:

Die DNA wurde in Agarose Typ VII (niedrig schmelzende Agarose) aufgetrennt, ausgeschnitten und die miteinander zu ligierenden Fragmente zusammengegeben. Anschließend wurden die Gelstücke 10 min bei 68 °C geschmolzen, auf 42 °C abgekühlt und mit Reaktionspuffer und Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 μ l ligiert. Die Reaktionsbedingungen waren dieselben wie bei der Ligation in wässriger Lösung.

3.2.6. Bal 31 Exonuklease-Verdau

10 μ g des Plasmids wurden mit EcoRI verdaut, um das Insert herauszuschneiden. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung wurde die DNA in 25 μ l Wasser resuspendiert. Durch Zugabe von 25 μ l 2xBal31-Puffer (1200 mM NaCl, 24 mM CaCl₂, 24 mM MgCl₂, 40 mM Tris-HCl pH 8) und 0,5 μ l Bal 31 (Biolabs, 0,75 U/ μ l), erfolgte der Start des Exonuklease-Verdaus bei 30 °C. Nach 30 sek, 2-, 4-, 6-, und 10 min wurden der Reaktion je 10 μ l entnommen und zum Stoppen der Reaktion in 50 μ l Phenol/20 μ l 50 mM EGTA/17,5 μ l Wasser gegeben. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Überprüfung der Größe der Deletionen in einem 0,8% Agarose-Gel wurde in Ethanol gefällt und in 100 μ l Wasser resuspendiert. Eventuell überhängende Enden wurden aufgefüllt (s. 3.2.3). Bei Einzelverdaus wurde mit dem anderen Enzym der multiplen Vektor-Klonierungsstelle nachgeschnitten. Die DNA wurde gereinigt, anschließend gefällt und in entsprechend geschnittene Vektoren subkloniert (s. 3.2.2).

3.2.7. Transformation von Bakterienzellen nach Hanahan [156]

Präparation von kompetenten Zellen für die Transformation:

Eine Übernacht-Kultur von *E. coli* TG1 in SOB-Medium mit Magnesiumsalzen wurde 1:50 in frischem SOB + Magnesiumsalzen verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 herangezüchtet. Die Zellen wurden in einer ungekühlten Zentrifuge bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert und in einem Drittel ihres ursprünglichen Volumens in kaltem T-Puffer resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis erfolgte wieder eine Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 min, diesmal aber in einer gekühlten Zentrifuge bei 4 °C. Das Zellsediment wurde in einem Zehntel des Ursprungsvolumens in kaltem T-Puffer resuspendiert und sofort für die Transformation der Bakterien verwendet.

T-Puffer (100 ml): 0,2 g MES-KOH (pH mit KOH auf 6,2 einstellen, bevor andere Salze zugegeben werden)
1,2 g RnCl
0,9 g MnCl₂
0,08 g [Co(NH₃)₆]C
0,147 g CaCl₂
mit Wasser auf 100 ml auffüllen und steril filtrieren.

Transformation mit Plasmiden:

Zu 200 µl kompetenten Zellen wurden maximal 5 µl eines Ligationsansatzes gegeben und für 1h auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock durch 90 sek Inkubation bei 42 °C. Nach 1 h Inkubation auf Eis wurde 800 µl SOB-Medium zugegeben. Die Zellen wurden für 1 h in ein 37 °C-Wasserbad gestellt. Dann erfolgte die Zugabe von 100 µl 2% X-Gal und 30 µl 2% IPTG als Indikator. Die Zellen wurden in Petrischalen auf LB-Agar + Ampicillin 100 µg/ml als Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation mit M13-Phagen:

Zu 200 µl kompetenten Zellen wurden max. 5 µl eines Ligationsansatzes gegeben und 45 min auf Eis inkubiert. Nach 90 sek Hitzeschock bei 42 °C erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für 15 min. Zu jedem Ansatz wurde nun 3 ml H-Top-Agar, der bei 45 °C flüssig gehalten worden war und 50 µl 2% X-GAI, 30 µl 2% IPTG und 30 µl TG1-Übernacht-

Kultur enthielt, gegeben. Nach kurzem Mischen wurde der Top-Agar auf Petrischalen mit H-Agar gegossen und die Platten nach dem Erstarren über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei jeder Transformation wurden 3 Kontrollen mitgeführt: 1. Um die Effizienz der Transformation beurteilen zu können, wurde ein Ansatz mit 25 pg unverdaulichem Vektor (ohne Insert-DNA) transformiert. 2. Je ein Ansatz erfolgte auch mit geschnittenem, dephosphoryliertem, nicht aber ligierten Vektor, um die Menge restlicher, eventuell nicht geschnittener DNA erkennen zu können. 3. Schließlich wurde mit 100 ng verdauter dephosphorylierter Vektor-DNA eine Ligasereaktion angesetzt und anschließend transformiert, um die Güte der Dephosphorylierung beurteilen zu können.

3.2.8. Kolonie-Hybridisierung

Zur Identifizierung der gewünschten Bakterienklone nach der Transformation wurde ein Filterabdruck der Kulturplatte und anschließend eine Kolonie-Hybridisierung mit der entsprechenden, radioaktiv markierten Probe durchgeführt. Dazu wurden die Kolonien der Musterplatte auf ein Nitrozellulose-Filter überführt. Die Filter wurden zuvor in Wasser, dann in 2 M NaCl getaucht und kurz auf 3MM-Papier gelegt, um zu verhindern, daß die Kolonien vollständig auf dem Filter anhaften. Die aufgelegten Filter wurden auf der Platte so markiert, daß nach der Hybridisierung des Filters die ursprüngliche Orientierung wiedergefunden werden konnte. Die Filterabzüge wurden 2 min denaturiert (0,5 M NaOH/1,5 M NaCl) und 3 min neutralisiert (0,5 M Tris pH 8/1,5 M NaCl). Danach wurde die DNA für 2 Stunden in einem Vakuumofen bei 80 °C auf die Filter festgebacken. Die Filter konnten anschließend bis zur Hybridisierung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

3.3. ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN UND PROTEINEN

3.3.1. Auftrennung von DNA durch herkömmliche Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen Agarosegelen (in 1xTBE). Das Gel wurde in einen horizontalen Geltank gelegt, der 1xTBE-Puffer als Laufpuffer enthielt. Die Proben wurden nach Zugabe von 5xLadungspuffer in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte je nach Größe der Gelkammer bei 75-100 Volt in einer Laufzeit von 1-3 Stunden oder bei 20-50 Volt über Nacht. Das Gel wurde anschließend für ca. 10 min mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, auf eine UV-Lampe an einen Maßstab angelegt und mit Hilfe einer Polaroidkamera photographiert.

3.3.2. Auftrennung von DNA durch Pulsfeldgelelektrophorese

Zunächst wurde ein 1%iges Agarosegel (gelöst in 0,5 x TBE-Puffer) gegossen. Dabei wurde darauf geachtet, daß eine waagrechte Stellfläche vorhanden ist, da eine unterschiedliche Dicke des Gels die Wanderung der DNA während der Elektrophorese beeinflusst. Die Taschen des Gels wurden zunächst mit Elektrophorese-Puffer (0,5 x TBE) gefüllt, damit die Gelstücke mit der verdauten DNA ohne Luftblasen in die Geltaschen überführt werden konnten. Die Gelstücke wurden mit niedrig schmelzender Agarose (0,75%, in 0,5 x TBE gelöst) in der Geltasche fixiert. Damit sich die Ionenkonzentrationen zwischen Puffer und Gel angleichen können, wurde das mit den Gelstücken beladene Gel bereits 2 Stunden vor dem Start der Elektrophorese in die Gelkammer überführt. Während dieser Zeit wurde außerdem das Puffer-Kühlsystem (Kühlwasserbad bei 4°C mit Umlaufpumpe) in Betrieb genommen. Die Temperatur sollte sich während der Elektrophorese nicht verändern, da bereits kleine Temperaturschwankungen z.B. den Leitwert des Puffers verändern und somit das Laufverhalten der DNA beeinflussen. Die Elektrophorese wurde bei einer Auftrennung von DNA-Fragmenten bis zu 2000 kb mit einem Spannungsgradienten von bis zu 8,5 Volt/cm durchgeführt. Bei einem Abstand der Elektroden von 35 cm entsprach dies einer Spannung von 300 Volt. Diese im Unterschied zu herkömmlichen Gelelektrophoresen sehr hohe Spannung ermöglicht einen relativ kurzen Gellauf, erklärt aber auch die Notwendigkeit eines Kühlsystems während der Elektrophorese. Nach dem Gellauf wurde die DNA ca. 30 min mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, 1 Stunde mit Wasser entfärbt und photographiert.

3.3.3. Auftrennung von DNA in Acrylamid/Harnstoff-Gelen: Sequenzier-Gel

50 ml einer 6% Acrylamid/Harnstoff-Stammlösung (7M Harnstoff, 6% Acrylamid: pro l 1xTBE, 57 g Acrylamid+3g Methylenbisacrylamid) wurden mit 80 µl 25% APS und 80 µl TEMED versetzt, in eine Gelkammer (20x40 cm, 0,4 mm Abstand) gegossen und für 30 min polymerisiert. Die Geltaschen wurden durch einen 48-zähligen Kamm der Firma BRL gebildet. Als Laufpuffer diente 1xTBE. Das Gel wurde bei einer Stromstärke von 28 mA soweit laufen gelassen, bis die Bromphenolblau-Bande am unteren Gelrand angekommen war. Nach dem Lauf wurde eine der Glasplatten vorsichtig abgehoben, sodaß das Gel an der anderen Platte haftete. Es wurde zur Fixierung in eine 10% Methanol/10% Essigsäure-Lösung gelegt, anschließend mit Whatman-3MM-Papier von der Platte abgezogen und 30 min bei 70 °C auf dem Geltrockner unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde autoradiographiert.

3.3.4. Auftrennung von RNA in Agarose-Gelen

Maximal 10 µg RNA in einem Volumen von 4 bzw. 8 µl Wasser, wurde mit 7,2 bzw. 14,4 µl Denaturierungspuffer versetzt und 5 min bei 50 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde dem Gemisch 1 µl Ladungspuffer zugegeben und auf ein 1,4% Agarose-Gel (11x14 cm) geladen. Die Elektrophorese wurde mit 75 Volt 2,5 Stunden in einer horizontalen Gelapparatur gefahren. Danach wurde das Gel mit 150 µl Acridinorange (30 µg/ml) in 150 ml RNA-Laufpuffer 10 min gefärbt. Die Entfärbung erfolgte jeweils durch dreimaliges Waschen in 20 min in Laufpuffer. Die RNA wurde anschließend durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und photographiert.

3.3.5. Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [157]

Die Auftrennung erfolgte in 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen. Das Trenngel und das Sammelgel wurden unter Verwendung einer Stammlösung (30% Acrylamid : 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid) hergestellt. Die Endkonzentrationen im Trenngel betragen: 10% Acrylamid/Bis, 0,375 M Tris (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,025% TEMED und 0,02% APS. Das Sammelgel enthielt 5% Acrylamid/Bis, 0,125% Tris (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% TEMED und 0,05% APS. Als Elektrodenpuffer wurde 0,192 M Glycin, 0,1% SDS, 0,025 M Tris (pH 8,3) verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 3 min in 1x Probenpuffer aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA (solange bis die Bromphenolblau-Bande die untere Kante des Gels erreichte). Anschließend wurde das Gel ca. 15 min mit der Proteinfärbelösung (mit Coomassie Brilliant Blue) gefärbt und fixiert, mit der Entfärbelösung entfärbt, und photographiert. Bei Verwendung ³⁵S-markierter Proteine wurde das Gel zur Verstärkung der radioaktiven Signale 30 min in Salicylsäure inkubiert. Danach wurden die Gele auf Whatman 3MM Papier überführt, für ca. 1 Stunde in einem Gelrockner bei 50°C getrocknet und anschließend autoradiographiert.

3.4. PRÄPARATIVE METHODEN

3.4.1. Herstellung von Proteinlysaten aus Lymphozyten

(nach einer Vorschrift von Dr. A. Bensaid, ILRAD, Nairobi)

Um die Aktivität von Proteasen zu hemmen, wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt und alle verwendeten Lösungen auf 4°C gekühlt. 2×10^7 Zellen wurden bei

1700 rpm 10 min abzentrifugiert, resuspendiert, und 3x in 20 ml PBS (mit 0,1% Na-Azid) gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Proteinlysispuffer und Überführung in ein Eppendorfröhrchen wurde die Zellsuspension 45 min auf Eis gestellt (max. 2-3 Stunden). Danach wurde 20 min in einer Eppendorfszentrifuge abzentrifugiert. Bei ^{35}S -markierten Proteinlysaten wurde vom Überstand ein Aliquot für eine TCA-Fällung zur Messung der Menge an markierten Proteinen entnommen. Der Rest wurde bei -70°C eingefroren oder direkt für Vorreinigung der Proteinlysate mit Protein A-Sepharose verwendet (s.3.7.1).

3.4.2. Präparation genomischer DNA aus Lymphozyten [158]

Etwa 3×10^7 Zellen wurden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 30 ml Kern-Lysis-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von Proteinase K (0,2 mg/ml), kurz gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 10 ml 6 M NaCl-Lösung zugegeben, gemischt und 30 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde, möglichst ohne Protein, dekantiert und zur Fällung der DNA ein 2-faches Volumen an Ethanol zugegeben. Ohne zu zentrifugieren wurden die DNA-Fäden mit einer Pasteurpipette herausgenommen und in 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA in der Luft wurde sie in 0,3-0,5 ml TE gelöst. Anschließend wurde die OD gemessen und die DNA bei 4°C aufbewahrt. Bei Verunreinigung mit Proteinen wurde zusätzlich mit Phenol/Chloroform-extrahiert.

3.4.3. Präparation langkettiger DNA-Moleküle für die Pulsfeldgelelektrophorese (nach einer Vorschrift von Dr. A. Bensaid, ILRAD, Nairobi)

Im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden der DNA-Präparation wurden hier jegliche Pipettierschritte, die zu DNA-Brüchen führen könnten, durch Einbetten von Zellen in niedrig schmelzende Agarose und anschließendem Proteinase K-Verdau des Zellmaterials vermieden. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte (Verdau der DNA, Elektrophorese) wurden mit der in Agaroseblöcken eingebetteten DNA durchgeführt.

Einbetten und Proteinase K-Verdau von Zellen:

Die Zellkonzentration in der Agarose sollte jeweils 2×10^7 Zellen/ml Agarose/PBS (siehe unten) betragen. Das jeweilige Volumen, in das die Zellen eingebettet wurden, errechnet sich aus der Anzahl an eingesetzten Zellen. Bei einer Größe der Gelstücke von

2 x 4 x 6 mm ergab sich eine DNA-Konzentration von ungefähr 5 µg. Eine definierte Anzahl von Zellen (z.B. 2×10^7 Zellen, ausreichend für ungefähr 12 Verdauungen) wurde zunächst 2 x mit eiskaltem PBS (je 50 ml) gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 50% des errechneten Endvolumens mit 42°C warmem PBS resuspendiert und dann mit dem gleichen Volumen niedrig schmelzender Agarose (1,5%ig, in PBS gelöst, im Mikrowellenherd geschmolzen und auf 42°C abgekühlt) versetzt und gut vermischt. Anschließend wurde eine definierte Menge dieser noch flüssigen Mischung in eine Form pipettiert (muß zum schnellen Härten der Agarose auf Eis stehen). Dazu wurde ein Gelkamm benutzt, dessen Zwischenräume der Zähne genauso breit waren wie die Zähne des zur Elektrophorese benutzten Kamms, damit die Agarosestücke genau in die Taschen des Elektrophoresegels paßten. Dieser Kamm wurde zwischen 2 Glasplatten (oder 2 weitere Kämmen) eingespannt, sodaß die Zwischenräume die Form der Agaroseblöcke ergeben. Nach dem Härten der Agarose (ungefähr nach 2 min) wurden die Gelstücke in die auf 55°C vorgewärmte Lysis-Lösung (0,5M EDTA pH 8, 0,5% SDS, 10 mM Tris pH 8, ungefähr 5 ml in einem 25 ml Becherglas) überführt und nach Zugabe von Proteinase K-Lösung (Endkonzentration 0,5 mg/ml, Stocklösung 20 mg/ml in H₂O) 2-3 Tage bei 55°C inkubiert (möglichst Schüttelwasserbad). Anschließend wurde die Lysis-Lösung abgeleert, die Gelstücke wurden 1 x mit TE (10mM Tris pH 8, 1mM EDTA) gewaschen und dann in TE (ca. 10 ml) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit TE wurden die Gelstücke bei 4°C in TE aufbewahrt oder sie wurden anschließend für einen Verdau verwendet (s.3.1.5.).

3.4.4. Präparation von Gesamt-RNA aus Lymphozyten

In einer sterilen Glasflasche wurden 19 ml NTE, 1 ml 10% SDS und 20 ml Phenol (Tris-gesättigt, pH 8) gemischt und bei 80°C erhitzt. Ungefähr 1×10^8 Zellen wurden auf 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt und 10 min mit 2500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit insgesamt 50 ml NTE resuspendiert, in ein Röhrchen vereint und 5 min mit 2500 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml NTE aufgenommen und tröpfchenweise in die heiße Phenollösung gegeben. Diese Lösung wurde nach vorsichtigem Mischen auf neue 50 ml Röhrchen verteilt und für 10 min mit 3000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und auf Eis gestellt. Die untere Phenolphase wurde mit 10 ml NTE für 5 min reextrahiert. Nach der Vereinigung der wässrigen Phasen, wurden sie erneut mit 20 ml Phenol versetzt und für 10 min mit 3000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit gleichem Volumen an Chloroform vereinigt und für 5 min mit 2000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit 2,5-fachem Volumen Ethanol in 200 ml Plastikgefäßen bei -20°C über Nacht

gefällt. Die präzipitierte RNA wurde 50 min mit 10000 rpm in einer Beckman Zentrifuge, Model J2-21, zentrifugiert, das Pellet getrocknet und anschließend in 1-3 ml Wasser aufgelöst. Nach Bestimmung des OD wurde die RNA wieder mit 2,5-fachem Volumen Ethanol und 0,25M NaAc über Nacht bei -20°C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren und Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet getrocknet, mit einer Konzentration von 4µg/ml in sterilem Wasser aufgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

3.4.5. Präparation von PolyA-RNA aus Lymphozyten

Ungefähr 6×10^7 Zellen wurden 5 min bei 1700 rpm abzentrifugiert, 2x mit PBS gewaschen und in 10 ml kaltem NTE resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 0,5 ml 10% SDS wurden die Zellen mit einem Ultra-Turrax der Firma Janker&Koch 30 sec homogenisiert und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde der Überstand auf eine Endkonzentration von 0,5 M NaCl eingestellt und zu ca. 100 mg Oligo-dT-Zellulose gegeben, die in RNA-Bindungspuffer resuspendiert war. Die Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rotatorque rotiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet mit der RNA wurde 3x mit RNA-Bindungspuffer und 1x mit RNA-Waschpuffer gewaschen. Die Extraktion der RNA erfolgte durch 5 maliges Waschen und Resuspendieren in RNA-Elutionspuffer (Zentrifugation bei 1400 rpm). Die Überstände wurden vereinigt und nochmals abzentrifugiert. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA durch Zugabe von 0,25 M NaAc und 2,5-fachem Volumen an Ethanol gefällt, anschließend bei 10000 rpm für 40 min in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl sterilem Wasser gelöst und in einem Eppendorfröhrchen nochmals gefällt. Nach Waschen in 70% Ethanol wurde das Pellet getrocknet, mit einer Konzentration von 1 µg/ml in sterilem Wasser aufgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

3.4.6. Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab

Eine Kolonie der Bakterien, die das entsprechende Plasmid enthielten, wurde in 2 ml 2xYT-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) bei 37 °C über Nacht geschüttelt. 1 ml der Bakteriensuspension wurde in 100 µl frisch hergestellter Lysozym-Lösung aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung, weiteren 5 min Inkubation auf Eis und Zugabe von 150 µl 3M NaAc wurde weitere 60 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem Überstand in einem neuen Röhrchen mit Ethanol gefällt. Das Sediment wurde in

100 µl 0,1 M NaAc, 50 mM Tris, pH 7,8 resuspendiert und erneut mit Ethanol gefällt und in 40 µl Wasser aufgenommen. Zur Beseitigung von RNA wurde ein Verdau mit DNase-inaktivierter RNase A (20 µg/ml) für 30 min bei 37 °C vorgenommen.

3.4.7. Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab

200 ml 2xYT-Medium + Ampicillin (100 µg/ml) wurden mit 2 ml einer Übernachtskultur der entsprechenden Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde dann bei 5000 rpm und 4 °C 10 min abzentrifugiert, das Sediment in 10 ml frischer Lysozym-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml alkalischer SDS-Lösung, 5 weiteren Minuten auf Eis und Zugabe von 20 ml 3 M NaAcetat pH 4,8, wurde weitere 60 min auf Eis inkubiert. Zellfragmente und hochmolekulare DNA wurden anschließend durch 40 min Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C sedimentiert. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand ohne weitere Salzzugabe ausgefällt und durch 20 min Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde in 10 ml 0,1 M NaAc / 50 mM Tris pH 8 resuspendiert und erneut ausgefällt. Dieser Niederschlag wurde in 4 ml 50 mM Tris / 1mM EDTA pH 8 aufgenommen und nach Auflösung mit soviel CsCl versetzt, sodaß die Endkonzentration 1 g CsCl pro g Lösung betrug. Zuvor wurden pro ml Lösung 5 µl Ethidiumbromid zugegeben. Die Lösung wurde mit einer Spritze in ein 5 ml VTI65 Beckman Quick-Seal Zentrifugenröhrchen gefüllt. Mit einer Lösung, die CsCl und Ethidiumbromid in den entsprechenden Anteilen enthielt, wurde der Inhalt des Röhrchens bei Bedarf ergänzt. Die Röhrchen wurden zugeschmolzen und 16 Stunden bei 55000 rpm in einem Beckman Vertikalrotor zentrifugiert. Im entstehenden Dichtegradienten wurde die Plasmid-DNA von verbleibender bakterieller genomischer DNA, RNA und Protein getrennt und sammelte sich zu einer Bande, die durch Interkalation von Ethidiumbromid durch UV-Bestrahlung sichtbar war und mit einer Spritze abgezogen werden konnte. Die abgezogene Lösung wurde wie oben beschrieben aufgefüllt und unter denselben Bedingungen noch einmal 6 Stunden zentrifugiert. Die plasmidhaltige Bande wurde dann erneut abgezogen und mit Wasser auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt. Das Ethidiumbromid wurde zweimal mit wassergesättigtem Butanol-1 extrahiert und die Plasmid-DNA ohne weitere Salzzugabe mit Ethanol gefällt. Das CsCl wurde durch Dialyse bei 4 °C gegen ein 1000-faches Volumen 1xNTE entfernt. Nach 1 Stunde erfolgte ein Wechsel des NTE-Puffers, dann wurde über Nacht weiter dialysiert. Schließlich wurde die DNA in 2,5-fachem Volumen an Ethanol und 0,25 M NaAc gefällt und in Wasser resuspendiert.

3.4.8. Präparation von Lambda-DNA in kleinem Maßstab

100 µl einer Übernacht-Kultur des jeweiligen Wirtsbakteriums, *E.coli* NM538hfl⁻ oder C600 hfl⁻, in NZCYM-Medium, dem 0,4% Maltose zugesetzt worden war, wurde mit dem Phagenlysat (die Anzahl an Phagen wurde vorher durch Titrierung bestimmt, siehe unten) beimpft und zur Infektion der Bakterien bei 37 °C für 30 min inkubiert (ohne zu schütteln). Die Phagenkonzentration sollte etwa 1 Phage pro 100 Bakterien betragen. Nach der Infektion wurden 12 ml NZCYM-Medium zugegeben und bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nach etwa 8 Stunden war die Bakterienlyse durch einen flockigen Niederschlag sichtbar. Zur Lysis der restlichen Bakterien wurde 500 µl Chloroform zugegeben. Die Kultur wurde über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Um die Zellfragmente zu entfernen, erfolgte am nächsten Tag eine Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min, der Überstand (Phagenlysat) wurde in ein frisches Röhrchen dekantiert. Nach dem Verdau der bakteriellen DNA und RNA durch Zugabe von DNase und RNase (je 10 µg/ml) und einstündiger Inkubation bei 37 °C, wurden die Phagen in 20% PEG6000/2,5 M NaCl gefällt, indem sie für mindestens eine halbe Stunde auf Eis gestellt wurden. Nach erneuter Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 min, wurde der Überstand dekantiert und alle am Rand des Röhrchens haftende Flüssigkeit mit einem Zellstofftuch entfernt. Nach der Aufnahme des Phagensedimentes in 250 µl lxTE-Puffer (10 mM Tris pH 8 / 10 mM EDTA) wurde Phenol/Chloroform-extrahiert und die DNA in Ethanol und NaAc gefällt, erneut in TE-Puffer resuspendiert und wieder gefällt. Die gereinigte Lambda-DNA wurde schließlich in Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris pH 8 / 1 mM EDTA) gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

3.4.9. Präparation von Lambda-DNA in großem Maßstab [159]

Die Phagenlösung wurde zunächst titriert. Dafür wurden 5-10 Verdünnungen von 1:10 von der Phagenstammlösung angesetzt und die Übernacht-Kultur der entsprechenden *E.coli*-Bakterien in NZCYM-Medium + 0,4% Maltose zugegeben. Zur Adsorption der Phagen an die Bakterien wurde 30 min bei 37 °C (ohne Schütteln) inkubiert. In jedes Röhrchen wurden 3 ml H-Top-Agar gegeben, der in einem 45 °C-Wasserbad flüssig gehalten wurde. Der Top-Agar wurde auf H-Agar-Platten gegossen und nach dem Erstarren über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch das Auszählen der Plaques konnte die Konzentration der Phagenstammlösung errechnet werden. Für die DNA-Präparation wurden 250 ml NZCYM-Medium + 0,4% Maltose mit einer 10 ml Übernacht-Kultur des entsprechenden Bakteriums angeimpft. Diese Vorkultur wurde für ca. 2 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterienzahl wurde bei einer OD₆₀₀ bestimmt: 1 OD₆₀₀ = 8x10⁸

Bakterienzellen/ml. Für einen großen 400 ml-Ansatz wurden Phagen und Bakterien in einem Verhältnis von 1:100 und einer Größenordnung von $10^{10} : 10^8$ in 20 ml 10 mM $\text{CaCl}_2/10$ mM MgCl_2 zur Absorption vorinkubiert und dann zu den 400 ml NZCYM-Medium + 0,4% Maltose zugegeben und bei 37 °C für 6-10 Stunden geschüttelt. Nach der Lysis der Bakterien wurde 3 ml Chloroform zugesetzt und über Nacht inkubiert. Zur Phagenisolierung wurden die Zellbruchstücke am nächsten Tag 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit RNase/DNase, jeweils 1 µg/ml, für 1 Stunde bei 37 °C zum Abbau der bakteriellen Nukleinsäuren inkubiert. Danach wurde wieder für 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden dann die Phagen mit 10% PEG6000/1 M NaCl gefällt (1 Stunde auf Eis). Anschließend wurden die Phagen bei 8000 rpm zentrifugiert und das Sediment in 6 ml TM-Puffer resuspendiert. Die Entfernung des PEG's erfolgte durch Extrahieren mit gleichem Volumen Chloroform. Der Überstand, mit 0,5 g/ml CsCl, wurde auf einen CsCl-Stufengradienten vorsichtig pipettiert und in einem SW40-Rotor bei 22000 rpm für 2 Stunden und 20 °C zentrifugiert. Der CsCl-Stufengradient wurde folgendermaßen hergestellt: die kleinste Dichte ($\rho=1,35$) wurde als erstes in das Zentrifugenröhrchen pipettiert, dann die beiden anderen Dichten ($\rho=1,5$; $\rho=1,7$) vorsichtig unterschichtet. Die Phagen sammelten sich, entsprechend ihrer Dichte, zwischen den beiden ersten Dichtestufen als eine bläulich schimmernde Bande und waren somit von der restlichen bakteriellen DNA getrennt worden. Die Bande wurde mittels einer großen Kanüle abgezogen und in 0,817 g CsCl/ml in einem SW 50 Swing-Out Rotor mit 37000 rpm für 16-20 Stunden bei 20 °C zentrifugiert. Die Phagenbande wurde wieder mit einer Spritze abgezogen und 2x gegen ein 1000-faches Volumen TM-Puffer über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die dialysierten Phagen wurden für 1 Stunde bei 65 °C mit Proteinase K verdaut (20 mM EDTA, 0,1% SDS, 50 µg/ml Proteinase K). Danach wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und erneut gegen ein 1000-faches Volumen TE-Puffer dialysiert. Schließlich wurde die DNA gefällt, in Wasser gelöst und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

3.5. ISOLIERUNG EINES GENS AUS EINER LAMBDA-GENBANK ('SCREENING')

3.5.1. Ausplattieren der Phagenkulturen (Plaque-Hybridisierung)

Nach der Bestimmung des Phagentiters der Gen- bzw. cDNA-Bibliothek (s. 3.4.9) wurden 10000 bis 50000 Phagen mit 200 µl der entsprechenden Bakterien (Übernacht-Kultur) und 200 µl 10 mM $\text{CaCl}_2/10$ mM MgCl_2 versetzt und bei 37 °C inkubiert. Mit

40ml NZCYM-Top-Agar wurde das Inkubations-Gemisch auf die Bakterienplatten (24x24 cm) auf NZCYM-Agar gegossen. Nach dem Erstarren des Top-Agars wurden die Platten für 6-10 Stunden bei 37 °C inkubiert bis Phagenplaques zu erkennen waren.

3.5.2. Filterabdruck der Phagen-Plaques

Der Phagentransfer auf Nitrozellulose-Filter erfolgte auf die gleiche Weise wie bei der Kolonie-Hybridisierung. Die Filter wurden hier allerdings vorher nicht befeuchtet. Die Musterplatten wurden mit Parafilm versiegelt und bei 4 °C aufbewahrt. Denaturierung, Fixierung und Hybridisierung, sowie die Zuordnung der spezifischen Signale, erfolgte wie bei der Kolonie-Hybridisierung (s. 3.2.8.).

3.5.3. 'Rescreening' der Lambda-Klone

Bei der ersten Plaque-Hybridisierung werden aufgrund der hohen Phagendichte mit großer Wahrscheinlichkeit keine einzelnen Phagenklone, sondern Phagengemische isoliert. Deshalb sollten die isolierten Phagen mindestens einmal erneut, jetzt aber in geringerer Anzahl ausplattiert werden. Die Phagen wurden aus den Plaques durch Zugabe von 1 ml SM-Puffer herausgelöst und zunächst titriert (s. 3.4.9.). Anschließend wurden die Phagen so ausplattiert, daß einzelne Plaques isoliert werden konnten. Nach Filterabdruck und Hybridisierung mit der entsprechenden, radioaktiv markierten Probe wurden die positiven Plaques mit einem Zahnstocher gepickt.

3.6. PRÄPARATION RADIOAKTIV MARKIERTER PROBEN

3.6.1. In vivo Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin

Je 2×10^7 Zellen (logarithmische Wachstumsphase) wurden 1x mit PBS gewaschen, resuspendiert, in 20 ml Markierungsmedium (Nährmedium ohne Methionin, mit dialysiertem FCS) aufgenommen und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach 1 Stunde wurde ³⁵S-Methionin (50 µCi) zugegeben und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Von den markierten Zellen wurden anschließend wie in 3.4.1. beschrieben, Proteinlysate hergestellt. Um die Menge an Radioaktivität zu bestimmen wurde eine TCA-Fällung durchgeführt: 50 µl Proteinlysat wurde mit 50 µl NET1 (enthält BSA, hier als Carrier) und 100 µl 20% TCA versetzt, 5 min auf Eis gestellt, und anschließend 5 min abzentrifugiert. Danach wurde 3x mit 100 µl 20% TCA gewaschen. Die gefällten ³⁵S-

Methionin-markierten Proteine wurden in 100 μ l Scintillationsflüssigkeit resuspendiert und im Betamac Liquid Scintillation Counter gezählt.

3.6.2. Markierung von DNA durch Nick-Translation [160]

Verwendet wurde ein 'Nick-Translationskit' der Firma Amersham. 100ng DNA (gereinigtes Insert) bzw. 300ng (Plasmid und Insert) wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l mit 10 μ l Nicktranslationskit 1 (Nukleotide dATP, dGTP, dTTP und Puffer), 5 μ l α -³²P-dCTP (50 μ Ci), und 5 μ l Nicktranslationskit 2 (DNase I und Polymerase I) versetzt und für 2 Stunden bei 15 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μ l 0,5 M EDTA gestoppt. Die Abtrennung der radioaktiv markierten Nukleotide erfolgte über eine Sephadex-G 50 Säule ('Spin Column'). Als Säule diente eine 1 ml Spritze, verdichtet mit Glaswolle. Die Säule wurde zuerst 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert, das radioaktive Reaktionsgemisch auf die Säule gegeben und anschließend wieder 2 min bei 1200 rpm zentrifugiert. 2 μ l des Säulendurchlaufs wurden im Scintillations-Zähler gezählt. Die spezifische Aktivität wurde durch TCA-Fällung von 2 μ l markierter Probe, zusammen mit Carrier-DNA, ermittelt.

3.6.3. Markierung von DNA durch Multiprime labeling [161]

Mit dieser Methode können im Vergleich zur Nick-Translation DNA-Proben mit einer höheren spezifischen Aktivität von $>10^9$ cpm/ μ g DNA erhalten werden. Es wurde ein 'Multi Prime Labeling Kit' der Firma Amersham benutzt. 25 ng DNA (in 10 μ l Wasser) wurden durch 3 min Kochen denaturiert und auf Trockeneis abgekühlt. In einem Reaktionsvolumen von 50 μ l wurden 18 μ l Wasser, 10 μ l Lösung 1 (Nukleotide dATP, dGTP, dTTP und Puffer), 5 μ l Lösung 2 (Hexanukleotid/Primergemisch), 5 μ l α -³²P-dCTP (50 μ Ci), und 2 μ l Lösung 3 (2 Einheiten DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)) für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 μ l 5 mM EDTA gestoppt. Die Abtrennung der freien Nukleotide von der markierten Probe erfolgte mittels einer Sephadex G50-Säule (siehe 3.6.2.).

3.7. ANALYTISCHE METHODEN

3.7.1. Immunpräzipitation mit Proteinlysaten

(nach einer Vorschrift von Dr. A. Bensaïd, ILRAD, Nairobi)

Überblick: Zur Durchführung der Immunpräzipitation wurden verschiedene vorbereitende Arbeitsschritte durchgeführt, die unten genau beschrieben sind. Die Protein A-Sepharose wurde zunächst hydratisiert, und dann mit dem Hochsalzpuffer NET2 gewaschen, um Kontaminationen zu entfernen (1). Anschließend wurde die Protein A-Sepharose mit dem entsprechenden Antiserum inkubiert, um die Antikörper an die Protein A-Sepharose zu binden (2). Die Proteinlysate wurden vor der eigentlichen Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose und gebundenem normalen Kaninchenserum vorgereinigt, um unspezifische Bindungen zu verringern (3). Danach erfolgte die Immunpräzipitation mit dem spezifischen Antikörper bzw. in einem parallelen Ansatz mit dem Kontrollantikörper (4). Das Antiserum und die Proteinlysate wurden jeweils vor Verwendung 20 min bei 10000 rpm abzentrifugiert, um Abbauprodukte zu entfernen.

(1) Vorbereitung der Protein A-Sepharose:

1g Protein A-Sepharose wurde zum Hydratisieren mit 50 ml NET2 versetzt und 30 min auf einem Rotatorque rotiert. Danach wurde bei 1000 rpm abzentrifugiert, 2x mit 50 ml NET1 und 1x mit NET2 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die abzentrifugierte Protein A-Sepharose mit gleichem Volumen NET2 versetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

(2) Präadsorption von Antikörpern an Protein A-Sepharose:

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurde die Protein A-Sepharose (in NET2 s.o.) gemischt, ein definiertes Volumen wurde abgenommen (2 x soviel wie Volumen an Antiserum) und in ein Eppendorfröhrchen oder 10 ml Falcon Röhrchen überführt. Nach dem Abzentrifugieren von NET2 (= 'gepackte' Protein A-Sepharose) wurde das Antiserum in gleichem Volumen zugegeben. Nach 1 Stunde Inkubation (auf einem Rotatorque) wurde 3x mit 10-fachem Volumen NET1, und anschließend 3x mit 10-fachem Volumen NET2 gewaschen. Bei größerem Volumen (z.B. bei der Präadsorption des Kontrollserums) wurde jeweils 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert, bei kleinem Volumen wurde 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Nach

dem letzten Waschschrift wurde die Protein A-Sepharose mit den gebundenen Antikörpern mit gleichem Volumen NET2 versetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

(3) Vorreinigung der Proteinlysate durch Immunpräzipitation mit normalem Kaninchenserum:

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zu 100 µl Protein A-Sepharose, an die zuvor das normale Kaninchenserum (NRS) gebunden wurde (s.o.), wurde je 1 ml Proteinlysate (s. 3.4.1.) gegeben und 30 min auf einem Rotatorque rotiert. Danach wurde 3 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Zur weiteren Reinigung wurde der Überstand in gleicher Weise 3-5x erneut mit Protein A-Sepharose/NRS inkubiert. Der Überstand wurde anschließend für die Immunpräzipitation mit dem spezifischen Antikörper bzw. dem Kontrollantikörper eingesetzt oder bei -70 °C aufbewahrt.

(4) Immunpräzipitation mit dem spezifischen Antiserum bzw. dem Kontrollantiserum:

Je 500 µl des vorgereinigten Proteinlysats wurde zu 20 µl 'gepackter' Protein A-Sepharose/NRS bzw. Protein A-Sepharose/spezifisches Antiserum gegeben und 1 bis max. 3 Stunden bei 4 °C auf dem Rotatorque inkubiert. Nach einer ersten Zentrifugation für 2 min bei 10000 rpm wurde der Überstand verworfen, während das Pellet je 3x mit 1 ml NET1 und je 2x mit 1 ml NET2 gewaschen wurde. Nach wiederholter Zugabe von 1 ml NET2 und mischen, wurde 100 µl abgenommen, um die Menge an Radioaktivität zu messen. Der Rest wurde abzentrifugiert, der Überstand entfernt und mit 20 µl 3x Probenpuffer versetzt. Das Gemisch wurde entweder bei -70°C eingefroren oder zur Hälfte direkt für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese eingesetzt (s. 3.3.5.).

3.7.2. Transfer von DNA auf Nitrozellulosefilter bzw. Hybond N-Nylonfilter (Southern Blot)[162]

Die elektrophoretisch aufgetrennte DNA (s. 3.3.1. und 3.3.2.) wurde im Gel mit 0,25 M HCl für 10-12 min bei einer herkömmlichen Gelelektrophorese bzw. für 30 min bei einer Pulsfeldgelelektrophorese teilweise hydrolysiert und anschließend 1 Stunde denaturiert (0.5 M NaOH/1,5 M NaCl). Danach wurde das Gel für mindestens 1 Stunde neutralisiert (1 M Tris pH 8/1,5 M NaCl). Der Transfer der DNA aus dem Agarose-Gel auf ein entsprechendes Filter wurde folgendermaßen durchgeführt: Das Gel wurde auf einen mit 20xSSC getränkten Schwamm gelegt. Ein Nitrozellulosefilter oder Nylonfilter

wurde mit Wasser befeuchtet und auf das Gel gelegt. Danach kamen 2 Lagen 3MM-Papier, darauf mehrere Lagen Papierhandtücher. Das Ganze wurde mit einem etwa 1 kg schweren Gewicht belegt. Der Transfer war im Fall von genomischer DNA über Nacht vollständig erfolgt. Für Plasmid-DNA genügten 3-4 Stunden. Anschließend wurde die DNA bei Verwendung von Nitrozellulosefiltern bei 80 °C in einem Vakuumofen auf das Filter festgebacken. Bei Nylonfiltern wurde 5 min mit UV-Strahlung bestrahlt.

3.7.3. Transfer von RNA auf Nitrozellulosefilter bzw. Hybond N-Nylonfilter (Northern Blot) [163]

Der Transfer von RNA auf das jeweilige Filter erfolgte wie in 3.7.2. beschrieben, nur daß durch die Bedingungen des Gellaufs die RNA bereits denaturiert vorlag (s. 3.3.4). Ebenso war auch keine saure Hydrolyse erforderlich, da die zu transferierenden RNA-Größen relativ klein sind.

3.7.4. Hybridisierung der Northern- bzw. Southern Blots mit radioaktiv markierten DNA-Proben

A) Heparin-Hybridisierung

Die Filter wurden jeweils in eine Plastikfolie eingeschweißt und zur Absättigung freier, unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 4 Stunden in Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Die Vorhybridisierung und Hybridisierung erfolgten in derselben Lösung und falls nicht anders angegeben, bei 65 °C. Dazu wurde die radioaktiv markierte DNA für 3-5 min hitzedenaturiert und für 5 min auf Trockeneis gestellt. Im Fall der Hybridisierung von Plasmid- bzw. Lambda-DNA wurden 1×10^5 cpm der markierten Probe/ml Hybridisierungslösung und bei genomischer DNA $1-2 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung zugegeben. Hybridisiert wurde über Nacht in einem Schüttelwasserbad.

Heparin-Hybridisierungslösung: 0,5% Heparin
 5xSSC
 0,1% SDS
 0,5% PiPPi
 5xDenhardt's-Lösung

Gewaschen wurde das Filter wie folgt:

- 1) Bei homologen Proben wurde das Filter für 30 min hintereinander mit 2xSSC/0,1%SDS, 1xSSC/0,1% SDS, 0,1xSSC/0,1%SDS, und 0,1xSSC mit vorgewärmten Waschlösungen bei 65 °C in einem Schüttelwasserbad gewaschen.
- 2) Bei heterologen Proben wurde das Filter 3x 30 min mit 3xSSC/0,1% SDS und einmal mit 3xSSC bei 55°C gewaschen.

B) Formamid-Hybridisierung

Die Hybridisierung genomischer DNA sowie RNA erfolgte bei homologen DNA-Proben stets mit dieser Methode. Es mußte streng darauf geachtet werden, daß sowohl Vorhybridisierung, als auch Hybridisierung bei exakt 42 °C durchgeführt wurden. Die Filter wurden, wie oben beschrieben in Plastik-folien eingeschweißt. Beim RNA-Blot wurde zuvor das Glyoxal des Filters durch kurzes Kochen der Lösung (20 mMTris pH 8) und Abkühlen auf Raumtemperatur entfernt.

Vorhybridisierungslösung:	50% Formamid
	4xSSC
	0,1% SDS
	0,1% PPI
	10x Denhardt's-Lösung
Hybridisierungslösung:	50% Formamid
	6x SSC
	0,1% SDS
	0,1% PPI
	5x Denhardt's-Lösung
	10% Dextransulfat

Alles weitere wurde, wie unter A) beschrieben, durchgeführt.

3.7.5. Autoradiographie

Das Sichtbarmachen radioaktiv markierter DNA oder RNA erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilmes der Marken Kodak X-AR oder Amersham HyperfilmTM in Kassetten mit Verstärkerfolie bei -80 °C.

3.7.6. Sequenzierung von Nukleinsäuren

3.7.6.1. Präparation von Einzelstrang-DNA aus M13-Phagen

Eine Übernacht-Kultur von E.coli TG1 wurde in 2xYT-Medium 1:100 verdünnt und zu je 1,5 ml in Glasröhrchen aliquotiert. Mit einem Zahnstocher wurden die gewünschten M13-Plaques gepickt und damit die Bakterien angeimpft. Infektion und Vermehrung der Phagen erfolgte in einem Schüttler bei 37 °C für 5-6 Stunden. Um die Zellen von den Phagen zu trennen, wurde 4 min bei 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verwendet und das Sediment im restlichen Medium als Phagenstock bei 4 °C aufbewahrt. Durch Zugabe von 150 µl 20% PEG6000/2,5 M NaCl und 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Phagen gefällt, dann abzentrifugiert und der Überstand vollständig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette entfernt. Das Sediment wurde in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und die DNA je einmal mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, sowie in Ethanol und NaAcetat gefällt. Nach Zentrifugation und Trocknen des Sediments an der Luft wurde die DNA in 60 µl TE-Puffer (10 mM Tris pH 8)/0,1 mM EDTA) aufgenommen. 5 µl davon wurden in einem Agarose -Minigel auf Reinheit und Ausbeute getestet .

3.7.6.2. Sequenzierung von Nukleinsäuren nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger [164]

Das Prinzip dieser Methode ist eine in vitro-Synthese eines DNA-Stranges von einem synthetischen Startermolekül aus an einer einzelsträngigen DNA-Matrize. Als Enzym dient DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), die keine 5'-> 3' Exonuklease-Aktivität besitzt. Durch Zugabe von entsprechenden Didesoxynukleotiden wird die Synthese jeweils abgebrochen und startet wieder von neuem.

Pro Klon, der sequenziert werden sollte, wurden 2 µl Primer (1 µg/ml, 1212 Biolabs, bzw. synthetisierte Oligonukleotide 2 µg/ml) mit 1 µl TM-Puffer und 5 µl Wasser gemischt. Je 8 µl dieser Mischung wurden zu 8 µl der zu sequenzierenden, einzelsträngigen DNA gegeben und zur Hybridisierung des Primers an die Matrize für 20 min bei 55 °C inkubiert. Pro Reaktion wurden dann 4 µl dieses 'template'/Primer-Gemisches mit 2 µl des jeweiligen Nukleotid-Mix (T-, C-, G-, A-Mix) und 2 µl der frisch angesetzten Enzym-Lösung zusammengegeben und zur Synthese des neuen Stranges für 20 min bei 30 °C inkubiert. Zur Verlängerung der neusynthetisierten Stränge wurde nochmals 2 µl einer 0,25 mM NTP-Lösung zugegeben ('chase') und für 15 min

weiterinkubiert. Schließlich wurde die Reaktion durch Zugabe von je 4 μl Formamid-Ladungspuffer gestoppt. Vor dem Laden auf das Gel wurden die Proben 3 min bei 95 °C hitzedenaturiert, 5 min auf Eis gestellt und ca. 1 μl bis 2 μl auf ein 6% Acrylamid/Harnstoff Gel geladen (s. 3.3.3).

Lösungen:

<u>T-Mix:</u>	5 μl 0,5 mM dTTP 100 μl 0,5 mM dCTP 100 μl 0,5 mM dGTP 10 μl 10 mM ddTTP 200 μl TE-Puffer	<u>G-Mix:</u>	100 μl 0,5 mM dTTP 100 μl 0,5 mM dCTP 5 μl 0,5 mM dGTP 3 μl 10 mM ddGTP 200 μl TE-Puffer
<u>C-Mix:</u>	100 μl 0,5 mM dTTP 5 μl 0,5 mM dCTP 100 μl 0,5 mM dGTP 1,6 μl 10 mM ddCTP 200 μl TE-Puffer	<u>A-Mix:</u>	100 μl 0,5 mM dTTP 100 μl 0,5 mM dGTP 100 μl 0,5 mM dCTP 3 μl 1 mM ddATP 200 μl TE-Puffer
<u>Enzym-Mix:</u>	2 μl $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP 4 μl 100 mM DDT 1 μl Klenow (5U/ μl) 25 μl Wasser		

<u>Formamid-Ladungspuffer:</u>	100 ml deionisiertes Formamid 4 ml 500 mM EDTA pH 8 0,03 g Xylencyanol 0,03 g Bromphenolblau
--------------------------------	---

3.8. ZELLKULTURTECHNIKEN

3.8.1. Zellkultivierung

Alle Zelllinien und primäre Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C ohne CO₂-Begasung kultiviert. Das Zellmedium wurde mit HEPES gepuffert. Die Stammkulturen wuchsen als Suspensionskulturen in 175 cm² oder in 75 cm² Gewebekulturflaschen. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen in frisches Medium überführt und mit einer Zelldichte von ca. 1 x 10⁵ Zellen/ml (infizierte Zellen) bzw. 5 x 10⁵ Zellen/ml (ConA-behandelte Zellen) angesetzt. Bei der Kultivierung von Lymphknotenzellen mit ConA und IL2 wurden 5 $\mu\text{g/ml}$ ConA bzw. 10U/ml IL2 zugegeben.

3.8.2. Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde auf zwei Arten bestimmt: 1. Zählung in der Zählkammer (Trypanblau-Färbung). 2. Zählung im Coulter Counter (Model ZBI, Coulter Electronics LTD) in geeigneten isotonverdünnten Lösungen.

3.8.3. Isolierung von Rinder-Lymphozyten [165]

Die Lymphozyten wurden aus Lymphknoten (Leistengegend) eines frischgeschlachteten Rindes isoliert. Der Lymphknoten wurde zunächst von Fett befreit und dann mit Skalpell und Schere in RPMI-Medium (1% P/S, 0,1% DNase) zerkleinert. Dieses Gemisch aus Zellen und Gewebepartikeln wurde über eine feinmaschige Gaze filtriert. Die erhaltenen Zellen wurden 15 min mit 2000 rpm zentrifugiert, das Sediment in RPMI-Medium (1% P/S, 0,1% DNase) resuspendiert und wieder 15 min mit 2000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach dem Waschen wurden die Zellen in cRPMI resuspendiert und gezählt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1 bis 2×10^6 /ml auf 75 cm^2 Gewebekulturflaschen verteilt und mit $5 \mu\text{g/ml}$ Concanavalin A kultiviert. Bei längerer Kultivierung (mehr als 2 Wochen) wurde zusätzlich 10 U/ml IL2 zugegeben.

3.8.4. Klonierung von Zellen

Die Zellen wurden durch limitierte Verdünnung einer Stammkultur, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befand, kloniert. Die Stammkultur wurde so verdünnt, daß theoretisch 1 bzw. 0,5 Zellen pro Vertiefung einer Mikrotiter-Platte (Firma Linbro, mit 96 Vertiefung, für $200 \mu\text{l}$ Kulturmedium pro Vertiefung) ausplattiert wurden. Dem Medium wurde IL2 (10 U/ml) zugesetzt, um das Wachstum in der Anfangsphase zu stimulieren. Da in der Regel nicht in jeder Vertiefung Zellen vorhanden sind und nur wenige Zellen hochwachsen, wurden mindestens 3 Mikrotiterplatten angesetzt. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet, bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank in einer Plastikwanne, in die angefeuchtete Zellstofftücher gelegt wurden, inkubiert und nach 1 Tag lichtmikroskopisch nach Zellen untersucht. Vertiefungen mit 1 bis 2 Zellen wurden dokumentarisch festgehalten. Anschließend wurden die Platten solange inkubiert, bis ungefähr 1000 bis 10000 Zellen hochgewachsen waren (nach ca. 14 Tagen). Die Zellen wurden isoliert, zunächst in Vertiefungen von Zellkulturplatten (von der Firma Nunc, mit 24 Vertiefungen, für 2 ml Kulturmedium/Vertiefung) und dann in 10 ml Kulturflaschen weitervermehrt. Nach der ersten Klonierung wurden die hochgewachsenen Zellen in gleicher Weise rekloniert.

3.8.5. Abtrennung toter Zellen

Tote Zellen wurden mit 'Ficoll-Paque for Lymphocyte culture' (Pharmacia) durch Zentrifugation von den lebenden Zellen abgetrennt. Dazu wurde die Zellsuspension vorsichtig mit doppeltem Volumen an Ficoll-Paque unterschichtet und bei 3000 rpm 30 min zentrifugiert (ohne Bremse). Die lebenden Zellen (in der Interphase) wurden abpipettiert, 1x in L15 gewaschen und in Kulturmedium resuspendiert. Die toten Zellen befanden sich am Boden des Zentrifugenröhrchens.

3.8.6. Morphologische Untersuchung der Zellen

Ca. 1×10^4 Zellen wurden in einem Volumen von 100-200 μl in den Cytospin (Shandon & Southern, UK) pipettiert und 5 min mit 1000 rpm auf ethanolgereinigte Objektträger zentrifugiert. Die Zellen wurden 5 min bei RT getrocknet, 5 min in 100% Methanol fixiert und anschließend in einer 6% Giemsa-Lösung bei 37 °C 45 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Giemsa-Lösung dekantiert und die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet. Die so hergestellten Präparate konnten mit Hilfe von Immersionsöl im Mikroskop bei 1250-facher Vergrößerung betrachtet und photographiert werden.

3.8.7. Eliminierung des Parasiten in theileriainfizierten Zellen

Die theileriainfizierten Lymphozyten wurden mit BW720C (720C), einem Hydro-naphtochinon, das für Säugerzellen nicht toxisch ist, behandelt. BW720C wurde mit einer Endkonzentration von 50ng/ml den Zellkulturen beigegeben.

3.8.8. ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung von Zellen

Den Zellen (in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, 200 μl) wurde jeweils 0,7 $\mu\text{Ci}/200 \mu\text{l}$ zugegeben. Nach einer Inkubation von 4 Stunden im Brutschrank wurden die Platten mit den Zellen entweder bei -20 °C Zellen eingefroren oder zur Bestimmung des ^3H -Thymidin-Einbaus mit Hilfe des Cell Harvester Combi (Scatron AS, Lier, Norwegen) auf Glasfaserfilter gesaugt (Lyse der Zellen mit destilliertem Wasser). Die Filter wurden anschließend durch Ausstanzen in Plastikröhrchen überführt, mit 2,5 ml Quickszintflüssigkeit (Zinsser, Frankfurt) versetzt und über Nacht darin belassen. Die eingebaute Radioaktivität wurde im Betamatic Liquid Scintillation Counter gemessen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Das c-raf-1-Gen wird in theileriainfizierten Rinderlymphozyten und nichtinfizierten Lymphozyten in vergleichbaren Mengen exprimiert

Um die Frage zu klären, ob das zelluläre c-raf-1-Onkogen bei der Transformation infizierter Lymphozyten beteiligt ist, wurden Untersuchungen hinsichtlich der DNA-Organisation und der Expression auf RNA- und Proteinebene durchgeführt. Dabei wurden jeweils infizierte Zellen mit nichtinfizierten Zellen verglichen. Als nichtinfizierte Zellen dienten ConA-behandelte Rinderlymphozyten, die von Lymphknoten isoliert wurden oder Zellen, bei denen der Parasit durch Behandlung mit dem Medikament 720C abgetötet wurde.

Zur Durchführung von Hybridisierungsexperimenten für die Analysen auf DNA- und RNA-Ebene war es zunächst wichtig, eine homologe Rinder-DNA-Probe des c-raf-1-Gens zur Verfügung zu haben. In Vorexperimenten hatte sich gezeigt, daß auch bei längeren Expositionszeiten der Autoradiogramme mit heterologen DNA-Proben (z.B. von menschlicher DNA) äußerst schwache Hybridisierungssignale erhalten wurden. Die Isolierung von Rinder-DNA-Proben des c-raf-1-Gens wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.1.1. Die c-raf-1-cDNA des Rinds zeigt im isolierten Bereich eine 100%ige Aminosäurehomologie zur menschlichen c-raf-1-cDNA

Zur Isolierung von homologen Rinder-DNA-Proben wurde ein 1,6 kb Fragment aus dem 3' Ende der c-raf-1-cDNA als DNA-Sonde eingesetzt, das aus einer menschlichen Leber-cDNA-Bank isoliert wurde. Vor dem Durchsuchen einer Rindergenbank wurden zunächst verschiedene Hybridisierungsexperimente mit genomischer Rinder-DNA durchgeführt, um geeignete Hybridisierungsbedingungen zu finden, bei denen die heterologe menschliche Probe mit dem c-raf-1-Gen des Rinds kreuzhybridisiert.

Als geeignet erwies sich eine Hybridisierung bei 60°C und Waschen der Filter bei 55°C mit einer Salzkonzentration von 3 x SSC. Diese Hybridisierungsbedingungen wurden anschließend zur Isolierung von Rinder-DNA-Sequenzen des c-raf-1-Gens aus einer Rinder-Genbank eingesetzt. Zur Verfügung standen eine genomische Rinderlymphozyten-Genbank (erhalten von Dr. G.Schütz, DKFZ, Heidelberg) und eine cDNA-

Bank, die aus mRNA theileriainfizierter Lymphozyten hergestellt wurde (erhalten von Dr. M. Carrington, IGT). In beiden Fällen war die DNA in Lambda-Vektoren kloniert. Bei der genomischen Genbank wurde der Lambda 'EMBL3'-Vektor und bei der cDNA-Bank wurde der Lambda '1149'-Vektor verwendet. Um die Chance einer Isolierung von c-raf-1-Sequenzen mit der heterologen DNA-Probe zu erhöhen, wurden beide Genbanken nach c-raf-1-Sequenzen des Rinds durchsucht ('Screening').

Von der genomische Genbank wurden $1,2 \times 10^6$ Phagenklone, von der cDNA Bank 4×10^5 Phagenklone auf Bakterienplatten ausplattiert, die das gesamte Genom bzw. möglichst alle Transkripte repräsentieren sollten. Von jeder Platte wurden dann 2 Filterabzüge (Nitrozellulose-Filter) angefertigt und mit der menschlichen c-raf-1-Probe unter den zuvor getesteten Bedingungen hybridisiert. Der Vergleich der Hybridisierungssignale zweier identischer Filter nach der Autoradiographie ergab einen stark hybridisierenden positiven Phagenklon aus der cDNA-Bank und 8 positive Klone aus der genomischen Genbank. Diese Phagenklone wurden von der Bakterienplatte isoliert, nochmals ausplattiert und hybridisiert, um Einzelklone zu erhalten und die positive Hybridisierung zu überprüfen. Nach diesem 'Rescreening' verblieben 3 genomische Phagenklone und 1 cDNA-Klon, die mit der menschlichen c-raf-1-Probe hybridisierten. Für weitere Experimente wurde von den Phagenklonen DNA präpariert, das Insert des cDNA-Klons wurde außerdem in einen Plasmidvektor ('bluescribe') umkloniert.

Daß es sich bei der isolierten cDNA und den genomischen Klonen tatsächlich um c-raf-1-Sequenzen des Rinds handelte, wurde durch verschiedene Hybridisierungsexperimente und durch Teilsequenzierung der cDNA gezeigt:

1. Durch Hybridisierung mit der isolierten bzw. der menschlichen cDNA als DNA-Proben wurde nachgewiesen, daß die Rinder-cDNA mit der menschlichen cDNA und mit c-raf-1-Sequenzen in menschlicher genomischer DNA kreuzhybridisierte (Abb.1). Die Plasmide wurden mit Restriktionsenzymen verdaut, sodaß die cDNA-Inserts herausgeschnitten wurden. Die menschliche DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut, das ein genomisches c-raf-1-Fragment bekannter Größe (3 kb) lieferte.

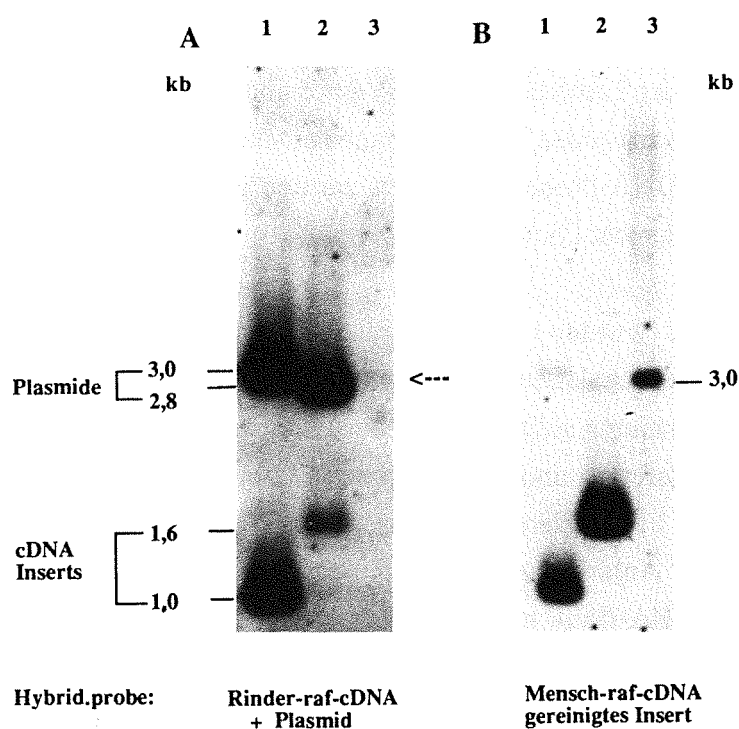


Abb.1: Die isolierte Rinder-c-DNA erkennt menschliche c-raf-1-Sequenzen

Nach Verdau der DNAs wurden die resultierenden DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer der DNA auf Nitrozellulose-Filter mit der radioaktiv markierten Rinder-raf-cDNA + Plasmid (A) bzw. einem radioaktiv markierten gereinigten Insert der menschlichen c-raf-1-cDNA (B) hybridisiert. Als Größenmarker wurde HindIII-verdaute DNA des Phagen Lambda eingesetzt.

1 500ng Rinder-raf-cDNA + Plasmid (bluescribe): Verdau mit *EcoRI*
 2 500ng Mensch-c-raf-1-cDNA + Plasmid (pSP65): Verdau mit *EcoRI/HindIII*
 3 10µg menschliche genomische DNA: Verdau mit *EcoRI*
 (Die Position des menschlichen genomischen 3 kb *EcoRI*-Fragments ist in A mit einem Pfeil angegeben.)

Die isolierte Rinder-cDNA (Abb.1A) hybridisierte an das 1 kb cDNA-Insert des cDNA-Klons (Abb.1A, Spur 1) und an das 1,6 kb Fragment der menschlichen c-raf-1-cDNA (Abb.1A, Spur 2). Da die Klonierungsvektoren homologe Sequenzen besitzen und das gesamte Plasmid (Vektor + Rinder-cDNA-Insert) als Hybridisierungsprobe eingesetzt wurde, hybridisierten auch die Plasmidvektoren (Abb.1/A, Spur 1: 3,0 kb-Fragment von bluescribe, Vektor der Rinder-cDNA bzw. Abb.1/A, Spur 2: 2,8 kb-Fragment von pSP65, Vektor der menschlichen cDNA). Bei Verwendung eines gereinigten Inserts der menschlichen cDNA als Hybridisierungsprobe (Abb.1/B) waren die Vektorfragmente kaum sichtbar (Abb.1/B, Spur 1 und 2). Da die cDNA-Inserts starke Hybridisierungssignale lieferten, war gezeigt, daß die Inserts (von Rind und Mensch) homologe Sequenzen enthalten, die miteinander kreuzhybridisierten. Dies wurde durch Hybridisierung der beiden DNA-Proben an genomische menschliche DNA bestätigt, da ein genomisches *EcoRI*-Fragment gleicher Größe hybridisierte (Abb.1/A bzw. B: Spur 3). In

Abbildung 1/B ist das 3 kb *EcoRI*-Fragment vermutlich deshalb stärker sichtbar, da mit der homologen menschlichen cDNA und nicht wie in Abbildung 1/A mit der heterologen Rinder-cDNA hybridisiert wurde.

- Bei einer Hybridisierung der isolierten cDNA (Abb.2/A) und der menschlichen cDNA (Abb.2/B) an Gesamt-RNA des Rinds resultierte ein Transkript gleicher Länge (3,4 kb). Die Länge des menschlichen c-raf-1-Transkripts beträgt ebenfalls 3,4 kb [130]. Die isolierte cDNA (1 kb) umfaßt somit ungefähr 1/3 des gesamten c-raf-1-Transkripts.

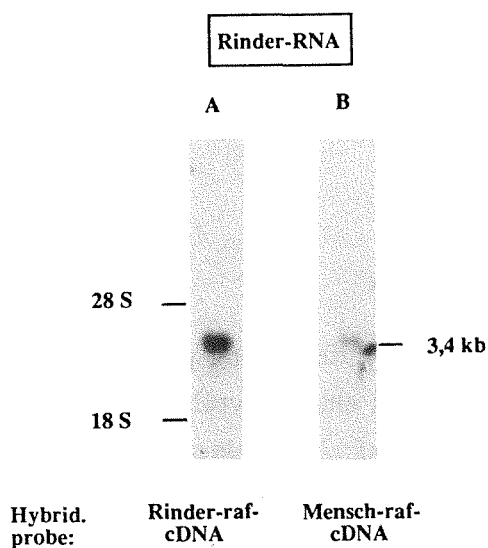


Abb.2: Die isolierte cDNA und die menschliche c-raf-1-cDNA erkennen in Gesamt-RNA des Rinds ein Transkript gleicher Länge

Northern-Blot-Analyse: 10 µg Gesamt-RNA des Rind wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonfilter übertragen und mit der radioaktiv markierten Rinder-cDNA (A) bzw. radioaktiv markierten menschlichen c-raf-1-cDNA (B) hybridisiert.

- Eine Hybridisierung des Rinder-cDNA-Klons und des menschlichen cDNA-Klons an *Sall*-verdaute DNA der genomischen Klone zeigte, daß aus beiden Genbanken homologe Sequenzen isoliert wurden (Abb.3). Durch Verdau mit *Sall* wurde jeweils das Insert mit den genomischen Sequenzen aus dem Lambda-Klon herausgeschnitten. Bei einem vollständigen Verdau entsprach die Größe der hybridisierenden Fragmente somit der Größe der klonierten genomischen Sequenzen.

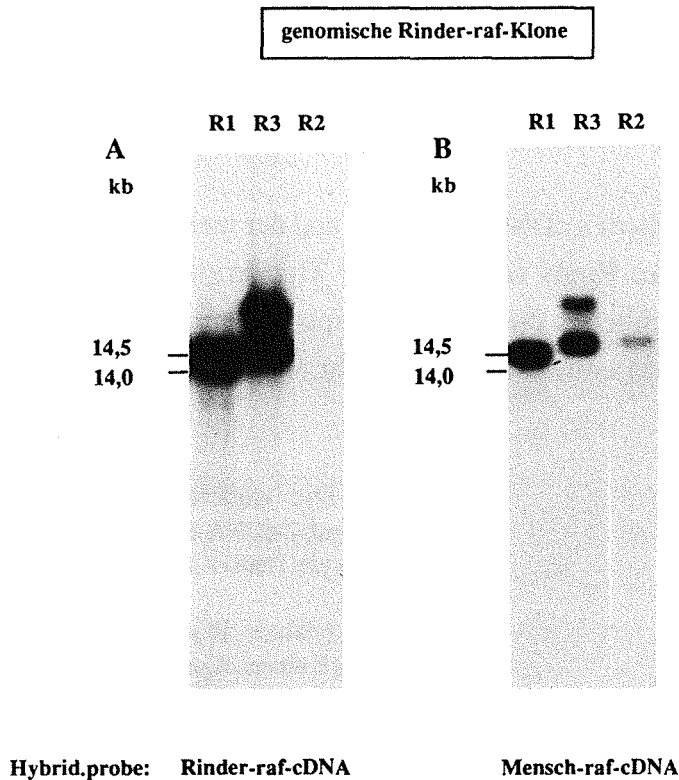


Abb.3: Die Rinder-cDNA und die menschliche c-raf-1-cDNA erkennen Sequenzen der isolierten genomischen Klone.

1 µg DNA der genomischen Klone R1, R2, R3 wurden nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sall* auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit der radioaktiv markierten isolierten (Abb.3/A) bzw. der menschlichen cDNA-Probe (Abb.3/B) hybridisiert.

Die DNA der Klone R1 und R3 ergaben mit beiden Hybridisierungsproben relativ starke Hybridisierungssignale. Bei R3 hybridisierten durch einen unvollständigen Verdau 2 *Sall*-Fragmente, von denen das größere Fragment zusätzlich Vektorsequenzen enthielt. Aus den Hybridisierungen wurde geschlossen, daß überlappende, homologe Sequenzen in der Rinder-cDNA und den genomischen Klonen R1 und R3 vorhanden waren. Da sie außerdem mit der menschlichen c-raf-1-Probe hybridisierten, handelte es sich vermutlich um genomische c-raf-1-Sequenzen des Rinds. Die DNA des Klons R2 hybridisierte mit der menschlichen cDNA (Abb.3/B), nicht aber mit der Rinder-cDNA (Abb.3/A). Er enthielt somit keine mit der Rinder-cDNA überlappenden Sequenzen. Da oben (Abb. 1 und 2) gezeigt wurde, daß die isolierte cDNA-Sequenz mit einer Länge von 1 kb nur einen Teil der gesamten c-raf-1-cDNA umfaßte, enthielt der Klon R2 somit vermutlich weiter 5' liegende Sequenzen des c-raf-1-Gens, die der klonierten Rinder-cDNA fehlten, in der menschlichen cDNA von 1,6 kb aber vorhanden waren.

4. Eine Teilsequenzierung und ein Sequenzvergleich mit der menschlichen c-raf-1-cDNA ergab, daß die Sequenzen der isolierten cDNA das 3' Ende des c-raf-1-Transkripts repräsentierten (Abb.4/A und 4/B). Zur Sequenzierung wurde das cDNA-Insert in den M13-Klonierungsvektor umkloniert und von beiden Richtungen her ansequenziert. In den isolierten kodierenden Sequenzen wurde eine 100%ige Aminosäurehomologie zwischen Rind und Mensch erhalten (Abb. 4/B).

ATAACGCACCAGACGGCCCAGGGCTGTCTGGGACTGTGGCGGCCTGGACGAGCCCGCTTTG
 || ||||| || ||||| ||| || |||| |||| ||| | | ||||| |||||
 AAGGCACCAAACAGCCCAGGACTGCCGAGACTCTGGCCGCCGAAGGAGCCTGCTTTG
 2545

GTACTA GGGACTTGAC TAGGGGACACG TCCTT TTCTGACGGGCTCAGT
 ||||| || |||| | ||||| |||| |||| ||| | | ||||
 GTACTATGGAACCTTTCTTAGGGGACACGTCCCTCTTTCACAGCTTCTAAGGTGTCCAGT
 2603

GC TGGGCTTGG TTCCACCAGAGGCGCTGGGCC TCC CCGCCC GGGGA
 || | || ||| |||| | ||| || |||| ||| | |||| |||
 GCATTGGGATGGTTTCCAGGCAAGGCACTCGGCCAATCCGCATCTCAGCCCTCTCAGGA
 2663

GCAGTCCT CAGCCTGCCGA GTCGTCTTCCAGGGGCAGCCCGT GGGCGGGCC
 ||||| | || | ||| || | ||||| || |||| | |||||
 GCAGTCTTCCATCATGCTGAATTTGTCTTCCAGGAGCTGCCCTATGGGGCGGGCCGCA
 2723

TGGCCAGCCTG TCTCT GCA TCACATC
 ||||| |||| || |||||
 GGGCCAGCCTGTTTCTCTAACAAACAAACAAACAAACAGCCTTGTCTCTAGTCACATC
 2783

ACGTG TGCAAGGAAGCCAGGAATACCGGTTTTCTTGATAATTT GGATTTAATTTTGT
 | ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| |||| | ||||| |||||
 ATGTGTATACAAGGAAGCCAGGAATACAGGTTTTCTTGATGATTGGGTTTTAATTTTGT
 2843

TTTTATCGCGCCTGACAAAATACAGTTATTCAATTATGTTATTTAATAAAAATAAATTAA
 ||||| || ||||| ||||| || || | ||| | ||| | ||| |
 TTTTATTGCACCTGACAAAATACAGTTA TC TGATGGTCCCTCAATTATGTTATTTTA
 2903

ATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 | |||| ||| |||
 ATAAAATAAATTAAATTT
 2960

Abb.4/A: Teilsequenz 1 der isolierten cDNA und Sequenzvergleich mit der menschlichen c-raf-1-cDNA

337 Basen der 3' nichttranslatierten Region und Poly A-Ende der Rinder c-raf-1-cDNA-Sequenz (5' --> 3' Richtung). Da die cDNA am 3' Ende eine PolyA-Sequenz von 24 Nukleotiden besitzt, konnte geschlossen werden, daß es sich bei der isolierten cDNA um das 3' Ende der c-raf-1-mRNA (Transkript) handelte. Die Gesamthomologie zur 3' nichttranslatierten Region (NTR) der menschlichen c-raf-1-cDNA (Position 2545 bis Position 2977 [130]) betrug 66%. Die Bereiche von Position 2545 bis 2608 und Position 2838 bis 2930 in der NTR der menschlichen cDNA waren stärker konserviert. In diesen Bereichen betrug die Homologie 81% bzw. 90%.

<i>Arg</i>	<i>Leu</i>	<i>Val</i>	<i>Ala</i>	<i>Asp</i>	<i>Cys</i>	<i>Val</i>	<i>Lys</i>	<i>Lys</i>	<i>Val</i>	<i>Lys</i>	<i>Glu</i>	<i>Glu</i>	<i>Arg</i>	<i>Pro</i>	<i>Leu</i>
CGG	CTG	GTA	GCT	GAC	TGC	GTG	AAG	AAA	GTG	AAG	GAA	GAA	AGG	CCT	CTT
AGG	CTG	GTA	GCT	GAC	TGT	GTG	AAG	AAA	GTA	AAG	GAA	GAG	AGG	CCT	CTT
<i>Phe</i>	<i>Pro</i>	<i>Glu</i>	<i>Ile</i>	<i>Leu</i>	<i>Ser</i>	<i>Ser</i>	<i>Ile</i>	<i>Glu</i>	<i>Leu</i>	<i>Leu</i>	<i>Glu</i>	<i>His</i>	<i>Ser</i>	<i>Leu</i>	<i>Pro</i>
TTT	CCC	CAG	ATC	CTG	TCT	TCC	ATC	GAG	CTG	CTC	CAG	CAT	TCT	CTA	CCC
TTT	CCC	CAG	ATC	CTG	TCT	TCC	ATT	GAG	CTG	CTC	CAA	CAC	TCT	CTA	CCG
<i>Lys</i>	<i>Ile</i>	<i>Asp</i>	<i>Arg</i>	<i>Ser</i>	<i>Ala</i>	<i>Ser</i>	<i>Glu</i>	<i>Pro</i>	<i>Ser</i>	<i>Leu</i>	<i>His</i>	<i>Arg</i>	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	<i>His</i>
AAG	ATC	AAC	CGG	AGT	GCC	TCG	GAG	CCC	TCC	CTG	CAC	CGG	GCG	GCC	CAC
AAG	ATC	AAC	CGG	AGC	GCT	TCC	GAG	CCA	TCC	TTG	CAT	CGG	GCA	GCC	CAC
<i>Thr</i>	<i>Glu</i>	<i>Asp</i>	<i>Ile</i>	<i>Asp</i>	<i>Ala</i>	<i>Cys</i>	<i>Thr</i>	<i>Leu</i>	<i>Thr</i>	<i>Thr</i>	<i>Ser</i>	<i>Pro</i>	<i>Arg</i>	<i>Leu</i>	<i>Pro</i>
ACC	GAG	GAC	ATC	AAC	GCC	TGC	ACG	CTG	ACC	ACG	TCC	CCT	CGG	CTG	CCT
ACT	GAG	GAT	ATC	AAT	GCT	TGC	ACG	CTG	ACC	ACG	TCC	CCG	AGG	CTG	CCT
<i>Val</i>	<i>Phe</i>														
GTC	TTC	TAG													
GTC	TTC	TAG													

Abb.4/B: Teilsequenz 2 der isolierten cDNA und Sequenzvergleich mit der menschlichen c-raf-1-cDNA

201 Basen kodierende Nukleotidsequenzen und Aminosäuresequenz vom 5' Ende der Rinder c-raf-1-cDNA (fett gedruckte obere Reihe) in Richtung 3' bis zum Translationsstopcodon (TAG). Die Nukleotidsequenz zeigte zur menschlichen c-raf-1-cDNA eine Gesamthomologie von 90% (untere Reihe, Position 1875 bis Position 2076, entspricht Teil von Exon 16 und gesamtes Exon 17 [130]). Die Aminosäurehomologie betrug 100%.

Die Sequenzierung der isolierten cDNA und die Hybridisierungsexperimente bestätigten eindeutig die Isolierung von c-raf-1-Sequenzen des Rinds. Die 100%ige Aminosäurehomologie am C-terminalen Ende des Proteins zwischen Rind und Mensch könnte darauf hindeuten, daß es sich um einen funktionell wichtigen Teil des Proteins handelt.

Damit waren die Voraussetzungen für Hybridisierungsexperimente mit einer homologen Probe zur Untersuchung der DNA-Organisation und Expression des c-raf-1-Onkogens in theileriainfizierten Rinderlymphozyten vorhanden. Für diese Experimente wurde die isolierte cDNA verwendet.

4.1.2. In 3' liegenden Sequenzen des c-raf-1-Gens treten in der DNA theileriainfizierter Rinderlymphozyten keine Strukturveränderungen auf

Untersuchungen bezüglich der DNA-Organisation des c-raf-1-Gens zeigten, daß innerhalb des Gens Strukturveränderungen (z.B. Deletionen im 5' und 3' Bereich) auftreten [130,142]. Die Strukturveränderungen könnten durch die Lokalisation des Gens in einem besonders instabilen chromosomalen Bereich begünstigt sein (beim Menschen: Chromosom 3 an der Position p25), der bei verschiedenen Krebsarten verändert vorliegt [147]. Im folgenden wurde untersucht, ob Strukturveränderungen innerhalb des Gens in infizierten Lymphozyten auftreten.

Eine Möglichkeit kleinere Strukturveränderungen eines Gens wie z.B. kleine Deletionen (Verlust von Sequenzen) zu identifizieren, ist eine Untersuchung kürzerer Restriktionsfragmente des betreffenden Gens. Neben der Wahl der Restriktionsenzyme ist bei solchen Untersuchungen wichtig, daß die Hybridisierungsprobe möglichst den gesamten Genort abdeckt. Nur so können alle auftretenden Fragmente und eventuelle Abweichungen identifiziert werden. Die das gesamte c-raf-1-Gen umfassende Analyse (die genomische Sequenz umfaßt ca. 40 kb) wurde nicht durchgeführt, da die als Hybridisierungsprobe eingesetzte isolierte cDNA nur den 3' Bereich der c-raf-1-cDNA repräsentierte (s.o.). Identifizierbar waren somit nur eventuelle Veränderungen im 3' Bereich des c-raf-1-Gens.

Die DNA infizierter (TpM- und TpK-Zelllinie) und nichtinfizierter Zellen (ConA) wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, die häufig schneiden und somit relativ kleine DNA-Fragmente (ca. 0,5 kb bis 20 kb) erzeugen. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch herkömmliche Gelelektrophorese und Hybridisierung mit der spezifischen c-raf-1-Probe wurde die Größe der Restriktionsfragmente in infizierten und nichtinfizierten Zellen verglichen. Abbildung 5 zeigt die hybridisierenden Fragmente nach Verdau der DNAs mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *PstI*, *BamHI* und *HindIII*. Die DNA infizierter Zellen zeigte keine Unterschiede zur DNA nichtinfizierter Zellen, was vermuten ließ, daß keine Strukturveränderungen im untersuchten 3' Bereich des c-raf-1-Gens auftraten. Es konnte allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden, daß kleinere Deletionen vorhanden waren, die mit den verwendeten Restriktionsenzymen und mit dieser Methode nicht nachweisbar waren.

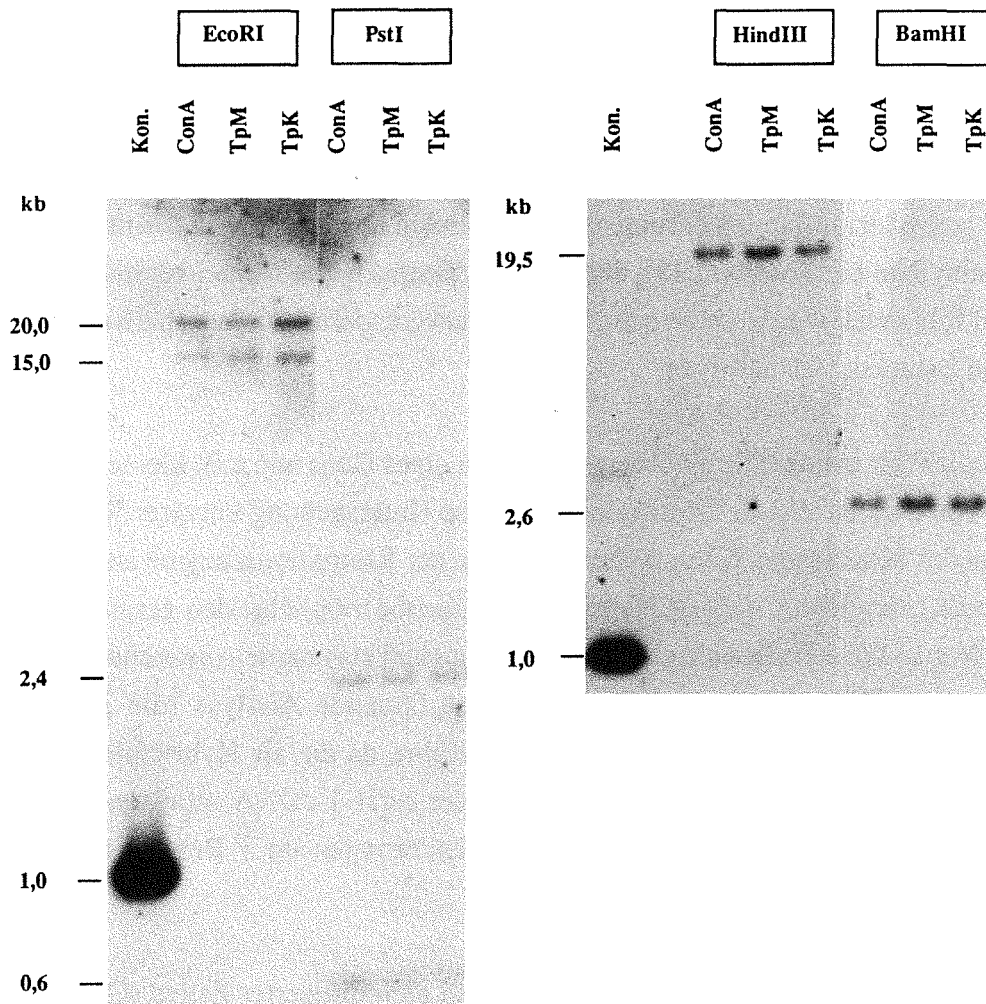


Abb.5: In 3' Regionen des *c-raf-1*-Gens werden keine unterschiedlichen Restriktionsfragmente in der DNA infizierter und nichtinfizierter Zellen erhalten

10 μ g der DNA nichtinfizierter Lymphozyten (ConA) und infizierter Lymphozyten (TpM, TpK) wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *PstI*, *HindIII* und *BamHI* verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit der Rinder *c-raf-1*-cDNA hybridisiert. Als Hybridisierungskontrolle (Kon) wurde 100 pg *EcoRI*-verdaute DNA der Rinder *c-raf-1*-cDNA + Plasmid aufgetragen. Als Größemarker diente *HindIII*-verdaute DNA des Phagen Lambda.

In den folgenden Experimenten wurde die Transkription des *c-raf-1*-Gens in infizierten und nichtinfizierten Zellen untersucht.

4.1.3. c-raf-1 und c-myc werden in infizierten und nichtinfizierten Lymphozyten in gleichen Mengen transkribiert

Eine Überexpression eines Protoonkogens kann in einigen Fällen eine onkogene Wirkung zur Folge haben [40,41]. T- und B-Lymphome weisen häufig charakteristische Translokationen auf, bei denen das c-myc-Gen zum Beispiel in die Nähe der Immunglobulin-Gene (schwere Kette) bzw. der alpha Kette des T-Zellrezeptors verlagert wird, was zu einer Deregulation der Genexpression des c-myc-Gens führen kann [166]. Da myc und raf bei der Transformation von Zellen synergistisch wirken [46,149] und c-myc zu den Genen gehört, die bei der Aktivierung des Wachstums ruhender Lymphozyten verstärkt exprimiert werden [167], wurde neben der Expression des c-raf-1-Gens auch die Expression des c-myc-Gens untersucht. Festgestellt werden sollte, ob eine erhöhte Transkription beider Gene im Vergleich zu ConA-stimulierten Rinderlymphozyten nachgewiesen werden kann.

Um zu überprüfen, ob das c-raf-1-Gen in einer frühen Phase der Aktivierung von Lymphozyten (wie das myc-Gen, [167]) vermehrt transkribiert wird, wurden ConA-Zellen verglichen, die nur 21 Stunden mit ConA stimuliert bzw. über einen längeren Zeitraum von 12 Wochen ständig mit ConA und dem Wachstumsfaktor Interleukin 2 (IL2) kultiviert wurden. Außerdem wurden infizierte Zellen untersucht, bei denen der Parasit durch das theilerizide Medikament 720C abgetötet wurde. Bei einem direkten Einfluß der Infektion bzw. des Parasiten auf die Transkription der Gene wurde eine Verringerung der Transkriptmenge in 720C-behandelten Zellen erwartet.

Nach Isolierung von PolyA-RNA der verschiedenen Zellen wurde die RNA auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf Nylon-Filter transferiert ('Northern-Blot') und mit der Rinder-c-raf-1-cDNA bzw. einer Rinder-c-myc-Probe (isoliert von Dr. D. Dobbelaere, IGT; enthält Exon 2 der genomischen Sequenz) hybridisiert (Abb.6). Um zu überprüfen, ob gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden, erfolgte eine Rehybridisierung der Filter mit einer Rinder-Aktin-cDNA-Probe (isoliert von Dr. A. Ehrfeld, IGT). Das Aktin-Gen wird neben anderen konstitutiv exprimierten 'Haushaltsgenen' ('housekeeping genes') häufig für derartige Kontrollhybridisierungen verwendet. Als weitere Kontrollen wurden die Filter mit einer Rinder-IL2-Rezeptor-cDNA-Probe (erhalten von Dr. R. Reeves, Washington State University, USA) und einer *Theileria*-Aktin-cDNA-Probe (erhalten von Dr. A. Ehrfeld [168]) rehybridisiert. Die Hybridisierung mit der theileriaspezifischen Probe sollte zeigen, daß in der mRNA 720C-behandelter Zellen keine parasitären Transkripte nachweisbar sind, was nach einer erfolgreichen Abtötung des Parasiten durch

720C zu erwarten ist. Durch Hybridisierung mit der IL2-Rezeptorprobe sollte eine bereits auf molekularer Ebene beschriebene Reaktion der Wirtszelle nach der Eliminierung des Parasiten [21], nämlich eine verminderte Transkription des IL2-Rezeptors in 720C-behandelten Zellen, gezeigt werden. In Abbildung 6 ist das Ergebnis der verschiedenen Hybridisierungen dargestellt.

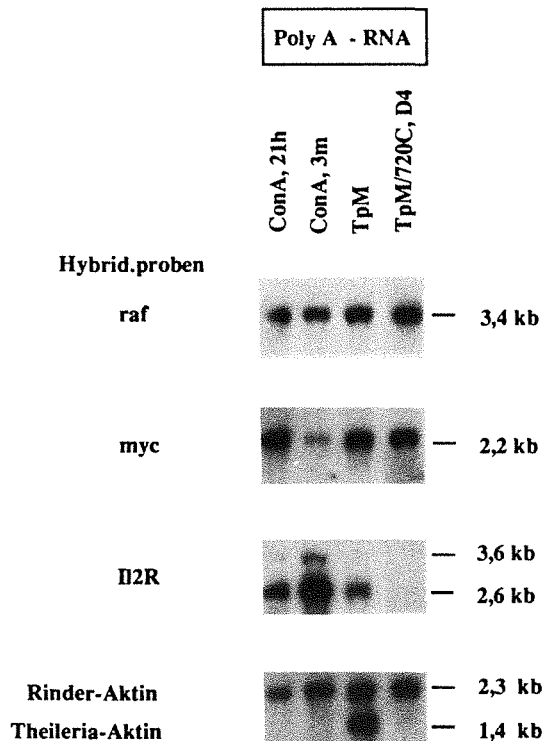


Abb.6: Transkriptmenge des c-raf-1- und des myc-Gens in infizierten und nichtinfizierten Rinderlymphozyten

4 µg PolyA-RNA aus theileriainfizierten Zellen (TpM), aus ConA-stimulierten Lymphozyten (ConA, 21 Stunden bzw. ConA, 12 Wochen) und aus infizierten Lymphozyten, die 4 Tage mit 720C behandelt waren (TpM/720C, D4), wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf Nylon-Filter transferiert und mit den angegebenen radioaktiv markierten DNA-Proben hybridisiert.

Die c-raf-1-mRNA war, wie in aktivierten Lymphozyten anderer Organismen [148], in allen untersuchten Zellen relativ stark und in vergleichbaren Mengen nachweisbar. Es ergab sich kein Unterschied zu ConA-Zellen, die über verschiedene Zeiträume stimuliert wurden (ConA 21 Stunden bzw. 12 Wochen). Auch nach Abtöten des Parasiten war keine verminderte Transkription feststellbar, obwohl die Proliferation dieser Zellen bereits deutlich gehemmt war. Dies wurde durch Messung des ^3H -Thymidin-Einbaus in die DNA kultivierter Zellen vor der RNA-Präparation festgestellt. Ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Transkriptmenge des c-raf-1-Gens und einer erhöhten Aktivität von Lymphozyten [148] konnte demnach in diesem Zellsystem nicht bestätigt werden.

Das c-myc-Gen zeigte in ConA-stimulierten Lymphozyten, die über einen Zeitraum von 12 Wochen kultiviert wurden, eine leicht verringerte Transkriptmenge im Vergleich zu Lymphozyten, die 21 Stunden mit ConA stimuliert wurden. Dies war zu vermuten, da Kelly und Mitarbeiter zeigten, daß die Transkriptmenge des myc-Gens bei einer erstmaligen Stimulierung von ruhenden T-Zellen zunächst stark zunimmt, und nach ca. 60 Stunden allmählich abnimmt [167]. In theileriainfizierten Zellen wurde eine Transkriptmenge erhalten, die den ConA-Zellen, die nur 21 Stunden mit ConA behandelt wurden, entsprach. Nach Abtötung des Parasiten war keine Veränderung feststellbar.

Die Hybridisierung mit der Rinder-Aktin-Probe zeigte, daß vergleichbare Mengen an mRNA aufgetragen wurden. Wie erwartet, führte die Behandlung der infizierten Zellen mit 720C zur Verminderung bzw. Eliminierung der parasitenspezifischen Aktin-RNA und zu einer verminderten IL2-Rezeptor-Transkriptmenge in der Wirtszelle.

Die Northern-Analyse zeigte somit für die Transkription des c-raf-1- und des c-myc-Gens keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und nichtinfizierten Lymphozyten. Außerdem wurde nach Abtötung des Parasiten keine Verminderung der Transkriptmenge nachgewiesen, sodaß ein direkter und schnell wirkender Einfluß des Parasiten auf Transkriptionsebene für beide Gene ausgeschlossen werden konnte.

Offen blieb allerdings die Frage, ob durch die Infektion posttranskriptionelle oder posttranslatorische Regulationsmechanismen der c-raf-1-Expression beeinflußt werden. Deshalb wurde anschließend das c-raf-1-Protein untersucht.

4.1.4. Das c-raf-1-Protein wird in infizierten und 720C-behandelten Lymphozyten in vergleichbaren Mengen exprimiert

Zum Nachweis des c-raf-1-Proteins in theileriainfizierten Zellen wurde ein polyklonales Antiserum eingesetzt, das gegen ein 29 kD großes Protein des viralen raf-Gens gerichtet ist und 2/3 des C-terminalen-Endes des viralen raf-Proteins repräsentiert [169]. Das Antiserum wurde auch zur Identifizierung des zellulären c-raf-1-Proteins verschiedener Species eingesetzt.

Zunächst wurden TpM-Zellen bzw. 3 Tage mit 720C-behandelte TpM-Zellen) 16 Stunden im Brutschrank mit ³⁵S-Methionin enthaltendem Kultur-medium inkubiert, um die neusynthetisierten Proteine in vivo radioaktiv zu markieren. Den 720C-Zellen

wurde dabei zusätzlich der Wachstumsfaktor IL2 zugesetzt, um die Zellen zu aktivieren, die Stoffwechselaktivität zu erhöhen und somit ausreichende Mengen an markierten Proteinen für das Experiment zu erhalten. Erwähnt werden sollte, daß das zugesetzte IL2 zwar die Stoffwechselaktivität der Zellen erhöht, die Signale, die für die Transformation der Zellen essentiell sind und in infizierten Zellen vom Parasiten geliefert werden, kann IL2 allerdings nicht ersetzen. Nach der Markierung wurden Gesamt-Proteinlysate hergestellt und nach einer Vorreinigung mit normalem Kaninchenserum (durch Immunpräzipitation) mit dem spezifischen Antikörper inkubiert. Die Vorreinigung sollte dazu dienen, unspezifische Antikörper-Bindungen zu reduzieren. Nach Präzipitation mit dem spezifischen Antiserum wurden die denaturierten Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese nach ihrer Größe getrennt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden anschließend durch Autoradiographie des Gels sichtbar gemacht.

Erste Experimente zeigten, daß trotz Vorreinigung der Lysate mit normalem Kaninchenserum, viele unspezifische Signale nach der Präzipitation erhalten wurden. Das verwendete Antiserum enthielt neben den raf-spezifischen Antikörpern vermutlich unspezifische Antikörper, sodaß andere Proteine kopräzipitiert wurden. Eine Reinigung des Antiserums konnte nicht durchgeführt werden, da die zur Verfügung stehenden Mengen nicht ausreichten. Die vorgereinigten Lysate wurden deshalb mit dem anti-v-raf-Antiserum und in einem parallelen Ansatz mit normalem Kaninchenantiserum (NRS), präzipitiert. Beide Ansätze wurden nebeneinander auf einem Proteingel aufgetragen. Unspezifische Signale wurden dann in beiden Ansätzen sichtbar und identifiziert. In Abbildung 7 ist das Ergebnis einer Immunpräzipitation gezeigt.

Als vermutlich spezifisch erwiesen sich zwei Proteine mit einer Größe von 74 kD bzw. 120 kD, da sie nur mit dem anti-v-raf-Antiserum erhalten wurden (Abb.7). Die Größe von 74 kD entsprach der Größe des endogenen c-raf-1-Proteinproduktes, wie es für menschliche Zellen beschrieben wurde [130,133]. Da die Größe des c-raf-1-Transkripts beim Rind und beim Menschen ungefähr die gleiche Länge (3,4 kb) besitzt, wurde geschlossen, daß das 74 kD Protein vermutlich das c-raf-1-Proteinprodukt des Rinds repräsentiert. Bei dem 120 kD Protein könnte es sich um ein Protein handeln, das mit raf-spezifischen Antikörpern kopräzipitiert wird. Spezifische Kopräzipitationen größerer Proteine werden auch in menschlichen Proteinlysaten und verstärkt in Lungenkarzinomzellen beobachtet [persönl. Mitteilung Dr. U. Rapp, National Cancer Institute, Frederick, USA]. Es wird vermutet, daß es sich um Liganden, die bei der Aktivierung der Kinaseaktivität des c-raf-1-Proteins eine Rolle übernehmen könnten oder um Substrate handelt, die durch das c-raf-1-Protein phosphoryliert werden.

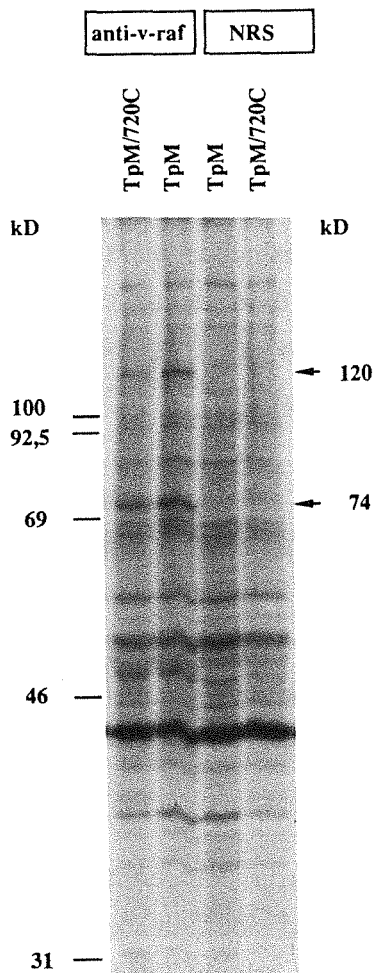


Abb.7: Immunpräzipitation ^{35}S -Methionin markierter Proteine mit raf-spezifischen Antikörpern zum Nachweis des c-raf-1-Proteins

Infizierte (TpM) bzw. 3 Tage mit 720C-behandelte TpM-Zellen (TpM/720) wurden für 16 h in Kulturmedium mit radioaktivem ^{35}S -Methionin inkubiert. Bei TpM/720-Zellen wurde zusätzlich der Wachstumsfaktor IL2 zugegeben. Nach Herstellung der Proteinextrakte und einer ersten Immunpräzipitation mit normalem Kaninchen Serum (Vorreinigung) wurden die markierten Proteine mit raf-spezifischen Antiserum (anti-v-raf) und als Kontrolle mit normalem Kaninchen Serum (NRS) präzipitiert, denaturiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und autoradiographiert. Die Proteine bei 74 kD und 120 kD wurden nur mit dem raf-Antiserum präzipitiert. Als Größenmarker dienen ^{14}C -markierte Markerproteine.

In TpM- und TpM/720C-Extrakte waren geringe quantitative Unterschiede bezüglich der Signale bei 74 kD und 120 kD aufgetreten. Bei einer gleichen Anzahl an markierten Zellen und bei gleicher Menge an Radioaktivität (Bestimmung vor und nach der Immunpräzipitation), wurde bei TpM-Zellen ein etwas stärkeres Signal bei 74 kD und ein deutlich stärkeres Signal bei 120 kD erhalten. Ob diese quantitativen Unterschiede in direktem Zusammenhang mit der Abtötung des Parasiten stehen, müßte weiter untersucht werden. Die Daten lassen jedoch vermuten, daß das c-raf-1-Protein bei primären Mechanismen der Transformation der Lymphozyten keine essentielle Funktion übernimmt, da 3 Tage bzw. 4 Tage nach Abtötung des Parasiten deutlichere Unterschiede in der Expression des Proteins bzw. der mRNA (Abb.6) zu erwarten wären.

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, liegt das c-raf-1-Gen beim Menschen in einem instabilen DNA-Bereich auf Chromosom 3, der bei verschiedenen Krebsarten (z.B. Kleinzelliges Lungenkarzinom) verändert vorliegt [147]. Es wird vermutet, daß in diesem Bereich, Gene lokalisiert sein könnten, die bei der Wachstumskontrolle wichtige Funktionen übernehmen (z.B. Tumorsuppressor-gene) [47]. Wie oben gezeigt wurde, gibt es keine Hinweise, daß das c-raf-1-Gen in infizierten Zellen eine essentielle Funktion bei der Transformation der Lymphozyten übernimmt. Deshalb ist nicht anzunehmen, daß das Gen durch die Infektion verändert wird. Es ist aber eine geeignete DNA-Sonde, um Veränderungen der Genomorganisation in der Nähe des c-raf-1-Gens wegen der möglichen Homologie zur menschlichen Situation auszutesten.

4.2. Die DNA infizierter Lymphozyten zeigt Hypermethylierungen in Schnittstellen selten schneidender CpG-Restriktionsenzyme

4.2.1. Beim Vergleich der NotI-Restriktionsfragmente in der Nähe des c-raf-1-Gens resultierte in der DNA infizierter und nichtinfizierter Lymphozyten ein unterschiedliches Restriktionsmuster

Zur Untersuchung und Charakterisierung größerer Strukturveränderungen im Genom wie Translokationen in andere chromosomale Bereiche wird eine Gelelektrophorese (Pulsfeldgelelektrophorese s.u.) angewendet, die es erlaubt DNA-Moleküle größer 20 Kilobasen aufzutrennen [152]. Für den Restriktionsverdau werden selten schneidende Restriktionsenzyme ('rare cutters') verwendet [151]. Dazu gehören z.B. das Restriktionsenzym *SfiI* mit der Erkennungssequenz -GGCCNNNNNGGCC- oder Restriktionsenzyme, die 8 oder 6 Basen erkennen und CpG-Nukleotide in ihrer Erkennungssequenz enthalten (z.B. *NotI*: -GCGGCCGC-). Die Schnittstellen dieser Enzyme sind im Genom unterrepräsentiert, wodurch relativ lange DNA-Fragmente mit einer Größe von bis zu mehreren Tausend Kilobasen entstehen können.

Bei der herkömmlichen Gelelektrophorese können nur DNA-Moleküle bis zu ca. 20 Kilobasen getrennt werden, da größere Moleküle in den Poren des Gels hängen bleiben ('Trapping') und somit nicht wandern. In allen bisher entwickelten Varianten der Pulsfeld-Gelelektrophorese-Methode wird die Trennung durch eine periodische Änderung der Richtung des angelegten elektrischen Feldes erreicht. Diese Richtungsänderungen führen zu einer ständigen Änderung der Laufrichtung der DNA und somit zur Auflösung des 'Trappings', wodurch eine Bewegung der langen DNA-Moleküle durch die Gelmatrix gewährleistet wird. Zur Trennung der DNA-Moleküle wird die Zeit

ausgenutzt, die die Moleküle benötigen, um sich in Richtung des geänderten elektrischen Feldes zu orientieren (Konformationsänderung der DNA). Kürzere DNA-Moleküle können diese Konformationsänderung schneller ausführen als längere DNA-Moleküle und bewegen sich somit insgesamt schneller durch die Gelmatrix [170,171]. In dieser Arbeit wurde die FIGE- und OFAGE-Methode eingesetzt. Das Prinzip beider Methoden wird im folgenden kurz erläutert :

- Bei der 'orthogonal field alternating gel electrophoresis' (OFAGE, [172]) wird eine Auftrennung der DNA durch eine periodische Änderung der Richtung des angelegten elektrischen Feldes in einem 120° Winkels erreicht. Diese Richtungsänderung führt zu einer zickzackförmigen Bewegung durch die Gelmatrix. Mit dieser Methode können zur Zeit Moleküle bis zu einer Größe von 7000 Kb aufgetrennt werden.
- Bei der 'field inversion gel electrophoresis' (FIGE, [173]) wird eine Auftrennung der DNA durch periodische Änderung der Richtung des angelegten elektrischen Feldes in einem 180° Winkel erreicht. Durch Umkehren der Spannung nach gewissen Zeitabständen wird die DNA zu einer Konformationsänderung und zu einer Änderung der Laufrichtung (vorwärts bzw. rückwärts) gezwungen. Zur Auftrennung großer DNA-Moleküle werden die Zeiten für die Vorwärts- bzw. Rückwärtsbewegung während eines Gellaufs kontinuierlich verändert, da unterschiedlich große DNA-Moleküle, wie oben beschrieben, unterschiedliche Zeiten für die Konformationsänderung benötigen. Die Wahl der Zeiten für die Vorwärts- und Rückwärtsrichtung der Elektrophoresespannung bestimmt somit den Größenbereich der Moleküle, die in einem FIGE-Lauf getrennt werden. In dieser Arbeit wurde meist mit einer Zeit von 3 Sekunden für die Vorwärtsrichtung bzw. 1 Sekunde für die Rückwärtsrichtung begonnen (erste Periode). Innerhalb der Laufzeit von 16 Stunden wurden diese Periodenzeiten kontinuierlich um 6 Millisekunden (vorwärts) bzw. 3 Millisekunden (rückwärts) erhöht. Die Zeiten für die letzte Periode betrug 21 Sekunden/vorwärts und 7 Sekunden/rückwärts. Dies entsprach einem Trennbereich von 5-2000 kb. Das verwendete computergesteuerte FIGE-System wurde von G.Langlotz im Rahmen einer Diplomarbeit entwickelt [174].

Für die Untersuchung der c-raf-1-DNA-Region wurde DNA ConA-stimulierter Lymphozyten mit der DNA theileriainfizierter Zellen bzw. DNA eines nichtinfizierten T-Zell-Klons (G6) mit der DNA des T-Zell-Klons nach einer in vitro Infektion mit dem Parasiten (G6TpM) verglichen. Die G6- bzw. G6TpM-Zellklone wurden im International Laboratory for Research on Animal Diseases (ILRAD, Nairobi, Kenya), über einen Zeitraum von ungefähr 2 Jahren in Zellkultur gehalten. Die DNAs wurden mit dem Enzym

NotI bzw. *SfiI* verdaut und mit der FIGE-Methode bzw. der OFAGE-Methode elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zeiten für die Vorwärts- bzw. Rückwärtsrichtung der Elektrophorese-Spannung bei der FIGE bzw. der Zickzack-Richtung bei der OFAGE wurden dabei so gewählt, daß Moleküle zwischen 5 bis ungefähr 1000 Kilobasen auf einem Agarosegel aufgetrennt wurden. Nach Transfer der DNA auf Nylonfilter wurde mit der markierten Rinder-cDNA-Probe des *c-raf-1*-Gens hybridisiert.

Abbildung 8 zeigt die hybridisierenden Restriktionsfragmente der verschiedenen DNAs mit dem Enzym *NotI*. Es wurde ein unterschiedliches Restriktionsmuster in der DNA nichtinfizierter und infizierter Zellen erhalten.

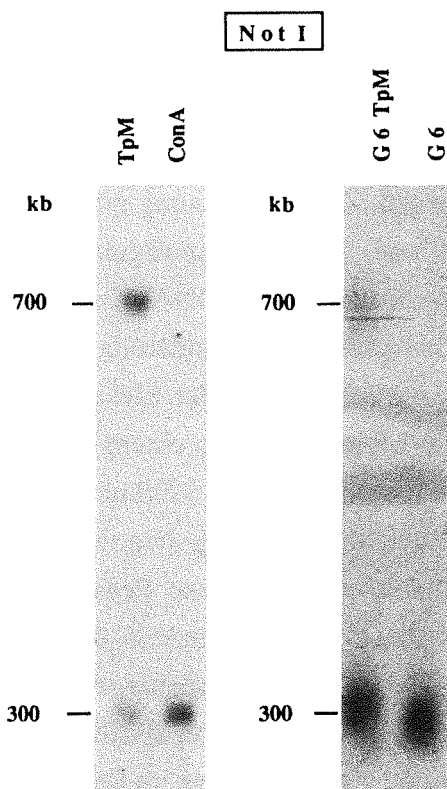


Abb.8: Die DNA infizierter und nichtinfizierter Lymphozyten zeigen ein unterschiedliches *NotI*-Restriktionsmuster

5µg DNA wurde mit dem Enzym *NotI* verdaut und mit der FIGE-Methode elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zeiten für die Vorwärtsrichtung der Elektrophoresespannung betrug 3 s bis 21 s, bzw. 1 s bis 7 s für die Rückwärtsrichtung der Elektrophoresespannung. Die Elektrophoresedauer betrug 16 h bei einem Spannungsgradienten von 8V/cm (300 V). Nach Transfer der DNA auf Nylonfilter wurde mit der markierten Rinder-cDNA-Probe des *c-raf-1*-Gens hybridisiert. Als Größenmarker dienten Hefe-Chromosomen des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* und Konkatemere des Phagen Lambda.

DNA nichtinfizierter Zellen:

- ConA-stimulierte Rinderlymphozyten (ConA)
- T-Zellklon (G6)

DNA infizierter Zellen:

- mit *Theileria parva* infizierte Zelllinie 803 (TpM)
- mit *Theileria parva* infizierter T-Zellklon (G6TpM)

In der DNA nichtinfizierter Zellen (Abb.8: Spur ConA und G6) hybridisierte ein Fragment mit einer Größe von ungefähr 300 kb, während in der DNA infizierter Zellen (Abb.8: Spur Tpm und G6Tpm) ein zusätzliches *NotI*-Fragment mit einer Größe von ungefähr 700 kb auftrat. Um zu prüfen, ob die DNA vollständig verdaut war, wurde das Experiment mehrmals wiederholt, wobei auch verschiedene Mengen an Restriktionsenzym eingesetzt wurden. In allen Experimenten wurde jeweils das gleiche, in Abbildung 8 gezeigte Ergebnis erhalten, sodaß ein unvollständiger Verdau sehr unwahrscheinlich war.

Mit dem Restriktionsenzym *SfiI* war kein Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen nachweisbar. In infizierten (Abb.9: Spur G6Tpm) und nichtinfizierten Zellen (Abb.9: Spur G6) hybridisierten jeweils ein 65 kb und ein 175 kb Fragment. Diese Fragmente wurden auch nach einem Doppelverdau mit den Enzymen *NotI/SfiI* erhalten.

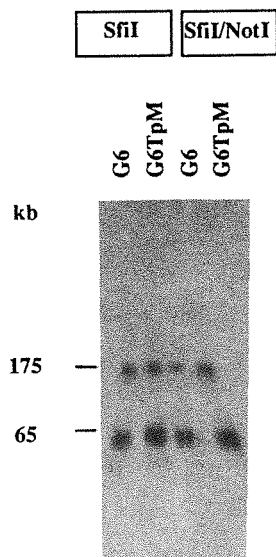
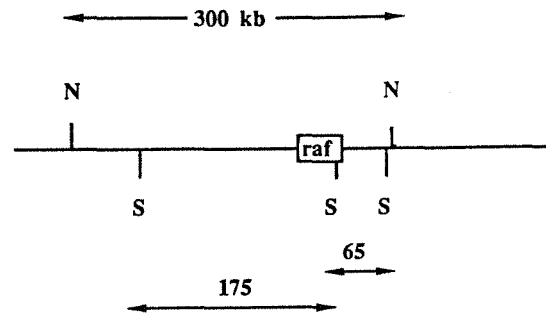


Abb.9: Die DNA infizierter und nichtinfizierter Lymphozyten zeigen ein identisches *SfiI*-Restriktionsmuster

Die DNAs nichtinfizierter Zellen (G6) und infizierter Zellen (G6Tpm) wurden mit den Enzymen *SfiI* bzw. *SfiI/NotI* verdaut und mit der OFAGE-Methode elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zeiten für die Zickzackrichtung der Elektrophoresespannung betrug 20 s. Die Elektrophoresedauer betrug 28 h bei einem Spannungsgradienten von 8V/cm (300 V). Nach Transfer der DNA auf Nylonfilter wurde mit der markierten Rinder-cDNA-Probe des *c-raf-1*-Gens hybridisiert. Als Größenmarker dienten Konkatemere des Phagen Lambda.

Da beim Doppelverdau mit *SfiI/NotI* und beim Einfachverdau mit *SfiI* DNA-Fragmente gleicher Größe erhalten wurden, konnte geschlossen werden, daß die *SfiI*-Schnittstellen innerhalb des 300 kb *NotI*-Fragments liegen mußten (die Orientierung der Fragmente wurde nicht bestimmt):



Das Auftreten des zusätzlichen 700 kb *NotI*-Restriktionsfragments ließ sich auf verschiedene Weise erklären:

1. Möglich war, daß im Bereich des *c-raf-1*-Genlocus eine Veränderung, z.B. eine Translokation in eine andere chromosomale Umgebung, stattgefunden hatte. Die hypothetische Translokation mußte dabei einen Bereich von $65 \text{ kb} + 175 \text{ kb} = 240 \text{ kb}$, also den Bereich innerhalb der *SfiI*-Schnittstellen beinhalten, da diese nach der Translokation erhalten blieben. Außerdem mußte die Translokation nur eines der zwei homologen Chromosomen betreffen, da das für nichtinfizierte Zellen charakteristische 300 kb *NotI*-Fragment auch in infizierten Zellen nachgewiesen wurde.
2. Neben einer Translokation ergab sich aber noch eine andere Möglichkeit das zusätzliche *NotI*-Fragment in infizierten Zellen zu erklären. Alle selten schneidenden CpG-Restriktionsenzyme sind methylen sensitiv, d.h. sie schneiden nicht in ihrer Erkennungssequenz, wenn ein Cytosin in einem CpG-Nukleotid methyliert vorliegt [151]. Im vorliegenden Fall des zusätzlichen *NotI*-Fragment müßte somit eine *NotI*-Schnittstelle, die außerhalb des *c-raf-1*-Genlocus lokalisiert ist, teilweise methyliert vorliegen. Da das Enzym diese methylierte Stelle nicht schneiden würde, könnte zusätzlich ein größeres (das 700 kb) Fragment resultieren.

Die Untersuchung größerer DNA-Bereiche um den *c-raf-1*-Genlocus durch Pulsfeld Gelelektrophorese lieferte erstmals Unterschiede zwischen der DNA nichtinfizierter und

Fragment durch eine Veränderung des Methylierungsmusters (eine Hypermethylierung) in der DNA infizierter Zellen und nicht durch eine Translokation des *c-raf-1*-Gens in einen anderen chromosomalen DNA-Bereich ('rearrangement'), entstanden war. Diese Hypermethylierung war nicht innerhalb des *c-raf-1*-Gens lokalisiert, sondern aufgrund des *SfiI*-Doppelverdaus (s.o.) mindestens 65 kb davon entfernt (vgl. Skizze *SfiI*-Fragmente).

4.2.2. Der Unterschied im *NotI*-Restriktionsmuster ist auf eine veränderte Methylierung in der DNA infizierter Zellen zurückzuführen

Um festzustellen, ob das zusätzliche 700 kb-Fragment in der DNA infizierter Zellen durch eine Methylierung der Base Cytosin in der *NotI*-Erkennungssequenz verursacht wurde, wurden infizierte Zellen zunächst mit dem Agens 5-Aza-Cytidin (5-Aza-C) behandelt. 5-Aza-C wird wie in der Einleitung beschrieben wurde, verwendet, um Methylierungen in der DNA zu entfernen [88]. Es handelt sich um ein Basenalog zu Cytosin (vgl. Abb. 10), das bei der Replikation anstelle von Cytosin in die DNA eingebaut wird und vermutlich die Aktivität der DNA-Methylasen hemmt.

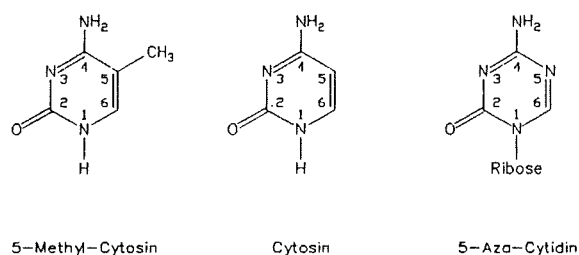


Abb.10: Chemische Strukturformeln von 5-Methyl-Cytosin, Cytosin und 5-Aza-Cytidin

Bei jeder Zellteilung gehen somit sukzessive Methylierungen an den verschiedensten Stellen der DNA verloren. Bei einer zusätzlichen Methylierung einer *NotI*-Schnittstelle in infizierten Zellen, mußte die Schnittstelle nach der Behandlung der Zellen mit 5-Aza-C erkannt werden und das zusätzliche 700 kb-Fragment mußte teilweise oder ganz verschwinden.

Für die Behandlung von Zellen mit 5-Aza-C wurden in anderen Arbeiten z.B. Konzentrationen von 1-5 μ M verwendet [89]. Diese Konzentrationen erwiesen sich aber für die infizierten Zellen als äußerst toxisch. Bei 5 μ M und 2,5 μ M starben die Zellen schon innerhalb 24 Stunden ab. Bei einer Konzentration von 1 μ M konnten die Zellen

morphologische Veränderungen (Größenzunahme, Vakuolenbildung). Eine längere Behandlung mit $1\mu\text{M}$ 5-Aza-C führte schließlich auch zum Zelltod.

Abbildung 11/A und B zeigt die DNA infizierter Zellen, die 1, 2 und 5 Tage bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ 5-Aza-C gehalten wurden, nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *NotI*, Auftrennung durch Pulsfeld-Gelelektrophorese und Hybridisierung mit der *c-raf-1*-Probe.

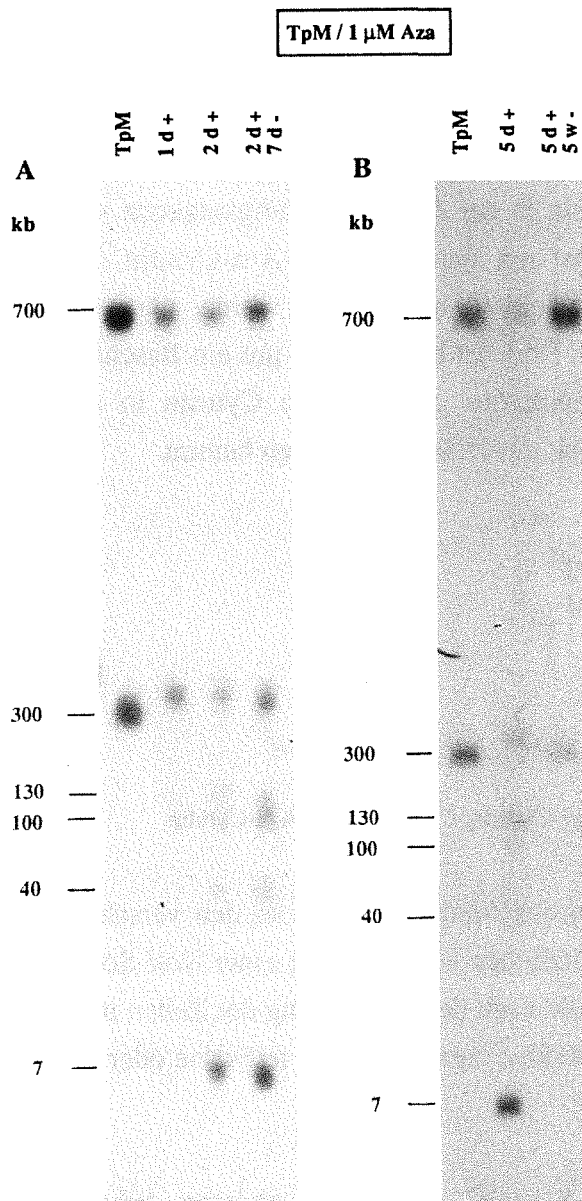


Abb.11: *NotI*-Restriktionsmuster im Bereich des *c-raf-1*-Gens nach Kurzzeit-Behandlung infizierter Zellen mit $1\mu\text{M}$ 5-Aza-C

Die DNA infizierter Zellen, die für verschiedene Zeiträume mit $1\mu\text{M}$ 5-Aza-C behandelt worden waren, wurden mit *NotI* verdaut, mit der FIGE-Methode aufgetrennt (16 h Gesamtlaufzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts), auf Nylonfilter transferiert und mit der *c-raf-1*-c-DNA-Probe hybridisiert. Als Größenmarker dienten Hefe-Chromosomen, Konkatemere und *HindIII*-verdaute DNA des Phagen Lambda.

DNA-Proben:

- A:**
- unbehandelte infizierte Zellen (TpM)
 - behandelte infizierte Zellen (1 d+ bzw. 2 d+)
 - Zellen, die 2 Tage nach Behandlung für 7 weitere Tage ohne 5-Aza-C weiterkultiviert wurden (2 d+, 7 d-)
- B:**
- unbehandelte infizierte Zellen (TpM)
 - behandelte infizierte Zellen (5 d+)
 - Zellen, die 5 Tage nach Behandlung für 5 Wochen ohne 5-Aza-C weiterkultiviert wurden (5 d+, 5 w-)

Schon nach 1 Tag Behandlung war eine Veränderung des Restriktionsmusters deutlich sichtbar. Außer den Fragmenten bei 700 kb und 300 kb traten zusätzliche kleinere Fragmente bei ca. 130, 100, 40 und 7 kb auf. Bei längerer Behandlung (2 und 5 Tage) nahmen die Hybridisierungssignale der größeren Fragmente an Intensität ab, während die Signale der kleineren stärker wurden. Gezeigt ist auch die DNA von Zellen, die nach 2 tägiger Behandlung anschließend 7 Tage ohne 5-Aza-C kultiviert wurden (Abb.11/A: Spur 2d+,7d-). In dieser DNA wurde eine Zunahme in der Intensität des 700 kb-Fragments beobachtet. Bei entsprechend längerer Kultur (für weitere 5 Wochen) waren die kleineren Fragmente schließlich nicht mehr nachweisbar (Abb.11/B: Spur 5d+, 5w-). Das stärkere Hybridisierungssignal bei 700 kb und das Verschwinden der Fragmente kleiner 300 kb kann durch ein Überwachsen von Zellen, deren DNA durch die Behandlung in diesen Schnittstellen nicht demethyliert wurde oder durch Remethylierung der demethylierten *NotI*-Schnittstellen erklärt werden.

Durch dieses Experiment wurde gezeigt, daß das 700 kb-*NotI*-Fragment durch eine Kurzzeit-Behandlung teilweise entfernt wurde und daß weitere methylierte *NotI*-Schnittstellen im Bereich des *c-raf-1*-Locus vorhanden sein mußten (Auftreten der kleineren Fragmente). Diese methylierten Schnittstellen sind vermutlich auch in der DNA nicht-infizierter Lymphozyten vorhanden. Die Lage der zusätzlichen methylierten Schnittstellen wurde nicht bestimmt. Abbildung 12 zeigt eine schematische Darstellung möglicher Positionen in und um den *c-raf-1*-Genlocus.

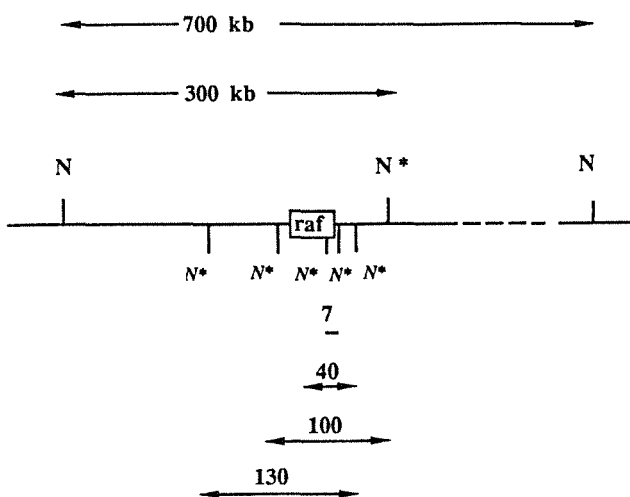


Abb.12: Schematische Darstellung der *NotI*-Schnittstellen im Bereich des *c-raf-1*-Genlocus

In der Abbildung ist die Größe und mögliche Position der *NotI*-Fragmente dargestellt, die im Bereich des *c-raf-1*-Gens lokalisiert sind und nach Hybridisierung mit der cDNA (1 kb) nachweisbar waren. Im oberen Teil der Abbildung sind die Fragmente gezeigt, die in infizierten Zellen ohne 5-Aza-C-Behandlung erhalten wurden. Das 700 kb-Fragment in der DNA infizierter Zellen entsteht vermutlich durch eine teilweise Methylierung der internen *NotI*-Schnittstelle (N^*). Die Fragmente kleiner 300 kb im unteren Teil der Abbildung waren nur nach Demethylierung mit 5-Aza-C nachweisbar. Die Schnittstellen sind vermutlich in infizierten und nichtinfizierten Zellen vollständig methyliert (N^*).

Um zu testen, ob das 700 kb-Fragment auch vollständig demethyliert und damit geschnitten werden kann, wurden infizierte Zellen über einen längeren Zeitraum (8 Tage, 14 Tage und 21 Tage) mit einer niedrigeren 5-Aza-C-Konzentration ($0,25\mu\text{M}$) behandelt. Bei dieser Konzentration war das Wachstum der Zellen zwar leicht inhibiert (ca. 20% Inhibition bei Bestimmung der Zellteilungsrate), ein Absterben der Zellen wurde aber nicht beobachtet. In Abbildung 13/A ist das Restriktionsmuster der DNA dieser Zellen nach Hybridisierung mit der *c-raf-1*-Probe gezeigt. Das 700 kb-Fragment war nach 8 Tagen noch sichtbar, nach 14 Tagen schwächer und nach 21 Tagen war es nicht mehr zu erkennen. Um eine teilweise Degradation der DNA auszuschließen und um die Vollständigkeit des Verdau zu überprüfen, wurde dasselbe Filter mit einer anderen Probe (Rinder-myc) rehybridisiert. In allen DNAs wurde ein 25 kb großes Fragment erhalten (Abb.13/B), was vermuten ließ, daß es sich um einen vollständigen Verdau mit nicht degradierter DNA handelte.

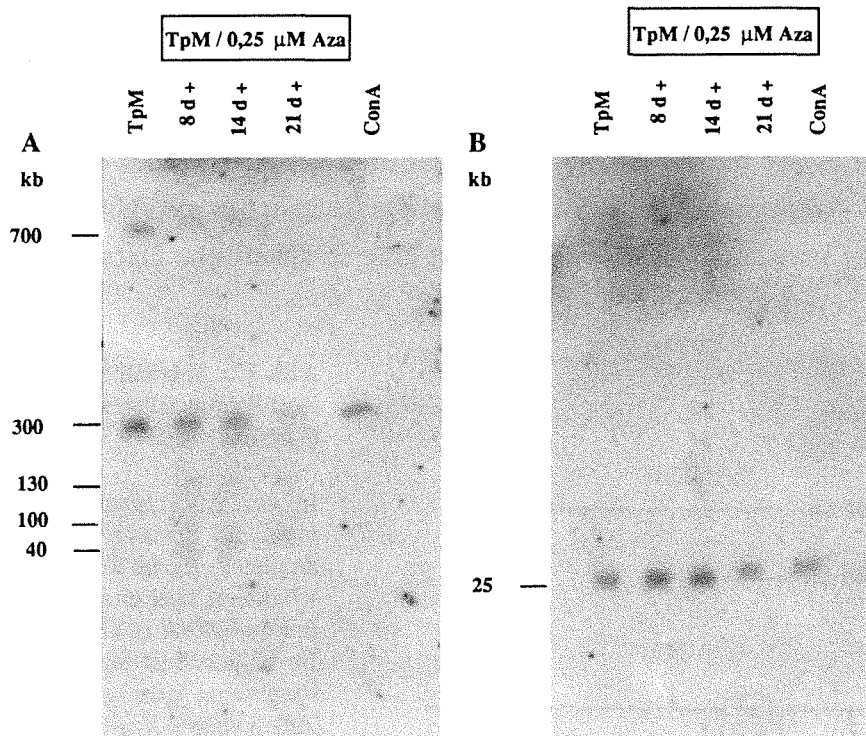


Abb.13: *NotI*-Restriktionsmuster im Bereich des *c-raf-1*-Gens nach Langzeit-Behandlung infizierter Zellen mit $0,25\mu\text{M}$ 5-Aza-C

Die DNA ConA-stimulierter Rinderlymphozyten (ConA) unbehandelter infizierter Zellen (TpM), und infizierter Zellen, die für verschiedene Zeiträume mit $0,25\mu\text{M}$ 5-Aza-C behandelt worden waren (8d+, 14d+, 21d+), wurde mit *NotI* verdaut, mit der OFAGE-Methode (Rotaphor-Gelkammer) aufgetrennt (46 h Gesamtlaufzeit bei $8,4\text{V/cm}$ und einer Pulszeit von 77 s), auf Nylonfilter transferiert und mit der *c-raf-1*-c-DNA-Probe (A) bzw. einer myc-DNA-Probe (B) hybridisiert. Als Größenmarker dienten Hefe-Chromosomen und *HindIII*-verdauete DNA des Phagen Lambda.

Da das 700 kb-Fragment nach Langzeit-Behandlung der Zellen mit 5-Aza-C nicht mehr nachweisbar war, bestätigte dieses Experiment, daß das 700 kb-Fragment in der DNA infizierter Zellen durch Methylierung einer *NotI*-Schnittstelle verursacht wurde. Da in infizierten Zellen allerdings auch das 300 kb-Fragment erhalten wurde, das in nicht-infizierten Zellen als einziges Fragment hybridisierte, konnte es sich nur um eine teilweise Hypermethylierung der internen *NotI*-Schnittstelle (vgl. Abb. 12: 'N*') handeln. Um festzustellen, ob in der DNA infizierter Zellen im Bereich des *c-raf-1*-Gens mehrere hypermethylierte Stellen vorhanden waren, wurden weitere methylen-sensitive CpG-Restriktionsenzyme getestet.

4.2.3. Der Verdau mit anderen methylen-sensitiven CpG-Restriktionsenzymen zeigt, daß der DNA-Bereich um das *c-raf-1*-Gen eine hypermethylierte Region in der DNA infizierter Lymphozyten darstellen könnte

Die DNA infizierter und nichtinfizierter Zellen wurde mit anderen methylen-sensitiven, selten schneidenden Restriktionsenzymen ('CpG-Enzyme') verdaut und mit der *c-raf-1*-Probe hybridisiert. Die Erkennungssequenzen der verwendeten Enzyme und die Größe der hybridisierenden Fragmente sind in Tabelle 1 aufgelistet.

		Restriktionsfragmente [kb]		
	Restriktions-enzyme	Erkennungs-sequenz	ConA-Zellen	TpM-Zellen
A	AvaI	C/T,C/CG/A,G/G	240	240
	NaeI	GCCGGC	240	240
	NarI	GGCGCC	220 240	220 240
B	NotI	GCGGCCGC	300	300 700
	MluI	ACGCGT	240 500	500 600 700
	BssHII	GCGCGC	220	220 240
	SacII	CCGCGG	135	135 180

Tabelle 1: Größe der Restriktionsfragmente der DNA infizierter und nichtinfizierter Zellen nach Verdau mit verschiedenen selten schneidenden CpG-Restriktionsenzymen

A: Restriktionsenzyme mit denen in der DNA infizierter (TpM) und nichtinfizierter Zellen (ConA) Fragmente gleicher Größe erhalten wurden.

B: Restriktionsenzyme mit denen in der DNA infizierter (TpM) und nichtinfizierter Zellen (ConA) Fragmente unterschiedlicher Größe erhalten wurden.

Ein unterschiedliches Restriktionsmuster in der DNA infizierter und nichtinfizierter Zellen wurde beim Verdau mit den Enzymen *MluI*, *BssHII* und *SacII* nachgewiesen. In Abbildung 14 sind die hybridisierenden *MluI* und *BssHII*-DNA-Fragmente gezeigt.

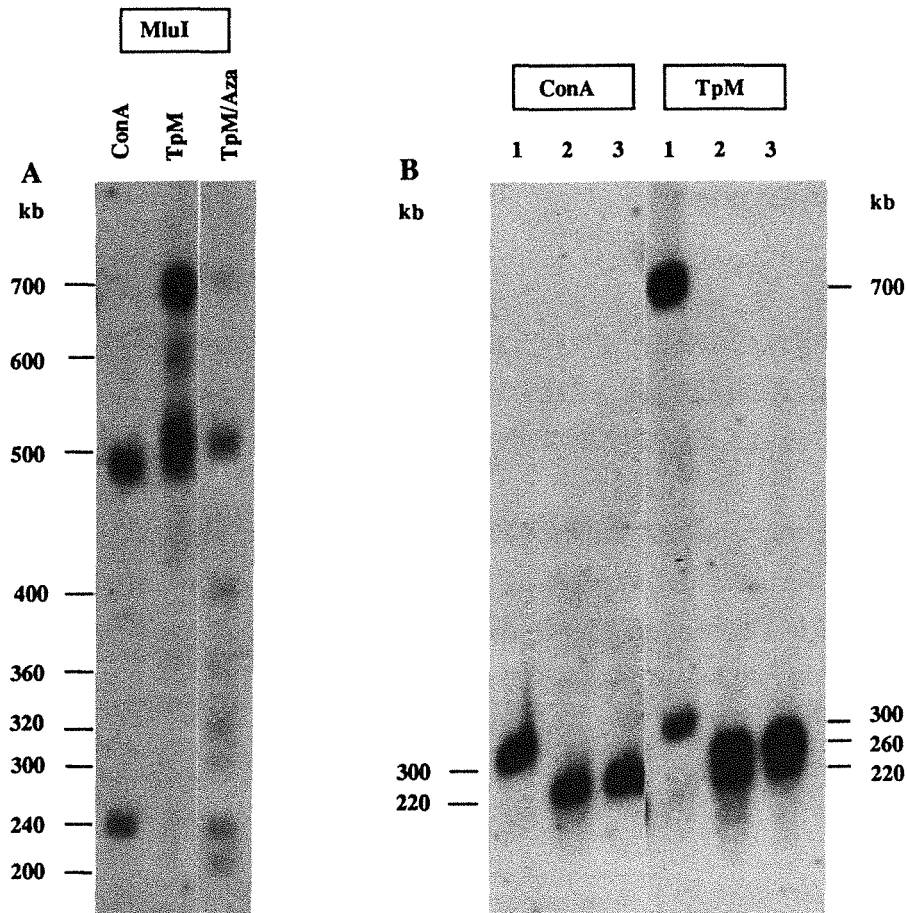


Abb.14: Unterschiedliche Restriktionsfragmente in der DNA infizierter und nichtinfizierter Zellen nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *BssHII*

Nach dem Restriktionsverdau wurde die DNA mit der FIGE-Methode aufgetrennt (16 h Gesamtlauzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts), auf Nylonfilter transferiert und mit der c-raf-1-c-DNA-Probe hybridisiert. Als Größenmarker dienen Hefe-Chromosomen, Konkatemere und *HindIII*-verdaute DNA des Phagen Lambda.

- A:
- DNA nichtinfizierter ConA-stimulierter Lymphozyten (ConA), Verdau mit *MluI*
 - DNA infizierter Zellen (TpM), Verdau mit *MluI*
 - DNA infizierter Zellen, die 5 Tage mit 1 μ M 5-Aza-C behandelt wurden (TpM/Aza), Verdau mit *MluI*
- B:
- DNA nichtinfizierter ConA-stimulierter Lymphozyten (ConA), Verdau mit *NotI* (1), *NotI/BssHII* (2), *BssHII* (3)
 - DNA infizierter Zellen (TpM), Verdau mit *NotI* (1), *NotI/BssHII* (2), *BssHII* (3) (Das Auftreten zweier *BssHII*-Fragmente in der DNA infizierter Zellen wurden bei Wiederholung des Experiments unter anderen Elektrophoresebedingungen, bei denen die Fragmente besser aufgetrennt wurden, bestätigt.)

Mit *MluI* resultierten bei nichtinfizierten Zellen 2 Fragmente mit einer Größe von 240 kb und 500 kb (Abb.14/A, Spur ConA) während bei infizierten Zellen 3 Fragmente mit einer Größe von 500 kb, 600 kb und 700 kb hybridisierten (Abb.14/A, Spur TpM). Um festzustellen, ob das unterschiedliche *MluI*-Restriktionsmuster in der DNA infizierter Zellen (wie bei *NotI*), auf eine Methylierung im Bereich der *MluI*-Schnittstellen zurückzuführen war, wurde die DNA von TpM-Zellen, die 5 Tage mit 1 μ M 5-Aza-C-behandelt waren, mit *MluI* verdaut. In dieser DNA wurden für die Fragmente der DNA unbehauelter Zellen (bei 700, 600 und 500 kb) schwächere Hybridisierungssignale beobachtet und es traten 6 zusätzliche kleinere Fragmente auf (Abb.14/A, Spur TpM/Aza). Dies bestätigte eine Hypermethylierung im Bereich der *MluI*-Schnittstellen und zeigte, daß, wie bei dem Enzym *NotI*, weitere methylierte *MluI*-Schnittstellen im Bereich des *c-raf-1*-Gens lokalisiert sein mußten.

Mit *BssHII* hybridisierte bei nichtinfizierten Zellen ein 220 kb-Fragment (Abb. 14/B: Spur ConA/2), bei infizierten Zellen zusätzlich zu dem 220 kb-Fragment ein 260 kb-Fragment (Abb. 14/B: Spur TpM/2). Nach einem Doppelverdau mit *NotI/BssHII* blieben diese Fragmente erhalten (Abb. 14/B: Spur ConA/3 und TpM/3). Daraus konnte geschlossen werden, daß die Fragmente innerhalb des 300 kb-*NotI*-Fragments lokalisiert waren. Das 260 kb-Fragment in der DNA infizierter Zellen mußte durch eine teilweise Methylierung einer *BssHII*-Schnittstelle entstanden sein. In Abbildung 15 ist die Position der Schnittstellen schematisch dargestellt.

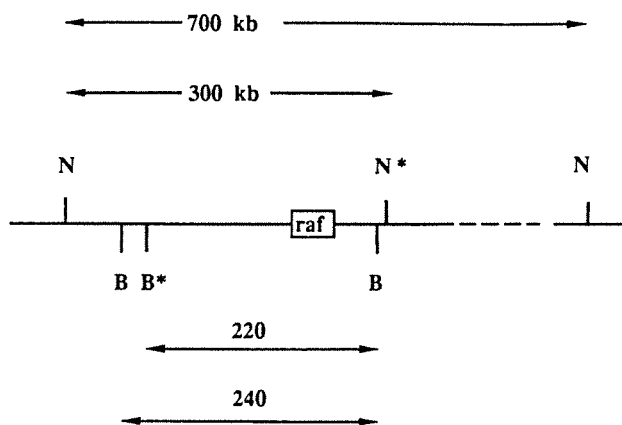


Abb.15:

Schematische Darstellung der *BssHII*-Schnittstellen innerhalb des 300 kb *NotI*-Fragments im Bereich des *c-raf-1*-Genlocus

In der Abbildung ist die Größe und mögliche Position von *BssHII*-Fragmenten dargestellt, die im Bereich des *c-raf-1*-Gens lokalisiert sind und nach Hybridisierung mit der cDNA (1 kb) nachweisbar waren. Im oberen Teil der Abbildung sind die *NotI*-Fragments gezeigt. Das 700 kb-*NotI*-Fragment und das 240 kb-*BssHII*-Fragment in der DNA infizierter Zellen entstehen vermutlich durch eine teilweise Methylierung der internen *NotI*- (N^*) bzw. *BssHII*-Schnittstelle (B^*).

Die Restriktionsanalyse ließ vermuten, daß es sich bei dem hier untersuchten DNA-Bereich um eine hypermethylierte Region in der DNA infizierter Zellen handeln könnte, da mit insgesamt 4 verschiedenen selten schneidenden CpG-Restriktionsenzymen (*NotI*, *BssHIII*, *MluI*, *SacII*) in der DNA infizierter Zellen größere Restriktionsfragmente erhalten wurden.

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob Veränderungen der Methylierung in der DNA infizierter Zellen auch in anderen DNA-Bereichen und nicht nur in der Region des c-raf-1-Gens identifiziert werden können.

4.2.4. Hypermethylierungen sind auch in anderen Bereichen der DNA infizierter Zellen nachweisbar

Um zu untersuchen, ob weitere Veränderungen in der Methylierung selten schneidender CpG-Restriktionsschnittstellen in der DNA infizierter Zellen auftraten, wurden Hybridisierungsexperimente mit anderen DNA-Proben durchgeführt. Die unten genannten Rinder-DNA-Proben wurden im Laufe dieser Arbeit, zum Teil durch Klonierung in unserer Arbeitsgruppe, erhalten:

- c-myc
- Interleukin 2 (IL2)
- IL2-Rezeptor (IL2R)
- Aktin
- CD3
- gamma-Interferon
- Interleukin 4 (IL4)
- invariante Kette

Mit der IL2-Probe und IL2-Rezeptor-Probe waren jeweils keine Hybridisierungssignale nachweisbar, was darauf schließen ließ, daß durch den Verdau Fragmente kleiner 5 kb oder größer 2000 kb entstanden sein mußten, die unter den verwendeten Elektrophoresebedingungen nicht auf dem Elektrophoresegel vorhanden waren. Kein Unterschied zwischen infizierten und nichtinfizierten Zellen war, wie schon in Abb. 13/B gezeigt wurde, für das c-myc-Gen nachgewiesen worden und dies galt auch für das Aktin-, gamma-Interferon-Gen (Abb.16/A) und CD3-Gen (Abb.16/B).

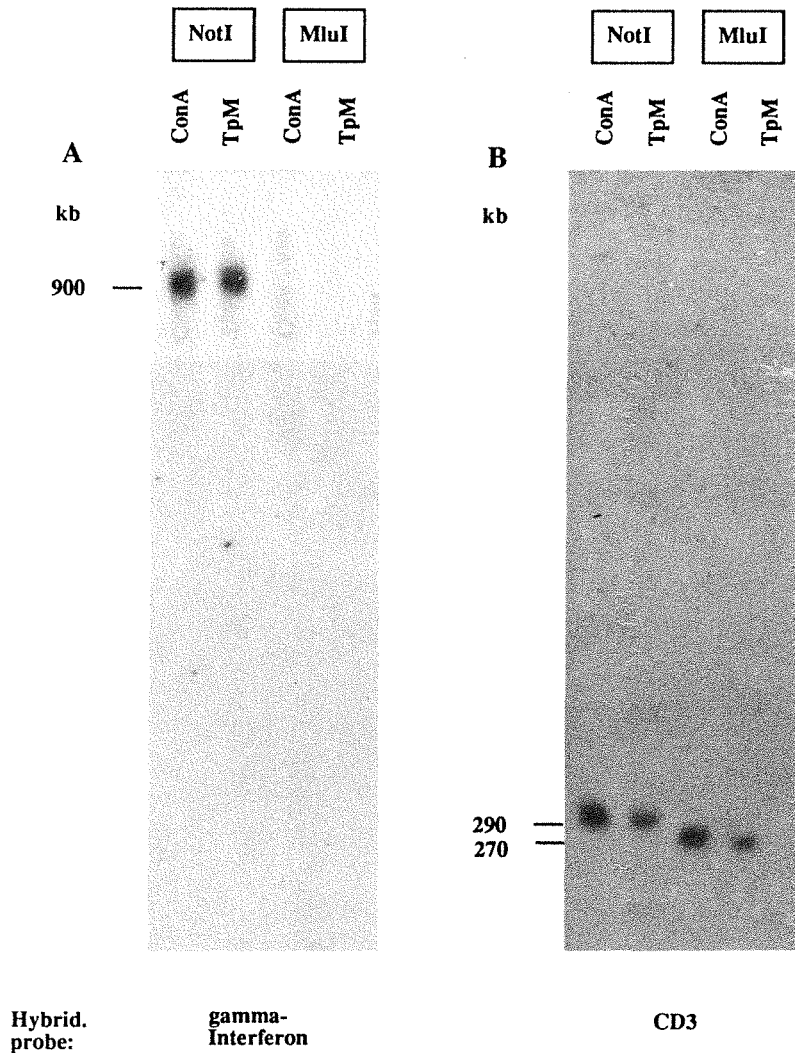


Abb.16: Identisches *NotI*- und *MluI*-Restriktionsmuster in der DNA infizierter und nichtinfizierter Zellen im Bereich des CD3- bzw. gamma-Interferon-Gens

Die DNA infizierter (TpM) und nichtinfizierter Zellen (ConA), wurde mit *NotI* bzw. *MluI* verdaut, auf einem Agarosegel mit der FIGE-Methode (16 h Gesamtlaufzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts) aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit einer gamma-Interferon-DNA-Probe (A) bzw. mit einer CD3-DNA-Probe (B) hybridisiert. Als Größenmarker dienten Hefe-Chromosomen und Konkatemere des Phagen Lambda.

(Beim Verdau mit *MluI* und Hybridisierung mit gamma-Interferon waren vermutlich DNA-Fragmente kleiner 5 kb oder größer 2000 kb entstanden, die unter den hier verwendeten Elektrophoresebedingungen nicht auf dem Elektrophoresegel vorhanden waren.)

Ein deutlicher Unterschied wurde nach einer Hybridisierung mit den DNA-Proben für das Gen der invarianten Kette und des Interleukin 4 - Gens erhalten. Daß es sich dabei um Hypermethylierungen handelte, wurde durch zusätzlichen Verdau der DNA 5-Aza-C-

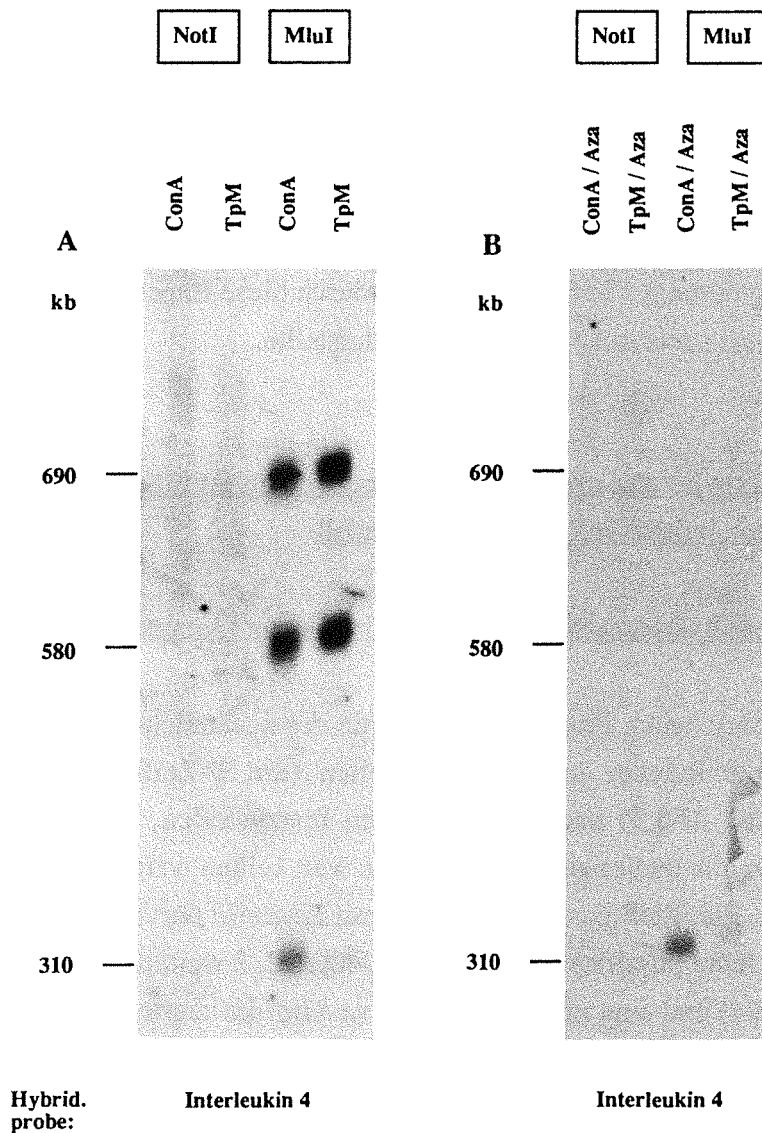


Abb.18: Unterschiedliches *NotI*- und *MluI*-Restriktionsmuster in der DNA infizierter und nichtinfizierter Zellen im Bereich des IL4-Gens

Die DNA infizierter (TpM) und nichtinfizierter Zellen (ConA), und DNA der Zellen, die 5 Tage mit $1 \mu\text{M}$ 5-Aza-C behandelt worden waren (TpM/Aza, ConA/Aza), wurde mit *NotI* bzw. *MluI* verdaut, auf einem Agarosegel mit der FIGE-Methode (16 h Gesamtlaufzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts) aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit der IL4-DNA-Probe hybridisiert. Als Größenmarker dienen Hefe-Chromosomen und Konkatemere des Phagen Lambda.

(Beim Verdau mit *NotI* waren vermutlich DNA-Fragmente kleiner 5 kb oder größer 2000 kb entstanden, die unter den hier verwendeten Elektrophoresebedingungen nicht auf dem Elektrophoresegel vorhanden waren.)

Die Hybridisierung mit der IL4-Probe (Abb.18) zeigte, daß auch in der DNA nicht-infizierter ConA-Zellen methylierte *MluI*-Schnittstellen vorkamen. Bei der DNA unbehandelter ConA-Zellen waren 3 Fragmente mit einer Größe von 690, 580 und 310 kb sichtbar (Abb.18/A), bei DNA der 5-Aza-C-behandelten ConA-Zellen war, wie in der DNA behandelter TpM-Zellen, nur das kleinste Fragment (310 kb) aufgetreten (Abb.18/B).

Damit wurden weitere hypermethylierte Stellen im Genom von infizierten Zellen im Bereich des IL4-Gens bzw. des Gens der invarianten Kette identifiziert. Aussagen wie häufig Hypermethylierungen auftreten, konnten durch diese Experimente nicht gemacht werden, da dies keine statistische Untersuchung darstellte.

4.3. Die Hypermethylierung im Bereich des c-raf-1-Gens ist für primäre Ereignisse der Transformation infizierter Zellen nicht essentiell

4.3.1. Die Hypermethylierung tritt nicht in allen infizierten Lymphozyten auf

In den zuvor beschriebenen Experimenten wurde die zusätzliche Methylierung in der DNA zweier verschiedener infizierter T-Zellen (die T-Zelllinien 'TpM 803' und 'G6TpM', vgl. z.B. Abb.5) nachgewiesen. Um festzustellen, ob die Methylierung charakteristisch für alle theileriainfizierten Zellen war, sollten weitere infizierte Zelllinien untersucht werden. Zur Verfügung standen eine mit *Theileria parva Muguga*-infizierte B-Zelllinie D409/B1, eine infizierte Null-Zelllinie D409/N2, 2 weitere infizierte T-Zelllinien (D409/T1, D409/T4) und eine mit *Theileria parva Kilifi*-infizierte T-Zelllinie (TpK). Bei Nullzellen handelt es sich um einen bestimmten T-Zelltyp, dem die für Helfer- bzw. cytotoxischen T-Zellen charakteristischen Oberflächenmoleküle ('CD4' bzw. 'CD8') fehlen. Als Kontrolle diente DNA von Rinderlymphozyten, deren Wachstum für 12 Wochen durch Zugabe von ConA und IL2 aufrechterhalten werden konnte.

Deutlich methylierungspositiv, sichtbar am Auftreten des zusätzlichen 700 kb-Fragments, waren die beiden T-Zelllinien D409/T4 (Abb.19: Spur T4) und TpK (Abb.19: Spur TpK). Bei der T-Zelllinie D409/T1 war das Fragment nur ganz schwach erkennbar (Abb.19: Spur T1). Die infizierten B- und Null-Zelllinien waren eindeutig negativ (Abb.19: Spur B1 und N1). Daraus konnte geschlossen werden, daß eine Infektion durch den Parasiten nicht in allen Lymphozyten zur Methylierung der spezifischen *NotI*-Schnittstelle führte.

Auffallend war, daß sie in allen untersuchten infizierten T-Zelllinien mit CD4- bzw. CD8-Oberflächenmolekülen (insgesamt wurden 5 verschiedene untersucht) auftrat.

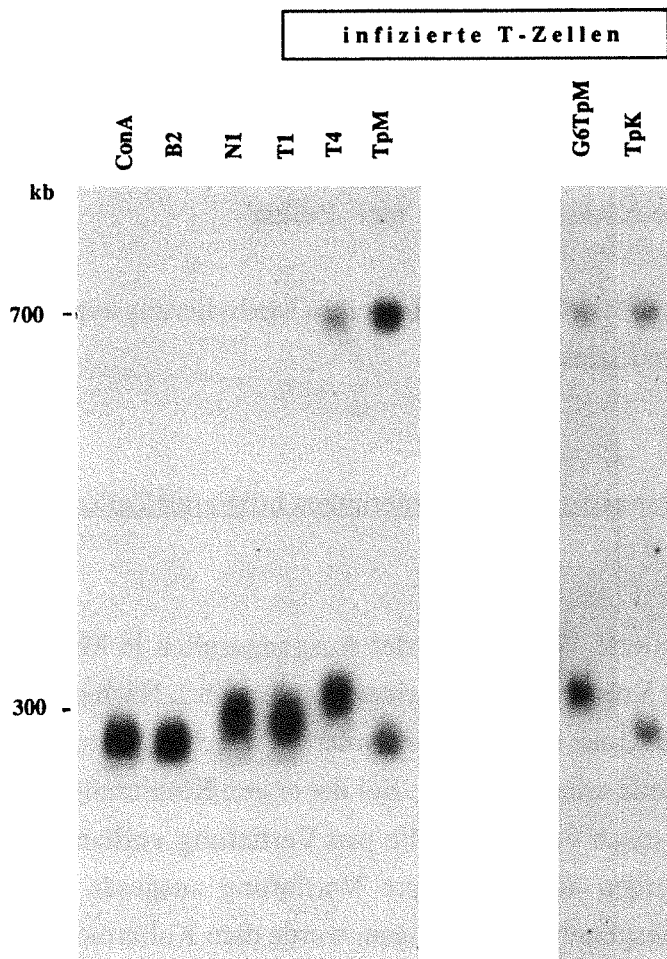


Abb.19: Die *NotI*-Hypermethylierung tritt nicht in allen infizierten Zelllinien auf

Die mit dem Restriktionsenzym *NotI* verdaute DNA der verschiedenen Zelllinien wurde mit der FIGE-Methode (16 h Gesamtlauzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts), auf Nylonfilter transferiert und mit der c-raf-1-c-DNA-Probe hybridisiert. Als Größenmarker dienten Hefe-Chromosomen, Konkatemere des Phagen Lambda.

DNA-Proben:

- nichtinfizierte Zellen, die 12 Wochen mit ConA und IL2 stimuliert wurden (ConA)
- infizierte B-Zelllinie D409/B2 (B2)
- infizierte Null-Zelllinie D409/N1 (N1)
- infizierte T-Zelllinie D409/T1 (T1)
- infizierte T-Zelllinie D409/T4 (T4)
- infizierte T-Zelllinien (TpM, G6TpM, TpK)

In der DNA der infizierten T-Zelllinien wurden allerdings sehr unterschiedliche Hybridisierungssignale bezüglich der Intensität des 700 kb-Fragments erhalten. Das 700 kb-Fragment war z.B. in D409/T1 nur sehr schwach erkennbar, in D409/T4 stärker und in TpK war die Intensität des Fragments vergleichbar mit der TpM-Zelllinie (Abb.19). Ein Unterschied in der Intensität des 700 kb-Fragments war schon vorher beim Vergleich der infizierten T-Zelllinie G6TpM mit TpM aufgetreten (vgl. Abb.5). Diese Unterschiede waren nicht auf eine schwächere oder stärkere Methylierung einer Zelllinie in unterschiedlichen Wachstumsphasen zurückzuführen, denn bei einer DNA-Präparation in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase blieb die Intensität der beiden *NotI*-Fragmente unverändert erhalten.

Dies ließ vermuten, daß sich die Zelllinien wahrscheinlich aus einer Mischpopulation von Zellen mit unterschiedlichem DNA-Methylierungsmuster zusammensetzten. Theoretisch waren 3 verschiedene Methylierungstypen im Bereich des c-raf-1-Genlocus möglich:

1. vollständig methyliert (beide Allele ++) --> 'met⁺⁺-Zellen'
2. teilweise methyliert (ein Allel +, ein Allel -) --> 'met^{+/-}-Zellen'
3. vollständig nichtmethyliert (beide Allele -) --> 'met⁻-Zellen'

Durch eine Klonierung von Zellen sollten Zellpopulation eines Methylierungstyps (in der spezifischen *NotI*-Schnittstelle) identifiziert werden.

4.3.2. Das Methylierungsmuster erweist sich bei Klonierungen infizierter Zellen als sehr instabil

Die Klonierung wurde durch limitierte Verdünnung der Ausgangszellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (200µl Volumen) in 2 Schritten durchgeführt. Nach der ersten Klonierung wurden die erhaltenen Klone nochmals rekloniert, um sicher zu stellen, daß ein Zellklon aus einer einzelnen Zelle erhalten wurde. Bei der ersten Klonierung wurden die Zellen so verdünnt, daß statistisch verteilt 1 Zelle pro Vertiefung vorhanden sein sollte. Bei der Reklonierung wurden '0,5' Zellen pro Vertiefung ausgesät. Um das Wachstum der Zellen in der Anfangsphase zu begünstigen, wurde dem Kulturmedium der Wachstumsfaktor IL2 zugesetzt (10U/ml).

Für die Klonierung wurden Zellen der infizierten T-Zelllinie TpM 803 eingesetzt, deren DNA nach Hybridisierung mit der c-raf-1-Probe ein ungefähr 50% iges Verhältnis in der Intensität des 300 kb- und 700 kb-DNA-Fragments zeigten. Bei der 1. Klonierung wurden nach 3 Wochen nur 2 Vertiefungen der Mikrotiterplatte gefunden, in denen Zellen hochgewachsen waren. Nach weiterer Kultur wurde schließlich von diesen Zellen (TpM1 und TpM2) zum frühest möglichen Zeitpunkt nach Beginn des Klonierungsexperiments (4 bzw. 6 Wochen) DNA präpariert. Die unterschiedlichen Zeiten der DNA-Isolierung waren dadurch zu erklären, daß TpM1 schneller gewachsen war als TpM2. Bei TpM2 waren erst nach 6 Wochen genügend Zellen für eine DNA-Isolierung vorhanden. Das folgende Schema zeigt die im Text beschriebenen Zellklone:

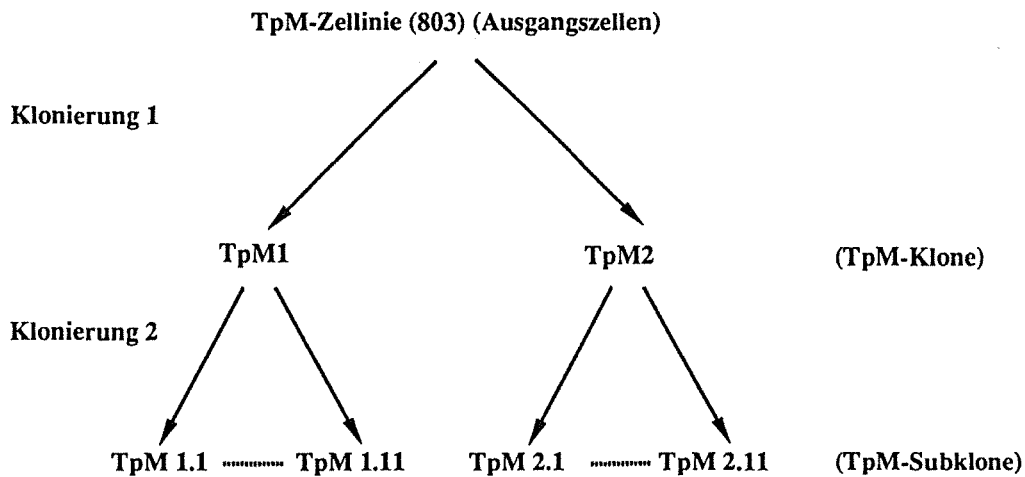


Abbildung 20 zeigt das *NotI*-Restriktionsmuster der DNA von TpM1 und TpM2 nach Hybridisierung mit der *c-raf-1*-Probe. Auffallend war, daß in beiden Klonen, außer den bekannten Fragmenten der Mischpopulation (das 300 kb und das 700 kb-Fragment), zusätzliche kleinere Fragmente (bei TpM2 ein 100 kb-Fragment, bei TpM1 ein 100 kb und ein 40 kb-Fragment) vorkamen. Diese Fragmente waren auch schon in der DNA 5-Aza-C-behandelter Zellen aufgetreten (vgl. Abb.11), was vermuten ließ, daß während der Klonierung der Zellen Demethylierungen stattgefunden hatten. Im vorliegenden Fall komplizierten die auftretenden Demethylierungen das Vorhaben, den Methylierungszustand einer einzelnen Zelle zu identifizieren, da während der Klonierung der Zellen wiederum eine Mischpopulation mit Zellen, deren DNA unterschiedlich methyliert war, entstanden war.

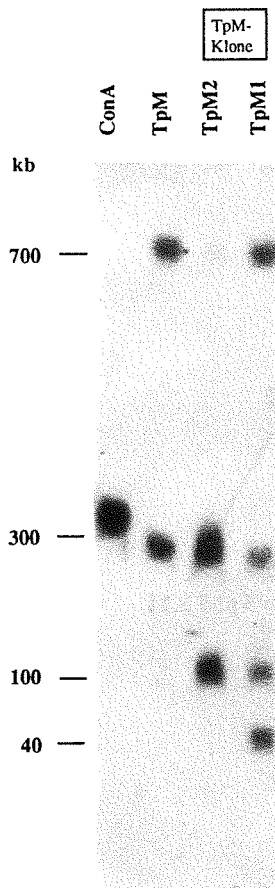


Abb.20: *NotI*-Restriktionsmuster der TpM-Klone nach Klonierung 1

Nach Verdau mit *NotI* wurde die DNA auf einem Agarosegel mit der FIGE-Methode (16 h Gesamtlaufzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts), auf Nylonfilter transferiert und mit der *c-raf-1-c*-DNA-Probe hybridisiert. Als Größenmarker dienten Hefe-Chromosomen und Konkatemere des Phagen Lambda.

DNA-Proben:

- nichtinfizierte Zellen (ConA)
- Ausgangszellen für Klonierung 1 (TpM)
- TpM-Klone nach Klonierung (TpM1, TpM2)

Da ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Klonen TpM1 und TpM2 bezüglich des 700 kb-Fragments (nur ein sehr schwaches Hybridisierungssignal bei TpM2, Abb.20: Spur TpM2) erhalten wurde, wurde die Reklonierung trotzdem durchgeführt. Vermutet wurde, daß in der TpM2-Mischpopulation verhältnismäßig mehr *met⁻*-Zellen vorhanden waren, die z.B. durch Verlust von Methylierungen in der spezifischen *NotI*-Schnittstelle oder einer der methylierten Schnittstellen in der näheren Umgebung des *c-raf-1*-Gens (vgl. Abb. 12) während der Klonierung entstanden sein könnten. Möglich war auch, daß es sich bei der Ausgangszelle um eine *met⁻*-Zelle handelte, deren Abkömmlinge zum Teil de novo methyliert wurden. Bei der Reklonierung von TpM1 waren nach 2 Wochen insgesamt 20 Subklone hochgewachsen, von 10 Subklonen wurde schließlich 4 Wochen nach Beginn der Klonierung DNA präpariert. Bei TpM2 resultierten nach 3 Wochen insgesamt 15 Subklone, die DNA-Präparation von 13 Subklonen erfolgte 5 Wochen nach Aussäen der Zellen.

Für die 10 Subklone von TpM1 wurde nach Hybridisierung mit der *c-raf-1*-Probe das in Abbildung 21/B gezeigte *NotI*-Restriktionsmuster erhalten. Um zu zeigen, daß gleiche

Mengen an DNA aufgetragen wurden, ist in Abbildung 21/A auch das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel abgebildet.

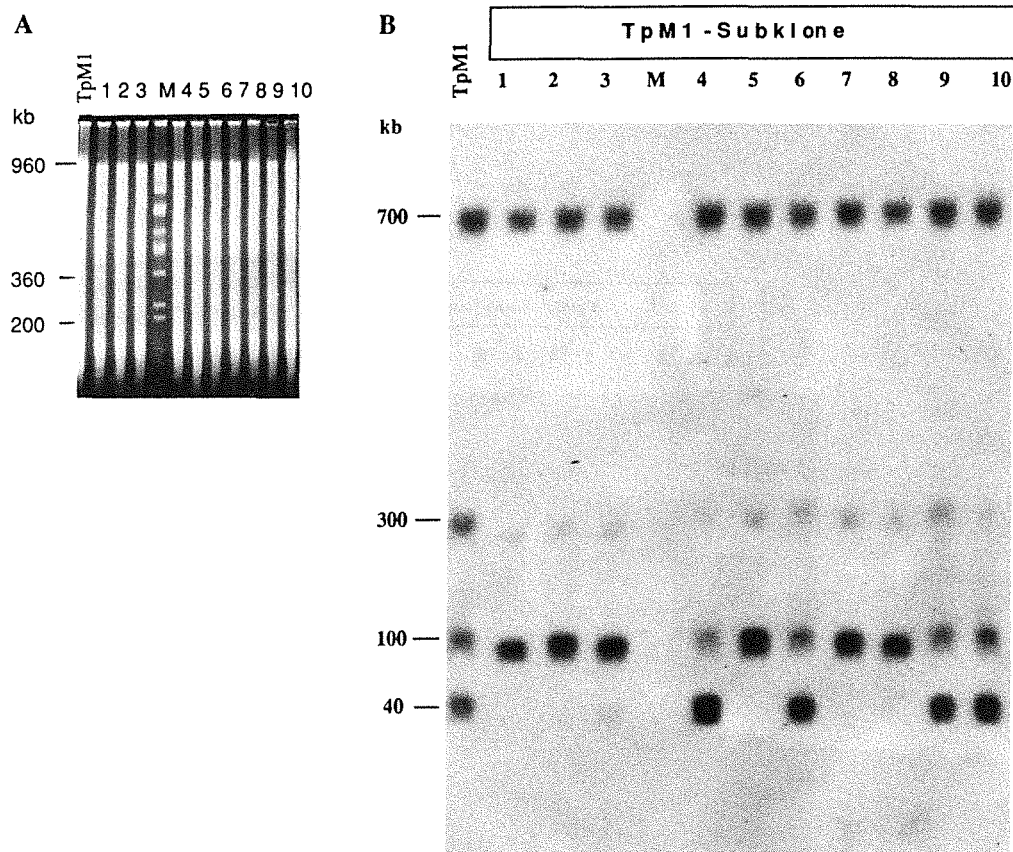


Abb.21: *NotI*-Restriktionsmuster der TpM1-Subklone nach Klonierung 2

- A: Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel: Die DNA wurde nach Verdau mit *NotI* auf einem Agarosegel mit der FIGE-Methode (12 h Gesamtlaufzeit bei 8V/cm; 3 bis 18 s vorwärts, 1 bis 6 s rückwärts) aufgetrennt, mit 1 μ g/ml Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Als Größenmarker (M) dienen Hefe-Chromosomen. Die Größe der Chromosomen beträgt (von unten nach oben): 250, 280, 360, 450, 600, 690, 770, 840, 980 kb.
- B: Restriktionsfragmente nach Transfer der DNA auf Nylonfilter und Hybridisierung mit der *c-raf-1-c*-DNA-Probe.

DNA-Proben:

- TpM-Klon nach Klonierung 1 (TpM1)
- verschiedene TpM1-Subklone nach Klonierung 2 (1 bis 10)

1. Bei allen Subklonen resultierte eine sehr starke Hybridisierung des 700 kb-Fragments (vergleichbar mit der Intensität in TpM1 und den Ausgangszellen TpM).
2. Bei allen Subklonen war das 300 kb-Fragment schwächer als in TpM1. Dafür nahmen aber die kleineren Fragmente bei 100 kb bzw. 40 kb in der DNA der meisten Subklone in ihrer Intensität zu. Deshalb mußte angenommen werden, daß während der 2. Klonierung erneut Demethylierungen in der Nähe des *c-raf-1*-Gens stattgefunden hatten. Auffällig war, daß vorallem das 300 kb-Fragment, nicht aber das 700 kb-Fragment weiter demethyliert wurde.

Bei den 13 Subklonen von TpM2 ergab sich folgendes *NotI*-Restriktionsmuster (Abb.22):

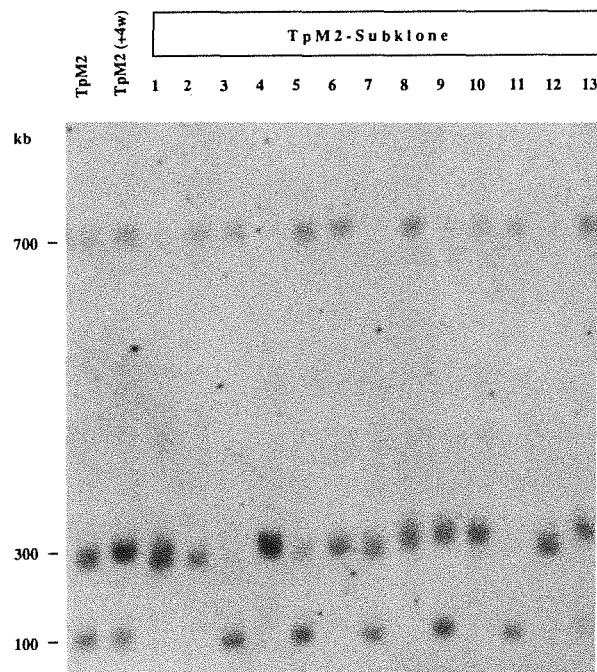


Abb.22: *NotI*-Restriktionsmuster der TpM2-Subklone nach Klonierung 2

Die DNA wurde nach Verdau mit *NotI* auf einem Agarosegel mit der FIGE-Methode (16 h Gesamtlauzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts) aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit der *c-raf-1*-cDNA hybridisiert. Als Größenmarker dienen Hefe-Chromosomen und Konkatemere des Phagen Lambda.

DNA-Proben:

- TpM2-Klon nach Klonierung 1 (TpM2)
- TpM2-Klon nach 4 Wochen weiterer Kultur (TpM2)
- verschiedene TpM2-Subklone nach Klonierung 2 (1 bis 13)

1. Bei 8 Subklonen von TpM2 war das 700 kb-Fragment zusammen mit dem 300 kb- bzw. dem 100 kb-Fragment aufgetreten (Abb.22: Spur 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 13). Ein derart hoher Anteil an Zellen mit 700 kb-Fragment in der DNA wurde in der TpM2-Mischpopulation aufgrund der schwachen Hybridisierung des 700 kb-Fragments nicht erwartet (Abb.22:Spur TpM2).
2. Bei insgesamt 5 Subklonen war das 700 kb-Fragment zunächst kaum nachweisbar (Abb. 22: Spur 1, 4, 7, 9, 12). Die DNA der überwiegenden Anzahl an Zellen dieser Subklone war somit in der für infizierte T-Zellen charakteristischen methylierten *NotI*-Schnittstelle nicht methyliert (met^- -Zellen).

Bei zwei Subklonen wurde nach 4 Wochen weiterer Kultur (4 Wochen nach der 1. DNA-Präparation) das Restriktionsmuster überprüft, wobei ein überraschendes Ergebnis erhalten wurde: das 700 kb-Fragment war in diesen Zellen jetzt deutlich stärker sichtbar (Abb.23: Spur TpM2.7 + 4w bzw. TpM2.9 + 4w). Dies wurde auch bei längerer Kultur der TpM2-Zellen der 1. Klonierung beobachtet (Abb.22: Spur Tpm2 + 4w).

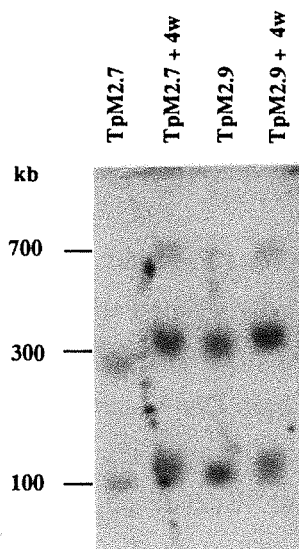


Abb.23: Veränderung des *NotI*-Restriktionsmuster von TpM2-Subklonen nach 4 Wochen Kultur

Die DNA wurde nach Verdau mit *NotI* auf einem Agarosegel mit der FIGE-Methode (6 h Gesamtlauzeit bei 8V/cm; 3 bis 12 s vorwärts, 1 bis 4 s rückwärts) aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit der *c-raf-1*-cDNA hybridisiert. Als Größenmarker dienten Hefe-Chromosomen und Konkatemere des Phagen Lambda.

DNA-Proben:

- TpM2-Subklone nach Klonierung 2 (TpM2.7, TpM2.9)
- TpM2-Subklone nach 4 Wochen weiterer Kultur (TpM2.7 + 4w, TpM2.9 + 4w)

Um festzustellen, ob die Zunahme in der Intensität des Hybridisierungssignals bei 700 kb durch ein Überwachsen von met^- -Zellen durch met^+ -Zellen erklärt werden könnte, wurde das Wachstum der verschiedenen TpM2-Subklone verglichen. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Ein Vergleich der Gesamtzellzahl der TpM2-Subklone, die direkt nach der Klonierung bestimmt wurde, lieferte auch keine

Hinweise, daß met^+ -Zellen schneller gewachsen waren als met^- -Zellen. Da kein Wachstumsvorteil von met^+ -Zellen erkennbar war, konnte die stärker werdende Methylierung nicht durch einen Wachstumsvorteil von met^+ -Zellen erklärt werden. Möglich war, daß die Rate an in diesem Bereich stattfindenden de novo Methylierungen größer war, als die Rate an Demethylierungen.

Aus den oben beschriebenen Klonierungen konnten keine genauen Rückschlüsse bezüglich des Methylierungsmusters in der DNA einer einzelnen Zelle gezogen werden, da sich die Methylierungen im Bereich des c-raf-1-Gens als instabil erwiesen und durch Demethylierungen und vermutlich auch durch de novo Methylierungen während der Klonierung wiederum Mischpopulationen von Zellen mit unterschiedlichem Methylierungsmuster entstanden.

Da in infizierten Zellen im Bereich des c-raf-1-Gens sehr wahrscheinlich de novo Methylierungen stattfanden, die in normalen differenzierten Zellen eher ein seltenes Ereignis darstellen [76], wurde im folgenden überprüft, ob sich das Methylierungsmuster der DNA nach Abtötung des Parasiten verändert.

4.3.3. Die Hypermethylierung ist nicht von der Anwesenheit des Parasiten abhängig

Um zu untersuchen, ob eine ständige Anwesenheit des Parasiten für die Aufrechterhaltung der Hypermethylierung und die mögliche Remethylierung nach 5-Aza-C-Behandlung der Zellen nötig war, wurde der Parasit mit 720C in 5-Aza-C behandelten infizierten Zellen und unbehandelten infizierten Zellen abgetötet. Das Wachstum der TpM / 720C-Zellen sollte durch Zugabe des Wachstumsfaktors IL2 und des Tumorpromotors TPA solange wie möglich aufrechterhalten werden, um Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA identifizieren zu können.

Ob eine Remethylierung der demethylierten DNA auch ohne Parasit möglich ist, wurde nicht geklärt, da 5-Aza-C behandelte Zellen nach Abtötung des Parasiten trotz Zugabe von IL2 und TPA nur wenige Zellteilungen durchführten und nach kurzer Zeit (ca. 10 Tage) abstarben. Dies war vermutlich auf die Demethylierungen in der DNA zurückzuführen. Auf diesen Punkt wird in Abschnitt 4.4.4. genauer eingegangen.

In normalen TpM/720C-Zellen (also nicht mit 5-Aza-C behandelt) wurde das Wachstum durch Behandlung mit IL2 und TPA induziert. Nach ungefähr 3 Wochen teilten sich die

Zellen nur noch einmal pro Woche, nach weiteren 4 Wochen wurde schließlich DNA präpariert und die Methylierung überprüft. Eine in der DNA der Ausgangszellen vorhandene Methylierung, die bei jeder Teilung durch den Einfluß des Parasiten gesetzt würde, dürfte nach 7 Wochen ohne Parasit in der überwiegenden Anzahl der Zellen nicht mehr vorhanden sein. Die Intensität der Hybridisierungssignale der zusätzlichen Restriktionsfragmente müßte somit zumindest schwächer werden, da Zellen, in deren DNA die Methylierung bereits vorhanden war, zunächst durch möglichst viele Zellteilungen ausverdünnung werden mußten.

Abbildung 24 zeigt die Fragmente *NotI* und *MluI*-verdauter DNA nach Hybridisierung mit der *c-raf-1*-Probe. Es wurde kein Verlust der Methylierung in den *NotI*- bzw. *MluI*-Schnittstellen festgestellt.

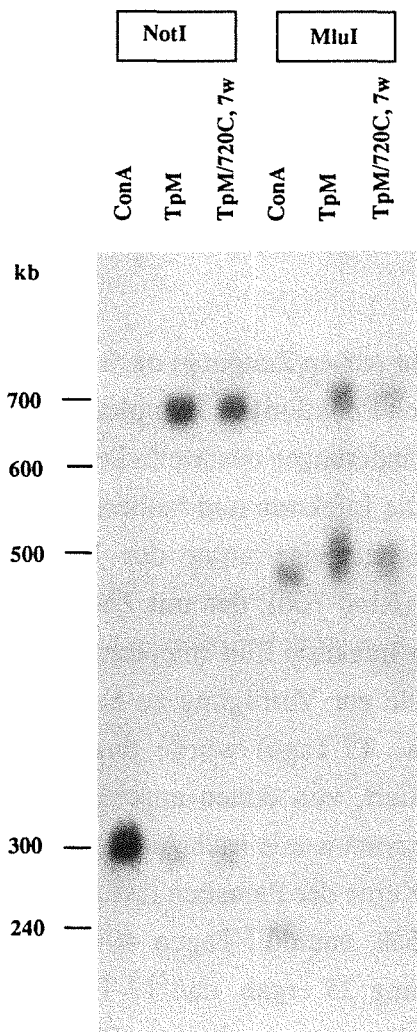


Abb.24: Keine Veränderung des *NotI*- und *MluI*-Restriktionsmusters nach Abtötung des Parasiten

Die DNA wurde nach Verdau mit *NotI* und *MluI* auf einem Agarosegel mit der FIGE-Methode (16 h Gesamtlaufzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts) aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit der *c-raf-1*-cDNA hybridisiert. Als Größenmarker dienten Hefe-Chromosomen und Konkatemere des Phagen Lambda.

DNA-Proben:

- nichtinfizierte Zellen (ConA)
- infizierte Zellen (TpM)
- TpM/Zellen 7 Wochen nach Abtötung des Parasiten mit 720C (TpM/720C, 7w)

Da das Restriktionsmuster in Zellen ohne Parasit erhalten blieb, konnte folgendes geschlossen werden:

1. Das Methylierungsmuster der DNA war in einer 720C-Massenkultur bis zum untersuchten Zeitpunkt stabil und im Gegensatz zur Transformation der Lymphozyten durch den Parasiten nicht reversibel. Die hier identifizierten Methylierungen konnten somit für die Aufrechterhaltung der Transformation der Lymphozyten durch den Parasiten keine essentielle Rolle spielen.
2. Die Hypermethylierungen wurden nicht durch einen Mechanismus aufrechterhalten, bei dem eine ständige Anwesenheit des Parasiten notwendig war. Sie waren, nachdem sie einmal gesetzt waren, unter normalen Kulturbedingungen (nicht bei den Klonierungsexperimenten s.o.) stabil bei jeder Zellteilung weitervererbt worden.

Der Zeitpunkt, wann diese Veränderungen nach einer Infektion auftraten, sollte in den folgenden Experimenten bestimmt werden. Durch eine Infektion eines Rinds sollte ein sehr früher Zeitpunkt, durch eine Infektion von ConA-stimulierten Lymphozyten und anschließender Kultur dieser Zellen sollten auch spätere Zeiten untersucht werden.

4.3.4. Die NotI-Hypermethylierung ist erst zu einem späten Zeitpunkt nach der Infektion nachweisbar

Bei einer in vivo-Infektion [175] kann zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Infektion eine ausreichende Menge an infizierten Zellen durch Punktion der Lymphknoten isoliert werden. Durch dieses Experiment sollten frühe Veränderungen des Methylierungsmusters im Bereich des c-raf-1-Gens untersucht werden. Die Infektion und Isolierung der DNA wurde im ILRAD (Nairobi, Kenya) freundlicherweise unter der Leitung von Dr. I. Morrison durchgeführt. Dem Versuchstier (Rind 760), das mit *Theileria parva* Muguga (TpM) infiziert worden war, wurde vor der Infektion Blut entnommen, um nicht-infizierte periphere Blutlymphozyten als Kontrolle zur Verfügung zu haben. Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion (14 bzw. 17 Tage) wurde durch Punktion geschwollener Lymphknoten Lymphozyten isoliert, von denen anschließend DNA präpariert wurde. Der Anteil an infizierten Lymphozyten wurde nach Anfärben der Zellen mit Giemsa lichtmikroskopisch bestimmt, da die Kerne der Parasiten dadurch angefärbt und sichtbar werden. Nach 14 Tagen waren 15%, nach 17 Tagen 40% der Zellen infiziert. Der *NotI*- und *MluI*-Verdau in Abbildung 25 ergab, daß 17 Tage nach der Infektion (Spur B760/TpM) keine Hypermethylierungen auftraten. Daraus konnte geschlossen werden, daß sie für eine erfolgreiche Infektion der überwiegenden Anzahl an

infizierten Zellen nicht nötig waren. Ob diese Zellen nach 17 Tagen schon transformiert waren, wurde nicht untersucht.

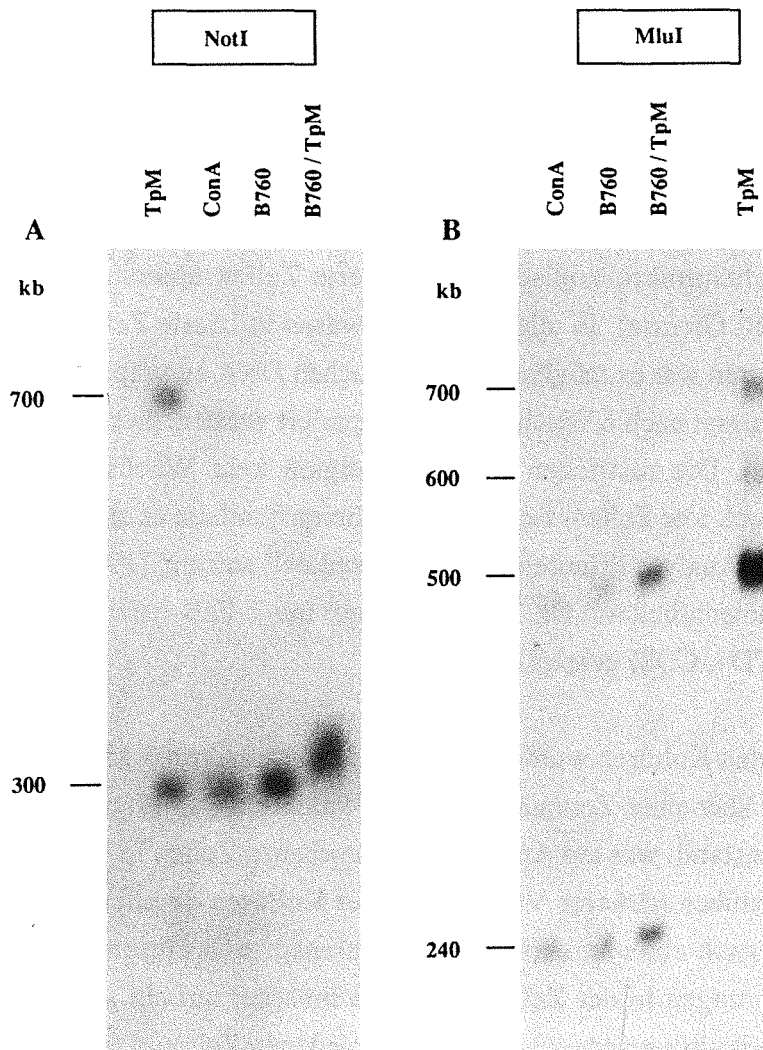


Abb.25: Zu einem frühen Zeitpunkt nach einer in vivo Infektion eines Rind mit dem Parasiten war keine Hypermethylierung in *NotI*- und *MluI*-Schnittstellen nachweisbar

Die DNA wurde nach Verdau mit *NotI* und *MluI* auf einem Agarosegel mit der FIGE-Methode (16 h Gesamtlauzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts) aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit der *c-raf-1*-cDNA hybridisiert. Als Größenmarker dienten Hefe-Chromosomen und Konkatemere des Phagen Lambda.

DNA-Proben:

- infizierte Zelllinie (TpM)
- nichtinfizierte Zellen (ConA)
- periphere Blutlymphozyten vor der in vivo Infektion des Rinds B760 (B760)
- durch Punktion geschwollener Lymphknoten isolierte Lymphozyten 17 Tage nach der in vivo Infektion. Der Anteil an infizierten Zellen betrug ca. 40% (B760/TpM)

Durch die *in vitro*-Infektion [10] war es möglich, auch längere Zeitpunkte nach der Infektion zu untersuchen. Mit *Theileria parva Muguga* infizierte Zecken wurden von Dr. Ahmed (Institut für tropische Veterinärmedizin und Parasitologie, Freie Universität Berlin) freundlicherweise zur Verfügung gestellt, die Infektion wurde unter Anleitung von Dr. D. Dobbelaere (IGT) durchgeführt. Infiziert wurden Lymphozyten, die von Lymphknoten einheimischer Schlachtrinder isoliert wurden und 5 Tage mit ConA behandelt waren. Nach der Infektion mit den Parasiten, wurden die Zellen auf insgesamt 10 Kulturflaschen verteilt und ohne weiteren Zusatz von ConA kultiviert. Nach 1 Woche wurden die 10 Kulturen lichtmikroskopisch auf infizierte Zellen untersucht (Anfärbung der Parasitenkerne mit Giemsa). In allen Kulturen waren infizierte Zellen vorhanden. Von insgesamt 2 Kulturen war es möglich, nach 3 Wochen DNA zu präparieren, von weiteren 2 Kulturen konnte erst nach 6 Wochen DNA präpariert werden, da zuvor zuwenig Zellen vorhanden waren. Die restlichen Kulturen zeigten kein Wachstum und enthielten schließlich nur noch tote Zellen. Bei allen 4 Zelllinien handelte es sich um T-Zellen, was durch eine FACS-Analyse ('fluorescence-activated cell sorting' [176]), durchgeführt im ZMBH in Zusammenarbeit mit Dr. Terry Prospero) mit T-Zell-spezifischen Oberflächenmarkern (CD2, CD4, CD8) gezeigt wurde [29].

Zwei der infizierten Kulturen wurden über einen Zeitraum von 3 Monaten, zwei weitere Kulturen wurden über einen Zeitraum von 1 Jahr kultiviert. Das Wachstum der Zellen war anfänglich sehr instabil, was am Anteil an abgestorbenen Zellen in den Kulturen und der Sensitivität gegenüber stärkerer Verdünnung der Kulturen deutlich wurde. Dies deutet darauf hin, daß nach einer Infektion ein Selektionsprozeß einsetzt, wobei vermutlich weitere Veränderungen in der Zelle stattfinden müssen, um ein stabiles unbegrenztes Wachstum in Zellkultur zu erreichen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde von den infizierten Zellen DNA präpariert und auf Änderung des Methylierungsmusters im angrenzenden DNA-Bereich des *c-raf-1*-Gens untersucht. Als Kontrolle diente DNA der ConA-stimulierten Zellen vor der Infektion.

In den *in vitro*-infizierten Zellen war zu einem relativ frühen Zeitpunkt nach der Infektion eine Veränderung nach Schneiden der DNA mit dem Restriktionsenzym *MluI* identifizierbar (Abb.26). Während die Zellen 'IN3' und 'IN10' 4 Wochen nach der Infektion noch das Restriktionsmuster von nichtinfizierten Zellen (ein 240 kb und ein 500 kb-Fragment) aufwiesen, war das kleinere 240 kb-Fragment nach 6 Wochen nicht mehr nachweisbar. Für die 2 weiteren Kulturen ('IN7' und 'IN9'), von denen erst nach 6 Wochen DNA präpariert werden konnte, wurde dasselbe Ergebnis erhalten. Das Restriktionsmuster veränderte sich bei längerer Kultur weiterhin, wobei zusätzlich das für Tpm-Zellen

typische 700 kb-*MluI*-Fragment auftrat, dessen Intensität immer stärker wurde (Abb. 26 zeigt die *MluI*-Fragmente der DNA von IN 10 und IN 9 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion).

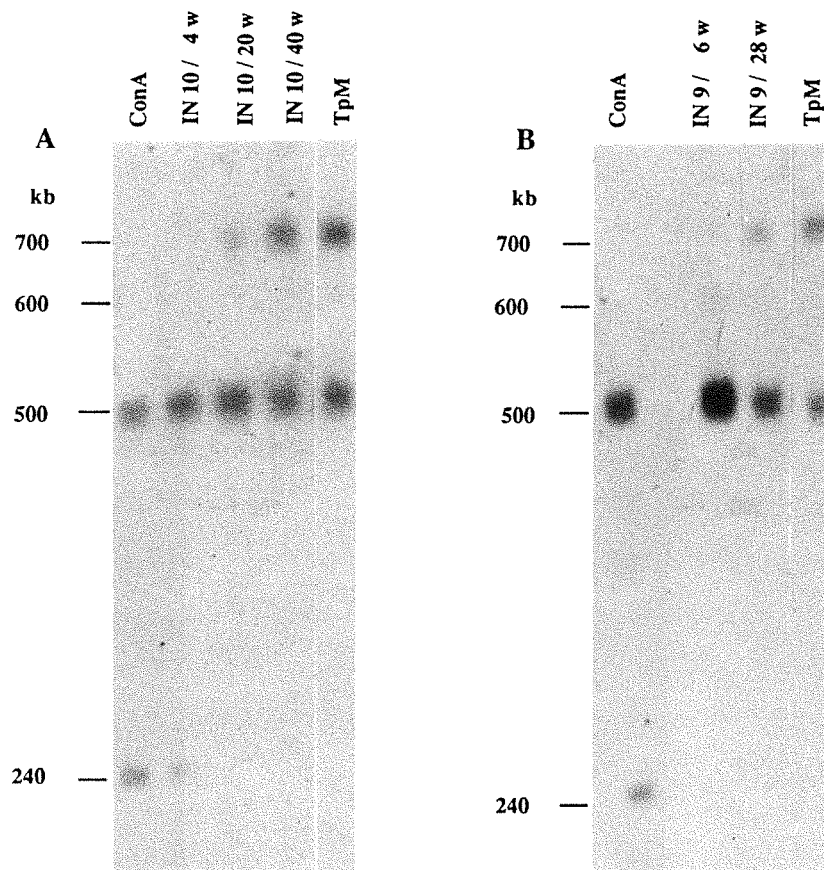


Abb.26: *MluI*-Restriktionsmuster in vitro infizierter Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion

Die DNA in vitro infizierter Zelllinien (IN9, IN10), die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion präpariert wurde, DNA ConA-stimulierter Lymphozyten (ConA) und infizierter Zellen (TpM), wurde nach Verdau mit *MluI* auf einem Agarosegel mit der FIGE-Methode (16 h Gesamtlauzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts) aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit der *c-raf-1*-cDNA hybridisiert. Als Größenmarker dienten Hefe-Chromosomen und Konkatemere des Phagen Lambda.

Der relativ frühe Verlust des 240 kb-*MluI*-Fragments (nach 6 Wochen) in den in vitro infizierten Zellen könnte auf unterschiedliche Weise erklärt werden: entweder waren Zellen, ohne 240 kb-Fragment schon vor der Infektion in den ConA-Zellen vorhanden, wurden infiziert und hatten schließlich andere nichtinfizierten Zellen überwachsen, oder es fand zu einem frühen Zeitpunkt nach der Infektion eine de novo Methylierung in der *MluI*-Schnittstelle statt.

Bei einem Verdau mit *NotI* war zu frühen Zeitpunkten keine Veränderung im Methylierungsmuster nachweisbar. Wie in der DNA nichtinfizierter Zellen war nur das 300 kb-*NotI*-Fragment aufgetreten. 32 Wochen bzw. 40 Wochen nach der Infektion war erstmals das für infizierte T-Zellen typische 700 kb-Fragment als schwache Bande sichtbar (Abb.27). In diesen Zellen mußte somit eine de novo Methylierung in der spezifischen *NotI*-Schnittstelle stattgefunden haben, da ein langsames Überwachsen nach dieser Zeit nicht zu erwarten war.

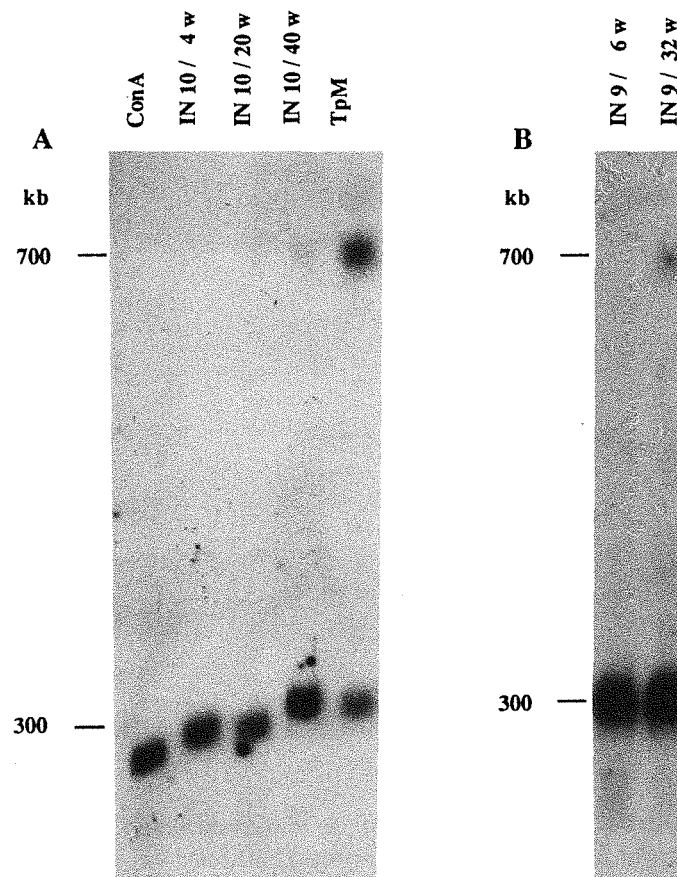


Abb.27: *NotI*-Restriktionsmuster in vitro infizierter Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion

Die DNA in vitro infizierter Zelllinien (IN9, IN10), die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion präpariert wurde, DNA ConA-stimulierter Lymphozyten (ConA) und infizierter Zellen (TpM), wurde nach Verdau mit *NotI* auf einem Agarosegel mit der FIGE-Methode (16 h Gesamtlauzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts) aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit der *c-raf-1*-cDNA hybridisiert. Als Größenmarker dienten Hefe-Chromosomen und Konkatemere des Phagen Lambda.

Aus einer der infizierten Kulturen (IN9) wurde nach 28 Wochen Kultur Zellen kloniert. Das Restriktionsmuster zeigte einen höheren Anteil des 700 kb-*NotI*-Fragments im Vergleich zu den Ausgangszellen, was wiederum auf eine novo Methylierungsaktivität in diesem Bereich während der Klonierung schließen ließ (vgl. Abschnitt 4.3.2.). Demethylierungen traten nicht auf. Die in vitro Infektion zeigte somit, daß sich das Methylierungsmuster im Bereich des c-raf-1-Gens nach einer Infektion von T-Zellen in charakteristischer Weise änderte. Es wurden zusätzliche DNA-Fragmente erhalten, die zuvor in der DNA einer über längere Zeit kultivierten infizierten Zelllinie nachgewiesen wurden. Für die Methylierung in der *NotI*-Schnittstelle konnte geschlossen werden, daß eine de novo Methylierung erst nach längerer Kultur der Zellen nachweisbar war.

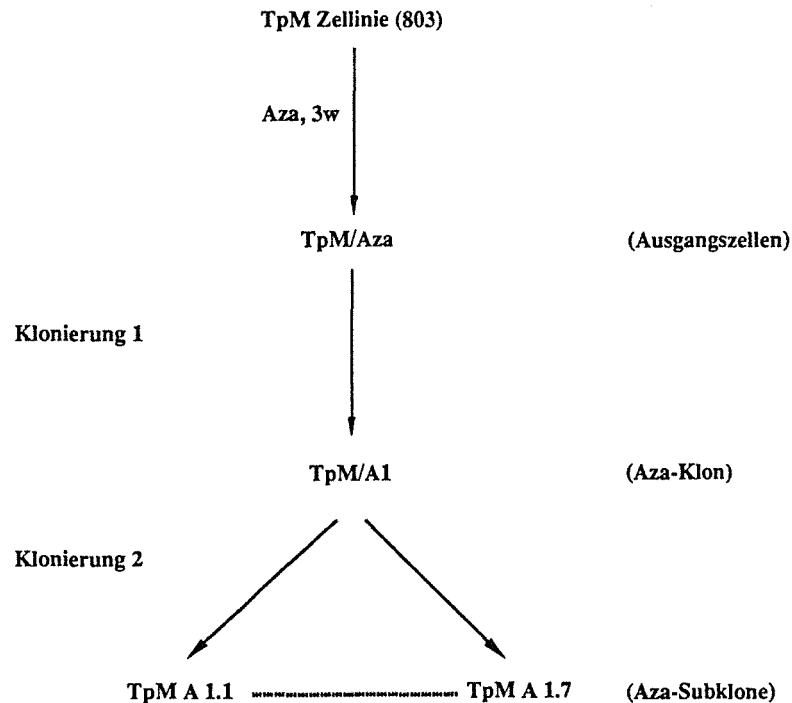
Bei den bisherigen Experimenten wurde das c-raf-1-Gen als Marker eines chromosomalen DNA-Bereichs verwendet, in dem Hypermethylierungen in der DNA infizierter Zellen auftreten. Es ergab sich keine Korrelation zwischen dem Auftreten dieser Hypermethylierung und primären Ereignissen der Transformation der Lymphozyten durch den Parasiten. Um festzustellen, ob Methylierungen in der DNA infizierter Zellen überhaupt im Hinblick auf Zellwachstum oder Tumorgenität von Bedeutung sind, wurden infizierte Zellen mit 5-Aza-C behandelt, um Methylierungen zu entfernen, und anschließend kloniert.

4.4. Demethylierungen führen zu einer veränderten Zellmorphologie, einem verminderten Zell-Zellkontakt, einer veränderten Reaktion auf den Tumorpromotor TPA und einer veränderten Tumorgenität infizierter Lymphozyten

Als Ausgangszellen für die Klonierung wurden infizierte Zellen der TpM-T-Zelllinie 803 benutzt, die 3 Wochen lang mit 5-Aza-C (0,25 μ M) kultiviert worden waren. Um de novo Methylierungen während und kurz nach der Klonierung (beim Hochwachsen der Klone) einzuschränken bzw. zu unterbinden, wurde dem Kulturmedium 5-Aza-C (0,25 μ M) zugesetzt. Diese 5-Aza-C-Konzentration hatte sich in früheren Zellkultur-experimenten als nicht toxisch erwiesen (vgl. Abschnitt 4.2.2.). Außerdem können bei Verwendung höherer 5-Aza-C-Konzentrationen Chromosomenaberrationen auftreten [104], sodaß Rückschlüsse auf die Bedeutung der DNA-Methylierung in der Zelle nur bedingt möglich sind.

Bei den Klonierungen wurden jeweils 1 Zelle pro Vertiefung der Mikrotiterplatte ausgesät. Nach der ersten Klonierung, resultierte 1 Klon. Von diesem wurden nach einer

zweiten Klonierung 7 Subklone erhalten. Das folgende Schema verdeutlicht das Klonierungsexperiment:



Um zu überprüfen, ob Demethylierungen stattgefunden hatten, wurde die DNA der erhaltenen Klone jeweils mit *NotI* verdaut und mit der c-raf-1-Probe hybridisiert (Abb.28/A):

1. Alle Klone hatten das charakteristische 700 kb-Fragment und das 300 kb-Fragment verloren.
2. Alle Klone hatten kleinere Fragmente (bei 100 kb bzw. bei 40 kb, die bereits bei den klonierten Zellen TpM1 bzw. TpM2 auftraten, vgl. Abb. 20, 21, 22), die in den Ausgangszellen von Klonierung 1 nur als sehr schwache Signale erkennbar waren (Spur TpM/Aza+).

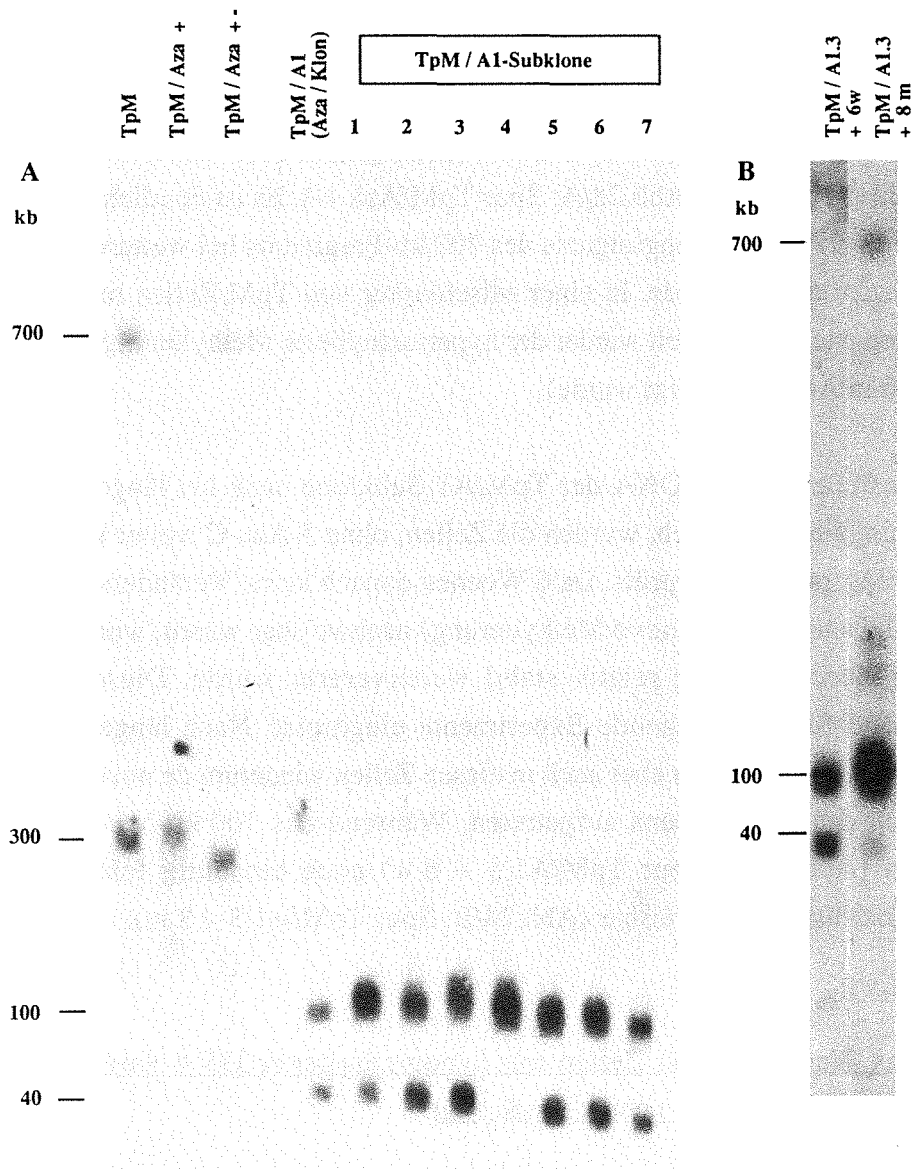


Abb.28: Nachweis von Demethylierungen in der DNA 5-Aza-C behandelter infizierter klonierter Zellen

Die DNA wurde mit *NotI* verdaut und in einem Agarosegel mit der FIGE-Methode aufgetrennt (A: 22 h Gesamtlaufzeit bei 8V/cm; 3 bis 27 s vorwärts, 1 bis 9 s rückwärts, B: 16 h Gesamtlaufzeit bei 8V/cm; 3 bis 21 s vorwärts, 1 bis 7 s rückwärts). Nach dem Transfer der DNA auf Nylonfilter wurde mit der *c-raf-1*-cDNA-Probe hybridisiert. Als Größenmarker dienen Hefe-Chromosomen und Konkatemere des Phagen Lambda.

DNA-Proben:

- infizierte T-Zelllinie 803, vor der Aza-Behandlung (TpM)
- infizierte T-Zelllinie 803, nach 21 Tagen Aza-Behandlung (0,25 μ M), Ausgangszellen für Klonierung 1 (TpM/Aza+)
- infizierte T-Zelllinie 803, nach 21 Tagen Aza-Behandlung und 14 Tagen weiterer Kultur ohne Aza (TpM/Aza+-)
- infizierter Aza-Klon nach Klonierung 1 (TpM/A1)
- infizierte Aza-Subklone TpM/A1.1 bis TpM/A1.7 nach Klonierung 2 (1 bis 7)
- infizierter Aza-Subklon TpM/A1.3 nach 6 Wochen (TpM/A1.3 + 6 w) bzw. 8 Monaten (TpM/A1.3 + 8 m) weiterer Kultur ohne 5-Aza-C

Die DNA der 5-Aza-C-behandelten Ausgangszellen wurde somit auch während dieser Klonierung weiter demethyliert (hier zusätzlicher 5-Aza-C-Effekt). Gezeigt ist auch die DNA der Ausgangszellen, die nach der Behandlung mit 5-Aza-C weitere 14 Tage ohne 5-Aza-C kultiviert wurden (Abb.28/A: Spur TpM/Aza +-). Es ist deutlich sichtbar, daß die Intensität des Hybridisierungssignals des 700 kb-Fragments bei weiterer Kultur ohne 5-Aza-C wieder stärker wurde. In einer Mischkultur von TpM/Zellen mit demethylierter DNA wurde nach kurzer Zeit wieder der hypermethylierte Methylierungszustand erhalten (wie schon in Abb.11 gezeigt wurde).

Um festzustellen, ob die DNA der TpM/A1-Subklone auch bei längerer Kultur stabil methylierungs-negativ blieb, wurden die Zellen, ohne 5-Aza-C weiter kultiviert und das Methylierungsmuster überprüft. Da 6 Wochen danach keine Veränderungen im Bereich des *c-raf-1*-Gens, (z.B. de novo Methylierung) nachweisbar waren, wurde vermutet, daß das Methylierungsmuster relativ stabil weitervererbt wurde. Diese Klone wurden anschließend für vergleichende Experimente eingesetzt. Nach längerer Kultivierung (ungefähr 8 Monate) waren aber auch in diesen Zellen wiederum de novo Methylierungen im Bereich des *c-raf-1*-Gens aufgetreten. Während das 700 kb-*NotI*-Fragment nach 6 Wochen (Abb.28/B: Spur TpM/A1.3 + 6 w) noch eindeutig fehlte, war es nach 8 Monaten deutlich nachweisbar (Abb.28/B: Spur TpM/A1.3 + 8 m).

4.4.1. Das Wachstum von Zellen mit hypomethylierter DNA wird unter normalen Kulturbedingungen nicht beeinträchtigt

Die Experimente wurden mit den TpM/Aza-Subklonen (TpM/A1.3, TpM/A1.7) durchgeführt, die 6 Wochen ohne Zusatz von 5-Aza-C kultiviert worden waren. Als Vergleichszellen diente die infizierte TpM-Zelllinie 803, deren DNA mehrere Hypermethylierungen aufwies.

Um festzustellen, ob Demethylierungen zu Veränderungen des Wachstums infizierter Zellen führen, wurde zunächst das Wachstum der Zellen verglichen. Die resultierende Wachstumskurve ist in Abbildung 29 gezeigt.

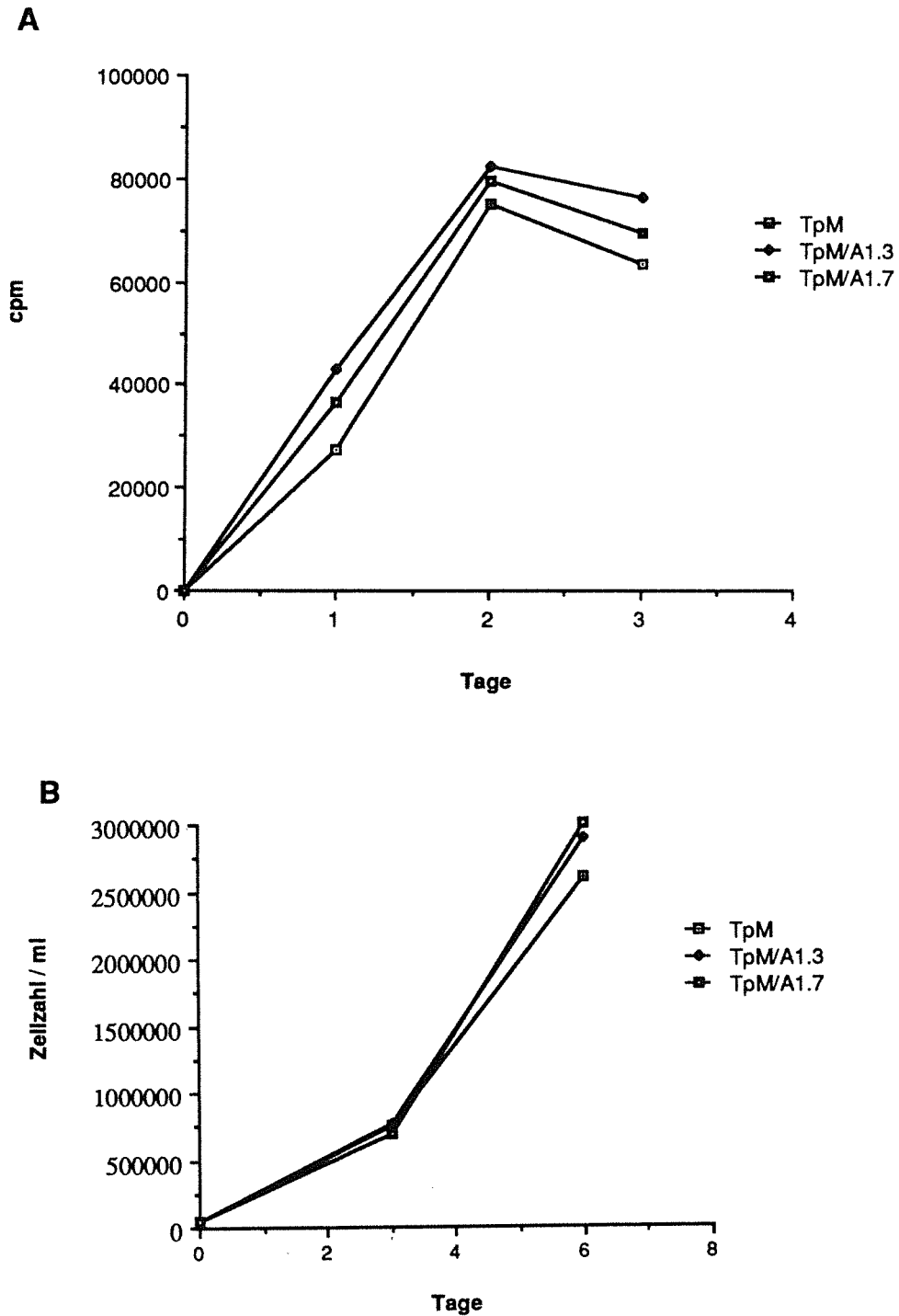


Abb.29: Wachstumskurven infizierter Zellen mit hyper- bzw. hypomethylierter DNA

Zellen mit hypermethylierter DNA (TpM) bzw. mit hypomethylierter DNA (TpM/A1.3, TpM/A1.7) wurden in jeweils 3 parallelen Ansätzen mit 5×10^4 Zellen/ml in 10 ml Kulturflaschen angesetzt. Nach 1, 2, und 3 Tagen wurde der ^3H -Thymidin-Einbau (A) und nach 3 und 6 Tagen wurde jeweils die Zellzahl (B) bestimmt. Die Standardabweichung pro Ansatz betrug max. 10%.

Die TpM/Aza-Subklone mit hypomethylierter DNA zeigten ein etwas besseres Wachstum im Vergleich zur TpM-Zelllinie mit hypermethylierter DNA. Sie bauten mehr ^3H -Thymidin ein (etwa 10-20%) und erreichten nach 6 Tagen Kultur höhere Zellzahlen (etwa 10%). Es handelte sich zwar nur um eine relativ geringfügige Abweichung im Wachstum der Zellen, die darauf schließen ließ, daß die stattgefundenen Demethylierungen unter normalen Kulturbedingungen das Wachstum der Zellen nicht beeinträchtigten. Dies war aber für die Versuche bezüglich der Tumorgenität der Zellen (Abschnitt 4.4.4.) sehr wichtig.

4.4.2. Zellen mit hypomethylierter DNA zeigen eine veränderte Zellmorphologie und einen verminderten spontanen und TPA-induzierten Zellkontakt

Unterschiede zwischen den TpM/Aza-Subklonen und TpM-Zellen zeigten sich in der Zellmorphologie. Im Gegensatz zu den in sehr verschiedenen Zellformen (rund, langgestreckt, oval) auftretenden TpM-Zellen (Abb.30/A), zeigten sich die TpM/Aza-Subklone als sehr homogen und hatten eine runde Form (Abb. 30/B). Außerdem bildeten sie keine größeren, schon mit dem Auge sichtbaren Zellaggregate, wie sie für TpM-Zellen typisch sind (Abb.30/A).

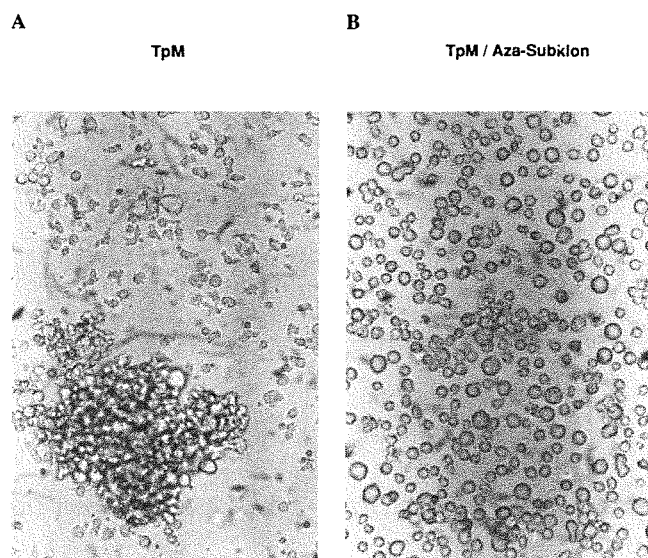


Abb.30: Die TpM/Aza-Subklone mit demethylierter DNA zeigten eine veränderte Zellmorphologie und einen verminderten spontanen Zellkontakt (Vergrößerung: 125-fach)

A: infizierte Zelllinie mit hypermethylierter DNA (TpM)

B: infizierter TpM/Aza-Subklon mit hypomethylierter DNA (TpM/Aza-Subklon)

Bei TpM-Zellen werden diese Zellaggregate nach TPA-Behandlung noch sehr viel größer (Abb.31/A), was bei den TpM/Aza-Subklonen nicht festzustellen war (Abb.31/B).

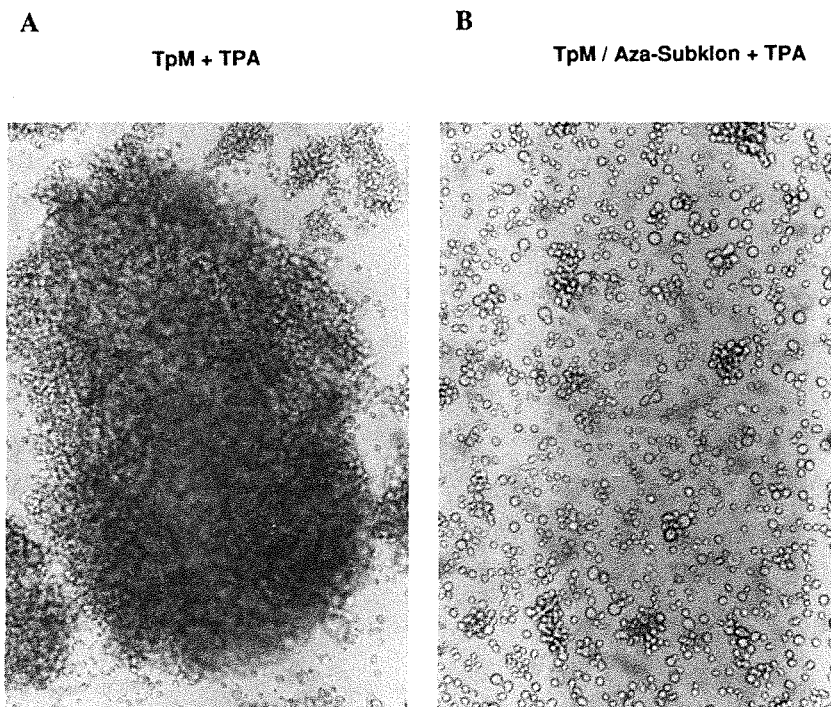


Abb.31: Die TpM/Aza-Subklone mit demethylierter DNA zeigten keinen TPA-stimulierten erhöhten Zellkontakt. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Zugabe des Tumorpromotors TPA (50ng/ml) photographiert (Vergrößerung:80-fach).

A: infizierte Zelllinie mit hypermethylierter DNA (TpM)

B: infizierter TpM/Aza-Subklon mit hypomethylierter DNA (TpM/Aza-Subklon)

Daß diese veränderte Reaktion auf einen Tumorpromotor für das Wachstum entscheidend sein könnte, wurde in einem Wachstumsexperiment nach Abtötung des Parasiten deutlich.

4.4.3. Demethylierungen führen zu einer verringerten Wachstumsstimulation durch den Tumorpromotor TPA

Im Vergleich zu TpM-Zellen zeigten die TpM/Aza-Subklone nach Abtötung des Parasiten mit dem theileriziden Medikament 720C ein anderes Wachstumsverhalten. Während 720C-behandelte TpM-Zellen durch Zusatz des Wachstumsfaktors IL2 und des Tumorpromotors TPA über einen längeren Zeitraum kultiviert werden konnten, starben die 720C-behandelten TpM/Aza-Subklone nach ungefähr 10 Tagen trotz dieser Behandlung ab. Ein Wachstumsexperiment, bei denen 5 Tage mit 720C-behandelten Zellen IL2 und TPA zugesetzt wurde, soll dies verdeutlichen (Abb.32). Ähnliches wurde, wie in

Abschnitt 4.3.3. beschrieben, auch nach Abtötung des Parasiten in nichtklonierten Zellen festgestellt, die zuvor mit 5-Aza-C behandelt worden waren.

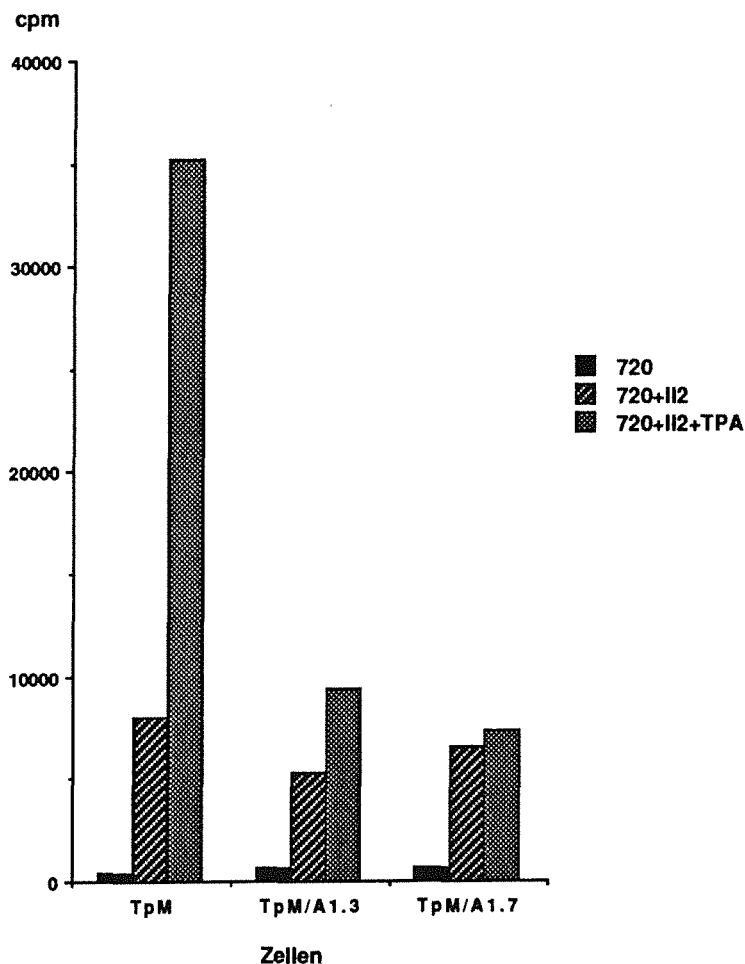


Abb. 32: Zellen mit demethylierter DNA zeigten nach Abtötung des Parasiten eine verringerte TPA-induzierte Stimulation des Wachstums

5 Tage mit 720C-behandelte Zellen wurden nach Zugabe von 720C, 720C + IL2 (10U/ml) bzw. 720C + IL2 + TPA (50ng/ml) jeweils in 4 parallelen Ansätzen mit einem Titer von 5×10^5 Zellen/ml in Mikrotiterplatten angesetzt (200µl Volumen pro Vertiefung). Nach 24 Stunden wurde der ^3H -Thymidin-Einbau bestimmt. Die Standardabweichung pro Ansatz betrug max. 10%.

Bei 720C-behandelten TpM-Zellen wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen (ohne IL2 und TPA) eine Induktion des Wachstums der Zellen durch IL2 erhalten, die durch zusätzliche Behandlung mit TPA ungefähr 2.5-fach erhöht wurde. Bei den 720C-behandelten TpM/Aza-Subklonen war nur ein sehr geringer stimulierender Effekt durch TPA nachweisbar, der allerdings nicht für ein Überleben der Zellen ausreichend war. Nach Zugabe von TPA bildeten 720C-behandelte TpM-Zellen Zellaggregate, die 720C-behandelten TpM/Aza-Subklone hingegen bildeten keine Zellaggregate. Wichtig ist in

diesem Zusammenhang, daß in 720C-behandelten TpM-Zellen ohne TPA keine großen Zellaggregate auftreten und die Zellen trotz Zugabe von IL2 nach ca. 10 Tagen absterben [14,17]. TPA ist also für eine Aktivierung des Wachstums und ein längeres Überleben dieser Zellen unbedingt nötig, wobei der TPA-induzierte Zellkontakt vermutlich bei der Wachstumsstimulation beteiligt ist. Von Dobbelaere und Mitarbeitern wurde nämlich gezeigt, daß das Wachstum IL2 und TPA-stimulierter 720C-behandelter TpM-Zellen durch Störung des Zellkontakts (durch ständiges Schütteln der Kulturen) inhibiert wird.

Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen lassen vermuten, daß die Tumorgenität von Tumorzellen durch Veränderungen in der DNA-Methylierung beeinflusst wird [103,123]. Zum einen ist bekannt, daß Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen gleichen Ursprungs meist einen geringeren Gehalt der Base 5-Methylcytosin aufweisen, wodurch die Expression normalerweise stummer Gene in den Tumorzellen angeschaltet werden könnte [100,102]. Experimente mit 5-Aza-C-behandelten Tumorzellen verschiedener Spezies zeigten allerdings, daß die Tumorgenität der Zellen durch einen Verlust von Methylierungen auch verringert werden kann [103,124]. Diese Beobachtung wurde im folgenden überprüft.

4.4.4. Demethylierungen führen zu einer verringerten Tumorgenität

Ein Kriterium für die Tumorgenität von Zellen ist deren Fähigkeit in Mäusen nach subcutaner Injektion Tumore auszubilden. Um eine Abstoßungsreaktion der Fremdzellen im Tier durch das zelluläre Immunsystem zu verhindern, werden immundefiziente nackte Mäuse verwendet [177]. Vor der Injektion wurden die Mäuse mit einer ^{60}Co -gamma Quelle entsprechend der Vorschrift von Irvin und Mitarbeitern bestrahlt [31]. Die Injektion nackter Mäuse wurde freundlicherweise von Dr. K. Tsunamoto und A. Wenzel im DKFZ, Heidelberg durchgeführt. Injiziert wurden Zellen des TpM-Aza-Subklons TpM/A1.3 (mit hypomethylierter DNA) bzw. Zellen der TpM-Zelllinie 803 (mit hypermethylierter DNA). Jeweils 5 Mäuse wurden mit insgesamt 5×10^7 Zellen in einem Volumen von 200 μl Kulturmedium bzw. nur mit Medium injiziert. Schon 5 Tage nach der Injektion der Zellen waren Knoten in allen mit Zellen injizierten Mäusen sichtbar, alle Kontrolltiere waren negativ. Es zeigten sich allerdings signifikante Unterschiede in der Ausprägung der Tumore von Mäusen, die Zellen der TpM-Zelllinie 803 bzw. Zellen des TpM-Aza-Subklons erhalten hatten:

1. In den Mäusen mit TpM-Zellen waren größere Tumore (2 bis 3-fache Größe) herangewachsen (Abb. 33).
2. Die Tumore der Mäuse mit TpM-Zellen zeigten eine beginnende Versorgung des Tumorgewebes mit kleinen Gefäßen (Vascularisierung), was an der stärkeren Durchblutung sichtbar war (Abb. 33).

Beide Beobachtungen ergaben, daß die TpM/Aza-Zellen mit demethylierter DNA im Vergleich zu den TpM-Zellen mit hypermethylierter DNA eine verringerte Tumorgenität aufwiesen. Die kleineren Tumore der TpM/Aza-Zellen deuteten auf eine verringerte Teilungsrate in den nackten Mäusen hin. Dies war aufgrund der durchgeführten in vitro Zellkultur-Wachstumsexperimente nicht zu erwarten, in denen die TpM/Aza-Subklone sogar ein etwas besseres Wachstum als die TpM-Zellen gezeigt hatten (vgl. Abb. 32). Außerdem wurde die Teilungsrate der in diesem Experiment verwendeten Kulturen direkt vor der Injektion der Zellen überprüft, sodaß eine verringerte in vitro Teilungsrate der TpM/Aza-Zellen auszuschließen war.

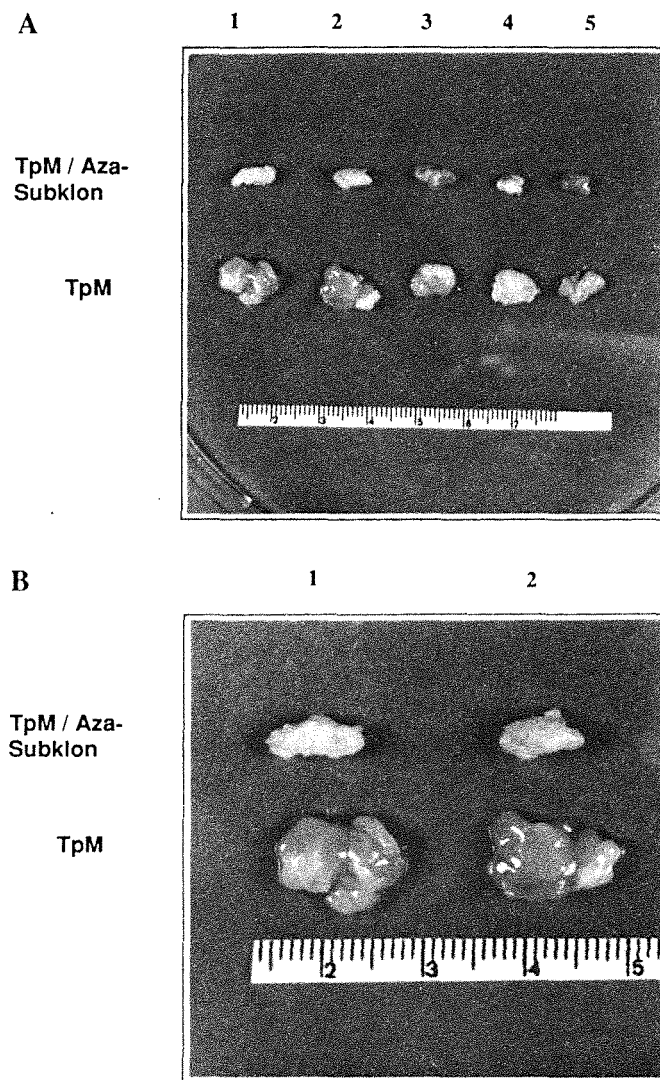


Abb.33: Zellen mit demethylierter DNA zeigten eine verringerte Fähigkeit zur Tumorgenität

Jeweils 5×10^7 Zellen des TpM-Aza-Subklons TpM/A1.3 (mit hypomethylierter DNA) bzw. Zellen der TpM-Zelllinie 803 (mit hypermethylierte DNA) wurden in einem Volumen von $200\mu\text{l}$ Kulturmedium unter die Haut von jeweils 5 nackten Mäusen (in rechte Schulter) injiziert. Nach 5 Tagen wurden die Tumore isoliert und photographiert.

- A: - obere Reihe: Tumore der 5 Mäuse nach Injektion des TpM-Aza-Subklons TpM/A1.3
 - untere Reihe: Tumore der 5 Mäuse nach Injektion der TpM-Zelllinie 803; (der kleinere Tumor (ganz rechts Nr.5) resultierte nach Injektion von nur 2×10^7 Zellen)
- B: - vergrößerter Bildausschnitt von A

5. DISKUSSION

5.1. c-raf-1 und c-myc sind bei primären Ereignissen der Transformation der Lymphozyten durch *Theileria parva* nicht beteiligt

Die Untersuchungen auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene lieferten keine Hinweise, daß das Rinder c-raf-1-Gen in infizierten Zellen in einer aktivierten Form vorliegt. Da v-raf und v-myc in anderen Modellsystemen synergistisch wirken und beide bei der Aktivierung und Tumorgenität von Lymphozyten involviert sein sollen, wurde auf RNA-Ebene auch das c-myc-Gen untersucht. Es trat keine Überexpression des c-raf-1- und des c-myc-Transkripts auf. Beide Gene wurden in theileriainfizierten Zellen in vergleichbaren Mengen transkribiert wie in aktivierten, nichtinfizierten Lymphozyten. Dies bestätigt die bisherigen Daten, daß sich theileriainfizierte Lymphozyten in einem zu aktivierten Lymphozyten vergleichbaren, aber permanent aktivierten Stadium befinden. Es ist zu vermuten, daß die untersuchten Gene dabei Grundfunktionen übernehmen (c-raf-1 bei der Signaltransduktion von der Zellmembran zum Kern [133] und c-myc vermutlich bei der Zellteilung [43]).

4 Tage nach Abtötung des Parasiten traten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Transkriptionsmenge auf, obwohl die behandelten Zellen nach dieser Zeit bereits typische Eigenschaften verloren hatten, die den transformierten Phänotyp von infizierten Zellen charakterisieren (Verlust der lymphoblastoiden Zellform, des Zell-Zellkontaktes, und von IL2-Rezeptoren). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß der Parasit zur Induktion und Aufrechterhaltung des transformierten Zustands der Zelle primär andere Signalketten benutzt. Die Frage, ob Onkogene bei der Transformation von Lymphozyten durch den Parasiten eine essentielle Rolle spielen, bleibt offen. Außer c-myc und c-raf-1 sind weitere Onkogene bekannt, die bei der Aktivierung von Lymphozyten verstärkt exprimiert werden [15].

5.2. Das Methylierungsmuster in Schnittstellen selten schneidender Restriktionsenzyme in der DNA infizierter Zellen erweist sich als instabil

Modifikationen der DNA durch Methylierung werden als einer der Mechanismen angesehen, die bei der Tumorprogression beteiligt sein könnten [73]. Eine Voraussetzung ist dabei, daß das Methylierungsmuster in Tumorzellen nicht so stabil weitervererbt wird, wie in normalen differenzierten Zellen. In dieser Arbeit wurden in theileriainfizierten

Zellen mit den c-raf-1-Sequenzen als Marker-Gen Veränderungen im Methylierungsmuster in Schnittstellen selten schneidender CpG-Restriktionsenzyme innerhalb eines großen DNA-Bereichs von ca. 300 kb untersucht. Es wurden sowohl Demethylierungen als auch de novo Methylierungen identifiziert.

5.2.1. Nach einer Klonierung infizierter Zellen resultierten keine identischen Abkömmlinge; es traten vor allem Demethylierungen auf

Demethylierungen werden in der DNA transformierter Zellen sehr häufig beobachtet, und sollen bei der Tumorprogression durch Anschalten normalerweise stummer Gene und durch Instabilisierung des Chromatins eine Rolle spielen [73,103]. Während der Klonierung von infizierten Zellen fanden neben de novo Methylierungen beträchtliche Demethylierungen im untersuchten Bereich statt. In den Klonen wurden zusätzliche kleinere DNA-Fragmente erhalten, die zuvor nur nach künstlicher Demethylierung der DNA durch Behandlung der TpM-Zelllinie mit dem Agens 5-Aza-C, aber nie in unbehandelten Zellen beobachtet wurden. Die Demethylierungen im untersuchten Bereich waren somit ein spezifisches Merkmal der Klonierungen. Eine Veränderung des Methylierungsmusters in HpaII-Schnittstellen (häufig schneidendes methylsensitives Restriktionsenzym) spezifischer Gene während der Klonierung wurde von Wolf und Mitarbeitern auf dem X-Chromosom identifiziert [178]. Die Autoren vermuteten, daß nach der Klonierung Mischpopulationen von Zellen mit unterschiedlichem Methylierungsmuster entstanden, was aufgrund der Anzahl der resultierenden Fragmente geschlossen wurde. Die Anzahl der erhaltenen DNA-Fragmente in den TpM-Subklonen deutet darauf hin, daß auch während dieser Klonierung eine Mischpopulation von Zellen mit unterschiedlichem Methylierungsmuster in der DNA resultierte.

Welche Folgerungen könnten sich daraus ergeben?

Heute wird allgemein angenommen, daß ein Tumorgewebe trotz seines klonalen Ursprungs meist aus einer heterogenen Population von Einzelzellen besteht, da durch Selektion ständig neue Varianten entstehen können, die sich in bestimmten Eigenschaften, wie Tumorgenität oder Metastasierung, unterscheiden können [179]. Beachtet werden sollte, daß Experimente, die Anlaß zu dieser Aussage geben, meist nach einem in vitro durchgeführten Klonierungsschritt einzelner Zellen des Tumorgewebes durchgeführt werden. Die Instabilität des Methylierungsmusters bei der Klonierung läßt vermuten, daß die beobachtete Heterogenität zum Teil erst in vitro bei der Klonierung der Zellen entsteht. Klonierungen sind somit ein kritisches Experiment, da sich Eigenschaften der Zellen

durch Beeinflussung der Genexpression verändern könnten. Bei der Untersuchung von Tumorzellen sollten deshalb wenn möglich primäre Zellen verwendet werden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß derartige Veränderungen im Methylierungsmuster auch *in vivo* stattfinden können und zur Heterogenität einer Tumorzellpopulation beitragen, was von Frost schon diskutiert wurde [180].

5.2.2. Nach einer Infektion traten vor allem de novo Methylierungen in der DNA infizierter Zellen auf

Nach der Infektion wurden im Gegensatz zu den meisten Tumorzellen keine Demethylierungen, sondern *de novo* Methylierungen im untersuchten Bereich der DNA infizierter Zellen identifiziert. Daß meist Hypomethylierungen in Tumorzellen nachgewiesen und in Zusammenhang mit der Tumorprogression diskutiert wurden, könnte daran liegen, daß nicht spezifische DNA-Regionen, sondern in der überwiegenden Anzahl an Untersuchungen der Gesamtgehalt an methylierten Cytosin-Basen in der DNA untersucht wurde [100]. Da außer den Hypermethylierungen im Bereich des *c-raf-1*-Gens weitere Hypermethylierungen im Bereich des *IL4*-Gens und des Gens der invarianten Kette nachgewiesen wurden, ist zu vermuten, daß *de novo* Methylierungen in verschiedenen Bereichen der DNA infizierter Zellen auftreten.

Was ergibt sich aus dem zeitlichen Verlauf, in dem die Veränderungen des Methylierungsmusters in der *c-raf-1*-Region nachgewiesen wurden?

Eine partielle Hypermethylierung im untersuchten DNA-Bereich um den *c-raf-1*-Genlocus war in allen Kulturen infizierter Zellen, die über einen längeren Zeitraum untersucht wurden, nachweisbar. Daß die Intensität der Hybridisierungssignale der zusätzlichen DNA-Fragmente bei längerer Kultur allmählich zunahm, könnte bedeuten, daß die einmal methylierten Stellen sehr stabil weitervererbt wurden. Unter der Annahme, daß auf *de novo* Methylierungen wiederum Demethylierungen folgen könnten und umgekehrt (wegen der oben beschriebenen Instabilität bei Klonierungen), müßte allerdings die Rate an in diesem Bereich stattfindenden Demethylierungen unbedingt kleiner sein als die Rate an *de novo* Methylierungen, da kein Wachstumsvorteil von 'met⁺-Zellen' bei den klonierten Zellen unter normalen Kulturbedingungen festgestellt wurde. Das späte Auftreten der Methylierungen nach der *in vitro* Infektion (nach 5 Monaten bei *NotI*) und die Tatsache, daß sie nicht in infizierten B- und Null-Zelllinien nachweisbar waren, läßt vermuten, daß kein direkter Zusammenhang mit primären Mechanismen der

Transformation der Lymphozyten durch den Parasiten besteht. Außerdem blieb die Hypermethylierung nach Abtötung des Parasiten erhalten, sodaß ein direkter Einfluß des Parasiten auf die Methylierungen bei jeder Zellteilung (z.B. eine parasiten-spezifische DNA-Methylase) ausgeschlossen werden kann. Dies war zu erwarten, da keine Daten vorliegen, daß eine Methylierung bei jeder Replikation der DNA durch eine spezifische de novo Methylase neu gesetzt wird.

Bisher wurde nicht geklärt, wie das Setzen von de novo Methylierungen in der Zelle geregelt wird. Es wird zum Beispiel vermutet, daß die DNA-Sequenz [181,182] und DNA-Struktur [183], Störungen der Chromosomenorganisation nach Insertion von Fremd-DNA [184] und der Aktivitätszustand eines DNA-Bereichs (transkribierte Bereiche sollen durch Bindung von Proteinfaktoren für die Methylasen unzugänglich sein [185]) von Bedeutung sind. Wichtig ist die Beobachtung, daß auch eine Mutation (von CG zu AT) zu de novo Methylierungen angrenzender DNA-Bereiche führen können [186]. Insgesamt betrachtet, deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß de novo Methylierungen nicht aktiv unter Beteiligung spezifischer DNA-bindender Proteine, die eine zu methylierende Stelle 'markieren', sondern sekundär nach Veränderung der DNA-Struktur durch die unspezifische Erhaltungsmethylase gesetzt werden. Findet eine Methylierung in der spezifischen Bindungsstelle eines Transkriptionsfaktors statt, so könnte die Genexpression reprimiert werden. In der Einleitung wurden bereits 2 Transkriptionsfaktoren genannt, deren Interaktion mit der DNA durch Methylierung verhindert wird [94,95].

Welche Rolle könnten Veränderungen im Methylierungsmuster nach der Infektion mit dem Parasiten spielen?

Jones vermutete, daß der reversible Mechanismus der Veränderung in der Methylierung der DNA in vivo und in vitro neben genetischen Mutationen (Veränderung der Basensequenz) im Rahmen des Selektionsprozesses dazu beitragen könnte, daß neue Varianten entstehen, die besser an eine veränderte Umweltbedingung angepaßt sind [73]. Auch nach der in vitro Infektion von Lymphozyten mit dem Parasiten wurde ein allmählicher Anpassungsprozeß beobachtet. Mit zunehmender Kulturdauer war eine allmähliche Steigerung der Teilungsrate feststellbar, wobei sich gleichzeitig der Anteil abgestorbener Zellen verringerte. Außerdem wurde wie in einigen HTLV-infizierten kultivierten Zelllinien [187] eine zunehmende Wachstumsfaktorunabhängigkeit [persönl. Mitteilung Dr. T. Coquerelle] beobachtet. Auffällig war auch eine Verminderung der Menge an IL2-Transkript [persönl. Mitteilung V.Heußler]. Ob diese Beobachtungen

jedoch in einem kausalen Zusammenhang mit den allmählichen Veränderungen im Methylierungsmuster stehen, ist nicht geklärt. Ein Hinweis, daß die IL2-Expression tatsächlich durch Methylierung beeinflusst werden kann, geben die Ergebnisse von Ballas und Mitarbeitern [188]. Sie stellten fest, daß die IL2-Expression nach Behandlung einer IL2-unabhängigen Maus-T-Zelllinie (EL4-Zellen) mit dem Demethylierungsmittel 5-Aza-C induziert wird. Von Holliday wird vermutet, daß de novo Methylierungen für die Enzymdefizienz permanenter Zelllinien verantwortlich sind [189]. Dazu gehören z.B. Zelllinien, die das Metallothionein-Gen oder das Thymidinkinase-Gen nicht exprimieren. Für diese Gene wurde nachgewiesen, daß die Transkription durch Methylierung blockiert bzw. durch Demethylierung induziert werden kann [190,191].

Um den Mechanismus von de novo Methylierungen besser zu verstehen, wäre es wichtig, endogene Sequenzen höherer Organismen zu untersuchen, die in vivo bevorzugt methyliert wurden. Um gleichzeitig die Rolle der Methylierung bei der Genexpression zu studieren, würde es sich anbieten, gezielt Bereiche zu klonieren (z.B. Sequenzen in der c-raf-1-Region der DNA theileriainfizierter Zellen), die Veränderungen in Schnittstellen selten schneidender Restriktionsenzyme aufweisen und z.B. auch nach einer Demethylierung durch 5-Aza-C wieder remethyliert werden. In der Einleitung wurde bereits erwähnt, daß diese Enzyme zur Kartierung großer genomischer Bereiche eingesetzt werden. Wie in dieser Arbeit wurden Unterschiede zwischen der DNA von Lymphozyten und der DNA von permanenten Zelllinien festgestellt [192]. In der DNA der Zelllinien wurden zusätzliche größere DNA-Fragmente identifiziert, wobei vermutet wurde, daß es sich um differenzierungsspezifische Unterschiede im Methylierungsmuster oder um Restriktionslängenpolymorphismen handeln könnte. Nur durch Klonierung einer signifikanten Anzahl an Sequenzen, die im Bereich der Schnittstellen von selten schneidenden CpG-Restriktionsenzyme liegen und nur in Tumorzellen methyliert vorliegen, kann geklärt werden, ob die beobachteten Veränderungen von Bedeutung sind.

5.3. Unspezifische Demethylierungen in der DNA nach 5-Aza-C-Behandlung führen zu veränderten Eigenschaften infizierter Zellen

Bei infizierten Zellen mit hypermethylierter DNA (unbehandelte Zellen) bzw. mit hypomethylierter DNA (Aza-behandelte Zellen) wurden Unterschiede bezüglich Morphologie, Reaktion auf einen Tumorpromotor und Tumorgenität identifiziert. Da durch 5-Aza-C an den verschiedensten Stellen der DNA Methylierungen entfernt werden, ist anzunehmen, daß Sequenzen, die auch in normalen nichtinfizierten Lymphozyten methyliert vorliegen,

demethyliert wurden. Erwähnt werden sollte auch, daß 5-Aza-C vermutlich nicht nur durch Demethylierung die Genexpression beeinflusst. Die modifizierte Base hemmt vermutlich die RNA-Polymerase und blockiert die Proteinbiosynthese [193]. In dieser Arbeit können diese Effekte ausgeschlossen werden, da die Experimente erst 6 Wochen nach einer 5-Aza-C-Behandlung der Zellen durchgeführt wurden.

Aza-behandelte Zellen zeigten eine veränderte Zellmorphologie

Im Gegensatz zu den TpM-Zellen, die bezüglich der Zellform sehr inhomogen sind (langgestreckt, oval, rund), waren die Zellen der TpM/Aza-Klone sehr homogen und meist rund. Es ist möglich, daß die runde Zellform durch Demethylierungen in der DNA induziert wurden, da in nichtklonierten 5-Aza-C-behandelten infizierten Zellen eine ähnliche Veränderung in der Morphologie zu beobachten war. Die Veränderung der Zellform könnte auf eine Veränderung von Oberflächenmolekülen oder des Cytoskeletts beruhen.

Zellen mit demethylierter DNA zeigten einen verminderten Zellkontakt

Die Bildung von Zellaggregaten ist eine charakteristische Eigenschaft von Lymphozyten, die nach einer Aktivierung durch verschiedene Stimulatoren (z.B. Antigene oder ConA) auftritt und bei der Aktivierung des Wachstums eine Rolle spielen soll [16]. Die Ergebnisse von Dobbelaere und Mitarbeitern deuten darauf hin, daß der Zell-Zellkontakt auch bei theileriainfizierten Zellen bei der Regulation des Wachstum beteiligt ist [17]. Nachgewiesen wurde, daß infizierte Zellen nach Abtötung des Parasiten durch das Medikament 720C die Fähigkeit zum Zellkontakt verlieren, was vermuten ließ, daß der Parasit auf unbekannte Weise den Zellkontakt induziert. Dobbelaere zeigte weiterhin, daß der Zellkontakt vor allem bei stark verdünnten Kulturen für das Wachstum infizierter Zellen essentiell ist. Das Wachstum wurde in Abhängigkeit von der Zelldichte durch Verhinderung des Zellkontakts stark inhibiert bzw. durch Verstärkung des Zellkontakts nach Zugabe abgetöteter Zellen aktiviert. Eine Aktivierung wird allerdings auch nach Zugabe von exogenem Wachstumsfaktor (IL2) beobachtet, was zeigt, daß Zellkontakt und Wachstumsfaktor für die Proliferation der Zellen wichtig sind. Eine verminderte Proliferation wird auch bei verdünnten Kulturen anderer permanenter T-Zelllinien beobachtet und kann durch Zugabe von IL2 [194] oder Transfektion mit dem IL2-Gen aufgehoben werden [195].

Das gute Wachstum der infizierten Aza-Klone, die meist als Einzelzellen vorliegen, bestätigt, daß die Zellaggregation unter normalen Kulturbedingungen (bei höherer Zelldichte) für die Aktivierung des Wachstums nicht essentiell sein kann. Überprüft werden könnte, ob das Wachstum der Aza-behandelten Zellen bei verdünnten Kulturen stärker inhibiert wird, als das Wachstum normaler infizierter Zellen. Wäre dies der Fall, so könnte eine genauere Untersuchung der Aza-Klone vielleicht dazu beitragen, die Oberflächenmoleküle zu identifizieren, die nach der Infektion mit dem Parasiten induziert werden und durch Demethylierung auf noch unbekannte Weise (s.u.) ihre Funktion verlieren.

Infizierte Zellen mit demethylierter DNA zeigten keinen TPA-induzierten Zellkontakt und eine verringerte Induktion des Wachstums durch IL2 und TPA nach Abtötung des Parasiten

In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, daß TPA die interzelluläre Kommunikation epidermaler Zellen hemmt [196]. Für Lymphozyten wurde aber festgestellt, daß der spontane Zellkontakt durch Behandlung mit TPA noch verstärkt werden kann [197], was auch für infizierte TpM-Zellen der Fall ist, nicht aber für die TpM-Aza-Klone. Dieser fehlende TPA-induzierte Zellkontakt könnte für die ausbleibende Induktion des Wachstums nach Abtötung des Parasiten in den Aza-Klonen verantwortlich sein.

Das Wachstum und Überleben infizierter Zellen kann nach Abtötung des Parasiten durch Zugabe des Wachstumsfaktors IL2 für ungefähr 10 Tage aufrechterhalten werden. Durch Gabe des Tumorpromotors TPA wird das Wachstum zusätzlich stimuliert (ca. 2,5-fache Induktion) und die Zellen können über einen Zeitraum von ca. 6 Wochen weiterkultiviert werden. Nach Demethylierung der DNA infizierter Zellen fand keine Induktion des Wachstums durch TPA statt. Die Zellen starben innerhalb von 10 Tagen ab. Dies deutet darauf hin, daß die Signalkette, über die die Aktivierung der TpM/720-Zellen durch TPA erfolgt, bei den Aza-Klonen durch Demethylierungen in der DNA nicht wirksam wurde.

Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen von Deguchi und Mitarbeitern, die zeigten, daß die Aktivierung von peripheren Blutlymphozyten durch mitogene Stimuli (ConA und TPA) bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit 5-Aza-C inhibiert wird [198]. Die Autoren hatten allerdings eine relativ hohe Dosis an 5-Aza-C eingesetzt (1µM) und 5-Aza-C war während des Experiments in den Kulturen vorhanden. Es konnte somit nicht ausgeschlossen werden, daß andere 5-Aza-C-Effekte [104,193] und nicht Demethylierungen für die Hemmung der Aktivierung der Zellen verantwortlich waren. Da die

TpM/Aza-Klone mit einer sehr niedrigen Konzentration an 5-Aza-C ($0,25\mu\text{M}$) behandelt wurden und vor den Experimenten mindestens 6 Wochen ohne 5-Aza-C weiterkultiviert wurden, wäre es wahrscheinlich, daß die Aktivität von Molekülen, die bei TPA-Wirkketten beteiligt sind, tatsächlich durch DNA-Methylierung modifiziert werden kann.

TPA bewirkt vielfältige morphologische und biochemische Veränderungen in der Zelle, und greift vermutlich in verschiedene Signalketten der Zelle ein [199,200,201]. Bekannt ist z.B., daß eine der Signalketten, die durch TPA aktiviert wird, an der Zellmembran beginnt, und vermutlich über die Aktivierung der Calcium- und Diacylglycerin-abhängigen Proteinkinase C [202] schließlich im Kern zur Expression verschiedener Gene führt [201]. Für ruhende T-Zellen wurde gezeigt, daß TPA alleine nicht oder nur schwach mitogen ist und nur bei gleichzeitiger Stimulation mit dem Lektin Concanavalin A oder mit Calcium-Ionophoren, die Aktivierung der Zellen stimuliert [203,204]. Wichtig ist dabei, daß eine Langzeitbehandlung mit TPA in Rinderlymphozyten nicht zur Aktivierung, sondern zur Hemmung des Wachstums führt, wobei eine Hemmung der Proteinkinase C vermutet wird [persönliche Mitteilung Dr. A. Mastro, Pennsylvania State University].

Bei 720C-behandelten Zellen, die nicht mit 5-Aza-C behandelt wurden, wird bei Langzeitbehandlung mit TPA keine Hemmung, sondern eine Aktivierung des Wachstums beobachtet. Unter der Voraussetzung, daß die obengenannte Hemmung des Wachstums bei Langzeitbehandlung mit TPA durch eine Hemmung der Proteinkinase C verursacht wird, wäre es durchaus möglich, daß die Proteinkinase C-Signalkette für die Aktivierung der 720C-behandelten Zellen nicht essentiell ist. Die fehlende Induktion des Wachstums in den 720C-behandelten TpM/Aza-Klonen deutet darauf hin, daß Oberflächenmoleküle, die beim Zellkontakt beteiligt sind, bei der Induktion des Wachstums durch TPA eine bedeutende Rolle übernehmen könnten. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß die beobachteten TPA-Effekte (verstärkte Zellaggregation und Aktivierung des Wachstums nach Abtötung des Parasiten) über unterschiedliche Signalketten verlaufen, die durch TPA induziert werden. In beiden Fällen werden die Signalketten jedoch durch Demethylierung der DNA blockiert.

Wie könnte die Funktion eines Oberflächenmoleküls durch eine Veränderung der DNA-Methylierung beeinflusst werden?

Da ein Verlust von Methylierungen meist mit der Aktivierung der Expression von Genen korreliert, kann ausgeschlossen werden, daß die Demethylierungen direkt die Expression

der Oberflächenmoleküle beeinflussen. Möglich wäre, daß ein negatives Regulatorprotein, das bei der Regulation der Aktivierung der Oberflächenmoleküle durch TPA oder der Regulation der Expression der Oberflächenmoleküle beteiligt ist, durch Verlust von Methylierungen in der DNA verstärkt exprimiert wird. Dieses Gen könnte in den TpM-Zellen und in 720C-behandelten Zellen durch Methylierung abgeschaltet sein.

Welche Oberflächenmoleküle könnten beteiligt sein?

Über Oberflächenmoleküle, die beim Zellkontakt normaler T-Zellen beteiligt und durch Methylierung beeinflußt werden, liegen bisher noch keine Daten vor. Bereits bekannte Oberflächenmoleküle, die direkt bei der Zellaggregation beteiligt sind, sind die Zelladhäsionsmoleküle Moleküle LFA-1, LFA-3 und deren Liganden ICAM-I bzw. CD2 [205,206]. Oberflächenmoleküle, die bei der Regulation des Zellkontakts eine Rolle spielen, sind z.B. CD44 [207] und der T-Zell-Rezeptor [208]. Um festzustellen, welche Oberflächenmoleküle in infizierten Zellen durch Methylierung beeinflußt werden, würde es sich anbieten, zunächst das 'lymphocyte function associated antigen-1' (LFA-1) und seinen Liganden 'intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) zu untersuchen. Es wurde nämlich gezeigt, daß Antikörper gegen diese Moleküle den spontanen und TPA-induzierten Zellkontakt hemmen können [209,210]. Dies könnte für theileriainfizierten Zellen überprüft werden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß andere bereits bekannte oder noch unbekannte Oberflächenmoleküle ähnliche Eigenschaften besitzen.

Demethylierungen führen zu einer verringerten Tumorgenität infizierter Zellen

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde festgestellt, daß eine Behandlung von Tumorzelllinien mit 5-Aza-C sowohl zum Verlust als auch zu einer Induktion der Tumorgenität und Metastasierung führen kann [103,211]. Für transformierte Lymphozyten lagen bisher noch keine Daten vor. In dieser Arbeit wurde festgestellt, daß theileriainfizierte T-Lymphozyten mit hypomethylierter DNA (TpM/Aza-Klon) eine deutlich eingeschränkte Tumorgenität aufwiesen. In allen Versuchstieren waren nach Injektion von Aza-Zellen innerhalb von 5 Tagen signifikant kleinere Tumore gewachsen als nach Injektion normaler TpM-Zellen, was zeigte, daß sich die Aza-Zellen im Tier eindeutig langsamer vermehrten als unbehandelte Zellen. Die Zellkultur-Wachstumsexperimente ergaben allerdings, daß sich die Aza-Zellen und unbehandelte Zellen nicht in der Teilungsrates unterscheiden. Daß Zellen, die in vitro keine Unterschiede im Wachstumsverhalten

zeigen, eine unterschiedliche Tumorgenität aufweisen, wird häufig beschrieben. Stanbridge folgerte, daß in vivo zusätzliche Mechanismen ablaufen, die das Zellwachstum in einem Organismus regulieren [212].

Auffällig war außerdem, daß die Tumore unbehandelter TpM-Zellen stärker durchblutet waren, was eine beginnende Vaskularisierung der Tumore mit kleinen Blutgefäßen anzeigt. Dies läßt vermuten, daß TpM-Zellen im Vergleich zu den TpM/Aza-Zellen auch eine ausgeprägtere Fähigkeit zur Metastasierung haben könnten, da die Versorgung des Tumorgewebes mit Blutgefäßen eine wichtige Voraussetzung zur Bildung von Metastasen ist [57]. Um diese Hypothese zu bestätigen, müßten die nackten Mäuse zu einem späteren Zeitpunkt nach einer Injektion auf Metastasen untersucht werden.

Wie könnte die Tumorgenität und die Fähigkeit zur Metastasierung durch eine Veränderung im Methylierungsmuster in der DNA infizierter Zellen beeinflusst werden?

1. Durch 5-Aza-C werden Methylierungen in der DNA entfernt. Die Tumorgenität der Zellen wurde verringert, während das Wachstum in vitro nicht gehemmt wurde.
2. Durch Demethylierung wird ein Gen meist angeschaltet, durch Methylierung abgeschaltet.

Deshalb wäre es möglich, daß durch die Aza-Behandlung der TpM-Zellen ein oder mehrere Kontrollgene demethyliert und somit aktiviert wurden, die das Wachstum im Organismus, nicht aber in Zellkultur hemmen. In den unbehandelten TpM-Zellen könnte dieses Gen durch Methylierung abgeschaltet sein oder schwächer exprimiert werden, da in dieser Arbeit z.B. nur partielle Hypermethylierungen festgestellt wurden. Die tumor-supprimierende Wirkung des Gens wäre somit in den unbehandelten TpM-Zellen verringert, sodaß ein besseres Wachstum im Tier (eine erhöhte Tumorgenität) im Vergleich zu den Aza-Zellen resultieren könnte. Ähnliches wurde auch bei kultivierten Wilm's Tumorzelllinien und bei Rhabdomyosarkomzellen beobachtet, die eine Deletion des kurzen Arms von Chromosom 11 (Lokalisation von mindestens 3 Tumorsuppressorgenen [120]) zeigen. Nach Übertragung der fehlenden Sequenzen verlieren die Zellen zwar ihre Tumorgenität, in vitro treten aber keine Unterschiede im Wachstum der Zellen auf [51].

Wie in der Einleitung erwähnt, wurden bisher nur wenige Tumorsuppressorgene kloniert, so daß noch keine Aussagen über eine Repression der Gene durch Methylierung vorliegt. Bustros und Mitarbeiter stellten fest, daß in einer Vielzahl menschlicher Lungenkarzinom-

zelllinien, T-Lymphomen und nach Infektion von menschlichen T-Zellen mit HTLV-1 und HTLV-2-Viren, eine hypermethylierte DNA-Region im Bereich des Calcitonin-Gens auftritt [119,213]. In den virusinfizierten Zellen wurde die Hypermethylierung ungefähr 8 Wochen nach der Infektion nachgewiesen [119]. Diese hypermethylierte Region liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 11, in einem DNA-Bereich, wo wie oben beschrieben wurde, vermutlich mehrere Tumorsuppressorgene lokalisiert sind. Es wurde diskutiert, daß diese Gene durch eine Hypermethylierung in deren Regulationssequenzen abgeschaltet werden könnten, wodurch ihre Funktion als 'Unterdrücker' der Fähigkeit zur Tumorgenität verloren gehen könnte. Vor kurzem wurde die DNA-Region in der, die Gene vermutet werden, von zwei Arbeitsgruppen mithilfe selten schneidender Restriktionsenzyme kartiert [214,215] und vermutlich eines der 3 postulierten Wilm's Tumorsuppressorgene isoliert [216,217]. Angenommen wird, daß es sich um einen gewebespezifischen Transkriptionsfaktor handeln könnte. Eine erhöhte Transkriptmenge wurde in RNA von Nierenzellen, aber auch in RNA von Milzgewebe und zwei hämatopoetischen Zelllinien nachgewiesen [217]. Im Hinblick auf die hypermethylierte Region, die von Bustros und Mitarbeitern auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 nachgewiesen wurden, könnte eine Hybridisierung mit dem isolierten Gen als DNA-Sonde an NotI-verdaute DNA der untersuchten Zelllinien zeigen, ob auch eine Hypermethylierung im Bereich des potentiellen Wilm's Gens vorliegt. Ein entsprechendes Experiment könnte auch mit NotI-verdauter DNA theileriainfizierter Zellen durchgeführt werden. Schnittstellen selten schneidender Restriktionsenzyme (unter anderem eine NotI-Schnittstelle) sind im Bereich des Gens vorhanden, woraus die Autoren schlossen, daß es sich um ein CpG-Insel [85] und um das 5'-Ende des Gens handeln könnte.

5.4. Ausblick

In dieser Arbeit wurden durch Hybridisierungsexperimente mit verschiedenen DNA-Proben an verschiedenen Stellen der DNA theileriainfizierter Zellen Hypermethylierungen in Schnittstellen selten schneidender CpG-Restriktionsenzyme identifiziert. Demethylierungen wie in den meisten Tumorzellen waren nur nach einer Klonierung von Zellen nachweisbar. Eine Aussage über die Anzahl an Hypermethylierungen in der gesamten DNA ist durch diese Daten nicht möglich. Für weitere Untersuchungen könnte der Gesamtgehalt an 5-Methylcytosin oder die Größenverteilung von HpaII-Restriktionsfragmenten zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer in vitro Infektion bestimmt werden. Aber auch diese Experimente können nur relativ ungenaue Angaben über die Anzahl an hypermethylierten Stellen im Genom liefern. Es wäre von Vorteil, die Untersuchung auf

kodierende aktive Bereiche zu beschränken. Eine Möglichkeit wäre die Identifizierung von veränderten NotI-Schnittstellen, mithilfe radioaktiv markierter NotI-Oligonukleotide. Diese Methode wurde zur gezielteren Klonierung von noch unbekanntem kodierenden Sequenzen entwickelt [218]. Durch eine geringfügige Modifikation dieser Methode, nämlich Verdau der genomischen DNA mit NotI, wären nur Restriktionsfragmente sichtbar, die interne methylierte NotI-Schnittstellen enthalten.

Im Bereich des *c-raf-1*-Gens waren außer mit dem Enzym NotI, auch Veränderungen in Schnittstellen anderer selten schneidender Restriktionsenzyme (MluI, BssHII, SacII) nachweisbar, was vermuten läßt, daß eine hypermethylierte Region vorliegt. Da beim Menschen in dieser chromosomalen Region außer *c-raf-1* vermutlich weitere wichtige Gene lokalisiert sind und Schnittstellen selten schneidender Restriktionsenzyme häufig Bereiche mit kodierenden Sequenzen markieren, wäre eine Untersuchung des Methylierungsmusters dieser DNA-Region in menschlichen Tumorzellen von Interesse. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die in dieser Arbeit identifizierten Veränderungen bei der Expression von Genen keine Rolle spielen. Dies könnte erst durch eine Klonierung der betroffenen Sequenzen überprüft werden. Eine wichtige Funktion bei primären Ereignissen der Transformation der Rinderlymphozyten durch den Parasiten *Theileria parva* wurde nicht festgestellt. Die Beobachtung, daß in diesem Bereich unter bestimmten Kulturbedingungen (bei einer Klonierung von Zellen) beträchtliche Demethylierungen auftreten, könnte *in vivo* vielleicht zur Instabilität des chromosomalen Bereichs beitragen.

Die Aza-Klone ermöglichen, die Bedeutung des Zellkontakts für das Wachstum infizierter Zellen näher zu charakterisieren. Die Daten deuten darauf hin, daß eine Zellaggregation, unter normalen Kulturbedingungen nicht für die Aktivierung der infizierten Zellen essentiell ist. Möglich wäre jedoch, daß nach Demethylierung quantitativ mehr IL2 produziert wird (ähnlich wie in Aza-behandelten EL4-Zellen), was den verringerten Zellkontakt ausgleichen könnte. Deshalb sollte zunächst die IL2-Transkriptmenge der Aza-Klone überprüft werden. Auch im Hinblick auf neuere Daten von Dr. D. Dobbelaire und M. Eichhorn (IGT), die zeigten, daß das Wachstum infizierter T-Zellen durch MHC-Klasse II-Antikörper stark gehemmt wird, ist zu vermuten, daß die Zelladhäsionsmoleküle keine primäre Rolle bei der Aktivierung der infizierten Zellen spielen. Sie könnten allerdings unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei verdünnten Zellkulturen, durch Verstärkung des Zell-Zellkontakts die Interaktion zwischen MHC-Klasse II-Molekülen und dem T-Zellrezeptorkomplex erleichtern.

Eine genauere Charakterisierung der TpM/Aza-Klone könnte auch dazu beitragen, weitere Informationen über die Beeinflussung der Expression von Genen durch DNA-Methylierung zu erhalten. Der eingeschränkte Zellkontakt nach Demethylierung der DNA und die stark verringerte Induktion des Wachstums 720C-behandelter Aza-Zellen geben einen Hinweis, daß die Aktivität bereits bekannter Zelladhäsionsmolekülen von Lymphozyten und eine durch TPA aktivierte Signalkette durch DNA-Methylierung beeinflusst werden könnte. Zelladhäsionsmoleküle gewinnen immer mehr an Bedeutung, da sie bei der Immunantwort, bei der Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten und vermutlich bei der Metastasierung beteiligt sind [206,61,219]. Über die Regulation der Moleküle ist bisher aber noch wenig bekannt. Daß ein negatives Regulatorprotein bei der Regulation der Aktivität der Zelladhäsionsmoleküle beteiligt sein könnte, wäre durchaus denkbar, da die meisten physiologischen Prozesse durch positive und negative Regulationsmechanismen geregelt werden. Die verringerte Fähigkeit zur Tumorgenität nach Demethylierung der DNA bestärkt die Hypothese, daß die Expression von Tumorsuppressorgen durch DNA-Methylierung beeinflusst werden könnte. Dies bleibt trotzdem nur eine Spekulation, da eindeutige Aussagen erst nach Klonierung und Untersuchung der Regulation der Gene erfolgen können. Eine alternative Möglichkeit wäre, daß die obengenannten Zelladhäsionsmoleküle, neben der bereits erwähnten Rolle bei der Metastasierung auch für das beobachtete stärkere Wachstum normaler theileriainfizierter Zellen in den nackten Mäusen verantwortlich sind. Wenn nachgewiesen werden kann, daß die Aktivierung dieser Moleküle in infizierten 5-Aza-C-behandelten Zellen durch Demethylierung blockiert wurde, so würden sich theileriainfizierte Zellen gut als Modellsystem zur Untersuchung dieser Fragestellung eignen.

6. Literatur

- [1] Cairns, J. (1981): The origin of human cancer. *Nature* 289:353-357.
- [2] Franks, L.M., Teich, N.M. (1986): Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press.
- [3] Irvin, A.D. (1981): In: Diseases in cattle in the tropics. M.Ristic and W.I.McIntyre (eds.), Martinus Nijhoff, The Hague, p393
- [4] Morrison, W.I., Lalor, P.A., Goddeeris, B.M., Teale, A.J. (1986): Theileriosis: Antigens and host-parasite interactions. In: Parasite Antigens, p167-213. T.W. Pearson (eds.), Marcel Dekker, Inc., N.Y. & Basel.
- [5] Mehlhorn, H. (1984): The piroplasms: Life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.* 23:37-103.
- [6] Morrison, W.I., Goddeeris, B.M., Brown, W.C., Baldwin, C.L., Teale, A.J. (1989): *Theileria parva* in cattle: characterization of infected cells and the immunresponse they provoke. *Veterinary Immunol. and Immunopathol.* 20:213-237.
- [7] Morrison, W.I., Goddeeris, B.M., Teale, A.J., Baldwin, C.L., Bensaid, A., Ellis, J. (1986): Cell-mediated immune responses of cattle to *Theileria parva*. *Immunol. Today* 7:211-216.
- [8] Morrison, W.I., Goddeeris, B.M., Teale, A.J., Groocock, S.J., Stagg, D.A. (1987): Cytotoxic T-cells elicited in cattle challenged with *Theileria parva* (Muguga): evidence for restriction by class I MHC determinants and parasite strain specificity. *Parasite Immunol.* 9:536-578.
- [9] Baldwin, C.L., Black, S.J., Brown, W.C., Conrad, P.A., Goddeeris, B.M., Kinuthia, S.W., Lalor, P.A., MacHugh, N.D., Morrison, W.I., Morzaria, S.P., Naessens, J., Newson, J. (1988): Bovine T cells, B cells, and null cells are transformed by the protozoon parasite *Theileria parva*. *Infect. Immun.* 56:462-467.
- [10] Brown, C.G.D., Cunningham, M.P., Burrige, M.J., Musoke, A.J., Purnell, R.E., Radley, D.E., Sempebwa, C. (1970): Infection and transformation of bovine lymphoid cells in vitro by infective particles of *Theileria parva*. *Nature* 245:189-192.
- [11] Pinder, M., Kar, S., Withey, K.S., Lundin, L.B., Roelants, G.E. (1981): Proliferation and lymphocyte stimulatory capacity of *Theileria*-infected lymphoblastoid cells before and after elimination of intracellular parasites. *Immunology* 44:51-60.
- [12] Hudson, A.T., Randell, A.W., Fry, M., Ginger, C.D., Hill, B., Latter, V.S., McHardy, N., Williams, R.B. (1985): Novel anti-malarial hydronaphthoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity. *Parasitology* 90:45-55.
- [13] Kuhlmann, I., Doerfler, W. (1983): Loss of viral genomes from hamster tumor cells and nonrandom alterations in patterns of methylation on integrated adenovirus type 12 DNA. *J. Virol.* 47:631-636.
- [14] Dobbelaere, D.A.E., Coquerelle, T.M., Roditi, I.J., Eichhorn, M., Williams, R.O. (1988): *Theileria parva* induces autocrine growth of bovine lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:4730-4734.
- [15] Crabtree, G.R. (1989): Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243:355-361.

- [16] Hamann, A., Jablonski-Westrich, D., Thiele, H.-G. (1986): Contact interaction between lymphocytes is a general event following activation and is mediated by LFA-1. *Eur. J. Immunol.* 16:847-850.
- [17] Dobbelaere, D.A.E., Roditi, I.J., Williams, R.O. (1990): Transformed T cells can stimulate their own proliferation by cell-cell contact. (in prep.)
- [18] Smith, K.A. (1988): Interleukin-2: Inception, impact, and implications. *Science* 240:1169-1176.
- [19] Greene, W.C., Leonard, W.L. (1986): The human interleukin-2 receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 4:69-95.
- [20] Heußler, Volker (1990): Lymphokin Genexpression in *Theileria parva* infizierten Rinderlymphozyten. Diplomarbeit an der Fakultät für Bio- Geowissenschaften der Universität Karlsruhe (Institut für Genetik).
- [21] Coquerelle, T.M., Eichhorn, M., Magnunson, N.S., Reeves, R., Williams, R.O., Dobbelaere, D.A.E. (1989): Expression and characterization of the interleukin 2 receptor in *Theileria parva*-infected bovine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 19:655-659.
- [22] Lenardo, M.J., Baltimore, D. (1989): NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 58:227-229.
- [23] Ivanov, V., Stein, B., Baumann, I., Dobbelaere, D.A.E., Herrlich, P., Williams, R.O. (1989): Infection with the intracellular protozoan parasite *Theileria parva* induces constitutively high levels of NF- κ B in bovine lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 9:4677-4686.
- [24] Dröge, W. (1986): Protein kinase C in T cell regulation. *Immunol. Today* 7:340-343.
- [25] Isakov, N., Scholz, W., Altman, A. (1987): Effect of Cyclosporin A on early stages of T cell activation. *Transplant. Proc.* 19 (1):1186-1188.
- [26] Eichhorn, M., Magnunson, N.S., Reeves, R., Williams, R.O., Dobbelaere, D.A.E. (1990): IL2 can enhance the Cyclosporin A-mediated inhibition of *Theileria parva*-infected T cell proliferation. *J. Immunol.* 144:691-698.
- [27] Meurer, S., Resch, K. (1989): Cellular signalling in T lymphocytes. *Immunology Today* Suppl. 10:23-25.
- [28] Brown, W.C., Logan, K.S. (1986): Bovine T-cell clones infected with *Theileria parva* produce an IL2-like factor. *Parasite Immunol.* 8:189-192.
- [29] Dobbelaere, D.A.E., Prospero, T., Roditi, I.J., Kelke, C., Baumann, I., Eichhorn, M., Morrison, W.I., Ahmed, J.S., Clevers, H., Williams, R.O. (1990): Interleukin-2/Tac antigen expression in different leukocyte populations infected with *Theileria parva* or *Theileria annulata*. (in prep.)
- [30] Irvin, A.D., Brown, C.G.D., Kanhai, G.K., Stagg, D.A. (1975): Comparative growth of bovine lymphosarcoma cells and lymphoid cells infected with *Theileria parva* in athymic (nude) mice. *Nature* 255:713-714.
- [31] Irvin, A.D., Brown, C.G.D., Kanhai, G.K., Stagg, D.A. (1977): Establishment of *Theileria parva* tissue culture in swiss and athymic (nude) mice. *Veterinary Parasitol.* 3:141-160.

- [32] Maruyama, M., Shibuya, H., Harada, H., Hatekayama, M., Seiki, M., Fujita, T., Inoue, J., Yoshida, M., Taniguchi, T. (1987): Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-1-encoded p40^x and T3/Ti complex triggering. *Cell* 48:343-350.
- [33] Leung, K., Nabel, G.J. (1988): HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF- κ B- like factor. *Nature* 333:776-778.
- [34] Greene, W.C., Böhnlein, E., Ballard, D.W. (1989): HIV-1, HTLV-1 and normal T-cell growth: transcriptional strategies and surprises. *Immunol. Today* 10:272:278.
- [35] Foulds, L. (1954): The experimental study of tumor progression: A review. *Cancer Res.* 14:327-339.
- [36] Klein, G., Klein, E. (1985): Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature* 315:190-195.
- [37] Nowell, P.C. (1976): The clonal evolution of a tumor cell populations. *Science* 194:23-28.
- [38] Heldin, C.-H., Westermark, B. (1984): Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell* 37:9-20.
- [39] Sporn, M.B., Roberts, A.B. (1985): Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313:745-747.
- [40] Weinberg R.A. (1985): The actions of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* 230:770-776.
- [41] Klein, G. (1988): Cellular oncogene activation. Marcel Dekker, INC., New York, Basel.
- [42] Bishop, J.M. (1987): The molecular genetics of cancer. *Science* 235:305-311.
- [43] Studzinski, G.P., Brelvi, Z.S., Feldman, S.C., Watt, R.A. (1986): Participation of c-myc in DNA-synthesis. *Science* 234:467-470.
- [44] Land, H., Parada, L.F., Weinberg, R.A. (1983): Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 222:771-778.
- [45] Land, H., Parada, L.F., Weinberg, R.A. (1983): Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304:597-602.
- [46] Cleveland, J.L., Jansen, H.W., Bister, K., Fredericksen, T.N., Morse, III, H.C., Ihle, J.N., Rapp, U.R. (1986): Interaction between raf and myc oncogenes in transformation in vivo and in vitro. *J.Cell.Biochem.* 30:195-218.
- [47] Sager, R. (1989): Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 246:1406-1412.
- [48] Harris, H., Miller, O.J., Klein, G., Worst, P., Tachibana, T. (1969): Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 223:363-368.
- [49] Stanbridge, E.J., Der, C.J., Doersen, C.-J., Nishimi, R.Y., Peehl, D.M., Weissman, B.E., Wilkinson, J.E. (1982): Human cell hybrids: analysis of transformation and tumorigenicity. *Science* 215:252-259.
- [50] Harris, H. (1988): The analysis of malignancy by cell fusion: the position in 1988. *Cancer Res.* 48:3302-3306.

- [51] Weissman, B.E., Saxon, P.J., Pasquale, S.R., Jones, G.R., Geiser, A.G., Stanbridge, E.J. (1987): Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilm's tumor cell line controls its tumorigenic expression. *Science* 236:175-180.
- [52] Cavenee, W.K., Koufos, A., Hansen, M.F. (1986): Recessive mutant genes predisposing to human cancer. *Mutat. Res.* 168:3-14.
- [53] Lee, W.-H., Shew, J.-Y., Hong, F.D., Sery, T.W., Donoso, L.A., Young, L.-J., Bookstein, R., Lee, E.Y.-H. (1987): The retinoblastoma gene encodes a nuclear phosphoprotein with DNA binding activity. *Nature* 329:642-645.
- [54] DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.-Y., Huang, C.-M., Lee, W.-H., Marsilio, E., Paucha, E., Livingston, D.M. (1988): SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54:275-283.
- [55] Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.A., Hatlow, E. (1988): Association between an oncogene and an antioncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334:124-129.
- [56] Dyson, N., Howley, P.M., Münger, K., Harlow, E. (1989): The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934-937.
- [57] Hart, I.R., Goode, N.T., Wilson, R.E. (1989): Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochim. Biophys. Acta* 989:65-89.
- [58] Matrisian, L.M. (1990): Metalloproteases and their inhibitors in matrix remodeling. *TIG* 6121-125.
- [59] Schultz, R.M., Silberman, S., Persky, B., Bajkowski, A.S., Carmichael, D.F. (1988): Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res.* 48:5539-5545.
- [60] Hynes, R.O. (1987): Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554.
- [61] Roosiens, F.F., DeRijk, D., Bikker, A., Roos, E. (1989): Involvement of LFA-1 in lymphoma invasion and metastasis. *J. Cell. Biol.* 108:1979-1985.
- [62] Stoolman, L.M. (1989): Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 56:907-910.
- [63] Sher, B.T., Bargaze, R., Holzmann, B., Gallatin, W.M., Matthews, D., Wu, N., Ticker, L., Butcher, E.L., Weissman, I.L. (1988): Homing receptors and metastasis. In: *Advances in Cancer Res.* 51:361-390. Klein, G., Weinhouse, S. (eds.), Academic Press, New York.
- [64] Tanaka, K., Isselbacher, K.J., Khoury, G., Jay, G. (1985): Reversal of oncogenesis by the expression of a major histocompatibility complex class I gene. *Science* 228:26-30.
- [65] Bernards, R. (1987): Suppression of MHC gene expression in cancer cells. *TIG* 3:298-301.
- [66] Varma, R.S. (1987): Chromosomal abnormalities in neoplastic diseases. In: *Manual of Clinical Oncology*. Rosenthal (ed.), C.I. Elsevier Scientific, New York.

- [67] Horowitz, J.M., Yandell, D.W., Park, S.-H., Canning, S., Whyte, P., Buchkovich, K., Harlow, E., Weinberg, R.A., Dryja, T.P. (1989): Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* 244:937-940.
- [68] Shew, J.-Y., Lin, B.T.-Y., Chen, P.-L., Tseng, B.Y., Yang-Feng, T.L. (1990): C-terminal truncation of the retinoblastoma gene product leads to functional inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6-10.
- [69] Holliday, R., Pugh, J.E. (1975): DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187:226-232.
- [70] Cedar, H. (1988): DNA methylation and gene activity. *Cell* 53:3-4.
- [71] Razin, A., Cedar, H. and Riggs, A.D. eds. (1984): *DNA Methylation: Biochemistry and Biological Significance*. Springer Verlag, New York.
- [72] Riggs, A.D., Jones, P.A. (1983): 5-methylcytosine, gene regulation and cancer. *Adv. Cancer Res.* 40:1-30.
- [73] Jones, P.J. (1986): DNA methylation and cancer. *Cancer Res.* 46:461-466.
- [74] Wigler, M., Levy, D., Perucho, M. (1981): The somatic replication of DNA methylation. *Cell* 24:33-40.
- [75] Groudine, M., Conklin, K.F. (1985): Chromatin structure and de novo methylation of sperm DNA: implication for activation of paternal genome. *Science* 228: 1061-1068.
- [76] Jaenisch, R., Jähner, D. (1984): Methylation, expression and chromosomal position of genes in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 782:1-9.
- [77] Gasson, J.C., Ryden, T., Bourgeois, S. (1983): Role of de novo methylation in the glucocorticoid resistance of T-lymphoid cell line. *Nature* 302:621-623.
- [78] Günthert, U., Schweiger, M., Stupp, M., Doerfler, W. (1976): DNA methylation in adenovirus, adenovirus-transformed cells, and host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73:3923-3927.
- [79] Pollack, Y., Stein, R., Razin, A., Cedar, H. (1980): Methylation of foreign DNA sequences in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:6463-6467.
- [80] Bestor, T.H., Ingram, V. (1983): Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:5559-5563.
- [81] Yisraeli, J., Szyf, M. (1984): Gene methylation patterns and expression. In: *DNA Methylation : Biochemistry and Biological Significance*. p353-378. Razin, A., Cedar, H. and Riggs, A.D. (eds.), Springer Verlag, New York.
- [82] Yisraeli, J., Adelstein, R.S., Melloul, D., Nudel, U., Yaffe, D., Cedar, H. (1986): Muscle-specific activation of a methylated chimeric actin gene. *Cell* 46:409-416.
- [83] Kelly, D.E., Pollok, B.A., Atchison, M.L., Perry, R.P. (1988): The coupling between enhancer activity and hypomethylation of kappa immunoglobulin genes is developmentally regulated. *Mol. Cell. Biol.* 8:930-937.

- [84] Schwartz, D. (1989): Gene-controlled cytosine demethylation in the promoter region of the Ac transposable element in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:2798-2793.
- [85] Bird, A.P. (1987): CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *TIG* 3:342-347.
- [86] Busslinger, M., Hurst, J., Flavell, R.A. (1983): DNA methylation and the regulation of globin gene expression. *Cell* 34:197-206.
- [87] Doerfler, W., Langner, K.-D., Kruczek, I., Vardimon, L., Renz, D. (1984): Specific promotor methylations cause gene inactivation. In: *DNA Methylation: Biochemistry and Biological Significance*. p221-241. Razin, A., Cedar, H. and Riggs, A.D. (eds.), Springer Verlag, New York.
- [88] Jones, P.A. (1985): Altering gene expression with 5-azacytidine. *Cell* 40:485-486.
- [89] Taylor, S.M., Constantinides, P.A., Jones, P.A. (1984): 5-azacytidine, DNA methylation, and differentiation. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 108:115-127.
- [90] Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.-H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A., Gehrke, C. (1983): Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucl. Acids Res.* 10:2709-2721.
- [91] Smookler Reis, R.J., Goldstein, S. (1982): Variability of DNA methylation patterns during serial passage of human diploid fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:3949-3953.
- [92] Monk, M. (1990): Variation in epigenetic inheritance. *TIG* 6:110-114.
- [93] Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J., Cedar, H. (1986): DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 44:535-543.
- [94] Becker, P.B., Ruppert, S., Schütz, G. (1987): Genomic footprinting reveals cell type-specific DNA binding ubiquitous factors. *Cell* 51:435-443.
- [95] Watt, F., Molloy, P.L. (1988): Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* 2:1136-1143.
- [96] Höller, M., Westin, G., Jiricny, J., Schaffner, W. (1988): Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes & Development* 2:1127-1135.
- [97] Swain, J.L., Stewart, T.A., Leder, P. (1987): Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting. *Cell* 50:719-727.
- [98] Saluz, H.P., Jiricny, J., Jost, J.P. (1986): Genomic sequencing reveals a positive correlation between the kinetics of strand-specific DNA methylation of the overlapping estradiol/glucocorticoid-receptor binding sites and the rate of avian vitellogenin mRNA synthesis. *Nucl. Acids Res.* 83:7167-7171.
- [99] Keshet, I., Yisraeli, J., Cedar, H. (1985): Effect of regional DNA methylation on gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:2560-2564.
- [100] Diala, E.S., Cheah, M.S.C., Rowitch, D., Hoffman, R.M. (1983): Extent of DNA methylation in human tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 71:755-764.

- [101] Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983): Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301:89-91.
- [102] Goelz, S.E., Vogelstein, B., Hamilton, S.R., Feinberg, A.P. (1985): DNA from benign and malignant human colon neoplasms is hypomethylated. *Science* 228:187-190.
- [103] Kerbel, R. S., Frost, P., Liteplo, R., Carlow, D., Elliott, B.E. (1984): Possible epigenetic mechanisms of tumor progression: induction of high frequency heritable but phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment. *J. Cell Physiol.* 3:87-97.
- [104] Hori, T.A. (1983): Induction of chromosome decondensation, sister chromatid exchanges and endoreduplication by 5-azacytidine, an inhibitor of DNA methylation. *Mutat. Res.* 121:47-52.
- [105] Wilson, V.L., Jones, P.A. (1983): Inhibition of DNA methylation by chemical carcinogens in vitro. *Cell* 32:239-246.
- [106] Lieberman, M.W., Beach, L.R., Palmiter, R.D. (1983): Ultraviolet radiation-induced metallothionein-I gene activation is associated with extensive DNA demethylation. *Cell* 35:207-214.
- [107] Kastan, M.B., Gowans, B.J., Lieberman, M.W. (1982): Methylation of deoxycytidine incorporated by excision-repair synthesis of DNA. *Cell* 30:509-516.
- [108] Kintner, C., Sudgen, B. (1981): Conservation and progressive methylation of Epstein-Barr viral DNA sequences in transformed cells. *J. Virol.* 38:305-316.
- [109] Sharma, S., Biswal, N. (1977): Studies on the in vivo methylation of replicating herpes simplex virus type 1 DNA. *Virology* 82:265-274.
- [110] Jähner, D., Stuhlmann, H., Stewart, C.L., Harbers, K., Löhler, J., Simon, I., Jaenisch, R. (1982): De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* 298:623-628.
- [111] Jähner, D., Jaenisch, R. (1985): Retrovirus-induced de novo methylation of flanking sequences correlates with gene activity. *Nature* 315:594-597.
- [112] Szyf, M., Eliasson, L., Mann, V., Klein, G., Razin, A. (1985): Cellular and viral DNA hypomethylation associated with induction of Epstein-Barr virus lytic cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:8090-8094.
- [113] Lichtenberg, Ü., Zock, C., Doerfler, W. (1988): Integration of foreign DNA into mammalian genome can be associated with hypomethylation at site of insertion. *Virus Research* 11:335-342.
- [114] Macnab, J.C.M., Adams, R.L.P., Rinaldi, A., Orr, A., Clark, L. (1988): Hypomethylation of host cell DNA synthesized after infection or transformation of cell by herpes simplex virus. *Mol. Cell. Biol.* 8:1443-1448.
- [115] Cheah, M.S.C., Wallace, C.D., Hoffman, R.M.: Hypomethylation of DNA in human cancer cells (1984): A site-specific change in the c-myc oncogene. *J. Natl. Cancer Inst.* 73:1057-1065.
- [116] Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983): Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111:47-54.

- [117] Borrello, M.G., Pierotti, M.A., Bongarzone, I., Donghi, R., Mondellini, P., Porta, G.D. (1987): DNA methylation affecting the transforming activity of the human Ha-ras oncogene. *Cancer Research* 47:75-79.
- [118] Borrello, M.G., Pierotti, M.A., Donghi, R., Bongarzone, I., Cattadori, M.R., Traversari, C., Mondellini, P., Porta, G.D. (1988): Modulation of the human Harvey-ras oncogene expression by DNA methylation. *Oncogene Research* 2:197-203.
- [119] Bustros de, A., Nelkin, B.D., Silverman, A., Ehrlich, G., Poiesz, B., Baylin, S.B. (1989): The short arm of chromosome 11 is a 'hot spot' for hypermethylation in human neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5693-5697.
- [120] Franke, U. (1990): A gene for Wilms' tumour? *Nature* 343:692-694.
- [121] Carr, B.I., Reilly, J.G., Smith, S.S., Winberg, C., Riggs, A. (1984): The tumorigenicity of 5-azacytidine in the male Fischer rat. *Carcinogenesis* 5:1583-1590.
- [122] Hsiao, W.-L.W., Galtoni-Celli, S., Weinstein, I.B. (1985): Effect of 5-azacytidine on the progressive nature of cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* 5:1800-1803.
- [123] Olsson, L., Forchhammer, J. (1984): Induction of metastatic phenotype in a mouse tumor model by 5-azacytidine, and characterization of an antigen associated with metastatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3389-3393.
- [124] Babiss, L.E., Zimmer, S.G., Fisher, P.B. (1985): Reversibility of progression of the transformed phenotype in Ad5-transformed rat embryo cells. *Science* 228:1099-1101.
- [125] Chambers, A.F., Harris, J.F., Ling, V., Hill, R. (1984): Rapid phenotype variation in cells derived from lung metastasis of KHT fibrosarcoma. *Invasion Metastasis* 4:225-237.
- [126] Rapp, U.R., Goldsborough, M.D., Mark, G.E., Bonner, T.I., Groffen, J., Reynolds, JR., F.H., Stephenson, J.R. (1983): Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:4218-4222.
- [127] Coll, J., Righi, M., de Taisna, C., Dissous, C., Gégonne, A., Stehelin, D. (1983): Molecular cloning of the avian acute transforming retrovirus MH2 reveals a novel cell-derived sequence (v-mil) in addition to myc. *EMBO J.* 2 (12):2189-2194.
- [128] Jansen, H.W., Lurz, R., Bister, K., Bonner, T.I., Mark, G.E., Rapp, U.R. (1984): Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611. *Nature* 307:281-284.
- [129] Bonner, T.I., Kerby, S.B., Sutrave, P., Gunnell, M.A., Mark, G., Rapp, U.R. (1985): Structure and biological activity of human homologs of the raf/mil oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 5:1400-1407.
- [130] Bonner, T.I., Oppermann, H., Seeburg, P., Kerby, S.B., Gunnell, M.A., Young, A., Rapp, U.R. (1986): The complete coding sequence of the human raf oncogene and the corresponding structure of the c-raf-1 gene. *Nucl. Acids. Res.* 14:1009-1015.
- [131] Nishida, Y., Hata, M., Ayaki, T., Ryo, H., Yamagata, M., Shimizu, K., Nishizuka, Y. (1988): Proliferation of both somatic and germ line cells is affected in the *Drosophila* mutants of raf protooncogene. *EMBO J.* 7:775-781.

- [132] Rapp, U.R., Cleveland, J.L., Bonner, T.I., Storm, S.M. (1988): The raf oncogenes. In: Handbook of oncogenes. p213. Reddy, R.C. et al. (eds.), Elsevier Publishing, Amsterdam.
- [133] Rapp, U.R., Heidecker, G., Huleihel, M., Cleveland, J.L., Choi, W.C., Pawson, T., Ihle, J.N., Anderson, W.B. (1988): raf family serine/threonine protein kinases in mitogen signal transduction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 53:173-184.
- [134] Moelling, K., Heimann, B., Beimling, P., Rapp, U.R., Sander, T. (1984): Serine- and threonine-specific kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins. Nature 312:558-561.
- [135] Mölders, H., Defesche, J., Müller, D., Bonner, T.I., Rapp, U.R., Müller, R. (1985): Integration of transfected LTR sequences into the c-raf proto-oncogene: activation by promoter insertion. EMBO J. 4:693-698.
- [136] Mark, G.E., Rapp, U.R. (1984): Primary structure of v-raf: relatedness to the src family of oncogenes. Science 224:285-289.
- [137] Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Rapp, U.R., Roberts, T.M. (1988): Signal transduction from membrane to cytoplasm: growth factors and membrane-bound oncogene products increase raf-1 phosphorylation and associated protein kinase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8855-8859.
- [138] Wasylyk, C., Wasylyk, B., Heidecker, G., Huleihel, M., Rapp, U.R. (1989): Expression of raf oncogenes activates the PEA1 transcription factor motif. Mol. Cell. Biol. 9:2247-2250.
- [139] Chiu, R., Boyle, W.J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T., Karin, M., (1988): The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. Cell: 54:541-552.
- [140] Jamal, S., Ziff, E. (1990): Transactivation of c-fos and beta-actin genes by raf as a step in early response to transmembrane signals. Nature 344:463-466.
- [141] Müller, R. (1986): Cellular and viral fos genes: structure, regulation of expression and biological properties of their encoded products. Biochim. Biophys. Acta 823:207-225.
- [142] Shimizu, K., Nakatsu, Y., Sekiguchi, M., Hokamura, K., Tanaka, K., Terada, M., Sugimura, T. (1985): Molecular cloning of an activated human oncogene, homologous to v-raf, from primary stomach cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. 82:5641-5645.
- [143] Stanton, JR., V.P., Cooper, G.M. (1987): Activation of human raf transforming genes by deletion of normal amino-terminal coding sequences. Mol. Cell. Biol. 7:1171-1179.
- [144] Kasid, U., Pfeifer, A., Weichselbaum, R.R., Dritschilo, A., Mark, G.E. (1987): The raf oncogene is associated with a radiation-resistant human laryngeal cancer. Science 237:1039-1041.
- [145] Rapp, U.R., Huleihel, M., Pawson, T., Linnoila, I., Minna, J.D., Heidecker, G., Cleveland, J.L., Beck, T., Forchhammer, J., Storm, S.M. (1988): Role of raf oncogene in lung carcinogenesis. Lung Cancer 4:162-167.
- [146] Boumpas, D.T., Tsokos, G.C., Mann, D.L., Eleftheriades, E.G., Harris, C.C., Mark, G.E. (1986): Increased proto-oncogene expression in peripheral blood lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. Arthritis and Rheumatism 29:755-760.

- [147] Bonner, T., O'Brien, S.J., Nash, W.G., Rapp, U.R., Morton, C.C., Leder, P. (1984): The human homologs of the raf(mil) oncogene are located on human chromosomes 3 and 4. *Science* 223:535-537.
- [148] Mark, G.E., Pfeifer, A., Mann, D.L., Harris, C.C., Berman, R., Pert, C.B. (1988): raf protooncogene expression in neural and immune tissues. In: Psychological, Neuropsychiatric, and Substance Abuse Aspects of AIDS. Bridge, T.P. et al. (eds.), Raven Press, New York.
- [149] Rapp, U.R., Cleveland, J.L., Fredrickson, T.N., Holmes, K.L., Morse III, H.C., Jansen, H.W., Patschinsky, T., Bister, K. (1985): Rapid induction of hemopoietic neoplasms in newborn mice by a raf(mil)/myc recombinant murine retrovirus. *J. Virol.* 55:23-33.
- [150] Alexander, W.S., Adams, J.M., Cory, S. (1989): Oncogenic cooperation in lymphocyte transformation: malignant conversion of E μ -myc transgenic pre-B cells in vitro is enhanced by v-H-ras or v-raf but not v-abl. *Mol. Cell. Biol.* 9:67-73.
- [151] Lindsay, S., Bird, A. (1987): Use of restriction enzymes to detect potential gene sequences in mammalian DNA. *Nature* 327:336-338.
- [152] Smith, C.L., Warburton, P.E., Gaal, A., Cantor, C.R. (1986): Analysis of genome organization and rearrangements by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Genet. Eng.* 8:45-70.
- [153] Barlow, D.P., Lehrach, H. (1987): Genetics by gel electrophoresis: the impact of pulsed field gel electrophoresis on mammalian genetics. *TIG* 3 (6):167-171.
- [154] Pohl, T.M., Zimmer, M., MacDonald, M.E., Smith, B., Bucan, M., Poustka, A., Volinia, S., Searle, S., Zehetner, G., Wasmuth, J.J., Gusella, J., Lehrach, H., Frischauf, A.-M. (1988): Construction of a NotI linking library and isolation of new markers close to Huntington's disease gene. *Nucl. Acids Res.* 16:9185-9198.
- [155] Emery, D.L., Morrison, W.I., Nelson, R.T., Murray, M. (1981): The induction of cell-mediated immunity in cattle inoculated with cell lines parasitized with *Theileria parva*. In: Irvin, A.D. (ed), *Advances in the control of Theileriosis*, p295-310, Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands.
- [156] Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of E.coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- [157] Laemmli, U. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- [158] Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 16:1215.
- [159] Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (eds.) (1982): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY.
- [160] Rigby, P.W.J., Diekmann, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA-polymerase I. *J.Mol.Biol.* 113:237-251.
- [161] Feinberg, A.B., Vogelstein (1984): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Add. Anal. Biochem.* 137:266-267.

- [162] Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- [163] Thomas, P.S. (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:5201-5205.
- [164] Sanger, F., Nicklen, S. Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467.
- [165] Mastro, A.M., Pepin, K.G. (1980): Suppression of lectin-stimulated DNA synthesis in bovine lymphocytes by the tumor promoter TPA. *Cancer Res.* 40:3307-3312.
- [166] Finger, L.R., Harvey, R.C.M., Moore, R.C.A., Showe, L.C., Croce, C.M. (1986): A common mechanism of chromosomal translocations in T- and B-cell neoplasia. *Science* 234:982-984.
- [167] Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D., Leder, P. (1983): Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factors. *Cell* 36:603-610.
- [168] Ehrfeld, A. (1989): Isolierung und Charakterisierung des Aktin-Gens des intrazellulären Parasiten *Theileria parva*. Dissertation an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.
- [169] Kolch, W., Schultz, A.M., Oppermann, H., Rapp, U.R. (1988): Preparation of raf-oncogene-specific antiserum with raf-Protein produced in *E.coli*. *Biochem. Biophys. Acta* 949:233-239.
- [170] Richards, T. (1989): DNA molecules observed. *Nature* 338:461-462.
- [171] Schwartz, D.C., Koval, M. (1989): Conformational dynamics of individual DNA molecules during gel electrophoresis. *Nature* 338:520-522.
- [172] Carle, G.F., Olson, M.V. (1984): Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 12:5647-5664.
- [173] Carle, G.F., Frank, M., Olson, M.V. (1986): Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 232:65-68.
- [174] Langlotz, G. (1989): Entwurf einer computergesteuerten Pulsfeldelektrophorese (FIGE-'Field Inversion Gel Electrophoresis') zur Trennung langkettiger DNA-Moleküle. Diplomarbeit. Fakultät f. Informatik und Institut f. Genetik, Universität Karlsruhe.
- [175] Malmquist, W.A., Nyindo, M.B., Brown, C.G. (1970): East Coast fever: cultivation in vitro of bovine spleen cell lines infected and transformed by *Theileria parva*. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 2:139-145.
- [176] Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A. (1978): Analysis and separation using fluorescence activated cell sorter (FACS). In: Weir, D.M. (ed.), *Handbook of experimental immunology*, Vol.3, Chapt. 22:1-21, Blackwell Scientific, Oxford.
- [177] Stanbridge, E.J., Perkins, F.T. (1976): Tumourigenicity testing in immunosuppressed mice: advantages and disadvantages. *Develop. biol. Standard.* 37:211-217.
- [178] Wolf, S.F., Migeon, B.R. (1982): Studies of X-chromosome DNA methylation in normal human cells. *Nature* 295:667-671.

- [179] Fidler, I.J., Hart, I.R. (1982): Biological diversity in metastatic neoplasm: origin and implications. *Science* 217:998-1003.
- [180] Frost, P., Kerbel, R.S. (1983): On a possible epigenetic mechanism(s) of tumor cell heterogeneity - The role of DNA methylation. *Cancer Metastasis Review* 2:375-378.
- [181] Bolden, A.H., Nalin, C.M., Ward, C.A., Poonian, M.S., McComas, W.W., Weissbach, A. (1985): DNA methylation: sequences flanking C-G pairs modulate the specificity of the human DNA methylase. *Nucl. Acids Res.* 13:3479-3494.
- [182] Bolden, A.H., Nalin, C.M., Ward, C.A., Poonian, M.S., Weissbach, A. (1986): Primary DNA sequence determines sites of maintenance and de novo methylation by mammalian methyltransferases. *Mol. Cell. Biol.* 6:1135-1140.
- [183] Bestor, T. (1987): Supercoiling-dependent sequence specificity of mammalian DNA methyltransferase. *Nucl. Acids Res.* 15:3835-3843.
- [184] Selker, E.U., Jensen, B.C., Richardson, G.A. (1987): A portable signal causing faithful DNA methylation de novo in *Neurospora grassa*. *Science* 238:48-53.
- [185] Smookler Reis, R.J., Goldstein, S. (1982): Interclonal variation in methylation patterns for expressed and non-expressed genes. *Nucl. Acids Res.* 10:4293-4304.
- [186] Cambereri, E.B., Jensen, B.C., Schabtach, E., Selker, E.U. (1989): Repeat-induced G-C to A-T mutations in *Neurospora*. *Science* 244:1571-1575.
- [187] Popovic, M., Lange-Wantzin, G., Sarin, P.S., Mann, D., Gallo, R.C. (1989): Transformation of human umbilical cord blood T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:5402-5406.
- [188] Ballas, Z.K. (1984): The use of 5-azacytidine to establish constitutive interleukin 2-producing clones of EL4 thymoma. *J. Immunol.* 133:7-9.
- [189] Holliday, R. (1987): The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238:163-170.
- [190] Compere, S.J., Palmiter, R.D. (1981): DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene in lymphoid cells. *Cell* 25:233-240.
- [191] Harris, M. (1982): Induction of thymidine kinase in enzyme-deficient chinese hamster cells. *Cell* 29:483-492.
- [192] Gardiner, K., Horisberger, M., Kraus, J., Tantravahi, U., Korenberg, J., Rao, V., Reddy, S., Patterson, D. (1990): Analysis of human chromosome 21: correlation of physical and cytogenetic maps; gene and CpG island distributions. *EMBO J.* 9:25-34.
- [193] Adams, R.L.P., Fulton, J., Kirk, D. (1982): The effect of 5-azadeoxycytidin on cell growth and DNA methylation. *Biochim. Biophys. Acta* 697:286-294.
- [194] Duprez, V., Lenoir, G., Dautry-Varsat, A. (1989): Autocrine growth stimulation of a human T-cell lymphoma line by interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:6932-6936.
- [195] Karasuyama, H., Tohayama, N., Tada, T. (1989): Autocrine growth and tumorigenicity of interleukin 2-dependent helper T cells transfected with IL2-Gene. *J. Exp. Med.* 169:13-25.

- [196] Fitzgerald, D.J., Murray, A.W. (1980): Inhibition of intercellular communication by tumor-promoting phorbol esters. *Cancer Res.* 40:2935-2937.
- [197] Hoshino, H., Miwa, M., Fujiki, H., Sugimura, T. (1980): Aggregation of human lymphoblastoid cells by tumor-promoting phorbol esters and dihydroteleocidin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 95:2-8.
- [198] Deguchi, Y., Negoro, S., Hara, H., Kishimoto, S. (1988): 5-azacytidine induced inhibition of mitogenic response by agents that activate or augment activation of human peripheral blood T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 151:1395-1401.
- [199] Weinstein, I.B., Lee, L.-S., Fisher, P.B., Mufson, A., Yamasaki, H. (1979): Action of phorbol esters in cell culture: mimicry of transformation, altered differentiation, and effects on cell membranes. *J. Supramolecular Structure* 12:195-208.
- [200] Patarroyo, M., Yogeeswaran, G., Biberfeld, P., Klein, E., Klein, G. (1982): Morphological changes, cell aggregation and cell membrane alterations caused by phorbol 12,13-dibutyrate in human blood lymphocytes. *Int. J. Cancer* 30:707-717.
- [201] Blumberg, P.M. (1988): Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.* 48:1-8.
- [202] Nishizuka, Y. (1984): The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308:693-698.
- [203] Mastro, A.M., Pepin, K.G. (1974): Synergistic action of phorbol esters in mitogen-activated bovine lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 88:40-46.
- [204] Truneh, A., Albert, F., Golstein, P., Schmitt-Verhulst, A.-M. (1985): Early steps in lymphocyte activation can be bypassed by calcium ionophores and phorbol esters. *Nature* 313:318-320.
- [205] Springer, T.A., Dustin, M.L., Kishimoto, T.K., Marlin, S.D. (1987): The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immunosystem. *Ann. Rev. Immunol.* 5:223-252.
- [206] Makgoba, M.W., Sanders, M.E., Shaw, S. (1989): The CD2-LFA-3 and LFA-1-ICAM pathways: relevance to T-cell recognition. *Immunology Today* 10:417-422.
- [207] Haynes, B.F., Telen, M.J., Hale, L.P., Denning, S.P. (1989): CD44 - a molecule involved in leucocyte adherence and T-cell activation. *Immunology Today* 10:423-428.
- [208] Weiss, A.J., Imboden, J., Hardy, K., Terhorst, C., Stobo, J. (1986): The role of T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 4: 593-619.
- [209] Rothlein, R., Springer, T.A. (1986): The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J. Exp. Med.* 163:1132-1149.
- [210] Rothlein, R., Dustin, M.L., Marlin, S.D., Springer, T.A. (1986): A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* 1270-1274.
- [211] Ormerod, E.J., Everett, C.A., Hart, I.R. (1986): Enhanced experimental metastatic capacity of a human tumor cell line following treatment with 5-Azacytidine. *Cancer Res.* 46:884-809.

- [212] Stanbridge, E.J., Wilkinson, J. (1978): Analysis of malignancy in human cells: malignant and transformed phenotypes are under separate genetic control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:1466-1469.
- [213] Baylin, S.B., Fearon, E.R., Vogelstein, B., de Bustros, A., Sharkis, S.J., Burke, P.J., Staal, S.P., Nelkin, B.D. (1987): Hypermethylation of the 5' region of the Calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies. *Blood* 70:412-417.
- [214] Gessler, M., Bruns, G.A.P. (1989): A physical map around the WAGR complex on the short arm of chromosome 11. *Genomics* 5:43-55.
- [215] Rose, E.A., Glaser, T., Jones, C., Smith, C.L., Lewis, W.H., Call, K.M., Minden, M., Champagne, E., Lewis, W., Bonetta, L., Yeger, H., Housman, D.E. (1990): Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilm's tumor gene. *Cell* 60:495-508.
- [216] Gessler, M., Pouska, A., Cavanee, C.A., Never, R.L., Orkin, S.H., Prons, G.A.P. (1990): Homozygeous deletion in Wilms' tumours of a zinc finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343:774-778.
- [217] Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W.H., Jones, C., Housman, D.E. (1990): Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60:509-520.
- [218] Estivill, X., Williamson, R. (1987): A rapid method to identify cosmids containing rare restriction sites. *Nucl. Acids. Res.* 15:1415-1425.
- [219] Johnson, J.P., Stade, B.G., Holzmann, B., Schwable, W., Riethmuller, G. (1989): De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma with increased risk for metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:641-644.