

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. Januar 2012 (19.01.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/007462 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP201 1/061854

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. M i 201 1 (12.07.201 1)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2010 03 1 354.8 14. Juli 2010 (14.07.2010) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN** [DE/DE]; Mommsenstrasse 11, 01062 Dresden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MENSCHIKOWSKI, Mario** [DE/DE]; Österreicher Straße 77, 01279 Dresden (DE). **HAGELGANS, Albert** [DE/DE]; Pfotenhauerstr. 15, 01307 Dresden (DE). **VOGEL, Margot** [DE/DE];

Krenkelstr. 21, 01309 Dresden (DE). **SIEGERT, Gabriele** [DE/DE]; Elbhangblick 18, 01259 Dresden (DE).

(74) Anwälte: **KAILUWEIT, Frank** et al; Bamberger Str. 49, 01187 Dresden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MEANS AND METHOD FOR THE DIAGNOSTICS, PROGNOSIS AND THE THERAPY CONTROL OF TUMOUR DISEASES

(54) Bezeichnung : MITTEL UND VERFAHREN ZUR DIAGNOSTIK, PROGNOSE UND THERAPIEKONTROLLE VON TUMORERKRANKUNGEN

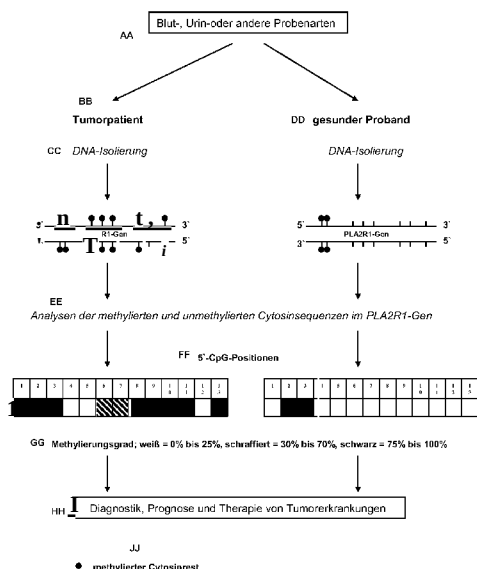


Abb. 13

AA Blood, urine or other types of sample
BB Tumor patient
CC DNA isolation
DD Healthy subject
EE Analyses of the methylated and unmethylated cytosine sequences in the PLA2R1 gene
FF 5'-CpG positions
GG Degree of methylation: white 0% to 25%, hatched: 30% to 70%, black: 75% to 100%
HH Diagnosis, prognosis and therapy of tumor diseases
JJ methylated cytosine residue
PLA2R1-Gen PLA2R1-gene

(57) Abstract: The invention relates to the field of medicine, specifically to the diagnostics, prognosis and therapy control of tumour diseases. The invention is based on the hitherto unknown epigenetic silencing, discovered by chance by the inventors, of the phospholipase-A2-receptor-1-coding gene in leukaemia cells (Fig. 1) and in patients suffering from leukaemias and solid tumours. Based on this finding, the invention provides methods and a kit with which the degree of methylation of the phospholipase-A2-receptor-1 gene in an isolated sample of the patient is determined.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft das Gebiet der Medizin, speziell die Diagnostik, Prognose und Therapiekontrolle von Tumorerkrankungen. Die Erfindung beruht auf der durch die Erfinder zufällig entdeckten und bisher unbekannten epigenetischen Stilllegung des für den Phospholipase A2 Rezeptor- 1 codierenden Gens in Leukämiezellen (Abb. 1) und bei Patienten mit Leukämien und soliden Tumoren. Basierend auf dieser Erkenntnis gibt die Erfindung Verfahren und ein Kit an, mit welchem der Methylierungsgrad des Phospholipase A2 Rezeptor- 1-Gens in einer isolierten Patientenprobe bestimmt wird.



CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

Mittel und Verfahren zur Diagnostik, Prognose und Therapiekontrolle von Tumorerkrankungen

Die Erfindung betrifft das Gebiet der Medizin, speziell die Diagnostik, Prognose und-Therapiekontrolle von Tumorerkrankungen.

Gegenwärtige Verfahren zum Nachweis von Tumoren wie klinisch-chemische Untersuchungen in Körperflüssigkeiten und Gewebeproben oder bildgebende Verfahren führen trotz aller Fortschritte in den letzten Jahren zu einem zu späten Nachweis von malignen Veränderungen. So ist die Hauptursache der hohen Mortalitätsrate von Tumorpatienten nicht das Auftreten von Primärtumoren, sondern von Metastasen. Um das Auftreten von Metastasen zu verhindern, ist ein so früh wie möglicher Nachweis von malignen Veränderungen erforderlich. Ferner bedarf es neben sensitiver auch hochspezifischer Verfahren, um maligne Zellen von normalen Zellen richtig unterscheiden zu können. Sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Befunde haben fatale Konsequenzen für die Betroffenen. Ebenso sind Methoden erforderlich, die eine richtige Prognose von Tumorpatienten gestatten und eine entsprechend auf den Patienten individuell abgestimmte Therapie erlauben.

Bisher werden in Körperflüssigkeiten wie Blutproben, Urin, Sputum oder Gewebeproben sogenannte Tumormarker bestimmt. Hierbei handelt es sich um Bestandteile von Tumorzellen, die verstärkt oder vermindert gebildet werden und deren Veränderungen in Körperflüssigkeiten wie Blut nachgewiesen werden können. Bis auf wenige Ausnahmen erlauben diese Tumormarker jedoch kein generelles Screening auf Tumorerkrankungen, da ihre diagnostischen Spezifitäten und Sensitivitäten zu gering sind. Wenngleich diese Tumormarker gegenüber bildgebenden Verfahren oft frühzeitiger maligne Veränderungen anzeigen können, gestatten sie bisher keinen Nachweis von malignen Veränderungen zu einem Zeitpunkt, bei dem das Auftreten von Metastasen in jeden Fall auszuschließen ist.

Die Nachteile bisheriger Verfahren zum Nachweis von Tumorerkrankungen beruhen in ihren niedrigen diagnostischen Sensitivitäten und Spezifitäten und ihr zu spätes Anzeigen von malignen zellulären Veränderungen.

Es ist bekannt, dass Gene durch DNA-Methylierung epigenetisch reguliert werden können. In Tumoren ist die DNA generell hypomethyliert. Einzelne Gene sind jedoch hypermethyliert [60, 61, 62]. Methoden zum Nachweis der DNA-Methylierung in Tumoren sind ebenfalls bekannt [60]. Auch DE 100 56 802 A1 beschreibt eine solche Methode zur toxologischen Diagnostik.

Vor mehr als 20 Jahren wurde erstmals eine Phospholipase A₂ (PLA₂) aus Thrombozyten der Ratte und aus Synovialflüssigkeiten von Patienten mit rheumatoider Arthritis isoliert, die sich strukturell von der bis dahin bekannten PLA₂ aus dem Pankreas unterschied [1-3]. Aus diesem Grund wurden in der

Folgezeit beide Enzyme als pankreatische bzw. nicht-pankreatische oder synoviale PLA₂ bezeichnet und den Gruppen 1 und 11 zugeordnet [1, 2]. Eine weitere Differenzierung der sPLA₂s wurde erforderlich, als die Struktur der im Bienengift vorkommenden PLA₂ aufgeklärt war. Im Gegensatz zu den Gruppen 1 und 11 besitzen Bienen- und Wespen-sPLA₂s nur 10 Cysteinreste, weshalb diese Enzyme der Gruppe III zugeordnet werden [4].

Nicht zuletzt durch die Untersuchungen des menschlichen Genoms wurden in den letzten Jahren zahlreiche neue PLA₂s entdeckt, die ebenfalls einen katalytischen Histidinrest besitzen. Da sich diese Enzyme strukturell deutlich von denen der Gruppen 1-11 unterscheiden, werden diese Enzyme den Gruppen V, X und XII zugeordnet [5]. Weitere PLA₂s wurden identifiziert, die bis auf die Anordnung der 7. Disulfidgruppe und einer C-terminalen Aminosäure-sequenz-verlängerung den bisher bekannten PLA₂ der Gruppe 11 ähnlich sind. Dementsprechend wurde eine Klassifizierung dieser Enzyme vorgeschlagen, die weitere Untergruppen vorsieht wie sPLA₂-IIA, sPLA₂-IID, sPLA₂-IIE und sPLA₂-IIF [6, 7]. Die nicht-pankreatische bzw. synoviale PLA₂ entspricht nunmehr der sPLA₂-IIA, der sekretorischen PLA₂ vom Typ IIA.

In einer Publikation aus dem Kreise der Erfinder wird eine epigenetische Regulierung von sezernierten Phospholipasen A₂ vom Typ IIA (sPLA₂-IIA) und vom Typ V (sPLA₂-V) durch DNA-Hypermethylierung in Jurkatzellen diskutiert [61].

Die sPLA₂-IIA ist neben der pankreatischen sPLA₂-IB und der cPLA₂-IVA das am häufigsten untersuchte Enzym der PLA₂-Superfamilie [1, 2, 6-8]. Bei Säugern einschließlich des Menschen wird die sPLA₂-IIA in einer Reihe unterschiedlicher Zelltypen konstitutiv exprimiert und in sekretorischen Granula gespeichert. Dazu zählen Thrombozyten [9], Neutrophilen, Makrophagen und Mastzellen [10-12]. In Organen und Geweben wie Prostata [13], Plazenta [14], Milz, Leber, Darmmukosa, Tonsillen, Speichel- und Tränendrüsen, Knorpel und Knochenmark finden sich ebenfalls sPLA₂-IIA-Enzymaktivitäten [13, 15]. Das Enzym lässt sich auch in Körperflüssigkeiten wie Seminalplasma [16, 17] und Tränenflüssigkeiten [18] nachweisen. In der Prostata sind besonders die glandulären Epithelzellen reich an sPLA₂-IIA. Die Funktion der sPLA₂-IIA im Seminalplasma und der Prostata wird mit einer aktiven Prostaglandinbiosynthese in Verbindung gebracht [19]. Außerdem sind fusogene Eigenschaften von Lysophospholipiden beschrieben, die bei der sPLA₂-IIA-katalysierten Reaktion freigesetzt werden. Dadurch wird möglicherweise die Penetration der Spermien durch die Eizellmembran erleichtert [20]. Auch anti-bakterielle Eigenschaften der sPLA₂-IIA können von Bedeutung sein. Weiterhin wurde eine sPLA₂-IIA in den Paneth-Zellen des Verdauungstraktes nachgewiesen. Neben der Körperabwehr soll die sPLA₂-IIA der Paneth-Zellen auch eine Rolle bei der Verdauung von Nahrungsphospholipiden spielen.

[21]. Schließlich lassen sich auch hohe sPLA₂-IIA-Konzentrationen in der Plazenta feststellen [22]. Die Funktion des Enzyms in diesem Gewebe ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Es wird eine Beteiligung des Enzyms an der Eicosanoidbiosynthese durch Freisetzung von Arachidonsäure diskutiert [23].

Neben Effekten, die mit der Freisetzung von Arachidonsäure assoziiert sind, kann eine Hochregulation der sPLA₂-IIA auch zu Effekten führen, die unabhängig von der Enzymaktivität sind. So behielten inaktive sPLA₂-IIA-Mutanten, die unfähig waren, Arachidonsäure von Zytokin-stimulierten Bindegewebsmastzellen freizusetzen, ihre Fähigkeit, die COX-2-Expression in diesen Zellen zu erhöhen. Das lässt darauf schließen, dass COX-2-induzierende Aktivitäten der sPLA₂-IIA unabhängig von ihrer Enzymaktivität vermittelt werden [24]. In mesangialen Zellen und glatten vaskulären Muskelzellen war die autokrine und parakrine transkriptionelle Regulation des *PLA2G2A-Gens* ebenfalls unabhängig von der Aktivität des Enzyms [25, 26]. Außerdem führt die sPLA₂-HA zu einer Aktivierung von Signaltransduktionswegen wie den Proteinkinase C-, MEK/ERK1/2-, p38 MAPK- und p13-K/Akt-abhängigen Kaskaden [27-31] wie auch zur Aktivierung der Synthese und Freisetzung von Zytokinen aus humanen Monozyten, Lungenmakrophagen und eosinophilen Zellen, wofür auch hier die Enzymaktivität, zumindest teilweise, nicht erforderlich war [32-35]. Schließlich konnte gezeigt werden, dass in Mastzellen sogenannte *survival Signals* durch die pankreatische sPLA₂-1B und Bienengift sPLA₂-111 induziert werden. Dabei scheint weniger die Bildung von sPLA₂-katalysierten Mediatoren als vielmehr ein sPLA₂-vermittelte Mechanismus von Bedeutung zu sein [36].

Aus diesen Gründen werden Rezeptoren bzw. Bindungsstellen diskutiert, die für die durch sPLA₂-RI hervorgerufenen und von ihren Enzymaktivitäten unabhängigen Effekte verantwortlich sind. Ein entsprechender sPLA₂-Rezeptor wurde in einer Reihe von Zellen wie glatte Muskelzellen, Fibroblasten, polymorphkernige neutrophile Zellen (PMN), Swiss 3T3-Zellen und Astrozyten nachgewiesen (31, 37-42). Die mögliche Bedeutung dieses Rezeptors für die Zellphysiologie und -pathophysiologie zeigt sich z.B. darin, dass entsprechende Einflüsse auf die Migration und Proliferation glatter vaskulärer Muskelzellen, auf die Adhäsion von PMN und auf die Aktivität von p38 MAPK beschrieben wurden. Dadurch wurden wiederum die Elastasefreisetzung, Hemmung von Acetylcholinfreisetzungen, die Proliferation von Swiss 3T3-Zellen und vor allem die Tumordinvasion verändert (31, 43-47).

In einer von Augert et al. [48] publizierten Arbeit wurde mittels eines *Loss-of-function-Screening* einer shRNA-Bibliothek des Netherlands Cancer Institutes [49] der sPLA₂-Rezeptor (sPLA₂-RI) als eine von vier Komponenten beschrieben, die im Prozess der Seneszenz, der Zellalterung, eine zentrale Rolle spielt [48]. Der sPLA₂-RI stellt einen transmembranen Glykoproteinrezeptor vom Typ 1 dar und ist auch als multifunktionaler M-Typ-Rezeptor bekannt. Er hat ein Molekulargewicht von 180 kDa, wurde erstmals

bei Kaninchen in Skelettmuskelzellen entdeckt und bindet spezifisch sekretorische sPLA₂s [50, 51]. Er ist dem Mannose-Rezeptor, DEC-205 Rezeptor und dem Endo-1890-Rezeptor strukturell ähnlich und besteht aus einer transmembranen Domäne, einem kurzen cytoplasmatischen Teil und einer großen extrazellulären Region. Letztere wird durch eine N-terminale Cystein-reichen Domäne, einer Fibronectin-ähnlichen Typ 11-Domäne und einem Tandemrepeat bestehend aus acht Lektin-ähnlichen Kohlenhydraterkennungsdomänen zusammengesetzt [52-54].

Die biologische Funktion des sPLA₂-RI ist noch ungeklärt. Bekannt ist, dass sPLA₂-RI-defiziente Mäuse teilweise resistent gegenüber einer LPS-induzierten Letalität sind und dass diese Mäusen nach LPS-Gabe verminderte TNF- α - und IL-1 β -Serumspiegel aufweisen. Daraus wurde eine pro-inflammatorische Bedeutung des Rezeptors abgeleitet [55]. Ferner wird der Rezeptor ähnlich dem LDL-Rezeptor endozytiert und führt zur lysosomalen Degradation von gebundenen sPLA₂s, so dass der Rezeptor möglicherweise auch bei der Regulation von sPLA₂-Aktivitäten bei Entzündungen eine Rolle spielt [56, 57].

Im Vergleich mit sPLA₂-RI-exprimierenden humanen Fibroblasten, die nach 2-wöchiger Kultivierung im Zellwachstum blockiert und verstärkt seneszent wurden, wiesen mit *short-hairpin* RNA (shRNA)-transfizierte Zellen, deren Translation des *PLA2R1*-Gens blockiert war, ein ungehindertes Wachstum auf. Dies zeigte sich auch anhand einer erhöhten β -Galaktosidase-Aktivität als Zeichen der Seneszenz [58], die in sPLA₂-RI-exprimierenden Zellen nachweisbar war, nicht aber in Zellen ohne sPLA₂-RI-Expression. Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass die sPLA₂-RI-abhängigen Effekte über p53-abhängige Stoffwechselwege vermittelt werden und die Generation von reaktiven Sauerstoffspezies dabei von Bedeutung ist [48].

Mit Hilfe der Erfindung sollen die oben genannten Nachteile bisheriger Verfahren beseitigt werden. Neben einer verbesserten diagnostischen Sensitivität und Spezifität soll durch die Erfindung ein Nachweis von malignen Veränderungen bereits frühzeitig, d. h. auf Zellebene, ermöglicht werden. Ferner sollen mit Hilfe der Erfindung Verfahren entwickelt werden, die eine unmittelbare Effizienzkontrolle von Therapien ermöglichen und die Suche nach neuen Wirkstoffen für die Therapie von Tumorerkrankungen erleichtern.

Aufgabe der Erfindung ist es insbesondere, neue Mittel und Methoden zur Diagnostik, Prognose und Therapiekontrolle von Tumorerkrankungen anzugeben.

Die Erfindung beruht auf der durch die Erfinder zufällig entdeckten und bisher unbekannten epigenetischen Stilllegung des Phospholipase A2 Rezeptor-1-Gens (*PLA2R1*-Gens) in Leukämiezellen (Abb. 1) und bei Patienten mit Leukämien und soliden Tumoren.

Diese epigenetische Stilllegung des *PLA2R1*-Gens ist mit einer DNA-Methylierung in GC-reichen Abschnitten (CpG-Inseln) innerhalb der für *PLA2R1*-codierenden Exons (insbesondere Exon 1) und/oder regulatorischer Bereiche, insbesondere vor (in 5'-Richtung stromaufwärts) des Exons 1 assoziiert. Die codierenden Exons und die regulatorischer Bereiche werden nachfolgend als *PLA2R1*-Gen (oder *PLA2R1*-DNA) bezeichnet. Als Referenz wird dazu die *PLA2R1*-Sequenz gemäß SEQ ID No. 1 herangezogen, welche die Nukleotide -2000 (Position 1 in SEQ ID No. 1) bis + 2199 (Position 4199 in SEQ ID No. 1) gerechnet vom Start des Exons 1 (Position 2001 in SEQ ID No. 1) umfasst, wobei der Begriff *PLA2R1*-Gen jedoch vorzugsweise auch homologe Sequenzen umfasst, die eine Sequenzidentität von 90 %, bevorzugt 95 %, besonders bevorzugt 98 % zu SEQ ID No. 1 aufweisen.

Die einzelnen GC Paare, die im *PLA2R1*-Gen methyliert werden können, werden nachfolgend CpG-Stellen genannt.

Der Grad der nachgewiesenen *PLA2R1*-Gen-Methylierung korreliert mit der Bösartigkeit des Tumors. Umso höher die nachgewiesene *PLA2R1*-Gen-Methylierung, umso niedriger ist die Lebenserwartung des Patienten.

Die Bestimmung der *PLA2R1*-Gen-Methylierung als Biomarker lässt sich somit nicht nur zur Diagnostik, sondern auch zur Prognose des Verlaufs von Tumorerkrankungen einsetzen.

Folgende CpG-Inseln im *PLA2R1*-Gen sind in den Tumoren insbesondere methyliert:

Der Bereich -662 bp bis +783 bp (1339 bis 2783 in SEQ ID No. 1) vom Beginn des Exons 1 des *PLA2R1*-Gen enthält insgesamt 91 CpG-Stellen. Bevorzugt wird in der Erfindung der Methylierungsgrad einzelner oder mehrerer dieser insgesamt 91 CpG-Stellen in der im Bereich -662 bp bis +783 bp des Exons 1 und distalen Promotorbereiches des *PLA2R1*-Gen (1339 bis 2783 in SEQ ID No. 1) bestimmt.

Das Exon 1 des *PLA2R1*-Gens ist 315 bp lang (Positionen 2001 bis 2315 in SEQ ID No. 1). Der Translationstart ist an Position 207 (2207 in SEQ ID No. 1). In 5'-Richtung stromaufwärts des Exons 1 enthält das *PLA2R1*-Gen eine CpG-Insel (hier als Insel 1 bezeichnet): -356 bp bis -241 bp (1645 bis 1760 in SEQ ID No. 1) vom Beginn des Exons 1 und drei weitere 5'-CpG-Inseln in den Nukleotidbereichen +37 bp bis +458 bp (Insel 2: 2038 bis 2458 in SEQ ID No. 1), +511 bp bis +667 bp

(Insel 3: 2511 bis 2667 in SEQ ID No. 1) und +836 bp bis +990 bp (Insel 4: 2836 bis 2990 in SEQ ID No. 1).

CpG-Stellen, welche in Tumoren methyliert sind, sind in Abb. 3 durch Fettdruck hervorgehoben und mit 1 bis 108 (tiefgestellt) nummeriert. Der Abschnitt des Exon 1 (Beginn und Ende) ist mit einem Stern (*) markiert und die CpG-Inseln sind unterstrichen. Die CpG-Stellen 1 bis 108 entsprechen folgenden Sequenzpositionen in SEQ ID No. 1:

Tabelle 1:

Nr.	Position in SEQ ID No. 1	Nr.	Position in SEQ ID No. 1	Nr.	Position in SEQ ID No. 1	Nr.	Position in SEQ ID No. 1
1	1418-1419	2	1469-1470	3	1480-1481	4	1529-1530
5	1554-1555	6	1587-1588	7	1590-1591	8	1651-1652
9	1657-1658	10	1660-1661	11	1662-1663	12	1691-1692
13	1702-1703	14	1704-1705	15	1738-1739	16	1759-1760
17	1774-1775	18	1795-1796	19	1840-1841	20	1854-1855
21	1929-1930	22	1946-1947	23	1960-1961	24	1972-1973
25	1974-1975	26	1983-1984	27	2003-2004	28	2010-2011
29	2029-2030	30	2035-2036	31	2073-2074	32	2087-2088
33	2089-2090	34	2101-2102	35	2107-2108	36	2113-2114
37	2115-2116	38	2117-2118	39	2120-2121	40	2126-2127
41	2139-2140	42	2141-2142	43	2155-2156	44	2171-2172
45	2186-2187	46	2205-2206	47	2217-2218	48	2220-2221
49	2223-2224	50	2250-2251	51	2253-2254	52	2255-2256
53	2263-2264	54	2267-2268	55	2277-2278	56	2280-2281
57	2283-2284	58	2293-2294	59	2297-2298	60	2332-2333
61	2344-2345	62	2349-2350	63	2365-2366	64	2374-2375
65	2394-2395	66	2415-2416	67	2425-2426	68	2429-2430
69	2431-2432	70	2445-2446	71	2476-2477	72	2522-2523
73	2524-2525	74	2529-2530	75	2549-2550	76	2556-2557
77	2560-2561	78	2563-2564	79	2569-2570	80	2585-2586
81	2601-2602	82	2610-2611	83	2614-2615	84	2625-2626
85	2639-2640	86	2655-2656	87	2886-2887	88	2718-2719
89	2737-2738	90	2750-2751	91	2753-2754	92	2856-2857
93	2878-2879	94	2886-2887	95	2903-2904	96	2910-2911
97	2920-2921	98	2942-2943	99	2966-2967	100	2970-2971
101	2974-2975	102	3007-3008	103	3061-3062	104	3070-3071
105	3108-3109	106	3115-3116	107	3171-3172	108	3215-3216

Untersuchungen der Erfinder haben gezeigt, dass die CpG-Stellen in vier CpG-Inseln (CpG-Insel 1: -356 bp bis -241 bp, 1645 bis 1760 in SEQ ID No. 1 vom Beginn des Exons 1; CpG-Insel 2: +37 bp bis +458 bp, 2038 bis 2458 in SEQ ID No. 1; CpG-Insel 3: +511 bp bis +667 bp, 2511 bis 2667 in SEQ ID No. 1 und CpG-Insel 4: +836 bp bis +990 bp, 2836 bis 2990 in SEQ ID No. 1) in Lymphoma- (U937)- und Leukämiezelllinien (Jurkat) vollständig methyliert vorliegen. Im Gegensatz dazu sind in DNA-Proben,

die von Normalprobanden isoliert wurden, die CpG-Stellen in drei CpG-Inseln (CpG-Insel 1: -356 bp bis -241 bp (1645 bis 1760 in SEQ ID No. 1) vom Beginn des Exons 1, CpG-Insel 2: +37 bp bis +458 bp (2038 bis 2458 in SEQ ID No. 1) und CpG-Insel 3: +511 bp bis +667 bp (2511 bis 2667 in SEQ ID No. 1) im *PLA2R1*-Gen nahezu vollständig unmethyliert. Die CpG-Stellen in CpG-Insel 4: +836 bp bis +990 bp (2836 bis 2990 in SEQ ID No. 1) hingegen waren auch in Proben gesunder Probanden vollständig methyliert.

In DNA-Proben aus Tumormustern (insbesondere weißen Blutzellen von Hoch-Risiko-Patienten mit MDS und Patienten mit akuten Leukämien) sind die bei Normalprobanden unmethyliert vorliegenden CpG-Stellen im *PLA2R1*-Gen verstärkt methyliert (insbesondere in der CpG-Insel 1: -356 bp bis -241 bp (1645 bis 1760 in SEQ ID No. 1). Aber auch in der CpG-Insel 2: +37 bp bis +458 bp (2038 bis 2458 in SEQ ID No. 1) und CpG-Insel 3: +511 bp bis +667 bp (2511 bis 2667 in SEQ ID No. 1) sind CpG-Stellen methyliert und unterscheiden sich deutlich von den Proben gesunder Probanden.

Bevorzugte CpG-Stellen, welche in Tumoren, nicht aber in Proben gesunder Probanden methyliert sind, umfassen CpG-Stellen in Positionen 1 und 4-87 (Positionen in SEQ ID No. 1 sind in Tab. 1 dargestellt). Die CpG-Stellen in Positionen 2, 3, 88-108 sind sowohl in Tumoren als auch in Proben gesunder Probanden methyliert. Die Anzahl und Positionen der CpG-Stellen, die in den einzelnen Tumoren methyliert vorliegen, sind unterschiedlich. Häufig sind besonders die Positionen 6-11 (Position in SEQ ID No. 1: 1587-1588, 1590-1591, 1651-1652, 1651-1652, 1660-1661 und 1662-1663) und die Positionen 31-36 (Positionen in SEQ ID No. 1: 2073-2074, 2087-2088, 2089-2090, 2101-2102, 2107-2108 und 2113-2114) in Tumoren, nicht aber in Proben gesunder Probanden methyliert.

Eine stromabwärts in 3'-Richtung liegende CpG-Insel (CpG-Insel 4: +836 bp bis +990 bp (2836 bis 2990 in SEQ ID No. 1) im *PLA2R1*-Gen war in Proben von Hoch-Risiko-Patienten mit MDS und Patienten mit akuten Leukämien und U937-Leukämiezellen, aber auch in DNA-Proben von Normalprobanden vollständig methyliert.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung methylierter und unmethylierter Sequenzen des *PLA2R1*-Gens, insbesondere die oben genannten CpG-Inseln und CpG-Stellen (Positionen 1 und 4-87), als Biomarker zur Diagnostik, Prognose und zur Kontrolle des Therapieverlaufs von Tumorerkrankungen.

Zur Detektion der DNA-Methylierung eignen sich unterschiedliche Verfahren:

In einer Variante werden dazu Unterschiede hinsichtlich der Methylierung im *PLA2R1*-Gen nach CpG-spezifischer Modifikation, bevorzugt durch Bisulfit-Modifizierung genomischer DNA, die aus

Körperflüssigkeiten wie z. B. Blut, Urin, Sputum oder aus Gewebeproben isoliert wurde, durch unterschiedliche Verfahren, wie z. B. Sequenzierung, Verwendung methylierungsspezifischer Oligonukleotide, methylierungsspezifischer Restriktasen oder durch Bestimmung von DNA-Schmelzkurven, qualitativ und/oder quantitativ bestimmt. Durch die Bisulfit-Behandlung tritt eine Sequenzänderung aller nicht-methylierter Cytosinbasen ein (Cytosin wird in Uracil umgewandelt), während 5-Methyl-Cytosin-Basen unverändert bleiben. Diese Sequenzänderung ist nur bei nicht methylierter DNA möglich, da die methylierte DNA geschützt ist. Aufgrund dieser chemischen Veränderung entstehen Sequenzen, die sich von der ursprünglichen Sequenz im Bereich der unmethylierten CpG-Stellen unterscheiden. Die modifizierte DNA wird dann bevorzugt mittels PCR amplifiziert. Die bei der PCR verwendeten Primer-Sets sind so kreiert, dass sie methylierte DNA von nicht-methylierter DNA unterscheiden und nur an modifizierte nicht-methylierte DNA (Uracil statt Cytosin) bzw. nur an nicht-modifizierte methylierte DNA binden. Weiters binden sie an verschiedenen Stellen in der kritischen Region, was zur Entstehung ungleich langer PCR-Produkte führt, die getrennt voneinander detektierbar sind.

Diese Verfahren können die direkte Sequenzierung (z. B. Pyrosequenzierung mit Massenspektrometrie) genomischer DNA nach Bisulfit-Modifizierung, aber auch MethyLight (z. B. nach Eads et al 2000 Nucleic Acids Res. 28(8): e32), MS-SnuPE (methylation-sensitive single nucleotide primer extension), MSP (methylation-specific PCR), MCA (methylated CpG island amplification), COBRA (combined bisulfite restriction analysis), Real-Time-PCR mit HMR (high melting resolution) und deren Kombinationen einschließen.

Alternativ erfolgt die Detektion der *PLA2R1*-DNA-Methylierung auch ohne vorherige Bisulfit-Modifizierung mit Hilfe methylierungssensitiver Restriktasen qualitativ und/oder quantitativ z. B. durch quantitative Real-Time-PCR.

Die Detektion der *PLA2R7*-DNA-Methylierung erfolgt bevorzugt in biologischen Körperflüssigkeiten wie Vollblut (Blutzellen), Serum, Plasma, Urin, Liquor, Sputum oder Gewebeproben insbesondere Tumorbiospien und/oder histologischen Präparaten. Aus diesen Gewebeproben wird genomische DNA mit bekannten Methoden isoliert.

In einer bevorzugten Variante erfolgt die Detektion der *PLA2R7*-DNA-Methylierung in einer Probe von Zellen, die kein oder nur wenig PLA_2 -R1 exprimieren (nachfolgend PLA_2 -R1-negative Zellen). Diese Variante eignet sich insbesondere zum Nachweis von Minimalrestenkrankung („minimal residual disease (MRD)“). Die Anreicherung der PLA_2 -R1-negativen Zellen erfolgt bevorzugt durch Separation von

sPLA₂-Rl -positiven und -negativen Zellen durch Bindung an Antikörpern gegen PLA₂-R1. Diese Antikörper sind vorzugsweise an Matrixmaterialien (z. B. magnetische Beads oder Trägermaterialien für Säulenchromatografie u. a.) immobilisiert. Alternativ erfolgt die Separation von sPLA₂-Rl -positiven und -negativen Zellen durch Durchflussszytometrie oder Immunpräzipitation mittels Antikörpern gegen sPLA₂-Rl.

Zusätzlich zu der qualitativen oder quantitativen Bestimmung der *PLA2R1*-DNA-Methylierung erfolgt bevorzugt eine Detektion der sPLA₂-Rl -Expression auf Protein-Ebene (z. B. durch Antikörper gegen sPLA₂-Rl) und/oder mRNA-Ebene. Die Detektion der PLA₂-R1 -Expression erfolgt beispielsweise durch Durchflussszytometrie, Western-Blotting oder andere immunchemische Verfahren. Bevorzugt werden diese Verfahren zur Bestimmung von sPLA₂-Rl -negativen Zellen verwendet, insbesondere zum Nachweis der Minimalresterkrankung („minimal residual disease“ (MRD)).

Gegenstand der Erfindung sind auch entsprechende Laborkits zur Diagnostik, Prognose und Therapie von Tumorerkrankungen.

Zur Detektion der *PLA2R1*-DNA-Methylierung enthält das Laborkit bevorzugt mindestens:

- Ein Reduktionsmittel, welches Cytosin in Uracil reduziert, Bisulfit und/oder methylierungssensitive DNA-Restriktasen,

sowie ggf. einen oder mehrere der folgenden Bestandteile:

- PCR-Primer, Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix, PCR-Puffer und DNA-Polymerase,
- Kontroll-DNA, insbesondere unmethylierte *PLA2R1*-DNA (Negativkontrolle) und/oder vollständig methylierte *PLA2R1*-DNA (Positivkontrolle), sowie optional eine DNA-Leiter,
- Antikörper gegen sPLA₂-Rl (ggf. an Matrixmaterialien immobilisiert),
- Puffer,
- Gebrauchsanleitung und Software zur Auswertung.

Die PCR-Primer sind so gestaltet, dass sie das *PLA2R1*-Gen oder Teile davon, insbesondere einzelne oder mehrere der oben genannten CpG-Inseln und CpG-Stellen, amplifizieren. Bevorzugt sind die PCR-Primer so gestaltet, dass sie selektiv das *PLA2R1*-Gen oder bestimmte Regionen des Phospholipase A2 Rezeptor- 1-Gens, insbesondere einzelne oder mehrere der oben genannten CpG-Inseln und CpG-Stellen, amplifizieren.

Die bei der PCR verwendeten Primer-Sets sind bevorzugt zusätzlich so kreiert, dass sie methylierte DNA von nicht-methylierter DNA unterscheiden und nur an modifizierte nicht-methylierte DNA (Uracil statt Cytosin) bzw. nur an nicht-modifizierte methylierte DNA binden. Weiters binden sie an verschiedenen Stellen in der kritischen Region, was zur Entstehung ungleich langer PCR-Produkte führt, die getrennt voneinander detektierbar sind.

Die Primer zur *PLA2R7*-DNA-Detektierung der Methylierung sind bevorzugt ausgewählt aus den Sequenzen gemäß SEQ 1D No. 6 bis 26.

Die Erfindung gestattet vorteilhaft den sensitiven und spezifischen Nachweis von malignen Veränderungen bereits auf Zellebene, wozu einzelne wenige veränderte Zellen erforderlich sind. Dadurch wird eine frühzeitige Diagnostik von Tumorerkrankungen möglich. Durch die Erfindung wird somit eine verbesserte Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen ermöglicht mit dem Ziel, die Mortalitäts- und Morbititätsraten von tumorerkrankten Patienten deutlich zu verringern.

Vorteilhaft können anhand der *PLA2R7*-DNA-Methylierungen DNA-Proben von Patienten mit Tumorerkrankungen, insbesondere Leukämiepatienten, Hochrisikopatienten mit MDS und Patienten mit AML sowie Patienten mit Prostatumoren, eindeutig von DNA-Proben unterschieden werden, die von Normalprobanden ohne Erkrankungen stammen.

Darauf aufbauend ermöglicht die Erfindung die Kontrolle der Antitumorthherapie, insbesondere wenn Methyltransferase-Hemmstoffe oder andere Substanzen, welche die Methylierung des *PLA2R1* reduzieren, eingesetzt werden.

Die Erfindung ist dabei nicht auf die Differenzierung von Blutkrebszellen und normalen Blutzellen beschränkt, sondern kann auch bei der Differenzierung von malignen Zellen solider Tumoren, wie z. B. bei Prostatakarzinomen, eingesetzt werden, da auch in soliden Tumoren, insbesondere Prostatumorzellen im Vergleich zu normalen epithelialen Zellen eine verstärkte Methylierung des *PLA2R1*-Gen beobachtet wurde.

Die Erfindung wird bevorzugt, insbesondere zur Diagnose, Prognose und Therapiekontrolle, auf Tumorerkrankungen ausgewählt aus Lymphomen, Leukämien, Neoplasien, Myelomen und Prostatumoren angewandt, insbesondere akute lymphatische Leukämie (ALL), akute myeloische Leukämie (AML), Hodgkin-Lymphome, myelodysplastische Syndrome (MDS), myeloproliferative Neoplasien, chronische myeloische Leukämien (CML), Multiple Myelome (MM, Plasmozytome), B- und T-Zell-Lymphome (NHL), Chronische Lymphozyten-Leukämien, Polycythaemia vera, primäre

Myelofibrosen, Aggressive B- und T-Zell-Lymphome, Indolente (reife) B- und T-Zell-Lymphome, B-CLL, Prolymphozytenleukämie (B-PLL, T-PLL), T-Zell "Large Granulär Lymphocyte"-Leukämien (T-LGL), adulte T-Zell-Leukämien (ATL), Lymphome der Haut, kutane T-Zell-Lymphome, Mycosis fungoides, Sezary-Syndrome, Lymphome des ZNS, Lymphome des GI-Traktes, Magenlymphome, intestinale Lymphome und Prostatatumorerkrankungen, aber auch auf Pankreas-, Hoden-, Mundhöhlen- und Rachentumoren, Speiseröhren-, Kehlkopf-, Schilddrüsen-, Magen-, Darm-, Lungen-, Nieren- und ableitende Harnwegs- und Harnblasentumoren, Mamma-, Eierstock-, Gebärmutterhals- und Gebärmutterkörper Tumoren, malignes Melanom, Gallenblasentumoren, Astrozytome, Glioblastome und Neuroblastome.

Die Erfindung eignet sich weiter zum Einsatz bei der Entwicklung und Suche von Wirkstoffen zur Prävention und Therapie von Tumorerkrankungen.

Dazu werden in einem Screeningverfahren bevorzugt Tumorzellen oder Tumorzelllinien, in denen *PLA2R1*-DNA methyliert vorliegt, mit zu testenden Substanzen inkubiert.

Anschließend (z. B. nach 2-6 Tagen) wird die *PLA2R7*-DNA-Methylierung in den Tumorzellen oder Tumorzelllinien, wie oben beschrieben detektiert, und die *PLA2R7*-DNA-Methylierung mit und ohne Einwirkung der zu testenden Substanzen verglichen. Der Vergleich erfolgt entweder basierend auf einer mitgeführten Kontrolle (Tumorzellen oder Tumorzelllinien ohne Testsubstanz) oder Vergleichsdaten aus vorherigen Messungen.

Substanzen, welche die *PLA2R7*-DNA-Methylierung vermindern, eignen sich voraussichtlich zur Prävention und Therapie von Tumorerkrankungen. Die so ermittelten Substanzen können vorteilhaft weiter in einem Tiermodell auf ihre Antitumorwirkung und Verträglichkeit getestet werden.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Abbildungen und Ausführungsbeispiele näher erläutert, ohne auf diese beschränkt zu sein:

Abb. 1: Bestimmung von *PLA₂RI*-mRNA-Transkripten mittels RT-PCR in U937-Leukämiezellen. L: Größenstandard; 1, 6: Leerwert; 2, 7: *IFN-γ*; 3: *IL-1β*; 5: *IL-6*; 5: *TNF-α*; 6: Leerwert; 7: *IFN-γ*; 8: *IL-1β*; 9: *IL-6*; 10: *TNF-α*.

Abb. 2: Untersuchung des *PLA2R1*-Promotors und Exon 1 (Nukleotidbereich -2000 bp bis zum Beginn des Exons 1 und +2200 bp nach Beginn des Exons 1) hinsichtlich des Vorkommens von CpG-Stellen

mittels MethPrimer-Software; CpG-Inseln in den Nukleotidbereichen -356 bp bis -241 bp, +37 bp bis +458 bp, +511 bp bis +667 bp und +836 bp bis +990 bp.

Abb. 3: Sequenzausschnitt des *PLA2R1*-Gens (Nukleotidbereich -2000 bp vom Beginn des Exons 1 und +2199 bp nach Beginn des Exons 1. CpG-Stellen in den Nukleotidbereichen -356 bp bis -241 bp, +37 bp bis +458 bp, +511 bp bis +667 bp und +836 bp bis +990 bp) sind durch Fettdruck und Unterstreichung hervorgehoben.

Quellen: GenBanks Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37), NC_000002.11 und NT_005403.17; Alternate assembly (Celera), AC_000045.1 und NW_921585.1 bzw. Alternate assembly (HuRef), AC_000134.1 und NW_001838860.1.

Chromosom: 2; Lokalisation: 2q23-q24; GenelD: 22925; *primäre Quelle: HGNC: 9042. Sequenz unter:* [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&term=%28pla2r1%29%20AND%20%28Homo%20sapiens%29%20AND%20%28alveolar%20proliferation%20NOT%20new%20entry%29&log\\$=genes&logdbfrom=pubmed&sort=weight](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&term=%28pla2r1%29%20AND%20%28Homo%20sapiens%29%20AND%20%28alveolar%20proliferation%20NOT%20new%20entry%29&log$=genes&logdbfrom=pubmed&sort=weight) (National Center for Biotechnology Information NCB1, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA) und SEQ ID No. 1.

Abb. 4: Verwendung methylierungsspezifischer Restriktasen *HinfI* und *HgaI* zum Methylierungsnachweis von CpG-Stellen in den Positionen 9 und 20 des Fragmentes 1 im *PLA2R1*-Gen bei Jurkat- und U937-Leukämiezellen und Leukozyten eines Normalprobanden [NP-1] in (A) bzw. eines Patienten [Pat. 21] mit AML und Normalprobanden [NP2 und NP3] in (B).

Abb. 5: Verwendung methylierungsspezifischer Restriktasen *Acil*, *BstUI*, *BsrBI* und *BceAI* zum Methylierungsnachweis von CpG-Stellen im Fragment 1 des *PLA2R1*-Gens von Leukozyten eines Normalprobanden (A), U937-Leukämiezellen (B) und eines Patienten mit AML (C).

Abb. 6: Restriktion genomischer DNA mittels methylierungssensitiver Restriktase *HgaI* und anschließender Amplifikation zur Bestimmung des Methylierungsgrades einer CpG-Stelle im Fragment 1 (Position 9) des *PLA2R1*-Gens ohne Natriumbisulfit-Modifizierung in U937-Leukämiezellen (Bahnen 2 und 3), Blutleukozyten eines Patienten mit AML, M1 (Patient 21, Bahnen 4 und 5) und eines Normalprobanden (NP1, Bahnen 6 und 7). Bahnen 1 und 8: 100 bp-Ladder, Bahnen 2, 4 und 6 wurden mit *HgaI* und Bahnen 3, 5, und 7 mit Puffer versetzt. Bahn 9: Leerwert ohne Template.

Abb. 7: Restriktion genomischer DNA mittels methylierungssensitiver Restriktase *HgaI* und anschließender Amplifikation zur Bestimmung des Methylierungsgrades einer CpG-Stelle im Fragment 1 (Position 9) des *PLA2R1*-Gens ohne Natriumbisulfit-Modifizierung. (A) Normalprobanden 1-4 (Bahnen 2-9), Patient 1 mit MDS (Bahnen 10, 11). (B) Patient 2 mit MDS (Bahnen 2, 3), Patient 5 mit MDS (Bahnen 4 und 5), Patient 7 mit MDS (Bahnen 6 und 7), Patient 8 mit MDS (Bahnen 8 und 9) und U937-

Leukämiezellen (Bahnen 10 und 11). Bahnen 2, 4, 6, 8 und 10 wurden mit *Hgal* und Bahnen 3, 5, 7, 9 und 11 mit Puffer versetzt. Bahn 1: 100 bp-Ladder, Bahn 12: ohne Template.

Abb. 8: Übersicht über die Methylierungen der CpG-Stellen 1 bis 21 im untersuchten Fragment 1 des *PLA2R1*-Gens bei U937- und Jurkat-Leukämiezellen, 6 Normalprobanden (NP 1-4, NP 29 und 30) und Patienten mit MDS (Pat. 7 und 8) und AML (Pat. 19, 21-24, 53 und 54).

Abb. 9: Übersicht über die Methylierungen der CpG-Stellen 22 bis 61 in dem untersuchten Fragment 2A des *PLA2R1*-Gens bei U937-Leukämiezellen, Normalprobanden 1-4 (NP 1-4) und Patienten 21, 22, 53 und 54 mit AML (Pat. 21, Pat. 22, Pat. 53 und Pat.54).

Abb. 10: Übersicht über die Methylierungen der CpG-Stellen 62 bis 91 in dem untersuchten Fragment 2B des *PLA2R1*-Gens bei U937-Leukämiezellen, Normalprobanden 1-4 (NP 1-4) und Patienten 21, 22, 53 und 54 mit AML (Pat. 21, Pat. 22, Pat. 53 und Pat.54).

Abb. 11: Übersicht über die Methylierungen der CpG-Stellen 92 bis 108 in dem untersuchten Fragment 3 des *PLA2R1*-Gens bei U937-Leukämiezellen, Normalprobanden 1-4 (NP 1-4) und Patienten 21, 22, 53 und 54 mit AML (Pat. 21, Pat. 22, Pat. 53 und Pat.54).

Abb. 12: Übersicht über die Methylierung von CpG-Stellen 1 bis 21 in der Insel 1 (Fragment 1) des *PLA2R1*-Gens bei normalen epithelialen Prostatazellen (PrEC), und drei Prostatatumorzelllinien (PC-3, DU-145 und LNCaP).

Abb. 13: Prinzip der Differenzierung zwischen Blut, Urin oder anderen Probenarten von Patienten mit Tumorerkrankungen und von gesunden Probanden.

In den Abb. 8 bis 13 steht ein weißes Kästchen jeweils für einen Methylierungsgrad von 0 % bis 25 %, ein gestricheltes Kästchen für einen Methylierungsgrad von 30 % bis 70 % und ein schwarzes Kästchen für einen Methylierungsgrad von 75 % bis 100 %.

Abb. 14: Durchschnittliche Methylierungsgrade (Mittelwert und Standardabweichung) der CpG-Stellen 1-108 des *PLA2R1*-Promoters von genomischer DNA aus Blutzellen von gesunden Probanden (N=10) und Leukämiepatienten (N=18). Ferner sind die Methylierungen der CpG-Stellen 1-108 des *PLA2R1*-Promoters in der Myelomzelllinie RPM1-8866, der lymphatischen Leukämiezelllinie Jurkat und der myeloischen Leukämiezelllinie U937 dargestellt. Der Bereich der in der HRM analysierten Nukleinsäuren ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet.

Abb. 15: Darstellung der durchschnittlichen Methylierungen der CpG-Stellen 6-14 des *PLA2R1*-Gens von 18 Leukämiepatienten.

Abb. 16: Durchschnittliche Methylierungsgrade des PLA2R1-Gens von Leukämiepatienten (N=31) und normalen Probanden (N=51) durch HRM-Analyse. In der Gruppe der Leukämiepatienten wiesen ein Patient mit AML-M4 eine Methylierung von 7% und ein Patient mit AML-MO von 3% auf. In der Kontrollgruppe wies eine Probandin eine PLA2R1-Methylierung von 21% auf. Die Unterschiede zwischen Leukämiepatienten und normalen Probanden waren im Mann-Whitney U-Test signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$).

Abb. 17: HRM-Analysen von Bisulfit-behandelter genomischer DNA von Leukämiepatienten (P22, P23, P40 und P43 mit jeweils AML-M1 und P37 mit ALL), gesunden Probanden (N11-N20), Jurkat- und U937-Zellen. Eine Kalibrierung wurde mit 0%, 20%, 30%, 40%, 60% und 100% methylierter Kontroll-DNA durchgeführt.

Abb. 18: Schmelzkurven (Melt)-Analysen von Bisulfit-behandelten und amplifizierten genomischen DNA-Proben aus Blutleukozyten von Leukämiepatienten (P22 und P23 mit jeweils AML-M1) im Vergleich zu unmethylierten (0%) und vollständig methylierten (100%) Kontroll-DNA. Bei P22 enthalten der größere Anteil der Blutleukozyten unmethylierte DNA-Sequenzen des PLA2R1-Gens, während bei P22 der größere Anteil hypermethylierte DNA-Sequenzen aufweist.

Abb. 19: HRM-Analysen von Bisulfit-modifizierter genomischer DNA von 2 Patienten (P1 und P7) mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) vor und nach Behandlung mit 5-Azacytidin (Vidaza). Bei den beiden Patienten, die als „Responder“ bezeichnet wurden, sank der Methylierungsgrad des PLA2R1-Gens.

Abb. 20: HRM-Analysen von Bisulfit-modifizierter genomischer DNA eines Patienten (P3) mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) vor und nach Behandlung mit 5-Azacytidin (Vidaza). Bei diesem Patient, der als „Non-Responder“ bezeichnet wurde, stieg der Methylierungsgrad des PLA2R1-Gens während der Behandlung signifikant an.

In den Abbildungen 17 bis 20 ist auf der X-Achse die Schmelztemperatur in °C und auf der Y-Achse das normalisierte Minus (normalized minus).

Untersuchungen zur Expression von sPLA₂-RI durch RT-PCR

Nach Isolierung zellulärer RNA aus humanen monozytären Leukämiezellen (U937-Zellen, ATCC CRL-1593.2) mittels TRIzol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) und reverser Transkription mit Hilfe von GeneAmp RNA-PCR Kits (PerkinElmer LAS GmbH, Jügesheim, Germany) wurden die cDNA von sPLA₂-RI unter Verwendung entsprechender Primer (Tab. 1) amplifiziert und semi-quantitativ bestimmt. Als Kontrolle diente die Bestimmung der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-spezifischen mRNA. Die Oligonukleotide wurden in einer Endkonzentration von 0.8 µM eingesetzt. Die PCR-Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt: 40 Zyklen bei 94 °C für 30 Sekunden, 68 °C für 30 Sekunden und 72 °C für 1 Minute. Die eingesetzten Puffer und Reagenzien stammten vom GeneAmp Kit (PerkinElmer LAS GmbH). Die amplifizierten Produkte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dabei waren 1) die basale Expression, 2) die Expressionen in Abhängigkeit von der Inkubation mit proinflammatorischen Cytokinen (IL-1β, IL-6, TNF-α und IFN-γ) und 3) die Expressionen nach gleichzeitiger Hemmung der DNA-Methylierung mit 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-dC) von Interesse (Abb. 1).

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide zum Nachweis von sPLA₂-RI-mRNA

Gen	Sequenzen	SEQ ID No.	Größe
<i>PLA2GIR</i>	5'-CAG AAG AAA GGC AGT TCT GGA TTG-3'	2	496 bp
	5'-AAA GCC ACA TCT CTG GCT CTG ATT-3'	3	
<i>GAPDH</i>	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT TG-3'	4	439 bp
	5'-GCA GGA GGC ATT GCT GAT GAT CTT G-3'	5	

Nachweis von 5'-CpG-Stellen im *PLA2R1*-Gen

Mit Hilfe von MethPrimer-Software konnten im *PLA2R1*-Gen im Nukleotidbereich -2000 bp vom Exon 1 und +2199 bp nach Beginn des Exons 1 vier S'-CpG-Inseln identifiziert werden (Abb. 2; Chromosom 2, Lokalisation: 2q23-q24; GenID: 22925; primäre Quelle: HGNC: 9042; Sequenz ENSG00000153246 ENSEMBL-Datenbank (<http://www.ensembl.org/>). Das Exon 1 selbst ist 315 bp lang. In 5'-Richtung stromaufwärts enthält das *PLA2R1*-Gen eine S'-CpG-Inselle: -356 bp bis -241 bp vom Beginn des Exons 1 und drei weitere S'-CpG-Insellen in den Nukleotidbereichen +37 bp bis +458 bp, +511 bp bis +667 bp und +836 bp bis +990 bp.

Untersuchungen zur DNA-Methylierung von 5'-CpG-Stellen im *PLA2R1*-Gen durch Sequenzierung

Nach Isolierung genomischer DNA aus U937- und humanen lymphozytären Jurkat-Leukämie-Zelllinien, normalen epithelialen Prostatazellen und Prostatatumorzelllinien (PC-3, DU-145 und LNCaP) sowie aus Leukozyten von Normalprobanden und Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS) und akuter myeloischer Leukämie (AML) mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, DE) wurde die DNA nach Frommer et al. [59] mittels EpiTect Bisulfit Kit (Qiagen) modifiziert und anschließend gereinigt.

Um die 5'-aufwärts gelegene Promotorregion des *PLA2R1*-Gens im Nukleotidbereich -662 bp bis zum Exon 1 und stromabwärts bis +1275 bp das *PLA2R1*-Gen zu sequenzieren, wurden 4 Fragmente in einer nested PCR amplifiziert. Dazu kamen folgende Oligonukleotid-Primerpaare zum Einsatz:

Fragment 1 (-662 bp bis -86 bp):

extrinsische Primer:

5' - TTTGTTGGTTATTTGAAGGAGGA- 3' (SEQ ID No. 6) und
5' - ACCATCTACCCATCCCAAAA- 3' (SEQ ID No. 7)

und intrinsische Primer:

5' - TATATTTTAGTTAGGGTTGTTTTAT - 3' (SEQ ID No. 8) und
5' - TTCCTACCTTTAAATAAAAACAAA- 3' (SEQ ID No. 9)

Fragment 2 (-105 bp bis +783 bp):

extrinsische Primer:

5' - CTGGTTATTTGAAGGAGGACAGT- 3' (SEQ ID No. 10) und
5' - CCATCTGCCCATCCCAGAAATT- 3' (SEQ ID No. 11) und

intrinsische Primer:

5' - CATTCTAGCCAGGGCTGTCCT- 3' (SEQ ID No. 12) und
5' - AATTCCTGCCTTTGGGGTGGG- 3' (SEQ ID No. 13).

Anstelle des gesamten Fragmentes 2 wurden z. T. auch Teilfragmente amplifiziert, wozu folgende Primer-Paare verwendet wurden:

extrinsische Primer:

5' - TTTGTTTTTATTTTAAAGGTAGGAA- 3' (SEQ ID No. 14) und
5' - ACCCTATCTCAAAAAACAAACAA- 3' (SEQ ID No. 15)

Fragment 2A:

intrinsische Primer:

5´-TTTTTGGGATGGGTAGATGG-3´ (SEQ ID No. 16) und
 5´-CATACTCAAACTACTAACACA-3´ (SEQ ID No. 17)

Fragment 2B:

intrinsische Primer:

5´-TTTGAGTGGTAGGGTGAGT-3´ (SEQ ID No. 18) und
 5´-ACCTAACTTAAAAATCACTCCTA-3´ (SEQ ID No. 19)

Fragment 3 (+824 bp bis +1275 bp):

semi-nested-PCR: extrinsische Primer:

5´-TAGGAGCGATTTTAAAGTTAGGT-3´ (SEQ ID No. 20) und
 5´-CTCTCCTCCCTCTCTTTACA-3´ (SEQ ID No. 21);

intrinsische Primer:

5´-TAGGAGCGATTTTAAAGTTAGGT-3´ (SEQ ID No. 20) und
 5´-CAACCTTCTAAATCTCATATATAA-3´ (SEQ ID No. 22).

Die Oligonukleotide wurden in einer Endkonzentration von 0,8 µM eingesetzt. Die Bedingungen für die PCR waren folgende: 20 Zyklen bei 95 °C für 45 Sekunden, 44 °C für 60 Sekunden und 72 °C für 45 Sekunden unter Verwendung der extrinsischen Primer und 35 Zyklen bei 95 °C für 30 Sekunden, 45 °C für 45 Sekunden und 72 °C für 30 Sekunden unter Verwendung der intrinsischen Primer. Die Puffer und Reagentien stammten vom GeneAmp Kit (PerkinElmer LAS GmbH). Die PCR-Produkte wurden schließlich mittels QIAquick PCR-Reinigungskit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) gereinigt.

Nach Markierung der PCR-Produkte mittels BigDye Terminator Sequencing Standard Version 3.1 (Qiagen) wurden die DNA-Sequenzen der PCR-Produkte am ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert.

Untersuchungen zur DNA-Methylierung von 5'-CpG-Stellen im PLA2R1-Gen durch methylierungsspezifische Restriktasen

Alternativ zur direkten Sequenzierung wurden PCR-Produkte nach Modifizierung genomischer DNA durch Natriumbisulfit-Behandlung mit Restriktasen inkubiert.

Als Beispiel wurde das Fragment 1, das die S'-CpG-Insel 1 des *PLA2RI-Gens* umfasst, mit methylierungssensitiven Restriktasen wie *Hinfl* und *HgaI* inkubiert und anschließend in der Agarosegelelektrophorese analysiert. Mit Hilfe dieser Methode konnten die Methylierungen der 5"-CpG-Stellen in Positionen 9 und 20 im Fragment 1 bestimmt werden (Abb. 4). Ferner wurden die methylierungssensitiven Restriktasen *Acil*, *BstUI*, *BsrBI* und *BceAI* zur Bestimmung der Methylierung weiterer S'-CpG-Stellen im *PLA2RI-Gen* bestimmt (Abb. 5). Durch diese Untersuchungen konnten die Ergebnisse, die durch Sequenzierung erhalten wurden, bestätigt werden.

Untersuchungen zur DNA-Methylierung von 5'-CpG-Stellen im *PLA2RI-Gen* ohne Natriumbisulfit-Behandlung genomischer DNA

Um eine Natriumbisulfit-Modifizierung genomischer DNA zu umgehen, wurden DNA-Proben direkt mit methylierungssensitiven Restriktasen behandelt und anschließend durch PCR-Amplifikation und Analyse im Agarosegel untersucht.

Als Beispiel wurden genomische DNA von U937-Leukämiezellen und Leukozyten von Normalprobanden bzw. Patienten mit MDS bzw. AML mit der methylierungssensitiven Restriktase *HgaI* inkubiert und anschließend durch nested PCR amplifiziert. Folgende Oligonukleotide wurden dafür eingesetzt:

extrinsische Primer:

5` - CTGGTTATTTGAAGGAGGACAGT-3` (SEQ ID No. 23) und

5` - CCATCTGCCCATCCCAGAAATT-3` (SEQ ID No. 24) und

intrinsische Primer:

5` - CATTCTAGCCAGGGCTGTCCT-3` (SEQ ID No. 25) und

5` - AATTCCTGCCTTTGGGGTGGG-3` (SEQ ID No. 26).

Mittels dieser Untersuchungen konnte die Methylierung der S'-CpG-Stelle Nr. 9 im Fragment 1 bestimmt (Abb. 6 und 7) und die Daten, die durch Sequenzierung erhalten wurden, bestätigt werden.

Die Ergebnisse werden wie folgt zusammengefasst:

- (1) Überraschend wurde in U937-Zellen eine epigenetische Stilllegung (*epigenetic silencing*) des *PLA2RI-Gens* festgestellt (Abb. 1).
- (2) Anschließend Untersuchungen zeigten, dass vier S'-CpG-Inseln in unmittelbarer Nähe des Exons 1 im *PLA2RI-Gen* existieren (Abb. 2). Diese vier S'-CpG-Inseln liegen in U937-Leukämiezellen vollständig methyliert vor (Abb. 8-1 1).

- (3) Im Gegensatz dazu waren in DNA-Proben, die aus weißen Blutzellen von Normalprobanden isoliert wurden, drei S'-CpG-Inseln im *PLA2R1-Gen* nahezu vollständig unmethyliert (Abb. 8-1 1).
- (4) Untersuchungen von DNA-Proben aus weißen Blutzellen von Hoch-Risiko-Patienten mit MDS und Patienten mit akuten Leukämien zeigten, dass die bei Normalprobanden unmethyliert vorliegenden 5'-CpG-Inseln im *PLA2R1-Gen* verstärkt methyliert waren und sich deutlich von den Proben gesunder Probanden unterschieden (Abb. 8-1 1).
- (5) Eine stromabwärts in 3"-Richtung liegende S'-CpG-Insel im *PLA2R1-Gen* war in Proben von Hoch-Risiko-Patienten mit MDS und Patienten mit akuten Leukämien und U937-Leukämiezellen, aber auch in DNA-Proben von Normalprobanden vollständig methyliert (Abb. 11).
- (6) Beispiele für diese Verfahren basierend auf der Verwendung methylierungsspezifischer Restriktasen nach Natriumbisulfit-Modifizierung genomischer DNA-Proben zur Bestimmung des Methylierungsgrades von S'-CpG-Stellen im *PLA2R1-Gen* sind in Abb. 4 und 5 dargestellt.
- (7) Ein Beispiel für diese Verfahren zur Bestimmung der Methylierung von S'-CpG-Stellen im *PLA2R1-Gen*, die keine Natriumbisulfit-Modifizierung genomischer DNA erfordern und damit besonders für die Untersuchung geringer DNA-Probemengen, z. B. aus Paraffinschnitten, geeignet sind und den Einsatz methylierungssensitiver Restriktasen vorsehen, ist in Abb. 6 und 7 dargestellt.
- (8) Auch in Prostatazelllinien (PC-3-, DU-145- und LNCaP-Zellen) wurde im Vergleich zu normalen epithelialen Prostatazellen (PrEC) eine deutliche erhöhte *PLA2R1*-DNA-Methylierung festgestellt (Abb. 12). Die Erfindung ist damit auch auf solide Tumore anwendbar.

Untersuchung des Methylierungsgrads in Leukämiepatienten und gesunden Probanden

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der hoch auflösenden Schmelzkurven-Analyse (high resolution melting curve analysis; HRM) von Leukämiepatienten und gesunden Probanden. In der Gruppe der Leukämiepatienten wiesen 2 Patienten eine Methylierung des *PLA2R1*-Gens unterhalb von 10% (7% bei einem Patienten mit AML-M4 und 3% bei einem Patienten mit AML-MO) und in der Kontrollgruppe eine Probandin eine *PLA2R1*-Methylierung von 21% auf. Die Unterschiede hinsichtlich der Methylierungen des *PLA2R1*-Gens zwischen beiden untersuchten Gruppen waren im Mann-Whitney U-Test signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$).

Tabelle 3:

	N	Methylierung
Leukämien	31	26,8% ± 15,9% (min. 12%*, max. 80%)
Kontrollen	51	6,9% ± 2,5%

*Ausnahme: 2 Patienten mit *PLA2R1*-Methylierungen von 7% bzw. 3%

In der Patentbeschreibung wird folgende Nichtpatentliteratur zitiert:

Literaturverzeichnis

- [I] Kramer RM, Hession C, Johansen B, Hayes G, McGray P, Chow EP, Tizard R, Pepinsky RB. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A₂. J Biol Chem. 1989; 264: 5768-5775.
- [2] Seilhamer JJ, Pruzanski W, Vadas P, Plant S, Miller JA, Kloss J, Johnson LK. Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic synovial fluid. J Biol Chem. 1989; 264: 5335-5338.
- [3] Valentin E, Ghomashchi F, Gelb MH, Lazdunski M, Lambeau G. On the diversity of secreted phospholipases A₂. Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group 11 enzymes. J Biol Chem. 1999; 274: 31195-31202.
- [4] Davidson FF, Dennis EA. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. J Mol Evol. 1990; 31: 228-238.
- [5] Kudo 1, Murakami M. Phospholipase A₂ enzymes. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002; 68-69: 3-58.
- [6] Dennis EA. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. Trends Biochem Sci. 1997; 22: 1-2.
- [7] Murakami M, Shimbara S, Kambe T, Kuwata H, Winstead MV, Tischfield JA, Kudo 1. The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A₂s are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A₂. J Biol Chem. 1998; 273: 14411-14423.
- [8] Chang HW, Kudo 1, Tomita M, Inoue K. Purification and characterization of extracellular phospholipase A₂ from peritoneal cavity of caseinate-treated rat. J Biochem (Tokyo). 1987; 102: 147-154.
- [9] Mounier C, Vargaftig BB, Franken PA, Verheij HM, Bon C, Touqui L. Platelet secretory phospholipase A₂ fails to induce rabbit platelet activation and to release arachidonic acid in contrast with venom phospholipases A₂. Biochim Biophys Acta. 1994; 1214: 88-96.
- [10] Inada M, Tojo H, Kawata S, Tarui S, Okamoto M. Preferential distribution of group-II-like phospholipase A₂ in mononuclear phagocytic cells in rat spleen and liver. Eur J Biochem. 1991; 197: 323-329.
- [II] Horigome K, Hayakawa M, Inoue K, Nojima S. Purification and characterization of phospholipase A₂ released from rat platelets. J Biochem (Tokyo). 1987; 101: 625-631.
- [12] Murakami M, Kudo 1, Suwa Y, Inoue K. Release of 14-kDa group-11 phospholipase A₂ from activated mast cells and its possible involvement in the regulation of the degranulation process. Eur J Biochem. 1992; 209: 257-265.
- [13] Nevalainen T, Haapanen T. Distribution of pancreatic (group 1) and synovial-type (group 11) phospholipase A₂ in human tissue. Inflammation 1993; 17: 453-464.
- [14] Andersen S, Sjursen W, Laegreid A, Austgulen R, Johansen B. Immunohistologic detection of non-pancreatic phospholipase A₂ (type 11) in human placenta and its possible involvement in normal parturition at term. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1994; 51: 19-26.
- [15] Murakami M, Nakatani Y, Atsumi G, Inoue K, Kudo 1. Regulatory functions of phospholipase A₂. Crit Rev Immunol. 1997; 17: 225-283.

-
- [16] Takayama K, Hara S, Kudo I, Inoue K. Detection of 14-kDa group 11 phospholipase A2 in human seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 178: 1505-1511.
- [17] Nevalainen TJ, Meri K-M, Niemi M. Synovial type (group 11) phospholipase A2 in human seminal plasma. *Andrologia* 1993; 25: 355-330.
- [18] Nevalainen TJ, Aho HJ, Peuravuori H. Secretion of group 2 phospholipase A2 by lacrimal gland. *Invest. Ophthalmol. Visc Sei* 1994; 32: 417-421.
- [19] Kunze H, Bohn E. Phospholipase A2 and Prostaglandins in human seminal plasma. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 1978; 3: 159-165.
- [20] Rizzo M, Parraga M. Lysophosphatidylcholine treatment allows interspecies fertilization of hamster oocytes with zona pellucida by human spermatozoa. *J Exp Zool.* 1995; 271: 151-154.
- [21] Senegas-Balas F, Balas D, Verger R, DeCaro A, Figarella C, Ferrato F, Lechene P, Bertrand C, Ribet A. Immunohistochemical localization of intestinal phospholipase A2 in rat Paneth cells. *Histochemistry.* 1984; 81: 581-584.
- [22] Farrugia W, Aitken MA, van Dünne F, Wong MH, Brennecke SP, Scott KF, Rice GE. Type 11 phospholipase A2 in human gestational tissues: subcellular distribution of placental immuno- and catalytic activity. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1166: 77-83.
- [23] Lappas M, Rice GE. Phospholipase A2 isozymes in pregnancy and parturition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004; 70: 87-100.
- [24] Tada, K., Murakami, M., Kambe, T., and Kudo, I. Induction of cyclooxygenase-2 by secretory phospholipases A2 in nerve growth factor-stimulated rat serosal mast cells is facilitated by interaction with fibroblasts and mediated by a mechanism independent of their enzymatic functions. *J Immunol* 161:5008. 1998.
- [25] Beck, S., Lambeau, G., Scholz-Pedretti, K., *et al.* Potentiation of tumor necrosis factor- α -induced secreted phospholipase A2 (sPLA2)-UA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving sPLA2 and peroxisome proliferator-activated receptor- α activation. *J Biol Chem* 278:29799. 2003.
- [26] Jaulmes, A., Janvier, B., Andreani, M., and Raymondjean, M. Autocrine and paracrine transcriptional regulation of type IIA secretory phospholipase A2 gene in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 25:1161. 2005.
- [27] Han, W.K., Sapirstein, A., Hung, C.C., Alessandrini, A., and Bonventre, J.V. Cross-talk between cytosolic phospholipase A2a (cPLA2a) and secretory phospholipase A2 (sPLA2) in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells. sPLA2 regulates cPLA2a activity that is responsible for arachidonic acid release. *J Biol Chem* 278: 24153. 2003
- [28] Hernandez, M., Burillo, S.L., Crespo, M.S., and Nieto, M.L. Secretory phospholipase A2 activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A2 in the human astrocytoma cell line 1321N1. *J Biol Chem* 273:606. 1998.
- [29] Huwiler, A., Staudt, G., Kramer, R.M, Pfeilschifter, J. Cross-talk between secretory phospholipase A2 and cytosolic phospholipase A2 in rat renal mesangial cells. *Biochim Biophys Acta* 1348:257. 1997.
- [30] Park, D.W., Kim, J.R., Kim, S.Y., *et al.* Akt as a mediator of secretory phospholipase A2 receptor-involved inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol* 170:2093. 2003.
- [31] Silliman, C.C., Moore, E.E., Zallen, G., *et al.* Presence of the M-type sPLA₂ receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1 102. 2002.

-
- [32] Triggiani, M., Granata, F., Oriente, A., *et cd.* Secretory phospholipases A₂ induce beta-glucuronidase release and 1L-6 production from human lung macrophages. *J Immunol* 164:4908. 2000.
- [33] Triggiani, M., Granata, F., Oriente, A., *et al.* Secretory phospholipases A₂ induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur J Immunol* 32:67. 2002.
- [34] Triggiani, M., Granata, F., Balestrieri, B., *et al.* Secretory phospholipases A₂ activate selective functions in human eosinophils. *J Immunol* 170:3279. 2003.
- [35] Granata, F., Balestrieri, B., Petraroli, A., Giannattasio, G., Marone, G., and Triggiani, M. Secretory phospholipases A₂ as multivalent mediators of inflammatory and allergic disorders. *Int Arch Allergy Immunol* 131:153. 2003.
- [36] Fonteh, A.N., Marion, C R., Barham, B.J., *et al.* Enhancement of mast cell survival: a novel function of some secretory phospholipase A₂ isotypes. *J Immunol* 167:4161. 2001.
- [37] Valentin, E., and Lambeau, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1488:59. 2000.
- [38] Nicolas, J.P., Lambeau, G., and Lazdunski, M. Identification of the binding domain for secretory phospholipases A₂ on their M-type 180-kDa membrane receptor. *J Biol Chem* 270:28869. 1995.
- [39] Nicolas, J.P., Lin, Y., Lambeau, G., Ghomashchi, F., Lazdunski, M., and Gelb, M.H. Localization of structural elements of bee venom phospholipase A₂ involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. *J Biol Chem* 272: 7173. 1997.
- [40] Ancian, P., Lambeau, G., and Lazdunski, M. Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A₂. *Biochemistry* 34: 13146. 1995.
- [41] Ancian, P., Lambeau, G., Mattei, M.G., and Lazdunski, M. The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A₂. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 270: 8963. 1995.
- [42] Hanasaki, K. Mammalian phospholipase A₂: phospholipase A₂ receptor. *Biol Pharm Bull* 27:1165. 2004.
- [43] Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., Oka, S., Teraoka, H., and Matsumoto, K. Novel proliferative effect of phospholipase A₂ in Swiss 3T3 cells via specific binding site. *J Biol Chem* 266:19139. 1991.
- [44] Fossier, P., Lambeau, G., Lazdunski, M., and Baux, G. Inhibition of ACh release at an *Aplysia* Synapse by neurotoxic phospholipases A₂: specific receptors and mechanisms of action. *J Physiol* 489:29. 1995.
- [45] Kanemasa, T., Hanasaki, K., and Arita, H. Migration of vascular smooth muscle cells by phospholipase A₂ via specific binding sites. *Biochim Biophys Acta* 1125:210. 1992.
- [46] Kundu, G.C., and Mukherjee, A.B. Evidence that porcine pancreatic phospholipase A₂ via its high affinity receptor stimulates extracellular matrix invasion by normal and Cancer cells. *J Biol Chem* 272:2346. 1997.
- [47] Hanasaki, K., and Arita, H. Phospholipase A₂ receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A₂. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:71. 2002.
- [48] Augert A, Payre C, de Launoit Y, Gil J, Lambeau G, Bernard. The M-type receptor PLA₂-R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO Rep*. EMBO Rep. 2009; 10: 271-7.
- [49] Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, Kerkhoven RM, Madiredjo M, Nijkamp W, Weigelt B, Agami R, Ge W, Cavet G, Linsley PS, Beijersbergen RL,

-
- Bernards R. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 2004; 428: 431-437
- [50] Lambeau G, Schmid-Alliana A, Lazdunski M, Barhanin J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1990 Jun 5;265(16):9526-32.
- [51] Lambeau G, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem.* 2008; 77: 495-520.
- [52] Drickamer K, Fadden AJ. Genomic analysis of C-type lectins. *Biochem Soc Symp.* 2002;(69):59-72.
- [53] East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep 19;1572(2-3):364-86
- [54] Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol.* 2005 Feb;26(2): 104-10.
- [55] Hanasaki K, Yokota Y, Ishizaki J, Itoh T, Arita H. Resistance to endotoxic shock in phospholipase A2 receptor-deficient mice. *J Biol Chem.* 1997 Dec 26;272(52):32792-7
- [56] Hanasaki K, Arita H. Phospholipase A2 receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002 Aug;68-69:71-82.
- [57] Lambeau G, Lazdunski M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol Sei.* 1999 Apr;20(4): 162-70.
- [58] Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj 1, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 9363-7.
- [59] Frommer M, McDonald LE, Miliar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA Strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Mar 1;89(5): 1827-31.
- [60] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000 Apr 15;28(8):E32.
- [61] Menschikowski M, Hagelgans A, Kostka H, Eisenhofer G, Siegert G. Involvement of epigenetic mechanisms in the regulation of secreted phospholipase A2 expressions in Jurkat leukemia cells. *Neoplasia.* 2008 Nov;10(11):195-203.
- [62] Kulis M, Esteller M. DNA methylation and Cancer. *Adv Genet.* 2010;70:27-56.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose, Prognose und Therapiekontrolle von Tumorerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, dass der Methylierungsgrad des Phospholipase A2 Rezeptor-1-Gens in einer isolierten Patientenprobe bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der bestimmte Methylierungsgrad mit dem Referenz-Methylierungsgrad des Phospholipase A2 Rezeptor-1-Gens in einer Referenzprobe eines gesunden Probanden oder entsprechenden Referenzdaten verglichen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein gegenüber dem Referenz-Methylierungsgrad erhöhter Methylierungsgrad mit dem Vorliegen einer Tumorerkrankung korreliert.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Tumorerkrankung ausgewählt ist aus Lymphomen, Leukämien oder soliden Tumoren.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis des Methylierungsgrades des Phospholipase A2 Rezeptor-1-Gens in einer Probe erfolgt, in der zuvor Zellen angereichert wurden, die kein oder nur wenig PLA₂-R1 exprimieren.
6. Verfahren nach Anspruch 5 zum Nachweis einer Minimalresterkrankung („minimal residual disease“ - MRD).
7. Verwendung von methylierten Sequenzen des Phospholipase A2 Rezeptor-1-Gens als Tumormarker, insbesondere für die Diagnostik, Prognose und Therapiekontrolle von Tumorerkrankungen.
8. Verwendung nach Anspruch 7 zum Nachweis einer Minimalresterkrankung (minimal residual disease - MRD).

9. Kit für die Diagnostik, Prognose und Therapiekontrolle von Tumorerkrankungen enthaltend:

- Bisulfit und/oder methylierungssensitive Restriktasen,

sowie ggf. einen oder mehrere der folgenden Bestandteile:

- PCR-Primer, Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix, PCR-Puffer und DNA-Polymerase,
- Kontroll-DNA, insbesondere unmethylierte Phospholipase A2 Rezeptor- 1-DNA und methylierte Phospholipase A2 Rezeptor- 1-DNA, DNA-Leiter,
- Antikörper gegen PLA₂-R1 (ggf. an Matrixmaterialien immobilisiert),
- Puffer,
- Gebrauchsanleitung und Software zur Auswertung.

10. Screeningverfahren zur Ermittlung von Wirkstoffen zur Prävention und Therapie von Tumorerkrankungen, mit den Schritten:

- a.) Inkubation von Tumorzellen oder Tumorzelllinien, in denen Phospholipase A2 Rezeptor- 1-DNA methyliert vorliegt, mit einer Testsubstanz, und anschließende
- b.) Detektion der Phospholipase A2 Rezeptor- 1-DNA-Methylierung in den Tumorzellen oder Tumorzelllinien.

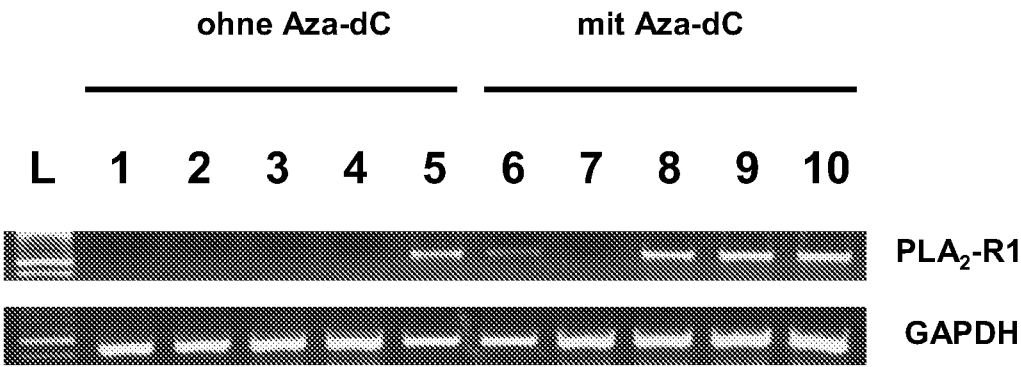


Abb. 1

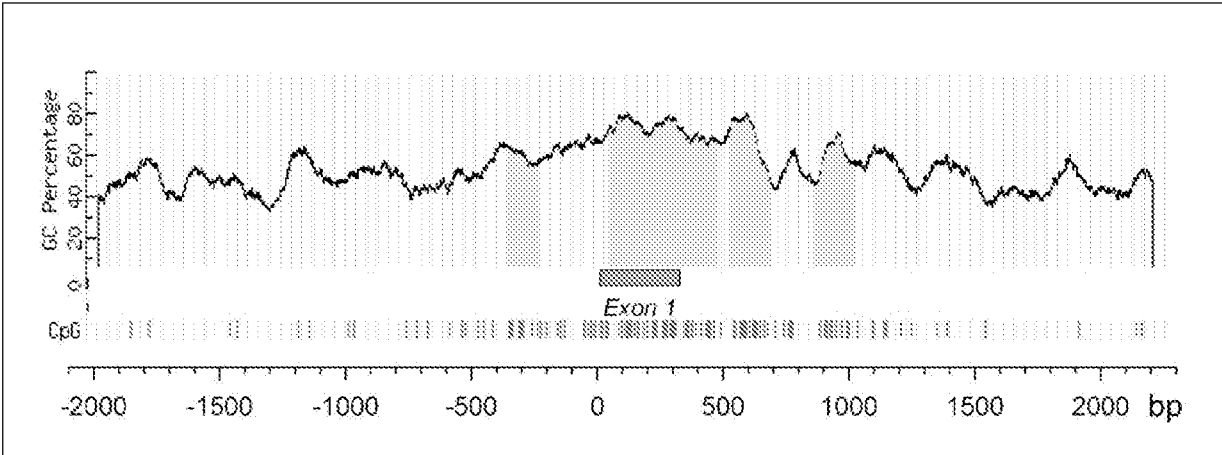


Abb. 2

Abb. 3

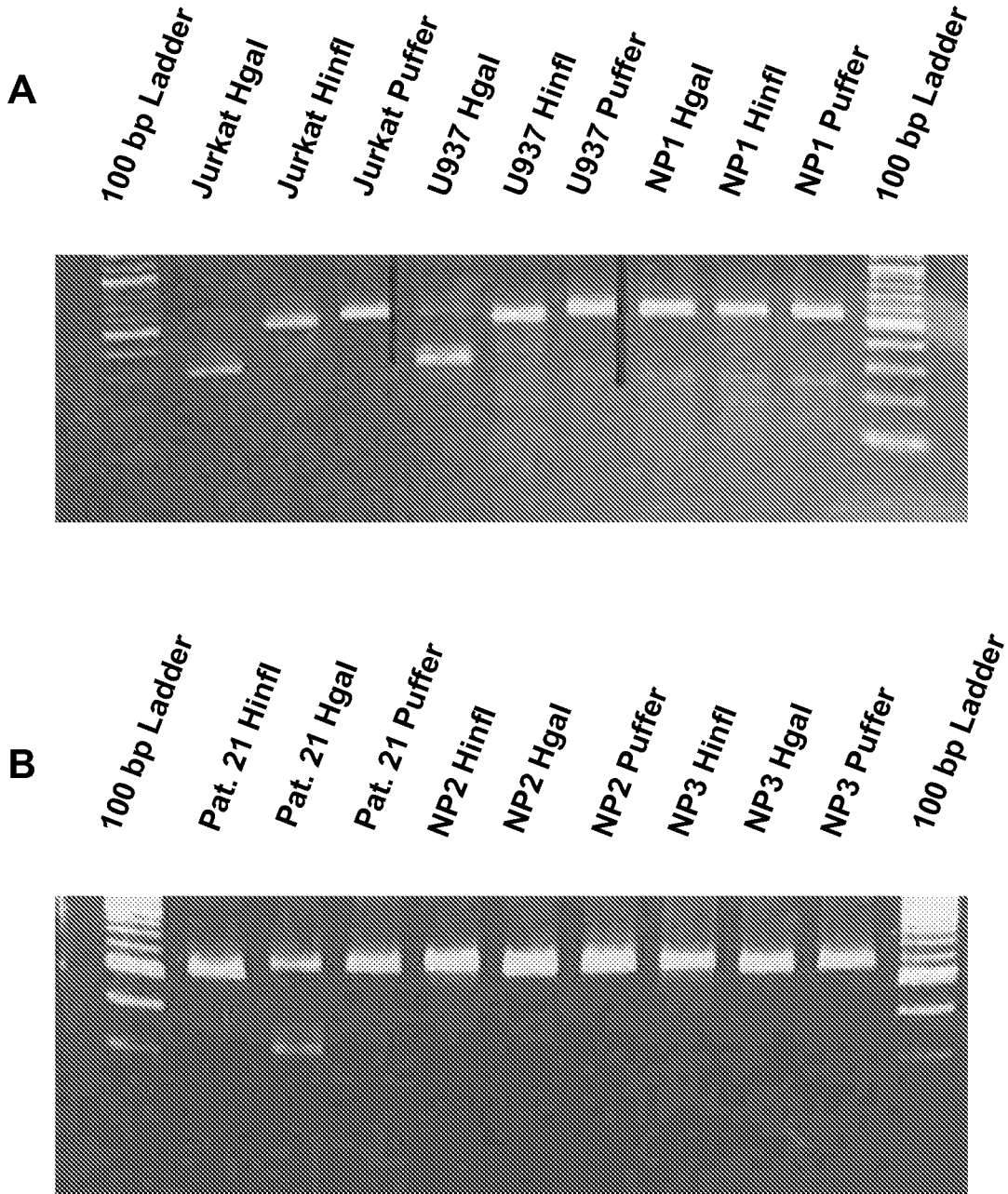


Abb. 4

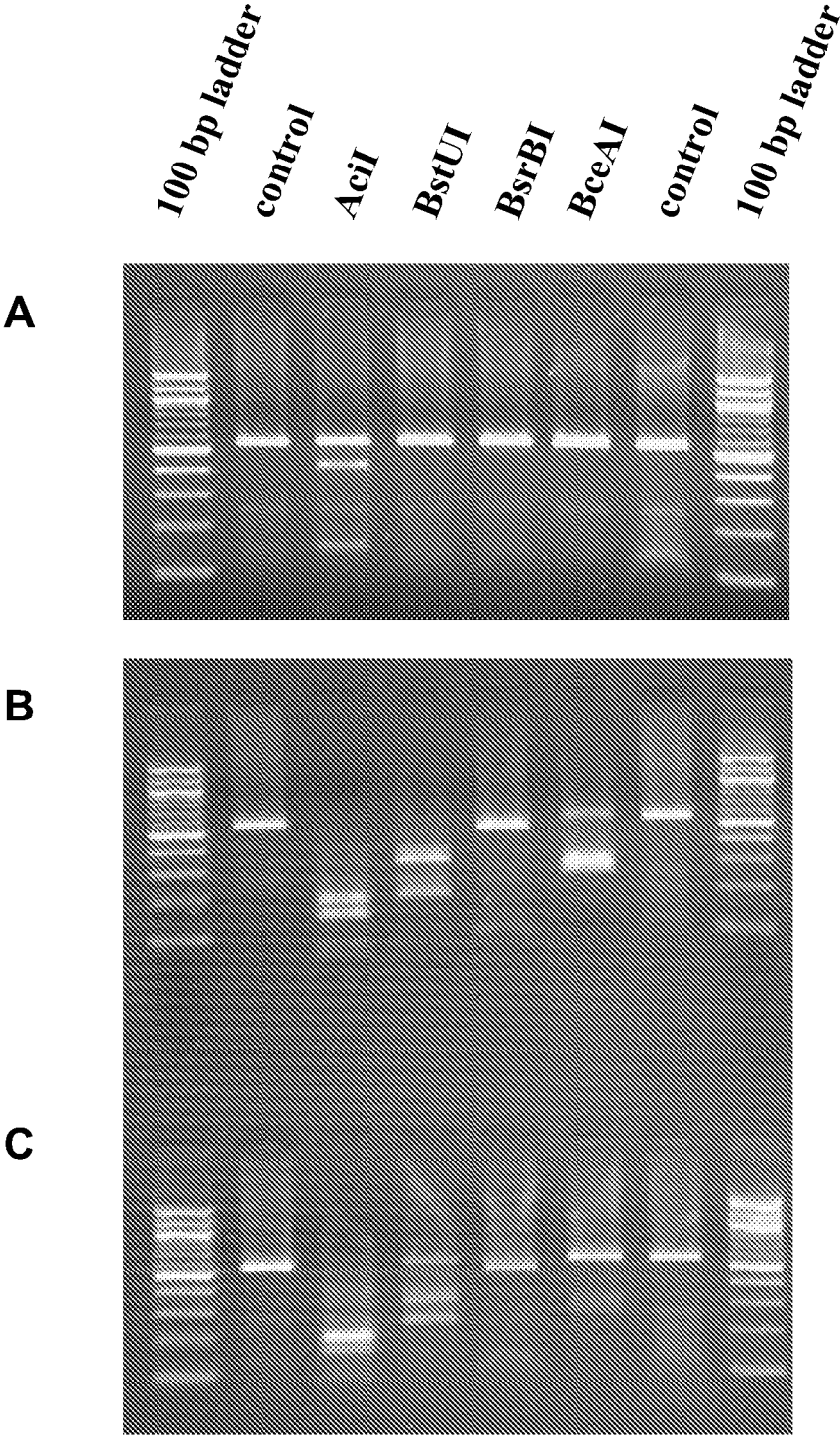


Abb. 5

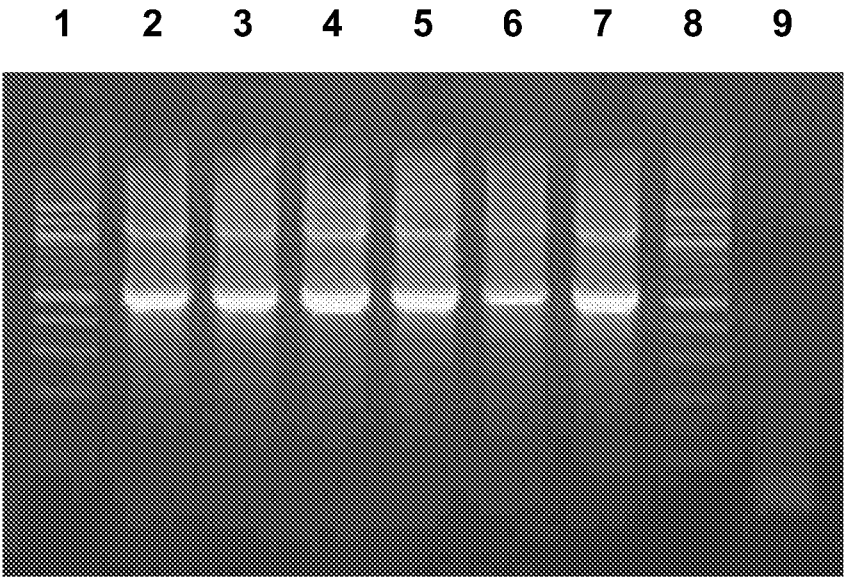


Abb. 6

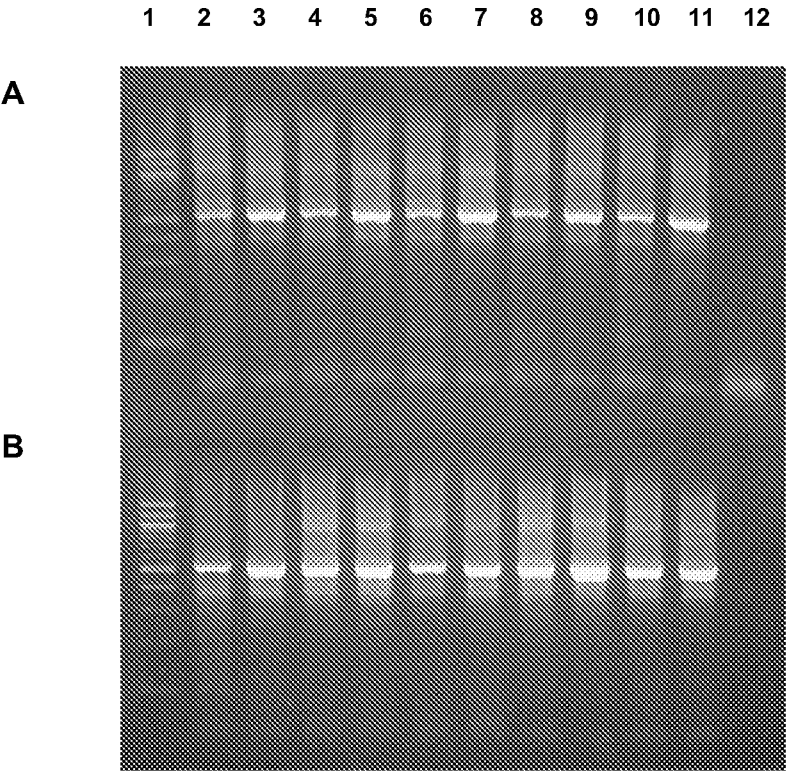


Abb. 7

Fragment 1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
U937																					
Jurkat																					
Pat. 7																					
Pat. 8																					
Pat. 19																					
Pat. 21																					
Pat. 22																					
Pat. 23																					
Pat. 24																					
Pat. 53																					
Pat. 54																					
NP 1																					
NP 2																					
NP 3																					
NP 4																					
NP 29																					
NP 30																					

Abb. 8

Fragment 2A:

	22	23	24	25	26	27	28	29	30	<u>31</u>	<u>32</u>	<u>33</u>	<u>34</u>	<u>35</u>	<u>36</u>	<u>37</u>	<u>38</u>	<u>39</u>	<u>40</u>	<u>41</u>
U937																				
NP 1																				
NP 2																				
NP 3																				
NP 4																				
Pat 21																				
Pat 22																				
Pat 53																				
Pat 54																				

	<u>42</u>	<u>43</u>	<u>44</u>	<u>45</u>	<u>46</u>	<u>47</u>	<u>48</u>	<u>49</u>	<u>50</u>	<u>51</u>	<u>52</u>	<u>53</u>	<u>54</u>	<u>55</u>	<u>56</u>	<u>57</u>	<u>58</u>	<u>59</u>	<u>60</u>	<u>61</u>
U937																				
NP 1																				
NP 2																				
NP 3																				
NP 4																				
Pat 21																				
Pat 22																				
Pat 53																				
Pat 54																				

Abb. 9

Fragment 2B:

	<u>62</u>	<u>63</u>	<u>64</u>	<u>65</u>	<u>66</u>	<u>67</u>	<u>68</u>	<u>69</u>	<u>70</u>	71	<u>72</u>	<u>73</u>	<u>74</u>	<u>75</u>	<u>76</u>	<u>77</u>	<u>78</u>	<u>79</u>	<u>80</u>	<u>81</u>
U937																				
NP 1																				
NP 2																				
NP 3																				
NP 4																				
Pat 21																				
Pat 22																				
Pat 53																				
Pat 54																				

	<u>82</u>	<u>83</u>	<u>84</u>	<u>85</u>	<u>86</u>	87	88	89	90	91
U937										
NP 1										
NP 2										
NP 3										
NP 4										
Pat 21										
Pat 22										
Pat 53										
Pat 54										

Abb. 10

Fragment 3:

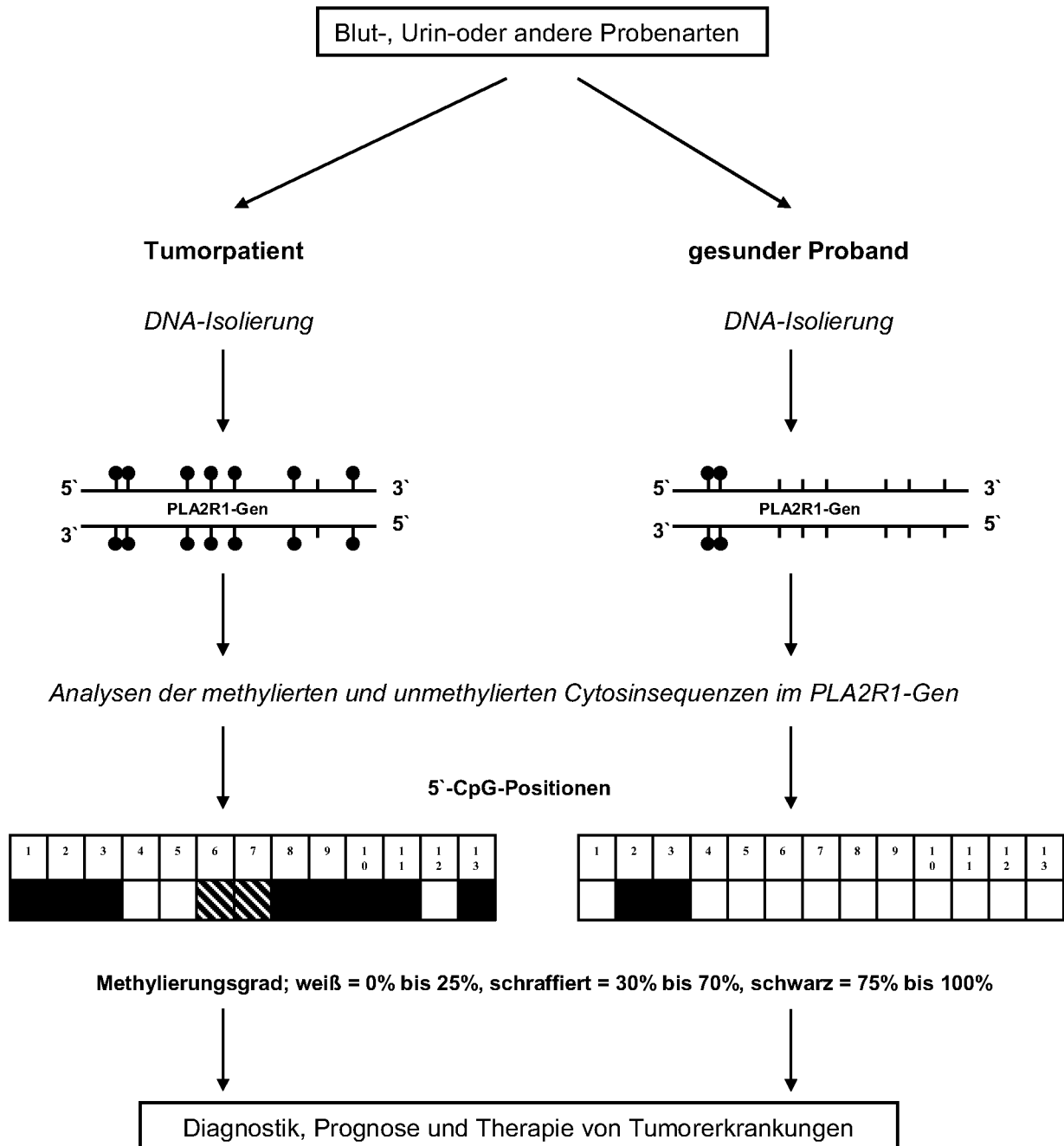
	<u>92</u>	<u>93</u>	<u>94</u>	<u>95</u>	<u>96</u>	<u>97</u>	<u>98</u>	<u>99</u>	<u>100</u>	<u>101</u>	102	103	104	105	106	107	108
U937																	
NP 1																	
NP 2																	
NP 3																	
NP 4																	
Pat 21																	
Pat 22																	
Pat 53																	
Pat 54																	

Abb. 11

Fragment 1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
PrEC																					
PC-3																					
DU-145																					
LNCaP																					

Abb. 12



- methylierter Cytosinrest

Abb. 13

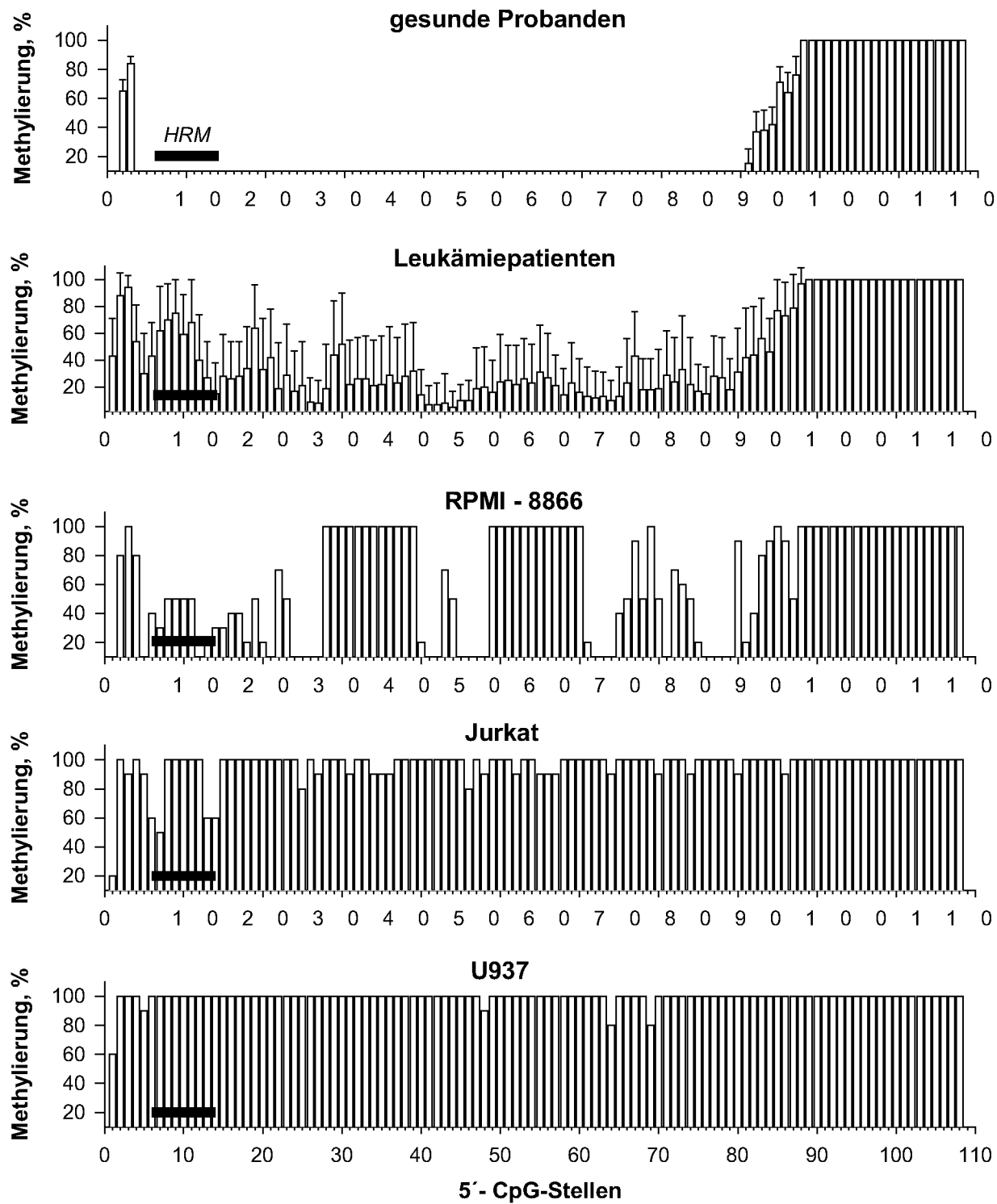


Abb. 14

Methylierung der 5'-CpG-Stellen Nr. 6-14 des *PLA2R1*-Gens bei Leukämiepatienten (N=18)

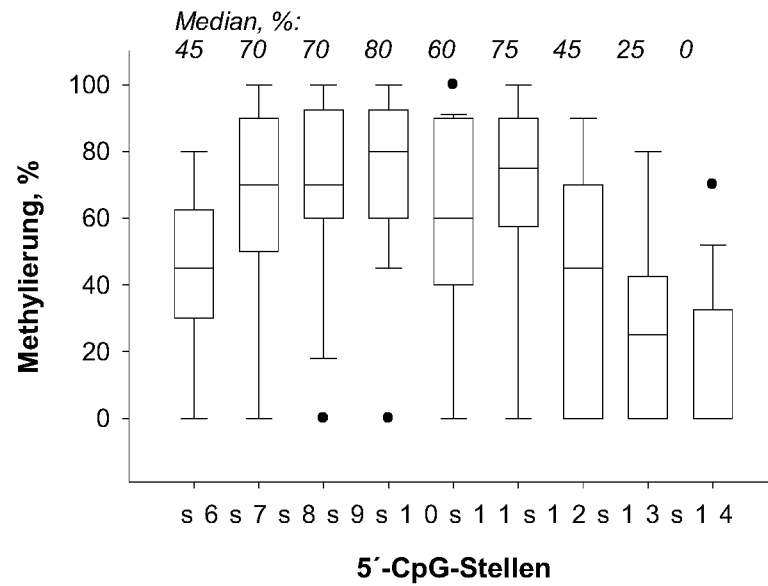


Abb. 15

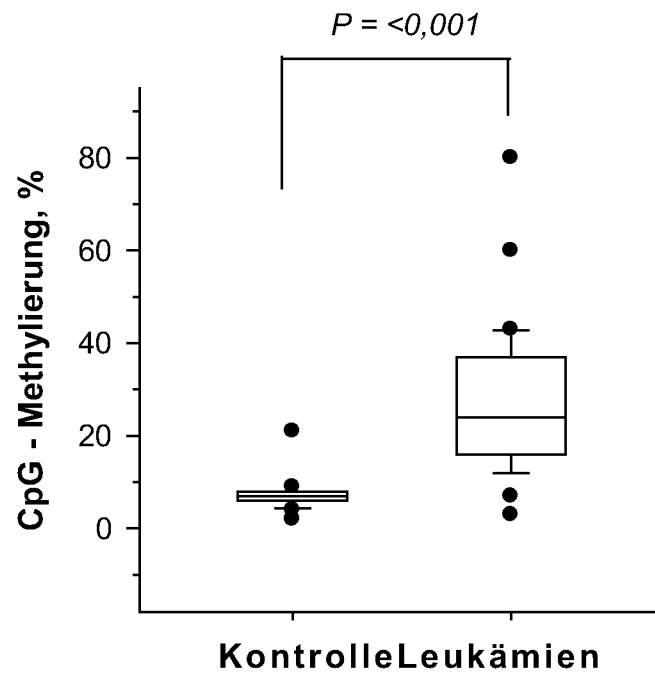
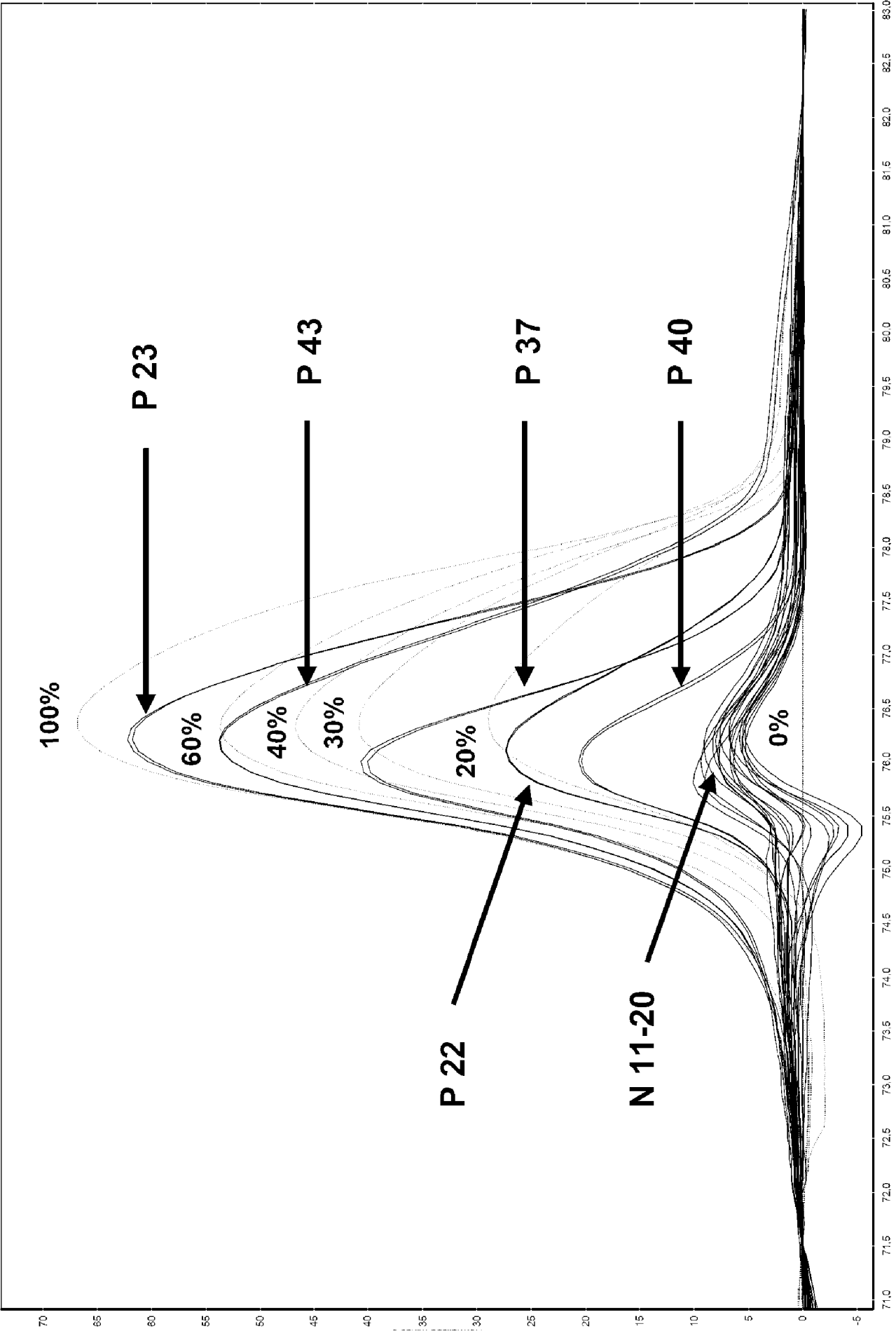


Abb. 16

Abb. 17



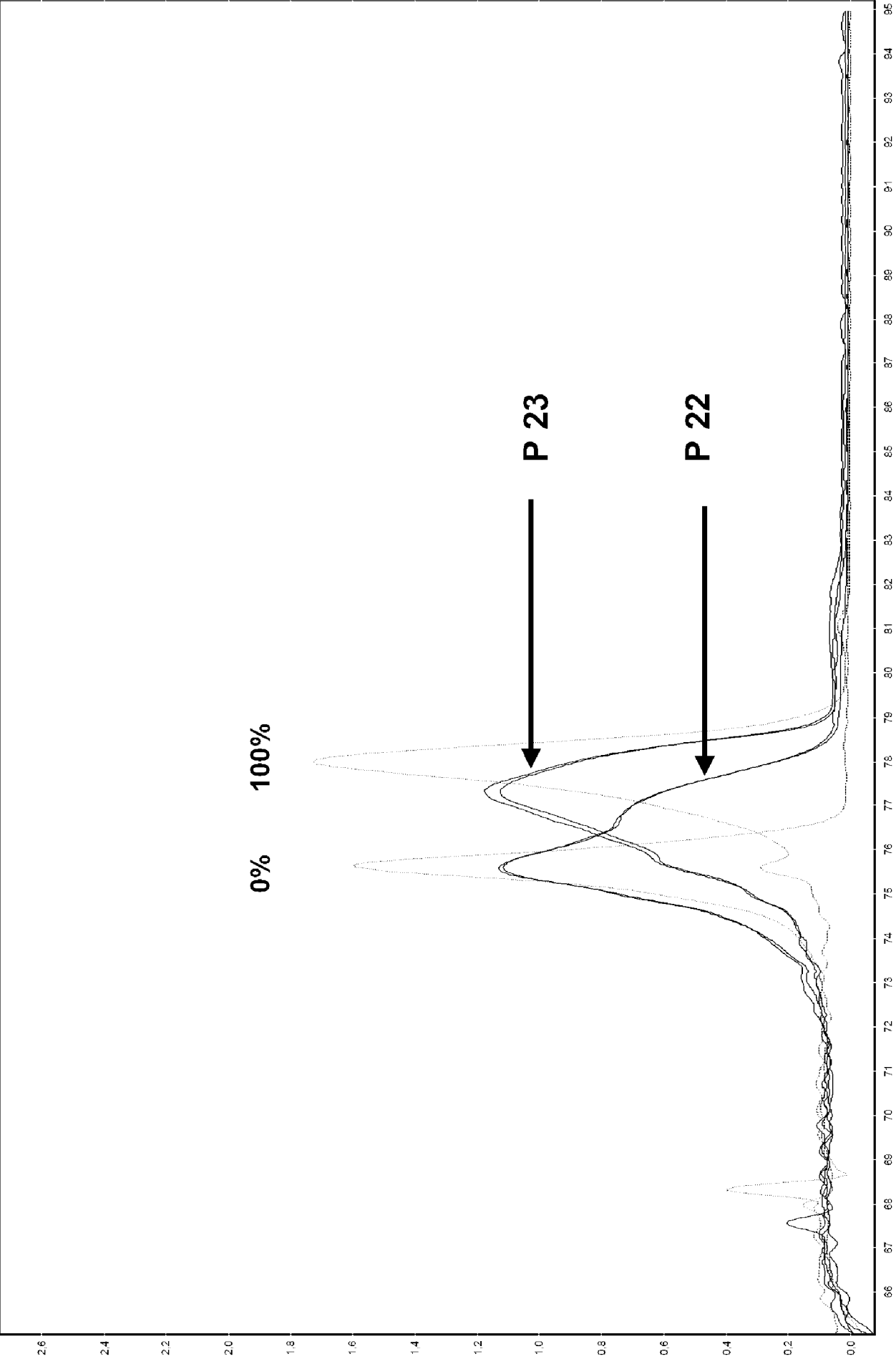


Abb. 18

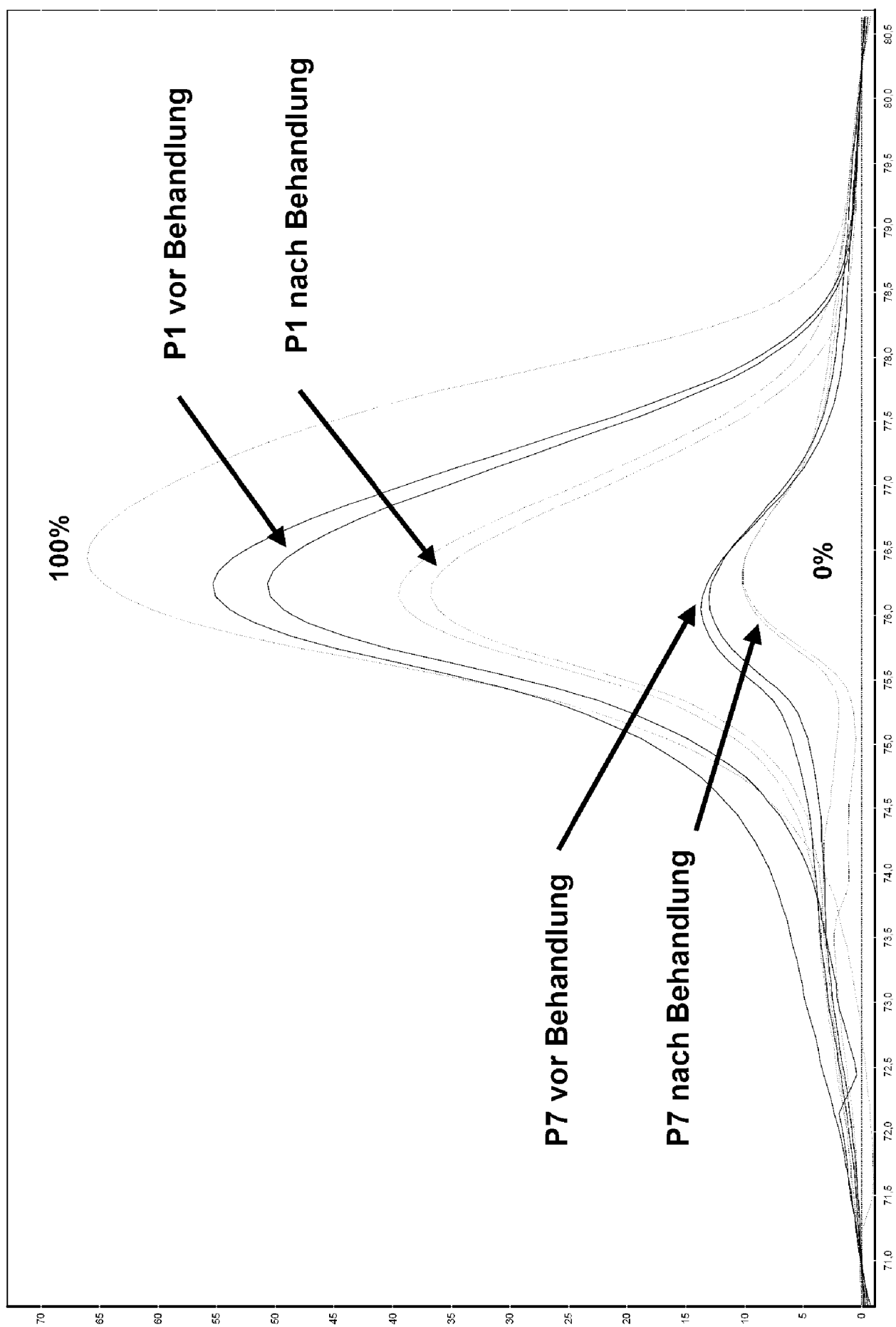


Abb. 19

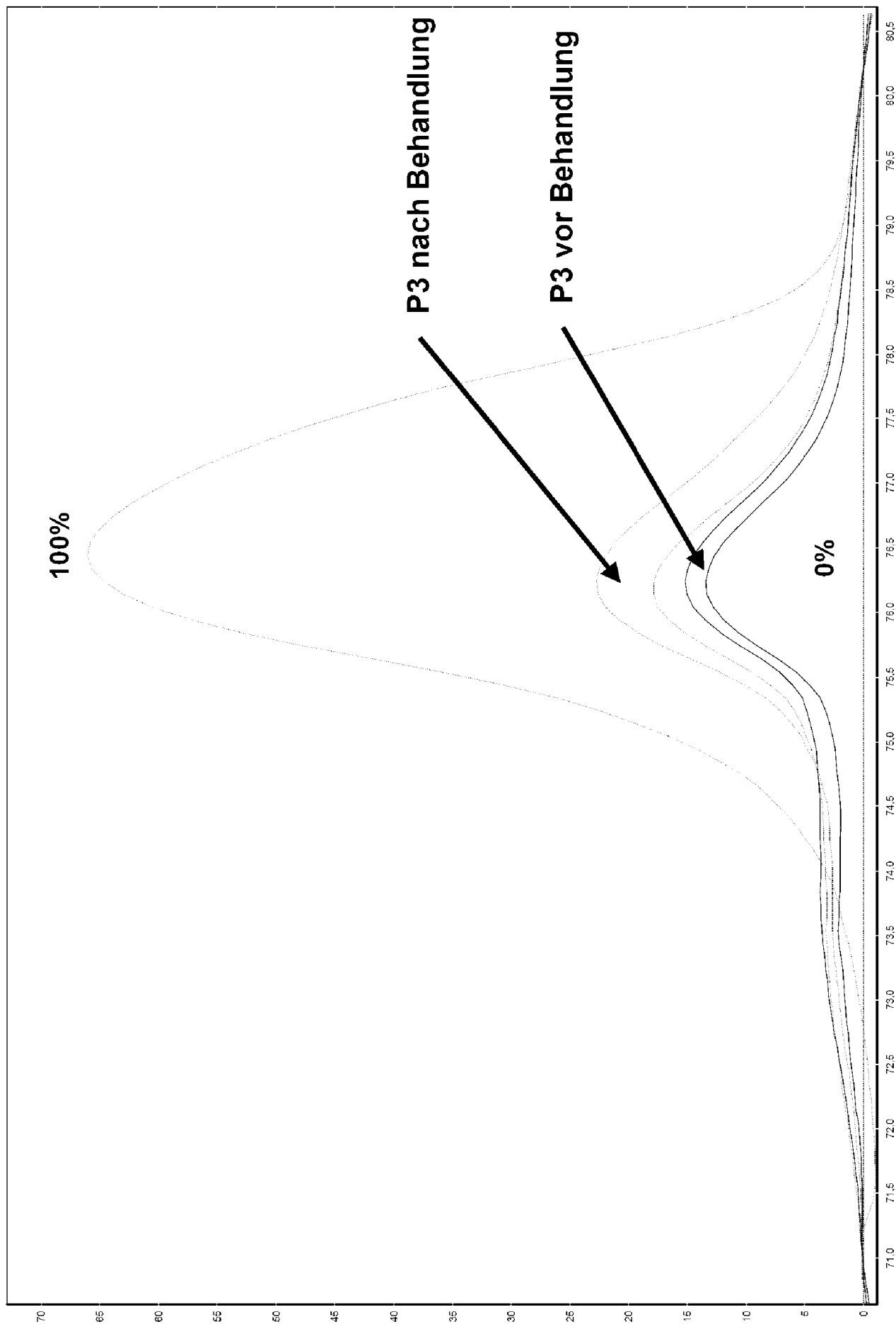


Abb. 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/061854

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (Classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal , BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Perkel : "DNA Methylation and Cancer" , BioCompare Buyer 's Guide For Life Scientists 14 April 2010 (2010-04-14) , XP002663137, Retrieved from the Internet: URL: HTTP://WWW.BIOCOMPARE.COM/ARTICLES/EDITORIALARTICLE/1139/DNA-METHYLATION-AND-CANCER.HTML [retrieved on 2011-11-07] the whole document ----- - / - -	9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 November 2011

Date of mailing of the international search report

23/11/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tijkorn, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/061854

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	GEBHARD CLAUDIA ET AL: "Genome-wide profiling of CpG methylation identifies novel targets of aberrant hypermethylation in myeloid leukemia", CANCER RESEARCH, vol . 66, no. 12, June 2006 (2006-06) , pages 6118-6128, XPQ02663139, ISSN: 0008-5472 the whole document	1-10
X	MENSCHI KOWSKI MARIO ET AL: "Involvement of epigenetic mechanisms in the regulation of secreted phospholipase A2 expressions in Jurkat leukemia cells.", NEOPLASIA (NEW YORK, N.Y.) NOV 2008 LNKD-PUBMED: 18953428, vol . 10, no. 11, November 2008 (2008-11) , pages 1195-1203, XP002663136, ISSN: 1476-5586	9
A	abstract page 1197, column 2, paragraph 2 - Paragraph 3; figure 1 page 1199, column 2, paragraph 2	1-8, 10
A	KUANG S-Q ET AL: "Genome-wide identification of aberrantly methylated Promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia", LEUKEMIA (BASINGSTOKE) , vol . 22, no. 8, August 2008 (2008-08) , pages 1529-1538, XP002663178, ISSN: 0887-6924 the whole document	1-10
A	SCHAFER ERIC ET AL: "Promoter hypermethylation in MLL-r infant acute lymphoblastic leukemia: biology and therapeutic targeting" , BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol . 115, no. 23, 10 June 2010 (2010-06-10) , pages 4798-1809 , XP008137233, ISSN: 0006-4971, DOI : 10.1182/BLOOD-2009-09-243634 [retrieved on 2010-03-09] the whole document	1-10
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/061854

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	DUNWELL THOMAS ET AL: "A Genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial Cancers" , MOLECULAR CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON , GB, vol . 9, no. 1, 25 February 2010 (2010-02-25) , page 44, XP021067996, ISSN: 1476-4598 the whole document -----	1-10
A	AGRAWAL SHUCHI ET AL: "DNA methylation of tumor suppressor genes in clinical remission predicts the relapse risk in acute myeloid leukemia", CANCER RESEARCH, vol . 67, no. 3, February 2007 (2007-02) , pages 1370-1377, XP002663179 , ISSN: 0008-5472 the whole document -----	1-10
X,P	MENSCHIKOWSKI M ET AL: "HYPERMETHYLATION OF PHOSPHOLIPASE A2-RECEPTOR GENE AS A MOLECULAR BIOMARKER OF LEUKEMIA", CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, WALTER DE GRUYTER & CO, BERLIN , NEW YORK, vol . 49, no. Suppl . 1, 19 May 2011 (2011-05-19) , page S257, XP009153655, ISSN: 1434-6621 the whole document -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2 011/ 061854

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 c) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist die internationale Recherche auf folgender Grundlage durchgeführt worden:
 - a. (Form)

in Papierform

X

 in elektronischer Form
 - b. (Zeitpunkt)

X

 in der eingereichten internationalen Anmeldung
 zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form
 bei dieser Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht wurde.
2. ☐ Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/061854

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12Q1/68
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12Q

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal , BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Perkel : "DNA Methylation and Cancer" , Biocompare Buyer 's Guide For Life Scientists 14. April 2010 (2010-04-14) , XP002663137 , Gefunden im Internet: URL: HTTP://WWW.BIOCOMPARE.COM/ARTICLES/EDITORIALARTICLE/1139/DNA-METHYLATION-AND-CANCER.HTML [gefunden am 2011-11-07] das ganze Dokument ----- - / - -	9



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

○ " Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. November 2011

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/11/2011

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Tijkorn, A

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GEBHARD CLAUDIA ET AL: "Genome-wide profiling of CpG methylation identifies novel targets of aberrant hypermethylation in myeloid leukemia", CANCER RESEARCH, Bd. 66, Nr. 12, Juni 2006 (2006-06) , Seiten 6118-6128, XP002663139 , ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument -----	1-10
X	MENSCHIKOWSKI MARIO ET AL: "Involvement of epigenetic mechanisms in the regulation of secreted phospholipase A2 expressions in Jurkat leukemia cells.", NEOPLASIA (NEW YORK, N.Y.) NOV 2008 LNKD-PUBMED: 18953428, Bd. 10, Nr. 11, November 2008 (2008-11) , Seiten 1195-1203 , XP002663136, ISSN: 1476-5586	9
A	Zusammenfassung Seite 1197, Spalte 2, Absatz 2 - Absatz 3; Abbildung 1 Seite 1199, Spalte 2, Absatz 2 -----	1-8, 10
A	KUANG S-Q ET AL: "Genome-wide identification of aberrantly methylated Promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia", LEUKEMIA (BASINGSTOKE) , Bd. 22, Nr. 8, August 2008 (2008-08) , Seiten 1529-1538, XP002663178, ISSN: 0887-6924 das ganze Dokument -----	1-10
A	SCHAFER ERIC ET AL: "Promoter hypermethylation in MLL-r infant acute lymphoblastic leukemia: biology and therapeutic targeting" , BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, Bd. 115, Nr. 23, 10. Juni 2010 (2010-06-10) , Seiten 4798-1809 , XP008137233, ISSN: 0006-4971, DOI : 10.1182/BLOOD-2009-09-243634 [gefunden am 2010-03-09] das ganze Dokument ----- -/--	1-10

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie *	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DUNWELL THOMAS ET AL: "A Genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial Cancers" , MOLECULAR CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON , GB, Bd. 9, Nr. 1, 25. Februar 2010 (2010-02-25) , Seite 44, XP021067996, ISSN: 1476-4598 das ganze Dokument -----	1-10
A	AGRAWAL SHUCHI ET AL: "DNA methylation of tumor suppressor genes in clinical remission predicts the relapse risk in acute myeloid leukemia", CANCER RESEARCH, Bd. 67, Nr. 3, Februar 2007 (2007-02) , Seiten 1370-1377 , XP002663179 , ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument -----	1-10
X,P	MENSCHIKOWSKI M ET AL: "HYPERMETHYLATION OF PHOSPHOLIPASE A2-RECEPTOR GENE AS A MOLECULAR BIOMARKER OF LEUKEMIA", CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, WALTER DE GRUYTER & CO, BERLIN , NEW YORK, Bd. 49, Nr. Suppl . 1, 19. Mai 2011 (2011-05-19) , Seite S257 , XP009153655, ISSN: 1434-6621 das ganze Dokument -----	1-10