

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med H-K Müller-Hermelink

Die Rolle der DNA-Methylierung in der Kontrolle des
MHC II-spezifischen Typ IV Promotors in Thymomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Marie-Annette Strehl
aus Stuttgart

Würzburg, Dezember 2004

Referent: Prof. Dr. med A. Marx
Koreferent: Prof. Dr. med. Rieckmann
Dekan: Prof. Dr. med. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 2005

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1.	Thymome und ihre Einteilung	1
1.2.	Assoziierte paraneoplastische Syndrome	1
1.3.	T-Zell-Reifung und –Selektion	2
1.4.	MHC II-Expression in Thymomen	4
1.5.	Kontrolle der MHC II-Expression	5
1.6.	Der Class II-Transaktivator	6
1.7.	CIITA-Expression und ihre Kontrolle	6
1.8.	Epigenetische Mechanismen der Genregulation	8
1.9.	Arbeitshypothese	9

2. Material und Methoden

2.1.	Patienten und Tumoren	10
2.2.	Prinzip der Methylierung	10
2.2.1.	Prinzip der Bisulfit-Methode für methylocytosin mapping (nach M.Strasser und S. Chuvpilo)	11
2.3.	Sequenz des Promotors	12
2.3.1.	Sequenz des Typ IV Promotors nach Na-Bisulfit-Behandlung der DNA	13
2.4.	DNA-Extraktion aus Gewebeblöcken und Kulturzellen mit DNeasy Protokoll	13
2.5.	Photometrische DNA – Messung	14
2.6.	Methylierungsanalyse mittels Natrium-Bisulfit- Vorbehandlung	14
2.7.	PCR und Sequenzierung	15
2.7.1.	PCR	15
2.7.2.	Jetsorb DNA Extraktion aus Agarose Gel	16
2.7.3.	Sequencing PCR	17
2.7.4.	DNA-Aufreinigung für Sequenzierung	17
2.8.	Primer	18

2.9.	Immunhistochemie	19
2.10.	Statistik	19
2.11.	Reagenzien, Lösungen und Hersteller	19
3.	Ergebnisse	
3.1.	MG tritt gehäuft in Thymomen mit hoher MHC II-Expression auf	22
3.2.	WHO Typ A-Thymome weisen keine Mutationen in der Promotorregion des CIITA Typ IV auf	23
3.3.	Amplifizierung der extrahierten DNA durch PCR	24
3.4.	Sequenzierung von Typ A Thymomen	24
3.5.	Ergebnisse der Sequenzierung	25
3.6.	Methylierungsmuster vom Thymomen und Kontrollthymi im Vergleich	25
4.	Diskussion	28
5.	Zusammenfassung	33
6.	Literatur	34
7.	Verzeichnis der Abbildungen und Diagramme	41
8.	Abkürzungsverzeichnis	43

Danksagung

Lebenslauf

Meiner Familie

1. Einleitung

1.1 Thymome und ihre Einteilung

Thymome sind Tumoren des Thymusepithels und sind die häufigsten Tumoren des Thymus (Muller-Hermelink and Marx, 2000). Das durchschnittliche Lebensalter bei Diagnose liegt zwischen vierzig und fünfzig Jahren, bei Kindern sind Thymome sehr selten. Die aktuelle WHO-Klassifikation (Rosai and Sobin, 1999) unterscheidet fünf Hauptgruppen vom Thymomen, basierend auf der Morphologie der neoplastischen Epithelzellen und dem Gehalt an Lymphozyten: WHO Typ A (medulläre Thymome), Typ B (kortikale Thymome) und Mischtypen (Typ AB). Der Typ B wird noch weiter unterteilt in Typ B1 (vorwiegend kortikal), Typ B2 (kortikal) und Typ B3 (gut differenziertes Thymuskarzinom) (Kirchner et al., 1992). Thymome zeigen häufig funktionelle Eigenschaften des normalen Thymus, einschließlich dem “homing” und der Reifung von T-Zellen aus unreifen Vorstufen (Hoffacker et al., 2000; Muller-Hermelink and Marx, 2000).

1.2 Assoziierte paraneoplastische Syndrome

Klinisch bedeutend sind die paraneoplastischen Syndrome, die in einer großen Zahl der Fälle mit Thymomen assoziiert sind. Dies sind vor allem Autoimmunphänomene, insbesondere die Myasthenia gravis (MG), welche mit Abstand die häufigste Autoimmunkrankheit bei Thymompatienten ist (Marx et al., 2003).

Myasthenia gravis ist eine neuromuskuläre Autoimmunkrankheit, die in der überwiegenden Mehrzahl der Patienten durch spezifische Antikörper gegen den Acetylcholin-Rezeptor (AChR) hervorgerufen wird (Vincent, 2002). Die Autoantikörperproduktion ist ein T-Zell-abhängiger Prozess (Vincent and Willcox, 1999). Zusätzlich zu den Antikörpern gegen den AChR werden fast immer Autoantikörper gegen Muskelproteine gefunden, vor allem gegen Titin und den Ryanodin-Rezeptor (Marx et al., 1992; Marx et al., 1996; Mygland et al., 1994). Interessanterweise werden in Thymustumoren keine kompletten AChR- und Titin-

Moleküle exprimiert, sondern nur Neurofilamente mit Titin-ähnlichen Epitopen. Zusätzlich wird das AChR-Epitop-tragende Protein p153 exprimiert. Die Expression dieser Autoantigene mag ein Faktor in der Akkumulation AChR-reaktiver T-Zellen in Thymomen sein (Nenninger et al., 1998; Sommer et al., 1990). MG-assoziierte Thymome haben einige Eigenschaften gemeinsam: Erstens eine intratumoröse Thymopoiese, welche zur Entstehung potentiell autoreaktiver T-Zellen führt, zweitens die intratumoröse Anwesenheit von AChR-reaktiven T-Zellen, und drittens den Export von reifen T-Zellen in das periphere Immunsystem (Buckley et al., 2001; Hoffacker et al., 2000; Strobel et al., 2002). Die paraneoplastische Autoimmunität korreliert direkt mit der Fähigkeit des Tumors, reife naive T-Zellen in die Peripherie zu exportieren. Thymome vom WHO Typ AB, B2, und B3 sind mit Abstand die häufigsten Subtypen und weisen die höchste Assoziation mit MG auf. Diese Thymom-Subtypen weisen gleichzeitig eine weitgehend erhaltene intratumoröse Thymopoiese auf (Nenninger et al., 1998; Strobel et al., 2001). Thymome vom Typ A und C, bei denen die Thymopoiese minimal bis nicht vorhanden ist, beinhalten ein viel kleineres Risiko an MG zu erkranken.

1.3 T-Zell-Reifung und -Selektion

Voraussetzung für eine effiziente Thymopoiese ist die Kommunikation zwischen Thymozyten und Stroma, die für ein immunkompetentes und selbst-tolerantes T-Zell-Repertoire verantwortlich ist. Die neoplastische Umwandlung von Thymusepithelzellen verändert möglicherweise auch das thymische Mikromilieu und somit die interzelluläre Kommunikation, mit dem Resultat einer abnormalen intratumorösen T-Zell-Entwicklung (Strobel et al., 2001). Die T-Zell-Reifung erfolgt im Wesentlichen durch die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit Molekülen des „major histocompatibility complex“ (MHC) (**Abbildung 1**).

MHC Klasse I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) wird von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen erkannt und ist auf allen kerntragenden Körperzellen vorhanden. MHC Klasse II (HLA-DP, -DQ, -DR) wird von CD4⁺ T-Helfer-Zellen erkannt und wird konstitutiv nur auf der Oberfläche von professionellen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert (zum

Beispiel B-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen, Thymusepithelzellen und andere), kann aber durch die Wirkung von Interferon-gamma (IFN- γ) auch in anderen Geweben induziert werden (Viret and Janeway, 1999; Waldburger et al., 2003).

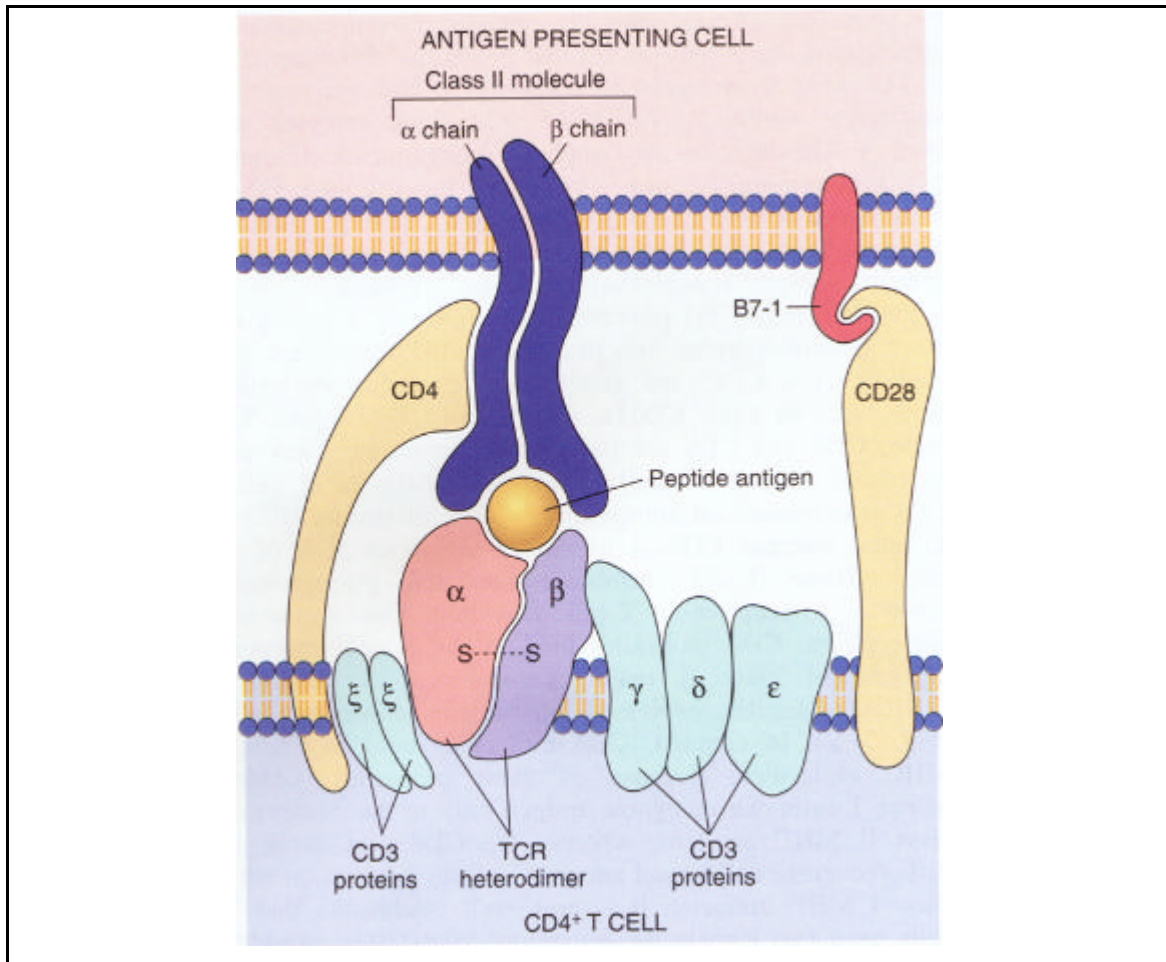


Abbildung 1: Die Interaktion zwischen dem major histocompatibility complex (MHC) und dem T-Zell-Rezeptor ist erforderlich für die zentralen Reifungsschritte der T-Zellen.

MHC II-Moleküle auf Thymusepithelzellen haben eine besonders wichtige Funktion für die Entstehung eines reifen, selbst-toleranten, aber immunkompetenten T-Zell-Repertoires. Dabei werden unreife T-Zellen mit körpereigenen „selbst“-Antigen-tragenden MHC II-Molekülen konfrontiert. Wenn die unreife T-Zelle keinen T-Zell-Rezeptor trägt, der das körpereigene MHC-Molekül erkennen kann, erhält sie kein

Überlebenssignal und stirbt („positive Selektion“). T-Zellen mit einer zu hohen Affinität zu körpereigenem Antigen/ körpereigenem MHC werden als potentiell autoreaktiv eliminiert („negative Selektion“) (Viret and Janeway, 1999).

1.4 MHC II-Expression in Thymomen

Ein häufiges Merkmal von Thymomen ist eine starke Reduktion der epithelialen MHC II-Expression, deren Ursache bislang nicht bekannt ist. Weiterhin korreliert das Ausmaß dieser Reduktion mit Störungen der intratumorösen T-Zell-Reifung und mit dem histologischen Tumorsubtyp (Strobel et al., 2001). Bei Typ B-Thymomen bleiben die Eigenschaften des normalen Thymuskortex erhalten, nämlich häufig starke MHC II-Expression und normale frühe T-Zell-Reifung bis in die späten Phasen der positiven Selektion. Im Gegensatz dazu weisen Typ AB- und Typ A-Thymome sehr stark reduzierte MHC II-Expression und eine stark abnormale frühe T-Zell-Reifung mit fehlerhafter positiver Selektion auf, während die terminale T-Zell-Reifung quantitativ weitgehend regelhaft verläuft (**Abbildung 2**).

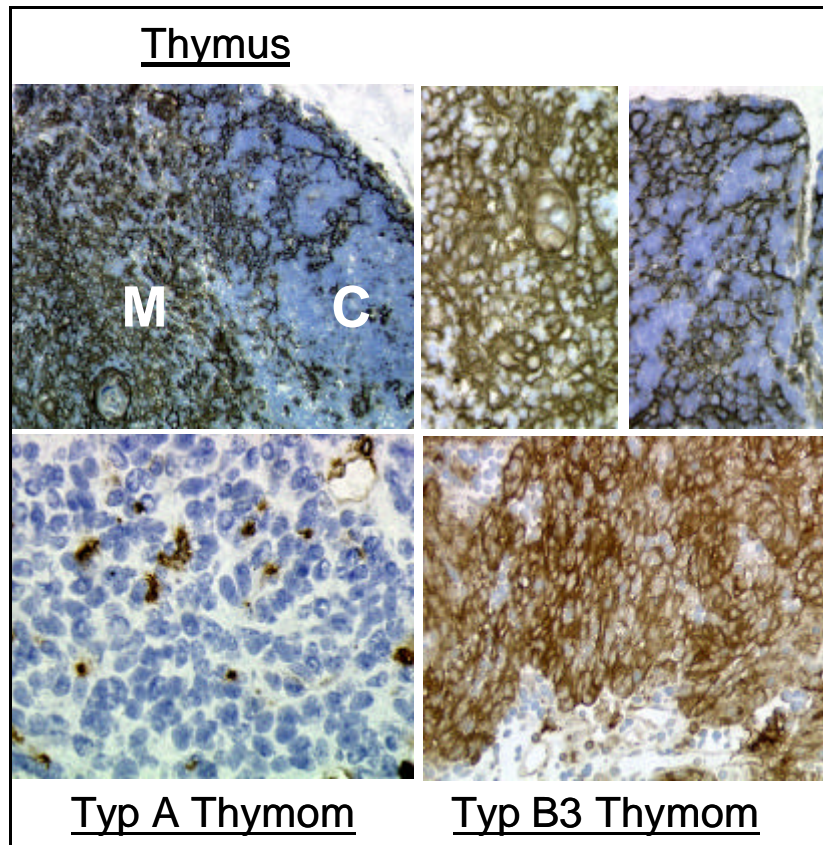


Abbildung 2: Im normalen Thymus sieht man ein Netzwerk aus kortikalen (C) und medullären (M) Epithelzellen, welche in dieser Färbung eine deutliche HLA-DR-Expression aufweisen. Typ A-Thymome zeigen immunhistochemisch keine Expression von HLA-DR, angefärbt sind Makrophagen (interne Kontrolle). In Typ B3-Thymomen ist hingegen häufig eine starke Expression von HLA-DR zu beobachten.

1.5 Kontrolle der MHC II-Expression

Die Expression des MHC II-Gens wird primär auf Transkriptionsebene kontrolliert (Ting and Trowsdale, 2002). Innerhalb des Promotors des MHC Gens gibt es verschiedene Bindungsstellen für essentielle Transkriptionsfaktoren. Die gebundenen Transkriptionsfaktoren fügen sich ihrerseits zu einem multimeren „MHC-enhanceosome“ zusammen. Die Bindungsstellen der Faktoren bilden ein kompaktes, hoch-konserviertes Motiv, welches vier Subelemente beinhaltet. Diese sind die W-box, an die sich als Transkriptionsfaktor der W-box-binding-factor bindet; die X1- und X2-

box welche die Transkriptionsfaktoren RFX und X2BP binden, und zuletzt die Y-box, welche NFY und YB1 bindet. YB1 ist ein Repressor der IFN- γ -stimulierten MHC II-Genexpression, NFY ein Aktivator. Der RFX-Komplex besteht aus verschiedenen Einzelementen, nämlich RFX5, RFXAP und RFXANK. RFX5 wird zusätzlich noch für die Expression der akzessorischen HLA-DM Gene benötigt. RFX, X2BP und NFY verbinden sich zu einen sehr stabilen Protein-DNA-Komplex, dem MHC II-enhanceosome.

1.6 Der Class II-Transaktivator

Diese Transkriptionsfaktoren allein reichen nicht aus, um die Transkription des MHC II-Gens einzuleiten. Das zentrale Regulationselement der MHC II-Genexpression ist der MHC Klasse II Transaktivator (Class II Transactivator, CIITA) (Steimle et al., 1993). CIITA ist ein Protein von 1130 Aminosäuren Länge, welches selbst nicht an die DNA bindet. Es funktioniert als molekularer Schalter, der die konstitutive und die induzierbare MHC II-Expression kontrolliert und reguliert (Rigaud et al., 1996). CIITA ermöglicht die Besetzung des MHC II-Promotors durch Transkriptionsfaktoren in vivo, indem es die Promotor-DNA für die Transkriptionsfaktoren erreichbar macht, hauptsächlich durch Veränderung der Chromatinstruktur des Promotors. Danach wird es selbst an das aus Transkriptionsfaktoren bestehende MHC II-enhanceosome gebunden (Masternak et al., 2000). Der CIITA-Pegel ist der wichtigste Faktor für die konstitutive und IFN- γ -induzierte MHC II-Transkription in vielen Zelltypen. CIITA- und MHC II-Expression sind qualitativ und quantitativ streng korreliert (Otten et al., 1998).

1.7 CIITA-Expression und ihre Kontrolle

Die Transkription des CIITA-Gens wird von vier alternativen, gewebsspezifischen Promotoren reguliert, Promotor I bis Promotor IV (Muhlethaler-Mottet et al., 1997) (**Abbildung 3**). Über alternatives splicing wird von jedem Promotor ein individuelles Genprodukt mit unterschiedlichem erstem Exon hergestellt, welches an ein

gemeinsames Exon 2 anknüpft. Während CIITA Typ I (PI) hauptsächlich von dendritischen Zellen und der Typ III (PIII) in B-Zellen exprimiert wird, ist der CIITA Typ IV (PIV) für die konstitutive MHC II- und IFN- γ -induzierte Expression in Thymusepithelzellen und für die IFN- γ -induzierte Expression in anderen Geweben verantwortlich. Die Funktion des CIITA Typ II ist bislang noch unklar. Ein Verlust des CIITA Typ IV Promotors führt zum Verlust der konstitutiven MHC II-Expression in Thymusepithelzellen (Waldburger et al., 2003).

Es hat sich gezeigt, dass sich innerhalb des CIITA Typ IV-Promotors vier verschiedene Regulationselemente befinden, die für die Kontrolle der Promotoraktivierung durch IFN- γ zuständig sind (Nikceвич et al., 1999; Piskurich et al., 1999; Piskurich et al., 1998). Die IFN- γ -Signalkaskade führt nach Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor zur Aktivierung von zwei Tyrosinkinase, Jak1 und Jak2. Diese phosphorylieren den latenten zyttoplasmatischen Transkriptionsfaktor Stat1, welcher in den Zellkern transloziert und an ein GAS-Element innerhalb des CIITA Typ IV bindet. Neben dem GAS-Element befinden sich eine E-Box, welche den Transkriptionsfaktor USF1 bindet, eine IRF1-Bindungsstelle (Stat1 induziert die Transkription von IRF1, welches dann an seine Bindungsstelle im CIITA Typ IV bindet) und eine NF-GMa-Bindungsstelle (**Abbildung 3**). Nur durch eine kooperative Interaktion zwischen diesen Transkriptionsfaktoren ist die spezifische Aktivierung des CIITA Typ IV Promotors durch IFN- γ möglich (Muhlethaler-Mottet et al., 1998). Für eine optimale Antwort ist die Anwesenheit aller vier Regulationselemente nötig.

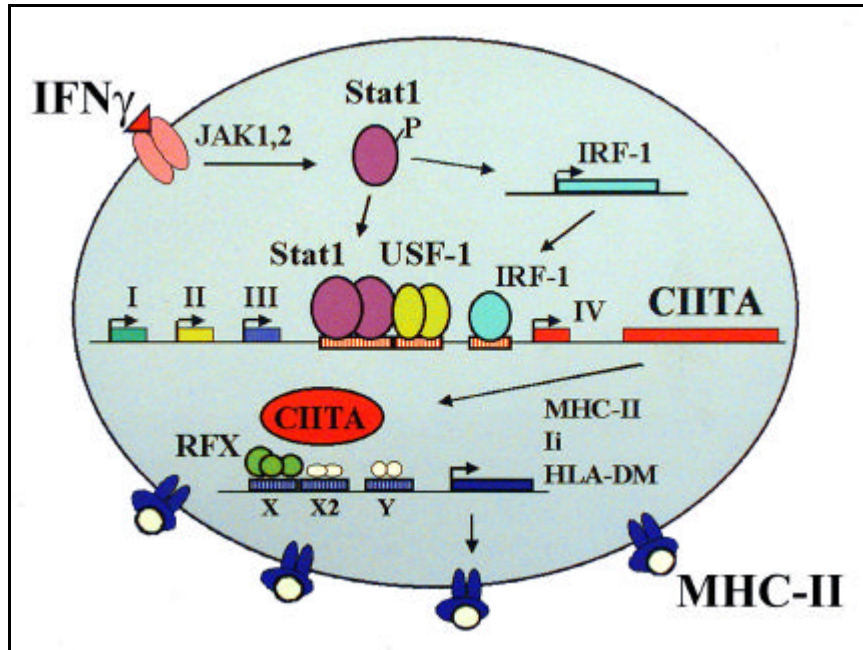


Abbildung 3: Der CIITA ist das zentrale Regulationmolekül in der MHC Klasse II-Expression. Der Promotor des CIITA-Gens hat vier mögliche Splicevarianten, wovon der Typ IV thymusspezifisch ist (aus:(Muhlethaler-Mottet et al., 1998))

1.8 Epigenetische Mechanismen der Genregulation

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Bedeutung der Expression des CIITA Typ IV Promotors in der Regulierung der MHC II-Expression in Thymomen. Neben einer Mutationsanalyse sollten auch epigenetische Mechanismen untersucht werden. Epigenetische Mechanismen verursachen Änderungen der Genexpression, die nicht mit einer Veränderung der kodierenden Sequenz der Gene einhergehen. Sie können mitotisch vererbt werden. Der am besten untersuchte epigenetische Mechanismus ist die DNA-Methylierung. Diese findet an Dinukleotiden mit einer Cytosin-Guanin-Sequenz statt. Genetische Regionen mit einer Häufung solcher konservierter CG-Sequenzen werden als CpG-islands bezeichnet. CpG-islands sind oft in der Promotorregion von Genen anwesend und normalerweise unmethyliert. Methylierung von CpG-islands führt meist zu einer Stilllegung des betreffenden Gens, es ist also ein Mechanismus, mit dem Gene oder Chromosomenabschnitte inaktiviert

werden können. Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA sind die häufigsten epigenetischen Veränderungen sowohl bei gutartigen als auch bei bösartigen Tumoren (Egger et al., 2004). Epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung sind weiterhin sehr wahrscheinlich an der Regulation des CIITA Typ IV Promotors und damit der MHC Klasse II-Expression in Thymusepithelzellen beteiligt (Holling et al., 2004; Morris et al., 2002; Morris et al., 2000; van den Elsen et al., 2001; van den Elsen et al., 2003).

1.9 Arbeitshypothese

Unsere Arbeitshypothese bestand darin, dass eine verstärkte Methylierung des CIITA Typ IV Promotors möglicherweise die Ursache der verminderten MHC II-Expression in Thymomen ist. Um dies zu untersuchen, wurde eine methylierungsspezifische PCR durchgeführt. Dazu benutzten wir DNA aus 27 Thymomen, zur Kontrolle wurden 9 Thymi von immunologisch gesunden Kontrollpersonen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Tumoren

Es wurden insgesamt 36 Patienten in die Untersuchungen einbezogen. Die Klassifizierung der Tumoren erfolgte anhand der aktuellen WHO-Klassifikation. 14 WHO Typ A-Thymome und 10 Typ B3-Thymome wurden untersucht, dazu 3 Epithelzelllinien mit und ohne IFN- γ -Stimulation. Als Kontrolle dienten 4 Kinderthymi und 5 Thymi von Personen über 65 Jahren aus dem Obduktionsgut des Pathologischen Institutes. Die Gewebe wurden unmittelbar nach Operation von einem Pathologen zugeschnitten und bei minus 80° C schockgefroren.

2.2 Prinzip der Methylierung

Eine Methylgruppe besteht aus einem Kohlenstoffatom mit drei Wasserstoffatomen. Sie kann kovalent an die DNA binden, wenn sie durch eine DNA-Methyltransferase an die C-5 Position eines Cytosin-Nukleotids angehängt wird, und zwar an stark konservierten Cytosin/Guanin Sequenzen (CpG-islands) (**Abbildung 4**). Die Methylierung von Cytosin ist reversibel und wird dynamisch durch die Methyltransferase kontrolliert. Das Methylierungsmuster einer somatischen Zelle wird vererbt und nach der DNA-Replikation durch die Methyltransferase wiederhergestellt. CpG-islands sind oft in den Promotoren von Genen anwesend und sind normalerweise unmethyliert. Methylierung von CpG-islands führt zu einer Stilllegung des betreffenden Gens.

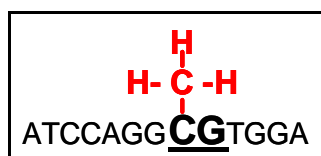


Abbildung 4: Methylierung erfolgt an stark konservierten CG-Sequenzen durch die Wirkung der Methyltransferase.

2.2.1 Prinzip der Bisulfit-Methode für Methlycytosin-Mmapping (nach M.Strasser und S. Chuvpilo)

Um das Methylierungsmuster des CIITA Typ IV Promotors zu untersuchen, muß die DNA so modifiziert werden, dass zwischen einem methylierten und einem unmethyliertem Cytosin unterschieden werden kann. Die Vorbehandlung mit einer Bisulfit-Lösung führt zur Konvertierung aller Cytosin-Nukleotide in Uracil-Nukleotide. Dies passiert allerdings nur, wenn die Cytosin-Nukleotide unmethyliert sind, weil die Methylierung sie gegen diese Modifikation resistent macht. Bei der nachfolgenden PCR-Amplifikation wird das Uracil wieder durch Thymin ersetzt (**Abbildung 5**). (Methode: (Herman et al., 1996; Lilischkis et al., 2000))

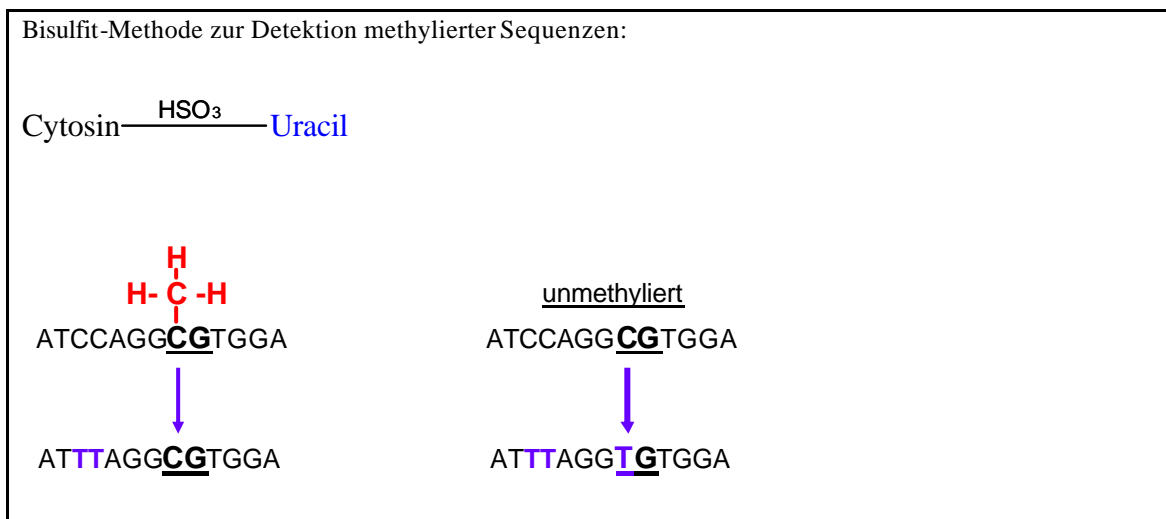


Abbildung 5: Mit der Bisulfit-Methode lassen sich methylierte von unmethylierten CG-Sequenzen unterscheiden, indem alle unmethylierten Cytosin-Moleküle in Uracil umgewandelt werden.

2.3 Sequenz des Promotors

Um den CIITA Typ IV Promotor unserer verschiedenen Proben durch Sequenzierung auf methylierte Stellen und Mutationen untersuchen zu können, mußte erst die ursprüngliche unveränderte Sequenz ermittelt werden. Dieser „Wildtyp“ des CIITA Typ IV wurde aus einer Genomdatenbank entnommen (**Abbildung 6**). Die Promotorregion des CIITA Typ IV enthält zahlreiche CpG-islands, CIITA ist somit ein potentielles Kandidatengen für Regulation durch Methylierung. Innerhalb der Promoterregion liegen die verschiedenen Bindungsstellen für die Regulationselemente NF κ B, NFGMa, die GAS-Box, die EBox und das IRF-Element. Von diesen Bindungsstellen enthält aber nur die USF-1 Bindungsstelle (die E-box) ein CpG-Island.



Abbildung 6: CIITA Typ IV Promotor und Exon 1 (Wildtyp), (Genbank Nummer Y18958)

2.3.1 Sequenz des Typ IV Promoters nach Na-Bisulfit-Behandlung der DNA

Im Vergleich zum Wildtyp sind nach der methylierungsspezifischen Vorbehandlung alle nicht-methylierten Cytosin-Nukleotide in Thymin umgewandelt (**Abbildung 7**).

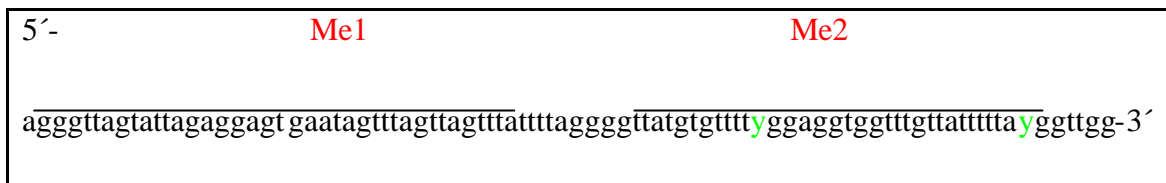


Abbildung 7: Ausschnitt des durch Na-Bisulfit-Vorbehandlung umgewandelten kodierenden DNA-Stranges (1st Strand). Darstellung der sense-primer Me 1 und Me 2. „Y“ zeigt potentiell methylierungsfähige C's in der Keimbahnsequenz an.

2.4 DNA-Extraktion aus Gewebeblöcken und Kulturzellen (DNeasy Protokoll)

Die DNA-Extraktion aus verschiedenen Geweben (Thymomgewebe, Restthymusgewebe, normales Gewebe aus Erwachsenen- und Kinderthymi und Kulturzellen) erfolgte mittels einen DNeasy-Kits nach den Angaben des Herstellers. Die DNA-Extraktion aus schockgefrorenen Gewebeblöcken erfolgte aus zwanzig 10 µm dicken Mikrotomschnitten. Die benötigte Menge Zellen (maximal 5×10^6) wurde für 5 Minuten zentrifugiert (1000 rpm). Das resultierende Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert, 200 µl Puffer AL wurden hinzugefügt und gut gemischt, bis eine homogene Lösung entstand. Anschließend wurden 20 µl Proteinase K hinzugefügt und die Probe für 10 Minuten bei 70° C inkubiert. Danach wurden 200 µl Ethanol (100 %) dazugegeben und die Probe gut gemischt. Die Probe wurde in ein DNeasy spin column pipettiert und bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Das DNeasy spin column wurde in ein neues Auffanggefäß gesetzt, 500 µl Puffer AW1 wurden hinzugefügt und bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Das DNeasy spin column wurde in ein neues Auffanggefäß gesetzt und 500 µl Puffer AW2 wurden hinzugefügt. Die Probe wurde für 3 Minuten (>10000

rpm) zentrifugiert, um das DNeasy spin column zu trocknen. Das DNeasy spin column wurde danach in ein sauberes 2 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt und mit 200 µl Puffer AE 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA durch 1 Minute bei 8000 rpm Zentrifugation eluiert. Das Eluat wurde ein zweites Mal durch den spin column zentrifugiert, um die maximal mögliche Menge an DNA zu extrahieren.

2.5 Photometrische DNA – Messung

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA wurde das Eluat auf eine Konzentration von 1:50 verdünnt. Davon wurde ein Volumen von 70 bis 100 µl entnommen und bei 260 nm photometrisch gemessen (Maßeinheit: OD). Vorher wurde zur Kontrolle eine Leerprobe mit Aqua bidest gemessen. 1 OD entsprach einer DNA-Konzentration von 50 µg / ml. Die resultierende DNA-Konzentration wurde nach folgender der Formel berechnet:

$OD \times 2500 = \text{DNA-Konzentration in } \mu\text{g} / \mu\text{l}.$

2.6 Methylierungsanalyse mittels Natrium-Bisulfit-Vorbehandlung

Die DNA wurde mit 1 / 20 ihres Volumens an Natrium Acetat und 2 Volumen 100 % Ethanol versetzt und mehrere Stunden bei -20° C präzipitiert. Danach wurde sie für 15 Minuten zentrifugiert (>10000 rpm) und einmal in 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in 20 µl Wasser aufgelöst, 5 µl 1M NaOH wurde hinzugefügt und die Lösung wurde für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurden 200 µl Bisulfit-Lösung dazugegeben und die Lösung 4 Stunden bei 50° C inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt:

Die DNA wurde mit 100 µl 3 M Na-Acetat, 460 µl Wasser und 750 µl Isopropanol versetzt und für 15 Minuten inkubiert. Danach wurde sie für 15 Minuten zentrifugiert

(>10000 rpm) und das Pellet einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 300 µl Wasser aufgelöst und danach nochmals mit 30 µl Na-Acetat und 750 µl 100 % Ethanol für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 15 Minuten zentrifugiert (>10000 rpm) und einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde anschließend in 100 µl 0,2 M NaOH aufgelöst und für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurde sie nochmals mit 100 µl 4 M NH₄⁺-Acetat (pH 7) und 750 µl 100 % Ethanol für 15 Minuten inkubiert, anschließend für 15 Minuten zentrifugiert (>10000 rpm) und einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl Wasser aufgenommen.

2.7 PCR und Sequenzierung

2.7.1 PCR

Die Bisulfit-behandelte DNA wurde mittels zweier PCR-Schritte amplifiziert. Dafür wurden 1,5 µl der gelösten DNA benutzt. Pro Ansatz wurden 24 µl Mastermix, 0,5 µl von jedem Primer, 0,13 µl Taq Polymerase und 1,5 µl DNA pipettiert. Die erste PCR-Runde bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 94° C, gefolgt von 40 PCR-Zyklen, wobei jeder Zyklus aus einem Denaturierungsschritt von 1 Minute bei 94° C, einem Annealingschritt von 1 Minute bei 60° C und einem Elongationsschritt von 2 Minuten bei 72° C bestand (5 min beim letzten PCR-Zyklus). Mit dem PCR-Produkt wurde ein Agarose-Gel angesetzt um zu kontrollieren, ob ein Fragment mit der erwarteten Länge amplifiziert wurde (**Abbildung 8a**). Von dem PCR-Produkt wurden jeweils 1,5 µl für eine semi-nested PCR benutzt. Anschließend wurde mit diesem zweiten PCR-Produkt (20-25 µl) ein präparatives Gel angesetzt und bei 60 V elektrophoretisch aufgetrennt (**Abbildung 8b**). Anschließend wurde das Gel mit low-UV Licht belichtet, die entsprechenden Banden auf dem Gel sehr knapp ausgeschnitten um Verunreinigung zu minimieren und in beschriftete Eppendorf-caps gegeben.

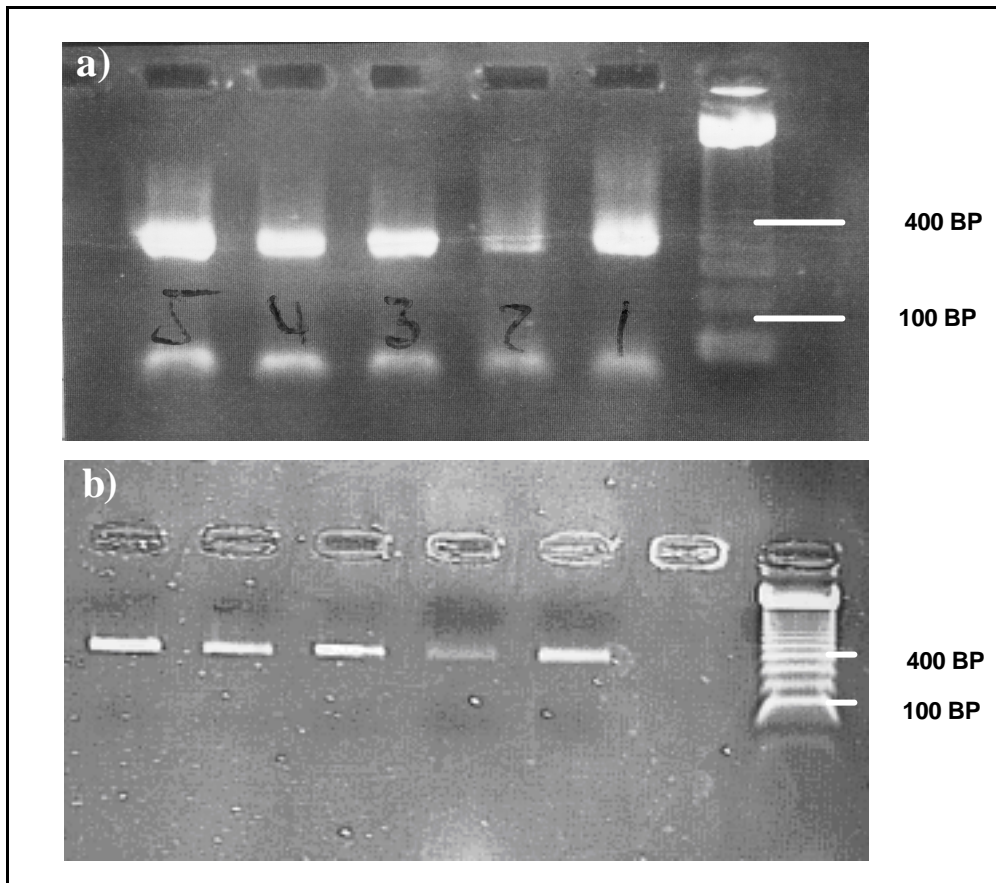


Abbildung 8: Ergebnisse der ersten PCR-Runde (a) und der nested PCR (b). In beiden Fällen war eine gut sichtbare Bande der erwarteten Länge (345 bp) nachweisbar.

2.7.2 Jetsorb DNA Extraktion aus Agarose Gel

Um die DNA aus dem Gel wieder herauszulösen, wurde sie mit einem Jetsorb Extraktions-Kit nach den Angaben des Herstellers behandelt. Für jede 100 mg Gel wurden 300 μ l buffer A1 und 10 μ l Jetsorb suspension hinzugefügt. Die Lösung wurde im vortex gemischt und bei 50 °C für 15 Minuten inkubiert, hierbei wurden die caps alle 3 Minuten geschüttelt. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (30 Sekunden bei >10000 rpm) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 300 μ l buffer A1 resuspendiert, nochmals 30 Sekunden bei > 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach wurde es in 300 μ l buffer A2 resuspendiert, 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand wieder abgenommen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Daraufhin wurde das Pellet bei 50° C getrocknet bis es ganz weiß und frei

von Ethanol war. Anschließend wurde es in 30 µl Wasser resuspendiert. Von dieser DNA wurde ein Gel angesetzt um abzuschätzen, wie viel DNA für die sequencing PCR eingesetzt werden mußte (meistens 3-5 µl).

2.7.3 Sequencing PCR

Für die sequencing PCR wurden pro Ansatz 2 µl Primer, 5 µl sequencing mix und 3-5 µl DNA in spezielle caps pipettiert. Die PCR bestand aus einem initialen Denaturationsschritt von 5 Minuten bei 94 °C, gefolgt von 40 PCR-Zyklen, wobei jeder Zyklus aus einem Denaturationsschritt von 1 Minute bei 94° C und einem Annealingschritt von 4 Minuten bei 60° C bestand. Als Primer wurde Me 3 benutzt.

2.7.4 DNA-Aufreinigung für Sequenzierung

Das PCR-Produkt wurde mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und über einer Sephadex-Säule aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA mit 10 µl Natrium-Acetat und 200 µl 100 % Ethanol versetzt, kurz im vortex gemischt und über Nacht bei -20° C präzipitiert. Danach wurde sie für 15 Minuten zentrifugiert (>10000 rpm) und das Pellet einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei 50° C getrocknet, bis es völlig frei von Ethanol war und unter UV-Licht kontrolliert. Anschließend wurde es mit einem ABI 373A Sequencer sequenziert und mit Hilfe einer GenScan Software analysiert (**Abbildung 9**).

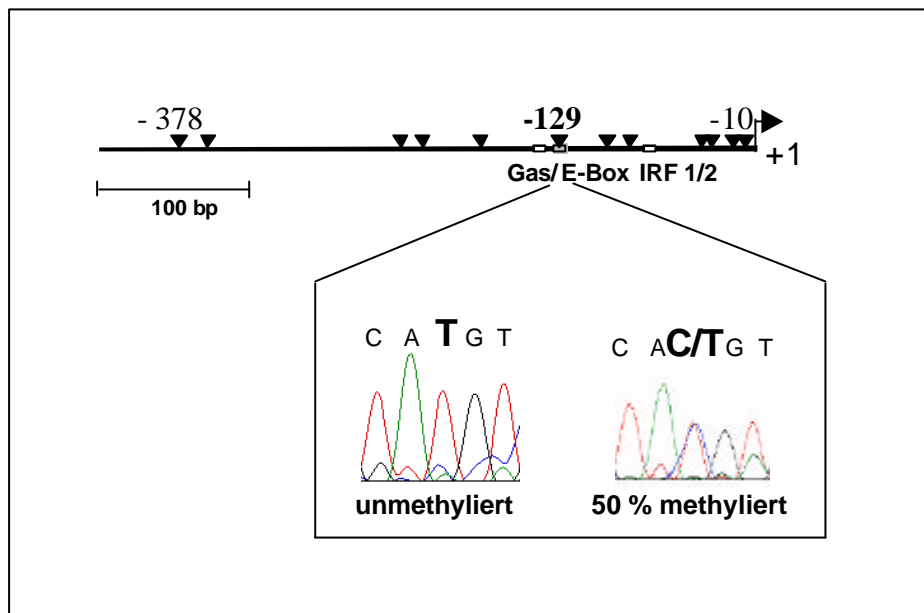


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des CIITA Typ IV Promotors und Beispiel für ein partiell methyliertes Cytosin an Position -129 nach Bisulfit-Behandlung (▼ CG site).

2.8 Primer

Für die PCR (erste Runde):

Sense Primer Me 1: 5' agggtagtattagaggagtgaatagtttag 3'

Antisense Primer Me 3: 5' crctattcccraactcccrercrctac 3'

Für die Semi-nested PCR (zweite Runde):

Sense Primer Me 2: 5' ttatgtgttttyggagggtggtttgtatttttayg 3'

Antisense Primer Me 3: 5' crctattcccraactcccrercrctac 3'

Für die Sequencing-PCR:

Hier wurde nur ein Primer benutzt: Me 3: 5' crctattcccraactcccrercrctac 3'

2.9 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Analyse wurden 177 Thymi untersucht, die auf einem am Pathologischen Institut der Universität verfügbaren Multi-Tissue-Array organisiert waren (Dissertation Frau Martina Hartmann; in Vorbereitung). Es wurde eine Drei-Schritt-Immunoperoxidase-Technik verwendet (Yoneda et al., 1999). Für die Detektion der MHC Klasse II-Expression wurde ein monoklonaler HLA-D Antikörper, gerichtet gegen HLA-DR, -DP und -DQ verwendet (Novocastra).

Die immunhistochemischen Färbungen wurden semiquantitativ mit einem „immunoreactivity score“ (IRS) ausgewertet. Die Prozentzahl der durch den Antikörper markierten Zellen (0 – 20 % = score 1; 21 – 50 % = score 2, 51 – 80 % = score 3, > 80 % = score 4) wurde mit der Intensität dieser Markierung multipliziert (negativ = 0, schwach = 1, moderat = 2, stark = 3), was einen maximal möglichen Wert von 12 ergab.

2.10 Statistik

Statistische Vergleiche zwischen nicht-abhängigen Gruppen wurden anhand des Mann-Whitney-U Tests durchgeführt. Korrelationen zwischen Variablen wurden mit dem Spearman's rank R Test durchgeführt, und Assoziationen zwischen kategorischen Variablen wurden anhand des Yates korrigierten Chi-Square Tests durchgeführt (SPSS Software, Version 2000, SPSS Inc. Chicago, USA). Für alle Analysen wurde ein p-Wert von < 0.05 als signifikant angenommen.

2.11 Reagenzien, Lösungen und Hersteller

1. Bisulfit-Lösung:

1,9 g Na-Metabisulfit (Sigma, Deisenhofen, Germany, S-1516) in 2 ml Wasser auflösen. 0,7 ml 2 M NaOH hinzufügen.

110 mg Hydroquinon (Sigma, H9003) in 1 ml Wasser auflösen. 0,5 ml davon der Metabisulfit-NaOH Lösung hinzufügen.

2. 10 x TBE-Puffer

108 Gramm Tris-Puffer mit 55 Gramm Borsäure mischen und in 900 ml Wasser lösen. 40 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8.0) dazugeben. Auf 1000 ml Wasser auffüllen.

3. Taq-polymerase

Firma Amersham, Braunschweig, Germany

4. 1,5% Agarose-Gel

6 Gramm Agarose-Pulver mit 400 ml 0,5× TBE-Puffer mischen, gut verrühren und 5 Minuten aufkochen. Abkühlen und nochmals aufkochen. Zugabe von 20 µl Ethidium-Bromid unter Abzugshaube.

5. DN-easy kit

Quiagen, Hilden, Germany

6. Primer

MWG-Biotech, Ebersberg, Germany

7. Jetsorb kit

Jetsorb, Bad Oenhausen, Germany

8. Sequencing-mix

ABI sequencing mix, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany

9. Sequencer

ABI 373A sequencer, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany

10. Antikörper

HLA-D: NovoCastra, Germany

3. Ergebnisse

3.1 MG tritt gehäuft in Thymomen mit hoher MHC II-Expression auf

Eine immunhistochemische Analyse von 177 Thymomen wurde durchgeführt und mit einem semiquantitativen „immunoreactivity score“ (IRS) versehen. Die Prozentzahl der durch den Antikörper markierten Zellen (0 – 20 % = score 1; 21 – 50 % = score 2; 51 – 80 % = score 3; > 80 % = score 4) wurde mit der Intensität dieser Markierung multipliziert (negativ = 0; schwach = 1; moderat = 2; stark = 3), was ein Maximum von 12 ergab.

Das Ergebnis dieser Analyse war, dass die Expression von HLA-D bei etwa 82 % der untersuchten Thymome im Vergleich zu Kontrolthymi mäßig bis stark reduziert war (IRS < 8). Fälle mit starker HLA-D Expression (IRS > 8) wurden fast ausschließlich bei den Typ B-Thymomen gefunden.

Danach wurden die Thymome im Bezug auf die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Myasthenia gravis gruppiert, und wiederum auf ihre HLA-D Expression hin geprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die Menge an Thymomen mit moderater oder starker Expression (IRS = 6) unter den MG + Thymomen signifikant höher war als unter den MG - Thymomen (Yates-corrected X-square test, $p < 0.05$) (**Abbildung 10**).

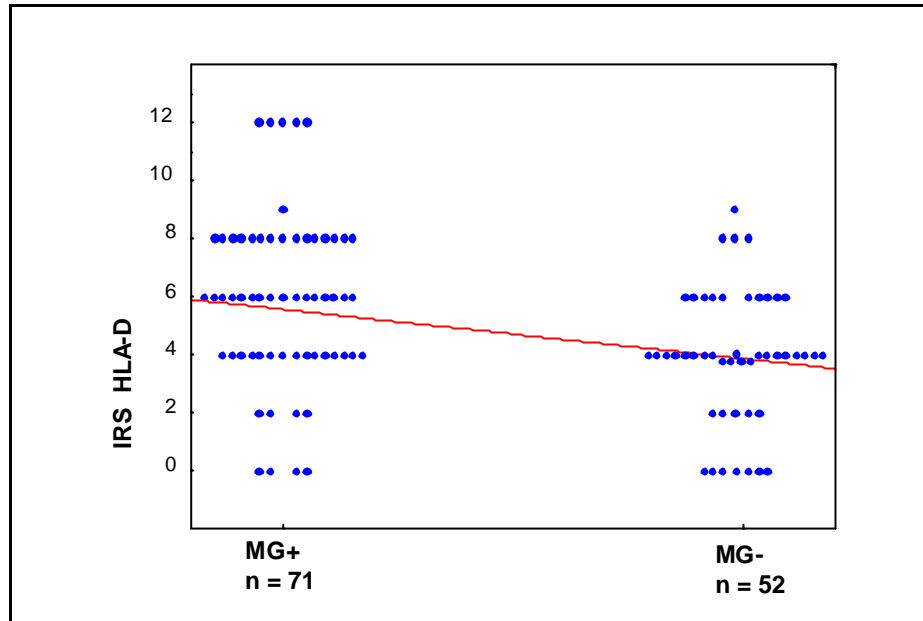


Abbildung 10: Histo-Array-Analyse von WHO Typ AB und B Thymomen: der durchschnittliche immunoreactivity score IRS ist bei MG + Thymomen signifikant höher als bei MG – Thymomen. Interessanterweise wiesen Typ A-Thymome (der histologische Subtyp mit der geringsten MG-Assoziation) in allen Fälle einen kompletten Verlust der MHC Klasse II-Expression auf (IRS 0).

3.2 WHO Typ A Thymome weisen keine Mutationen in der Promoterregion des CIITA Typ IV auf

Um herauszufinden, ob der Verlust der MHC Klasse II-Expression in Typ A-Thymomen durch eine Mutation in der Promoterregion des CIITA Typ IV bedingt war, wurde unbehandelte genomische DNA von 3 Typ A-Thymomen amplifiziert und das Exon 1 sequenziert. Hierbei wurde eine hundertprozentige Übereinstimmung mit publizierten Sequenzen gefunden. Eine „loss-of-function“ Mutation innerhalb des Promotors als Ursache für die reduzierte Transkription konnte somit ausgeschlossen werden. Weiter gestützt wurde dieser Befund durch unveröffentlichte Beobachtungen der Arbeitsgruppe, dass die Expression von CIITA Typ IV in Epithelzelllinien aus Thymomen durch Interferon- γ induzierbar war.

3.3 Amplifizierung der extrahierten DNA durch PCR

Um den CIITA Typ IV Promotor analysieren zu können, mußte die gesuchte Sequenz mittels einer methylierungsspezifischen PCR amplifiziert werden. Die Primer waren so gewählt, dass nur das Fragment, welches den eigentlichen Promotor enthält amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde durch ein Agarose-Gel von Verunreinigungen befreit und konnte dann in einem Sequenziergerät (ABI 373A sequencer, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) weiter untersucht werden.

3.4 Der CIITA Typ IV Promoter weist in Normalthymi unterschiedlicher Altersgruppen einen unterschiedlichen Methylierungsgrad auf

Die physiologische und nicht reversible Abnahme des lymphatischen Thymusgewebes beginnt nach der Geburt, setzt sich bis ins hohe Alter fort und wird als Altersinvolution bezeichnet (**Abbildung 11**). In dieser Arbeit wurde der CIITA Typ IV Promotor einiger Thymi erwachsener und junger Personen auf Methylierung untersucht. Dabei konnte bei zunehmendem Alter eine zunehmende Hypermethylierung festgestellt werden. Bei den untersuchten Kinderthymi konnte festgestellt werden, dass alle CpG-islands unmethyliert waren mit Ausnahme der ersten beiden Positionen, die sich jedoch außerhalb der eigentlichen Promotorregion befinden. Die untersuchten Thymi erwachsener Kontrollpersonen zeigten an verschiedenen Positionen Methylierungen, die bei den Kinderthymi nicht vorhanden waren, zusätzlich zu den zwei Positionen am Anfang des Promotors die ebenso wie bei den Kinderthymi methyliert waren. (**Abbildung 12**).

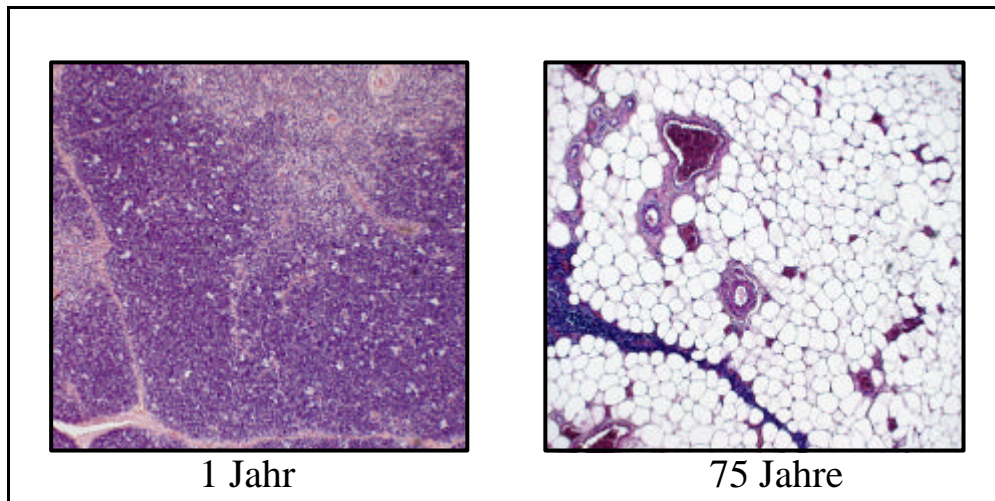


Abbildung 11: Mit zunehmendem Alter atrophiert der Thymus. Das Gewicht reduziert sich auf etwa 20 Prozent des maximalen Gewichts und das Stroma wird zum größten Teil in Fettgewebe umgewandelt.

3.5 Ergebnisse der Sequenzierung

Die zu untersuchende DNA wurde aus solchen Thymom-Subtypen extrahiert, welche immunhistochemisch den größten Unterschied in der HLA-DR-Expression aufweisen, nämlich WHO Typ A-Thymome und Typ B3-Thymomen. Die lymphozytenreichen Typen AB und B2 wurden nicht berücksichtigt, um die störenden Effekte des lymphozytären Hintergrunds zu reduzieren. Es wurden 14 WHO Typ A-Thymome und 10 Typ B3-Thymome analysiert. Als Kontrolle wurde DNA aus 4 normalen Kinderthymi und aus 5 Erwachsenenthymi extrahiert.

3.6 Methylierung des CIITA Typ IV Promoters in Thymomen

Durch DNA-Sequenzierung konnte zwischen methylierten und unmethylierten Cytosin-Molekülen unterschieden werden. Das prozentuale Verhältnis zwischen methylierten und unmethylierten Cytosin-Molekülen für jedes CpG-island innerhalb der Promotorregion wurde kalkuliert, indem ein Methylierungsindex erstellt wurde (die

Prozentzahl aller methylierten Cytosine wurde durch die Prozentzahl aller unmethylierten Cytosine geteilt). Anhand dieses Indexes konnte untersucht werden, inwieweit jedes CpG-island methyliert war.

Sämtliche untersuchten Thymome waren an allen untersuchten Positionen innerhalb des Promotors im Vergleich zu altersgematchten Normalthymi stark hypermethyliert ($p < 0.05$), mit Ausnahme der USF1-Bindungsstelle an Position -129 (**Abbildung 12**). An einigen Stellen gab es statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Thymom-Subtypen, die aber nicht zwischen dem MHC^{high} Typ B3 und dem MHC^{low} Typ A unterscheiden ließen (**Abbildung 12**).

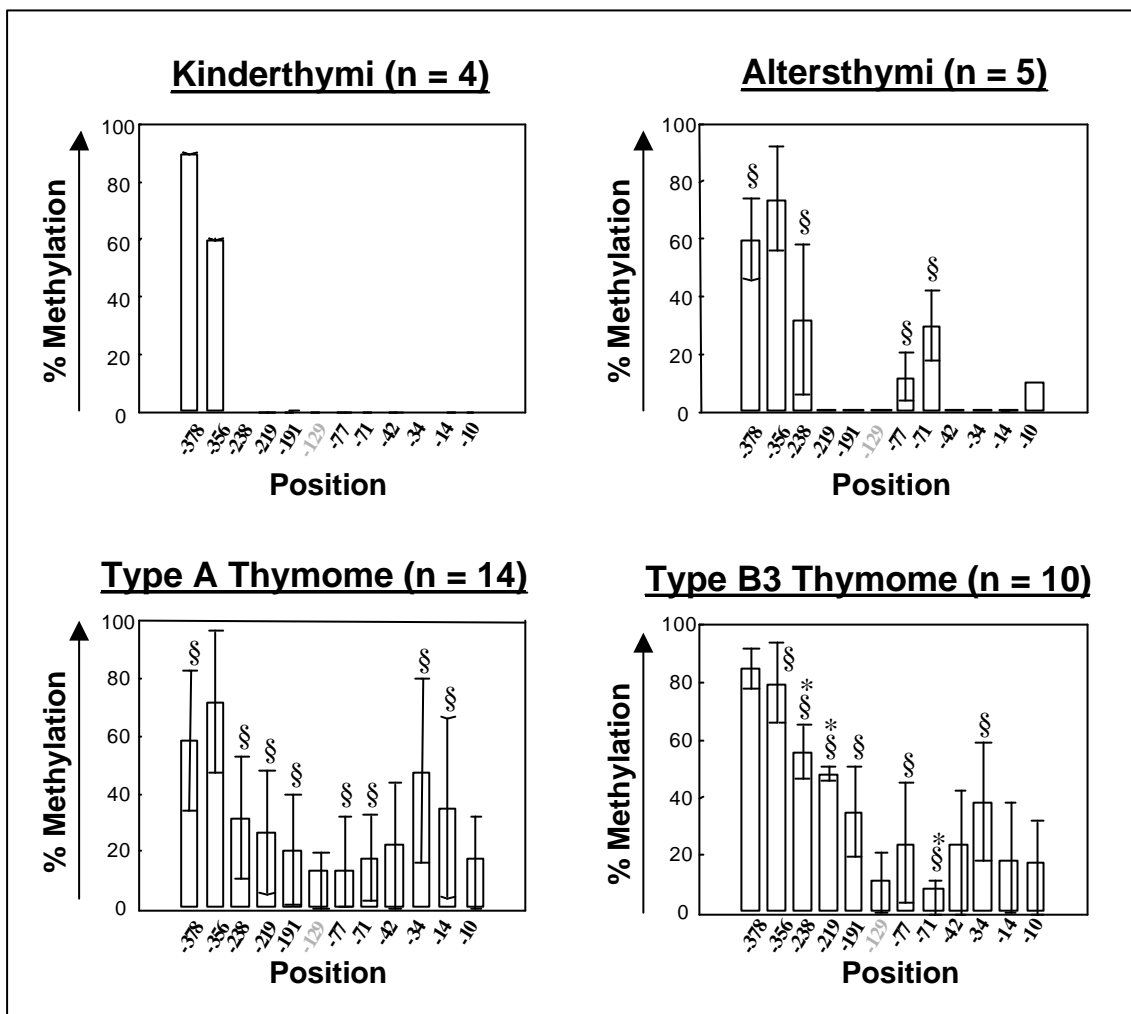


Abbildung 12: Ergebnisse der Methylierungsanalyse. Keine nachweisbare Methylierung der Promotorregion bei den Kinderthymi, dagegen gering vermehrte Methylierung einzelner Positionen im Thymus von Erwachsenen. Ausgeprägte Hypermethylierung sämtlicher Positionen bei den Thymomen, wobei die MHC^{high} Typ B3-Thymome eine eher noch stärkere Methylierung als die MHC^{low} Typ A-Thymome aufweisen (§ : statistisch signifikante Unterschiede zwischen Thymomen und Kontrollthymi; §* : statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Thymom-Subtypen)

4. Diskussion

In dieser Dissertation wurde die Rolle der Methylierung des CIITA Typ IV Promotors in der Expression des MHC Klasse II in Thymomen untersucht. Thymome sind Tumoren des Thymusepithels, welche die Fähigkeit besitzen, reife T-Zellen zu generieren und zu exportieren. Allerdings weist die T-Zell-Reifung in Thymomen quantitative und qualitative Störungen auf, die wahrscheinlich ursächlich für die hohe Inzidenz paraneoplastischer Autoimmunphänomene, vor allem Myasthenia gravis (MG), bei diesen Tumoren sind. Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten einer paraneoplastischen MG und der Fähigkeit eines Thymoms besteht, reife CD4⁺ T-Zellen zu generieren und in das periphere Blut zu exportieren (Buckley et al., 2001; Hoffacker et al., 2000; Strobel et al., 2002). Der MHC Klasse II spielt in der Reifung von CD4⁺ Thymozyten eine zentrale Rolle.

Thymome vom WHO Typ AB, B2, und B3 sind mit Abstand die häufigsten Subtypen und weisen die höchste Assoziation mit MG auf. Während die MHC II-Expression der meisten WHO Typ A und Typ AB-Thymome im Vergleich zu Kontrollthymi stark reduziert ist, weisen Typ B-Thymome häufig eine mäßige bis starke MHC II-Expression auf (Strobel et al., 2001). Die Ursachen dieser reduzierten MHC II-Expression sind bisher noch nicht bekannt.

Durch eine immunhistochemische Analyse von 177 Thymomen konnte erstmals statistisch gezeigt werden, dass eine Myasthenia gravis vor allem in Thymomen mit gut erhaltener MHC II-Expression vorkommt. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch zu der Tatsache, dass bei vielen MG (+) Thymomen nur eine schwache bis fehlende MHC II-Expression in der immunhistochemischen Untersuchung zu finden war, da auch eine niedrige MHC II-Expression für die CD4⁺ T-Zell-Reifung ausreichend ist (de Bont et al., 1999).

Das wichtigste regulatorische Element in der Expression des MHC II-Gens ist der Class II transactivator (CIITA). Die Splicevariante IV des CIITA, die in einer Vielzahl von Zellen durch IFN- γ induziert werden kann, ist zugleich verantwortlich für die konstitutive MHC II-Expression auf Thymusepithelzellen (Waldburger et al., 2003).

Der genaue Mechanismus dieser konstitutiven MHC II-Expression ist noch nicht geklärt.

Innerhalb des CIITA Typ IV Promotors liegen vier verschiedene Regulationselemente, die für die Kontrolle der Promotoraktivierung durch IFN- γ zuständig sind (Muhlethaler-Mottet et al., 1997). Die IFN- γ -Signalkaskade führt nach Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor zur Aktivierung von zwei Tyrosinkinase, Jak1 und Jak2. Diese phosphorylieren den latenten zytoplasmatischen Transkriptionsfaktor Stat1, welcher in den Nukleus transloziert und an ein GAS-Element innerhalb des CIITA Typ IV bindet. Neben dem GAS-Element befindet sich eine E-Box, welche den Transkriptionsfaktor USF1 bindet, eine IRF1-Bindungsstelle (Stat1 induziert die Transkription von IRF1, welches dann an seine Bindungsstelle im CIITA Typ IV bindet) und eine NF-GMa-Bindungsstelle. Nur durch eine kooperative Interaktion zwischen diesen Transkriptionsfaktoren ist die spezifische Aktivierung des CIITA Typ IV Promotors durch IFN- γ möglich.

Frühere Untersuchungen zur Induktion durch IFN- γ postulierten eine Rolle für methylierungsabhängige Mechanismen in der Regulierung der CIITA-Expression (Morris et al., 2000; van den Elsen et al., 2001; van den Elsen et al., 2003). Es gibt verschiedene Methoden, mit denen der Methylierungsstatus einer interessierenden Genregion analysiert werden kann. Die ersten entwickelten Methoden basierten auf Southern Blots nach Verdau durch methylierungssensitive Restriktionsenzyme (Herman et al., 1996). Die Nachteile dieser Methode liegen darin, dass die Restriktion häufig inkomplett ist und zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Weiterhin können CpG-islands in Sequenzen auftreten, die gar nicht von Restriktionsenzymen erkannt werden. Aus diesen Gründen wurde für die vorgelegte Untersuchung eine andere Methode unter Verwendung einer methylierungsspezifischen PCR (MSP) gewählt (Herman et al., 1996; Lilischkis et al., 2000). Durch Vorbehandlung der DNA mit Natrium-Bisulfit können die methylierten und unmethylierten Cytosin-Nukleotide unterschieden werden, außerdem können die Primer so gewählt werden, dass sie nur die vollständig modifizierte DNA amplifizieren. In Kombination mit einer Sequenzierung des PCR-Produktes ist die MSP eine einfache und sensitive Technik zur Untersuchung methylierter Sequenzen. Durch Sequenzierung der gesamten CIITA Typ IV Promotor-

Region in Typ A-Thymomen konnte eine vollständige Übereinstimmung mit publizierten Sequenzen gezeigt und damit loss-of-function Mutationen im CIITA Typ IV Promotor als Ursache der verminderten MHC II-Expression ausgeschlossen werden.

Unsere Methylierungsanalyse zeigte erstmals, dass die Methylierung des CIITA Typ IV Promotors in Kontrollthymi ein altersabhängiger Prozess mit zunehmender Methylierung der Promoterregion in höherem Lebensalter ist. Verschiedene Thymustransplantations-Experimente haben gezeigt, dass die altersbezogene physiologische Involution genetisch vorprogrammiert ist (Bodey et al., 1997). Eine Hypermethylierung des CIITA Typ IV Promotors und damit negative Regulierung eines zentralen thymischen Funktionsgens stellt somit möglicherweise ein Phänomen im Rahmen dieses genetisch determinierten physiologischen Involutionsprozesses dar.

Im Vergleich zu Kontrollthymi war in der gesamten Promotorregion aller untersuchten Thymomtypen eine statistisch signifikante Hypermethylierung zu finden. Interessanterweise war die einzige Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor, die ein CpG-island enthält, USF1, nicht signifikant hypermethyliert. Dieser Befund deckt sich mit früheren Untersuchungen an Trophoblasten-Zelllinien (Morris et al., 2002; Morris et al., 2000).

Im Gegensatz zu den sehr deutlichen Unterschieden in der MHC II-Expression in Typ A- und B3-Thymomen bestanden bezüglich des Methylierungsmusters nur sehr geringe Unterschiede zwischen diesen beiden untersuchten Thymom-Subtypen; Typ B3-Thymome waren im Vergleich sogar etwas stärker methyliert. Dieser Befund weist darauf hin, dass in der Regulation der CIITA- und MHC II-Expression bei Thymomen noch andere, methylierungsunabhängige Faktoren eine Rolle spielen müssen, wie dies auch für andere Tumoren gefunden wurde (Croce et al., 2003). In Betracht kommt hier zunächst ein weiterer epigenetischer Regulationsmechanismus, die Histon-Acetylierung. Eine Acetylierung der Histone H3 und H4 in der Nähe eines Promotors führt zu einer geöffneten Chromatinstruktur, welche wiederum zu einer effizienteren Anlagerung der entsprechenden Regulationselemente, zum Beispiel des CIITA, führt (Morris et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass der CIITA mit Histon-Acetyltransferasen (HAT)

assoziiert (Raval et al., 2001), zudem verfügt der CIITA selbst auch über intrinsische HAT-Aktivität (Raval et al., 2001). Die Acetylierung des CIITA führt zu einer verstärkten nukleären Akkumulation und Aktivität des Moleküls (Spilianakis et al., 2000). Umgekehrt hemmen Histon-Deacetylasen (HDACS) die transaktivierende Aktivität des CIITA (Zika et al., 2003). Histon-Deacetylierung ist als Ursache eines CIITA^{neg} MHC II^{neg} Phänotyps von Tumorzellen beschrieben worden (Kanaseki et al., 2003). Schließlich spielen auch ATP-abhängige Faktoren wie das sogenannte Brahma-related gene-1 (BRG-1) eine Rolle beim chromatin remodelling und bei der Aktivierung des CIITA Typ IV durch IFN- γ (Pattenden et al., 2002). CIITA kann in BRG-1^{neg} Zellen nicht durch IFN- γ induziert werden (Pattenden et al., 2002). Zusätzlich wird BRG-1 durch CIITA rekrutiert und ist selbst für die Induktion von MHC II Genen erforderlich, da MHC II in BRG-1^{neg} Zellen auch durch exogen zugefügtes CIITA nicht induziert werden kann (Mudhasani and Fontes, 2002).

Außer mit Methylierung sind Thymome auch noch mit anderen genetischen Veränderungen vergesellschaftet. Die häufigsten sind der Verlust von Teilen oder des ganzen Chromosom 6 (Inoue et al., 2002; Inoue et al., 2003; Zetzl et al., 2000; Zhou et al., 2001). Deletionen im Chromosom 6 sind bei Thymomen besonders wegen der Anwesenheit des HLA (MHC)-Locus auf 6p21.3 interessant. Eine solche Deletion impliziert eine Monosomie für MHC im Tumorepithel, welches für die T-Zell-Reifung zuständig ist (Zetzl et al., 2000). Die intratumorösen T-Zellen reifen also nur auf einem einzigen MHC-Allel und treffen danach in der Peripherie auf normale antigenpräsentierende Zellen, die über beide Allele verfügen. Eine mögliche Konsequenz davon könnte die abnormale periphere Aktivierung autoreaktiver T-Zellen, ähnlich einer Graft-versus-Host-Reaktion sein. Ob ein direkter Zusammenhang zwischen dem Verlust von genetischem Material von Chromosom 6p und der Expression von MHC-Molekülen im Sinne eines Gene-dosage-Effektes besteht, ist bisher nicht geklärt. Da aber die Häufigkeit von genetischen Veränderungen auf Chromosom 6p vor allem in Typ A-Thymomen eher niedrig ist (Inoue et al., 2003; Zetzl et al., 2000), sind chromosomale Aberrationen als alleinige Erklärung für die besonders in Typ A-Thymomen ausgeprägte Verminderung der MHC II-Expression unwahrscheinlich. Vielmehr weist die von uns beobachtete Hypermethylierung der

CIITA Typ IV Promotorregion auf eine Inaktivierung des gesamten Genabschnittes hin. Obwohl Untersuchungen an transgenen IFN- γ -Rezeptor- oder Stat1-knock-out-Mäusen zumindest keine auffälligen Störungen der T-Zell-Reifung erbracht haben (Hobart et al., 1997; Meraz et al., 1996) läßt sich eine Rolle einer permanenten Aktivierung der IFN- γ -Signalkaskade in der konstitutiven Expression des CIITA Typ IV und damit von MHC Klasse II im menschlichen Thymus nach unseren Ergebnissen nicht ausschließen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass der thymusspezifische CIITA Typ IV Promotor in Thymomen im Vergleich zu altersadaptierten Normalthymi stark hypermethyliert ist. Diese Veränderung könnte eine Rolle bei der reduzierten MHC II-Expression in vielen Thymomen spielen. Da aber kein signifikanter Unterschied in der Methylierung zwischen Thymomen mit hoher und solchen mit niedriger MHC II-Expression festgestellt werden konnte, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass eine Hypermethylierung des CIITA Typ IV Promotors sehr wahrscheinlich nicht der alleinige Grund für die verminderte MHC II-Expression in Thymomen ist. Eine weitere Untersuchung anderer epigenetischer Regulationsmechanismen wie zum Beispiel Histon-Acetylierung sowie eine Analyse der IFN- γ vermittelten Signalkaskade könnte Aufschlüsse über eine mögliche Beteiligung dieses Signalweges in der konstitutiven MHC.Klasse II-Expression im Thymus des Menschen geben.

5. Zusammenfassung

Die Moleküle des „major histocompatibility complex“ (MHC) spielen in der thymischen T-Zell-Reifung eine zentrale Rolle. Durch Interaktion des T-Zell-Rezeptors auf der unreifen T-Zelle und den Co-Rezeptoren CD4 und CD8 mit dem MHC auf dem Thymusepithel werden die zwei wichtigsten Reifungs- und Selektionsprozesse, positive und negative Selektion, vermittelt. Störungen dieser Selektionsmechanismen können zu Immundefekten oder Autoimmunphänomenen führen. Die Regulierung der MHC II-Expression erfolgt hauptsächlich transkriptionell und wird vor allem durch den sogenannten Class II Transaktivator (CIITA) bestimmt. Die Transkription von CIITA wird über vier alternative, gewebsspezifische Promotoren durch alternatives splicing reguliert. Unter diesen Splicevarianten ist der CIITA Typ IV Promotor für die konstitutive MHC II-Expression in Thymusepithelzellen und für die IFN- γ induzierte Expression in anderen Geweben verantwortlich. Thymome sind menschliche Tumoren des Thymusepithels, welche häufig mit einer paraneoplastischen Myasthenia gravis (MG) assoziiert sind. Die paraneoplastische MG zeigt eine starke positive Korrelation mit der Fähigkeit eines Thymoms, reife CD4+ T-Zellen zu produzieren und in das periphere Blut zu exportieren. Thymome weisen aus bislang ungeklärten Gründen häufig eine starke Reduktion der epithelialen MHC II-Expression auf. Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob eine DNA-Methylierung der Promotorregion des MHC-Klasse II Transaktivators (CIITA) Typ IV daran beteiligt ist. Hierzu wurden 27 Thymome mit sowohl hoher und als auch niedriger MHC II-Expression und 9 Normalthymi aus unterschiedlichen Altersgruppen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der CIITA Typ IV Promotor in kindlichen Kontrollthymi vollständig unmethyliert ist, während die Thymi erwachsener Kontrollpersonen eine vermehrte Methylierung aufweisen. Im Gegensatz dazu war der CIITA Typ IV in nahezu allen Thymomen stark hypermethyliert. Da aber kein signifikanter Unterschied in der Methylierung zwischen Thymomen mit hoher und solchen mit niedriger MHC II-Expression festgestellt werden konnte, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass eine Hypermethylierung des CIITA Typ IV Promotors sehr wahrscheinlich nicht der alleinige Grund für die verminderte MHC II-Expression in Thymomen ist, sondern das auch andere Regulationsmechanismen wie zum Beispiel Histon-Acetylierung beteiligt sein könnten.

6. Literatur

Bodey, B., Bodey, B., Jr., Siegel, S. E., and Kaiser, H. E. (1997). Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging. *In Vivo* 11, 421-440.

Buckley, C., Douek, D., Newsom-Davis, J., Vincent, A., and Willcox, N. (2001). Mature, long-lived CD4⁺ and CD8⁺ T cells are generated by the thymoma in myasthenia gravis. *Ann Neurol* 50, 64-72.

Croce, M., De Ambrosis, A., Corrias, M. V., Pistoia, V., Occhino, M., Meazza, R., Giron-Michel, J., Azzarone, B., Accolla, R. S., and Ferrini, S. (2003). Different levels of control prevent interferon-gamma-inducible HLA-class II expression in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 22, 7848-7857.

de Bont, E. S., Reilly, C. R., Lo, D., Glimcher, L. H., and Laufer, T. M. (1999). A minimal level of MHC class II expression is sufficient to abrogate autoreactivity. *Int Immunol* 11, 1295-1306.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-463.

Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., and Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9821-9826.

Hobart, M., Ramassar, V., Goes, N., Urmson, J., and Halloran, P. F. (1997). IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes in vivo. *J Immunol* 158, 4260-4269.

Hoffacker, V., Schultz, A., Tiesinga, J. J., Gold, R., Schalke, B., Nix, W., Kiefer, R., Muller-Hermelink, H. K., and Marx, A. (2000). Thymomas alter the T-cell subset

composition in the blood: a potential mechanism for thymoma-associated autoimmune disease. *Blood* 96, 3872-3879.

Holling, T. M., Van der Stoep, N., and Van den Elsen, P. J. (2004). Epigenetic control of CIITA expression in leukemic T cells. *Biochem Pharmacol* 68, 1209-1213.

Inoue, M., Marx, A., Zettl, A., Strobel, P., Muller-Hermelink, H. K., and Starostik, P. (2002). Chromosome 6 suffers frequent and multiple aberrations in thymoma. *Am J Pathol* 161, 1507-1513.

Inoue, M., Starostik, P., Zettl, A., Strobel, P., Schwarz, S., Scaravilli, F., Henry, K., Willcox, N., Muller-Hermelink, H. K., and Marx, A. (2003). Correlating genetic aberrations with World Health Organization-defined histology and stage across the spectrum of thymomas. *Cancer Res* 63, 3708-3715.

Kanaseki, T., Ikeda, H., Takamura, Y., Toyota, M., Hirohashi, Y., Tokino, T., Himi, T., and Sato, N. (2003). Histone deacetylation, but not hypermethylation, modifies class II transactivator and MHC class II gene expression in squamous cell carcinomas. *J Immunol* 170, 4980-4985.

Kirchner, T., Schalke, B., Buchwald, J., Ritter, M., Marx, A., and Muller-Hermelink, H. K. (1992). Well-differentiated thymic carcinoma. An organotypical low-grade carcinoma with relationship to cortical thymoma. *Am J Surg Pathol* 16, 1153-1169.

Lilischkis, R., Kneitz, H., Lehmann, U., and Kreipe, H. (2000). Positive display of methylated sites: a novel method for the detection of promoter methylation. *Diagn Mol Pathol* 9, 165-171.

Marx, A., Muller-Hermelink, H. K., and Strobel, P. (2003). The role of thymomas in the development of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 998, 223-236.

Marx, A., Osborn, M., Tzartos, S., Geuder, K. I., Schalke, B., Nix, W., Kirchner, T., and Muller-Hermelink, H. K. (1992). A striational muscle antigen and myasthenia gravis-associated thymomas share an acetylcholine-receptor epitope. *Dev Immunol* 2, 77-84.

Marx, A., Wilisch, A., Schultz, A., Greiner, A., Magi, B., Pallini, V., Schalke, B., Toyka, K., Nix, W., Kirchner, T., and Muller-Hermelink, H. K. (1996). Expression of neurofilaments and of a titin epitope in thymic epithelial tumors. Implications for the pathogenesis of myasthenia gravis. *Am J Pathol* 148, 1839-1850.

Masternak, K., Muhlethaler-Mottet, A., Villard, J., Zufferey, M., Steimle, V., and Reith, W. (2000). CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev* 14, 1156-1166.

Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., *et al.* (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431-442.

Morris, A. C., Beresford, G. W., Mooney, M. R., and Boss, J. M. (2002). Kinetics of a gamma interferon response: expression and assembly of CIITA promoter IV and inhibition by methylation. *Mol Cell Biol* 22, 4781-4791.

Morris, A. C., Spangler, W. E., and Boss, J. M. (2000). Methylation of class II transactivator promoter IV: a novel mechanism of MHC class II gene control. *J Immunol* 164, 4143-4149.

Muhlethaler-Mottet, A., Di Berardino, W., Otten, L. A., and Mach, B. (1998). Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8, 157-166.

Muhlethaler-Mottet, A., Otten, L. A., Steimle, V., and Mach, B. (1997). Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled

by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *Embo J* 16, 2851-2860.

Muller-Hermelink, H. K., and Marx, A. (2000). Thymoma. *Curr Opin Oncol* 12, 426-433.

Mygland, A., Aarli, J. A., Matre, R., and Gilhus, N. E. (1994). Ryanodine receptor antibodies related to severity of thymoma associated myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57, 843-846.

Nenninger, R., Schultz, A., Hoffacker, V., Helmreich, M., Wilisch, A., Vandekerckhove, B., Hunig, T., Schalke, B., Schneider, C., Tzartos, S., *et al.* (1998). Abnormal thymocyte development and generation of autoreactive T cells in mixed and cortical thymomas. *Lab Invest* 78, 743-753.

Nikcevich, K. M., Piskurich, J. F., Hellendall, R. P., Wang, Y., and Ting, J. P. (1999). Differential selectivity of CIITA promoter activation by IFN-gamma and IRF-1 in astrocytes and macrophages: CIITA promoter activation is not affected by TNF-alpha. *J Neuroimmunol* 99, 195-204.

Otten, L. A., Steimle, V., Bontron, S., and Mach, B. (1998). Quantitative control of MHC class II expression by the transactivator CIITA. *Eur J Immunol* 28, 473-478.

Pattenden, S. G., Klose, R., Karaskov, E., and Bremner, R. (2002). Interferon-gamma-induced chromatin remodeling at the CIITA locus is BRG1 dependent. *Embo J* 21, 1978-1986.

Piskurich, J. F., Linhoff, M. W., Wang, Y., and Ting, J. P. (1999). Two distinct gamma interferon-inducible promoters of the major histocompatibility complex class II transactivator gene are differentially regulated by STAT1, interferon regulatory factor 1, and transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol* 19, 431-440.

Piskurich, J. F., Wang, Y., Linhoff, M. W., White, L. C., and Ting, J. P. (1998). Identification of distinct regions of 5' flanking DNA that mediate constitutive, IFN-gamma, STAT1, and TGF-beta-regulated expression of the class II transactivator gene. *J Immunol* 160, 233-240.

Raval, A., Howcroft, T. K., Weissman, J. D., Kirshner, S., Zhu, X. S., Yokoyama, K., Ting, J., and Singer, D. S. (2001). Transcriptional coactivator, CIITA, is an acetyltransferase that bypasses a promoter requirement for TAF(II)250. *Mol Cell* 7, 105-115.

Rigaud, G., De Lerma Barbaro, A., Nicolis, M., Cestari, T., Ramarli, D., Riviera, A. P., and Accolla, R. S. (1996). Induction of CIITA and modification of in vivo HLA-DR promoter occupancy in normal thymic epithelial cells treated with IFN-gamma: similarities and distinctions with respect to HLA-DR-constitutive B cells. *J Immunol* 156, 4254-4258.

Rosai, J., and Sobin, L. (1999). Histological typing of tumours of the thymus. In Anonymous. World Health Organization, International Histological Classification of Tumours. (Heidelberg, Springer), pp. 1-16.

Sommer, N., Willcox, N., Harcourt, G. C., and Newsom-Davis, J. (1990). Myasthenic thymus and thymoma are selectively enriched in acetylcholine receptor-reactive T cells. *Ann Neurol* 28, 312-319.

Spilianakis, C., Papamatheakis, J., and Kretsovali, A. (2000). Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol* 20, 8489-8498.

Steimle, V., Otten, L. A., Zufferey, M., and Mach, B. (1993). Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75, 135-146.

Strobel, P., Helmreich, M., Kalbacher, H., Muller-Hermelink, H. K., and Marx, A. (2001). Evidence for distinct mechanisms in the shaping of the CD4 T cell repertoire in histologically distinct myasthenia gravis-associated thymomas. *Dev Immunol* 8, 279-290.

Strobel, P., Helmreich, M., Menioudakis, G., Lewin, S. R., Rudiger, T., Bauer, A., Hoffacker, V., Gold, R., Nix, W., Schalke, B., *et al.* (2002). Paraneoplastic myasthenia gravis correlates with generation of mature naive CD4(+) T cells in thymomas. *Blood* 100, 159-166.

Ting, J. P., and Trowsdale, J. (2002). Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 *Suppl*, S21-33.

van den Elsen, P. J., Gobin, S. J., van der Stoep, N., Datema, G., and Victor, H. E. (2001). Transcriptional control of MHC genes in fetal trophoblast cells. *J Reprod Immunol* 52, 129-145.

van den Elsen, P. J., Holling, T. M., van der Stoep, N., and Boss, J. M. (2003). DNA methylation and expression of major histocompatibility complex class I and class II transactivator genes in human developmental tumor cells and in T cell malignancies. *Clin Immunol* 109, 46-52.

Vincent, A. (2002). Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol* 2, 797-804.

Vincent, A., and Willcox, N. (1999). The role of T-cells in the initiation of autoantibody responses in thymoma patients. *Pathol Res Pract* 195, 535-540.

Viret, C., and Janeway, C. A., Jr. (1999). MHC and T cell development. *Rev Immunogenet* 1, 91-104.

Waldburger, J. M., Rossi, S., Hollander, G. A., Rodewald, H. R., Reith, W., and Acha-Orbea, H. (2003). Promoter IV of the class II transactivator gene is essential for positive selection of CD4⁺ T cells. *Blood* *101*, 3550-3559.

Yoneda, S., Marx, A., Heimann, S., Shirakusa, T., Kikuchi, M., and Muller-Hermelink, H. K. (1999). Low-grade metaplastic carcinoma of the thymus. *Histopathology* *35*, 19-30.

Zettl, A., Strobel, P., Wagner, K., Katzenberger, T., Ott, G., Rosenwald, A., Peters, K., Krein, A., Semik, M., Muller-Hermelink, H. K., and Marx, A. (2000). Recurrent genetic aberrations in thymoma and thymic carcinoma. *Am J Pathol* *157*, 257-266.

Zhou, R., Zettl, A., Strobel, P., Wagner, K., Muller-Hermelink, H. K., Zhang, S., Marx, A., and Starostik, P. (2001). Thymic epithelial tumors can develop along two different pathogenetic pathways. *Am J Pathol* *159*, 1853-1860.

Zika, E., Greer, S. F., Zhu, X. S., and Ting, J. P. (2003). Histone deacetylase 1/mSin3A disrupts gamma interferon-induced CIITA function and major histocompatibility complex class II enhanceosome formation. *Mol Cell Biol* *23*, 3091-3102.

7. Verzeichnis der Abbildungen und Diagramme

Abbildung 1: Die Interaktion zwischen dem Major Histocompatibility Complex (MHC) und dem T-Zell-Rezeptor ist erforderlich für die zentralen Reifungsschritte der T-Zellen.

Abbildung 2: Im Thymuskortex sieht man ein Netzwerk aus kortikalen und medullären Epithelzellen, welche in dieser Färbung eine deutliche HLA-DR-Expression aufweisen. Typ A-Thymome zeigen immunhistochemisch keine Expression von HLA-DR, angefärbt sind Makrophagen (interne Kontrolle). In Typ B3-Thymomen ist hingegen häufig eine stärkere Expression von HLA-DR zu beobachten.

Abbildung 3: Der CIITA ist das zentrale Regulationmolekül in der MHC Klasse II-Expression. Der Promotor des CIITA-Gens hat vier mögliche Splicevarianten, wovon der Typ IV thymusspezifisch ist.

Abbildung 4: Methylierung erfolgt an stark konservierten CG-Sequenzen durch Wirkung der Methyltransferase.

Abbildung 5: Mit der Bisulfit-Methode lassen sich methylierte von unmethylierten CG-Sequenzen unterscheiden indem alle unmethylierten Cytosin-Moleküle in Uracil umgewandelt werden.

Abbildung 6: CIITA Typ IV Promotor und Exon 1 (Wildtyp), Genbank Nummer Y18958

Abbildung 7: Ausschnitt des durch Na-Bisulfit-Vorbehandlung umgewandelten kodierenden DNA-Stranges (1st Strand). Darstellung der sense-primer Me1 und M2. Y zeigt potentiell methylierungsfähige C's in der Keimbahnsequenz an.

Abbildung 8: Ergebnisse der ersten PCR-Runde (a) und der nested PCR (b). In beiden Fällen war eine gut sichtbare Bande der erwarteten Länge (345 bp) nachweisbar.

Abbildung 9: Schematischer Aufbau des CIITA Typ IV Promotors und Beispiel für ein partiell methyliertes Cytosin an Position -129 nach Bisulfit-Behandlung

Abbildung 10: Histo-Array: der durchschnittliche immunoreactivity score IRS ist bei MG + Thymomen signifikant höher als bei MG – Thymomen. Interessanterweise wiesen Typ A Thymome (der histologische Subtyp mit der geringsten MG-Assoziation) in allen Fällen einen kompletten Verlust der MHC-Klasse II Expression auf (IRS 0).

Abbildung 11: Mit zunehmendem Alter atrophiert der Thymus. Das Gewicht reduziert sich auf etwa 20 Prozent des maximalen Gewichts und das Stroma wird zum größten Teil im Fettgewebe umgewandelt.

Abbildung 12: Ergebnisse der Methylierungsanalyse. Keine nachweisbare Methylierung der Promotorregion bei den Kinderthymi, dagegen gering vermehrte Methylierung einzelner Positionen im Thymus von Erwachsenen. Ausgeprägte Hypermethylierung sämtlicher Positionen bei den Thymomen, wobei die MHC^{high} Typ B3 Thymome eine eher noch stärkere Methylierung als die MHC^{low} Typ A Thymome aufweisen

§ : statistisch signifikante Unterschiede zwischen Thymomen und Kontrollthymi.

§* : statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Thymom-Subtypen.

8. Abkürzungsverzeichnis

AChR	Acetylcholin-Rezeptor
BRG-1	Brahma-related gene-1
CD	Cluster of differentiation
CIITA	Class II transactivator
CpG-island	Cytosin-Guanin Nukleotid
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDACS	Histon-Deacetylase
HLA	Human leucocyte antigen
IFN- γ	Interferon gamma
IRF1	Interferon regulating factor 1
IRS	immunoreactivity score
Jak1/Jak2	Tyrosinkinase
MHC	Major histocompatibility complex
MHC II	Major histocompatibility complex Klasse II
MG	Myasthenia gravis
MSP	Methylierungsspezifische PCR
NF-Gma	Nuclear factor (NF)-GMA
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1
USF1	Upstream transcription factor 1
TCR	T-Zell-Rezeptor
WHO	World Health Organisation

Danksagung

Für die freundlich Überlassung des Themas sowie die Betreuung und Unterstützung möchte ich Prof. Dr. Alexander Marx danken. Für die Übernahme des Koreferates möchte ich Prof. Dr. Rieckmann danken.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Betreuer Dr. Philipp Ströbel, der mich am Anfang meiner Arbeit in die Labormethoden eingewiesen hat, mir immer mit sehr viel Geduld und guten Ratschlägen tatkräftig zur Seite stand und mir vor allem beim erstellen des Manuskriptes eine sehr große Hilfe war. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Sergei Chuvpilo bedanken für seine ausdauernde Hilfe bei der Sequenzierung.

Meiner Familie, meinem Mann und meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle für die wunderbare Unterstützung während des ganzen Studiums danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Marie-Annette Strehl (geb. Schwach)
Geburtsdatum/Ort: 20. März 1978 in Stuttgart
Anschrift: Straubmühlweg 11
97078 Würzburg
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch
Mutter : Astrid Schwach, Dolmetscherin
Vater: Joachim Schwach, Dipl.-Volkswirt

Schulbildung:

1984 – 1985: Malkerns Valley Primary School, Malkerns, Swaziland
1986 – 1988: British Embassy School, Ankara, Türkei
1988 – 1992: Michael Grizimek Schule, Nairobi, Kenia
1992 – 1993: International School of Zambia, Lusaka, Zambia
1994: Waterford Kamhlaba United World College, Mbabane, Swaziland
1995 – 1997: Deutsche Schule Kapstadt, Kapstadt, Südafrika
November 1997: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

SS 1998 – SS 2004: Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
Frühjahr 2000: Physikum
Frühjahr 2001: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Herbst 2003: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Promotion:

Seit dem WS 2000/2001 am Pathologischen Institut der Universität Würzburg

Würzburg, Dezember 2004