

Aus dem Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Guido Reifenberger

**Promotorhypermethylierung und verminderte Expression des
NDRG2-Gens in primären Glioblastomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Martin Tepel

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. Reifenberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Haas

Die wichtigsten Befunde der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in der folgenden wissenschaftlichen Originalarbeit veröffentlicht:

Tepel M, Roerig P, Wolter M, Gutmann DH, Perry A, Reifenberger G, Riemenschneider MJ. Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int J Cancer*. 2008 Nov 1;123(9):2080-6.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Material und Methoden	7
2.1 Material	7
2.2 Expressionsanalysen	7
2.3 Nachweis von Allelverlusten	8
2.4 Mutationsanalysen	8
2.5. Methylierungsanalysen	9
2.6 Immunhistochemie	10
2.7 Statistische Auswertungen	11
3. Ergebnisse	12
4. Diskussion	19
5. Literaturverzeichnis	23
6. Danksagung	27
7. Lebenslauf	28
8. Zusammenfassung	30

1. Einleitung

Das Gen *NDRG2* liegt in der chromosomalen Bande 14q11.2 und kodiert für ein 41 kDa großes Protein, das zur Familie der Alpha/Beta-Hydrolasen gehört (37). Es wird vermutet, dass *NDRG2* eine Rolle in der Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen, wie dendritischen und intestinalen Zellen sowie PC12 Zellen, die in vitro als „Modell-Zellen“ für die neuronale Differenzierung und Entwicklung verwendet werden, spielt (3, 43). Eine mögliche Funktion als Tumorsuppressorgen wird durch Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen nahegelegt, die eine erniedrigte Expression von *NDRG2* in verschiedenen Tumoren zeigen konnten, darunter Glioblastome (5) sowie Brust- (35, 41), Magen- (2), Pankreas- (12), Leber- (12, 20, 34) und kolorektale Karzinome (4, 15, 16, 24, 36, 40). Zudem beschrieben Deng et al. (5) eine erniedrigte Proliferation von Glioblastomzelllinien in vitro nach Überexpression von *NDRG2*.

In einer Vorarbeit der Düsseldorfer Arbeitsgruppe von Prof. Reifenberger und der Arbeitsgruppe von Prof. Gutmann, St. Louis, wurde die Rolle von *NDRG2* in humanen Meningeomen charakterisiert und ein Zusammenhang zwischen erniedrigter Expression von *NDRG2* und ungünstiger Prognose festgestellt (25). Die erniedrigte Expression war mit einer Hypermethylierung der Promotorregion des *NDRG2*-Gens assoziiert. In der eigenen Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob der gleiche Mechanismus auch in Glioblastomen zur Herunterregulierung der Expression von *NDRG2* führt.

Glioblastome sind die häufigsten astrozytären Tumore und machen ca. 15-20 % aller primären Hirntumore im Erwachsenenalter aus. Man unterscheidet zwei verschiedene Arten. Das primäre Glioblastom entsteht *de novo*, ist also bereits bei Erstdiagnose ein hochmaligner Tumor des WHO Grades IV. Das sekundäre Glioblastom entsteht durch Progression aus vorbestehenden Vorläufergliomen niedrigeren Malignitätsgrades.

Bei älteren Patienten überwiegt das primäre Glioblastom, das häufig durch Amplifikation und Überexpression des EGF-Rezeptors, *PTEN*-Mutationen und *CDKN2A*-Deletionen charakterisiert ist (47).

Dem gegenüber findet man sekundäre Glioblastome vor allem bei Patienten mittleren Alters. Typische molekularpathologische Veränderungen sind hier Mutationen des *p53*- Tumorsuppressorgens und des Isocitratdehydrogenase 1-Gens (*IDH1*) (17, 31, 49).

Es gibt keine kurative Therapie für das Glioblastom, da aufgrund des aggressiven und invasiven Wachstums Tumorzellen nahezu immer auch in das gesunde Hirngewebe eingewandert sind. Die Therapie besteht aus einer Kombination aus Operation, Bestrahlung und alkylierender Chemotherapie mit Temozolomid (42). Trotz aller Bemühungen bleibt die Prognose jedoch infaust mit einer mittleren Überlebenszeit nach Erstdiagnose von unter 12 Monaten in populationsbasierten Studien (32).

Molekulargenetische Forschung ist also wichtig für ein besseres Verständnis von Ätiologie und Pathogenese dieser Tumoren. Ziel ist es dabei, neue Ansätze für eine verbesserte Diagnostik und Vorhersage der Prognose sowie insbesondere molekular zielgerichtete Therapiestrategien zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumoren stammten aus der Tumorbank des Instituts für Neuropathologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. Die Einteilung der Tumoren erfolgte nach der WHO-Klassifikation für Tumoren des Zentralnervensystems aus dem Jahr 2007 (23).

Die analysierte Tumorserie bestand aus 67 astrozytären Tumoren, davon 10 diffuse Astrozytome WHO-Grad II, 11 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III, 12 sekundäre Glioblastome WHO-Grad IV und 34 primäre Glioblastome WHO-Grad IV.

Die Gewebeproben wurden histologisch auf einen ausreichenden Tumorzellanteil von mindestens 80 % überprüft und bei –80 °C tiefgefroren gelagert. Von den Tumoren standen DNA und RNA für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung, die mittels Ultrazentrifugation über Caesiumchlorid isoliert worden waren (46). Als Kontrolle diente DNA von humanen nicht-neoplastischen Hirngewebsproben aus dem temporalen Cortex beziehungsweise der weißen Substanz von zwei Patienten, die aufgrund einer chronischen Epilepsie operiert worden waren. DNA dieser Proben wurden auch als Positiv-Kontrollen für die Methylierungsanalyse verwendet, nachdem sie mit SssI Methylase (New England Biolabs, Beverly, MA) behandelt worden waren. Als Referenz für die Expressionsanalyse wurde autoptisch aus Hirngewebe gewonnene RNA einer 66-jährigen Spenderin benutzt (Stratagene, La Jolla, CA). Als Referenz für die Allelverlust- und Mutationsanalysen wurde DNA aus peripheren Blutleukozyten aller 34 Patienten mit einem primären Glioblastom und zweier Patienten mit einem sekundären Glioblastom verwendet. Diese DNA-Proben standen für die eigenen Analysen in extrahierter Form zur Verfügung.

2.2 Expressionsanalysen

Die Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene erfolgte mittels Real-time Reverser Transkriptions-PCR. Zunächst wurde mit jeweils 5 Mikrogramm Gesamt-RNA jedes Tumors eine reverse Transkription zur Herstellung von cDNA durchgeführt. Hierfür wurde das Enzym Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany) eingesetzt. Die Primersequenzen stammten aus der Arbeit von Lusi et al. (25):

- sense, 5'-ACCCATCTCTGGACCAGCTT-3'
- antisense, 5'-CAGTGTCCGGGTGGTTAAGA-3'

Mit diesen Primern werden Transkripte beider bekannter Isoformen von *NDRG2* erfasst. Der Expressionsstatus wurde mittels Real-time PCR auf dem ABI PRISM 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) ermittelt. Als Fluoreszenz-Marker wurde SybrGreen und als Referenz-Transkript *ARF1* (ADP-ribosylation factor 1) verwendet. Die Daten wurden mittels der SDS-Software und Microsoft Excel unter Anwendung der Delta-Delta CT-Methode (22) in relative Expressionswerte umgewandelt und mit den Expressionswerten des Referenzgewebes verglichen.

2.3 Nachweis von Allelverlusten

Die Analyse auf Allelverlust für Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 14q wurde für alle Tumoren durchgeführt, für die zusätzlich DNA aus peripherem Blut als Referenz verfügbar war. Dies traf auf alle 34 Patienten mit primärem Glioblastom und auf zwei Patienten mit sekundärem Glioblastom zu. Insgesamt wurden 7 Mikrosatellitenmarker untersucht. Die Nukleotidnummern in Klammern entsprechen der Nummerierung des UCSC Genome Browsers (<http://www.genome.ucsc.edu>). Die 4 Marker *D14S261* (nt 19,910,228-19,910,544), *D14S72* (nt 20,440,828-20,441,191), *D14S122* (nt 20,447,502-20,447,903) und *D14S1023* (nt 20,511,741-20,512,060) sind proximal, die 3 Marker *D14S1070* (nt 20,618,092-20,618,430), *D14S50* (nt 21,425,666-21,425,933) und *D14S283* (nt 21,757,255-21,757,624) sind distal von *NDRG2* (nt 20,554,762-20,563,775) lokalisiert.

2.4 Mutationsanalysen

Zum Nachweis möglicher Mutationen wurde eine Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse für alle primären und sekundären Glioblastome durchgeführt. Die Untersuchung beinhaltete alle 17 bekannten Exone von *NDRG2*. Nach PCR-Amplifikation wurden die Proben auf 10 bis 14-prozentige nicht denaturierende Polyacrylamidgele aufgetragen. Die Elektrophorese zur Auftrennung der DNA-Produkte erfolgte über 16 Stunden bei Raumtemperatur und 90 Volt beziehungsweise bei 4 °C und 200 Volt. Die Elektrophoresebanden wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. PCR Produkte, die aberrante Banden zeigten, wurden anschließend mit dem BigDye Cycle Sequencing Kit unter Verwendung eines ABI PRISM 377 Semiautomated DNA Sequencers (Applied Biosystems, Foster City, CA) analysiert.

2.5 Methylierungsanalysen

Für die Analyse des Methylierungsstatus der Promotorregion von *NDRG2* wurde ein Mikrogramm jeder DNA-Probe für 16 Stunden mit Natriumbisulfit behandelt (28). Die CpG-Insel von *NDRG2* (nt 20,562,576-20,564,110) bildeten wir mittels zwei Primerpaaren ab (25):

- *NDRG2* Met 1:
sense, 5'-gcggccgcttttcgaggggtataaggagagttatatt-3'
antisense, 5'-tgttatttaggagtagagttttgg-3'
- *NDRG2* Met 2:
sense, 5'-gcggccgctttaggatattgcgttttttaagttttatatt-3'
antisense, 5'-tttgggtacgagggagtcggaatttt-3'

Insgesamt erfassten die Primer 32 CpG-Dinukleotide, wovon 23 unmittelbar proximal des Transkriptionsstarts und die restlichen 9 innerhalb von Exon 1 lagen. Somit umfasste die Untersuchung die gesamte von Zhang et al. (50) beschriebene *NDRG2* Promotorregion. Die Sequenzierung der Natriumbisulfit behandelten DNA wurde ebenfalls mit dem BigDye Cycle Sequencing Kit und einem ABI PRISM 377 Semiautomated DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt. Der Methylierungsgrad jedes CpG-Dinukleotids wurde durch ein semiquantitatives Rating-System abgebildet:

- 0: keine Methylierung
- 1: schwaches methyliertes Signal in der Sequenz detektierbar
- 2: methyliertes Signal und unmethyliertes Signal ungefähr gleich stark
- 3: methyliertes Signal stärker als unmethyliertes Signal

Die Summe dieser Werte ergab für jeden Tumor einen Methylierungsscore. Nach diesem wurden die Tumoren in zwei Gruppen eingeteilt. Gliome mit einem Methylierungsscore größer oder gleich 17 wurden als hypermethylierte Tumoren und Gliome mit einem Methylierungsscore kleiner 17 als schwach methylierte Tumoren eingestuft. Die Grenze 17 basiert auf der Anzahl der untersuchten CpGs und der Annahme, dass ein hypermethylierter Tumor in mehr als 50 % der CpGs zumindest eine schwache Methylierung zeigen sollte.

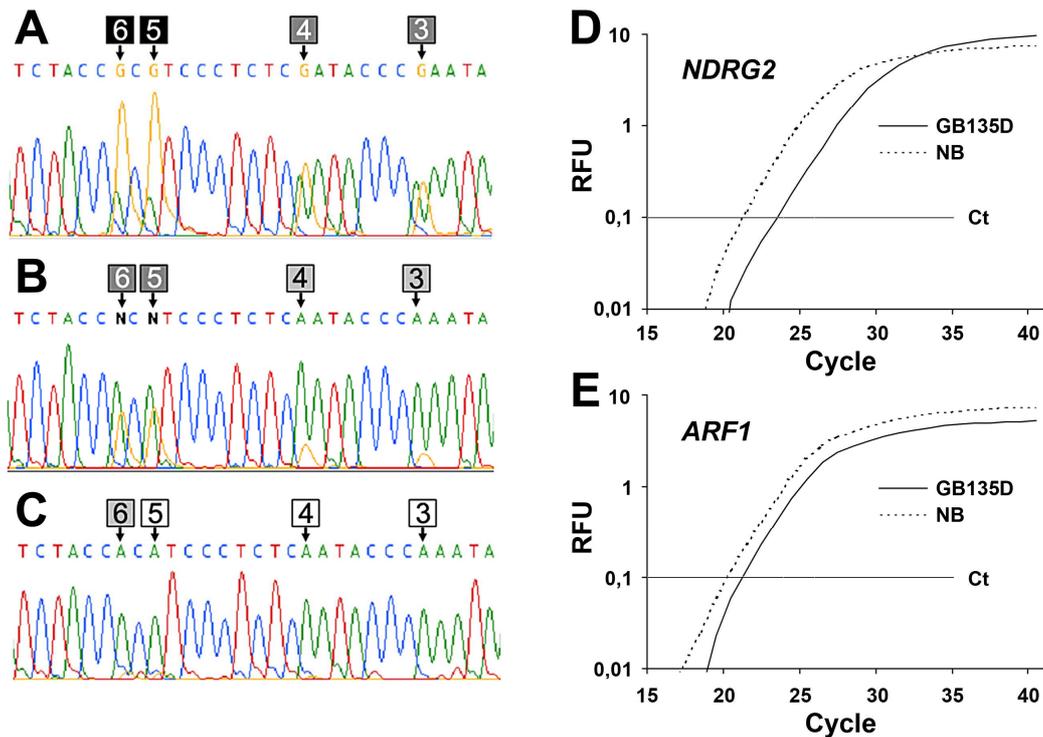


Abb. 1: Beispiele für die Analyse der *NDRG2*-Promotorregion auf Hypermethylierung (A-C) und der *NDRG2* mRNA-Expression (D, E). Die Sequenzierung zeigt die CpG Stellen 3-6 der zum *NDRG2*-Promotor gehörenden CpG-Insel. Die Zahlen sind entsprechend dem oben beschriebenen Methylierungsgrad farblich hinterlegt, je dunkler um so höher der Methylierungsgrad. Die Sequenzen entstammen dem nicht-kodierenden Strang. (A) Das primäre Glioblastom GB135D zeigt eine starke Methylierung der CpG-Stellen 5 und 6 und eine moderate in 3 und 4. (B) Primäres Glioblastom GB59D mit moderater Methylierung in 5 und 6 sowie schwacher Methylierung in 3 und 4. (C) Nicht-neoplastisches Hirngewebe als Kontrolle mit schwacher Methylierung der Stelle 6 und unmethylierten CpGs 3-5. Die Darstellung der mRNA-Expression des primären Glioblastoms GB135D vergleicht die relative Expression von *NDRG2* (D) und *ARF1* (ADP-ribosylation factor 1) (E). Ordinate, RFU (relative fluorescence unit) entsprechend der gemessenen Fluoreszenz als Maßstab der relativen Expression; Abszisse, Nummer des PCR-Zyklus. Ct markiert den Schwellenwert der Fluoreszenz. Im Gegensatz zur nicht-neoplastischen Kontrolle (NB) fällt bei GB135D eine Rechtsverschiebung der Kurve für die *NDRG2*-Expression auf, was eine erniedrigte relative *NDRG2* mRNA-Expression bedeutet.

2.6 Immunhistochemie

Eine immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis der *NDRG2*-Expression auf Proteinebene wurde bei 27 primären Glioblastomen, 6 sekundären Glioblastomen, 8 anaplastischen Astrozytomen und 5 diffusen Astrozytomen durchgeführt. Als Positiv-Kontrollen dienten Schnittpräparate mit nicht-neoplastischem Brustdrüsengewebe. Zur Verwendung kamen Formalin-fixierte Paraffinschnitte und ein kommerziell erhältlicher polyklonaler *NDRG2*-spezifischer Antikörper (Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden; Verdünnung 1:200). Immunreaktivität wurde mit dem EnVision™ Detection System (Dako, Hamburg,

Germany) unter Verwendung von 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) sichtbar gemacht.

Zur Beurteilung wurde ebenfalls ein semiquantitatives Rating-System eingeführt:

- 0: keine oder minimale Reaktivität, < 1 % positive Tumorzellen
- 1: < 10 % positive Tumorzellen
- 2: 10-50 % positive Tumorzellen
- 3: 50-90 % positive Tumorzellen
- 4: > 90 % positive Tumorzellen

2.7 Statistische Auswertungen

Zum Vergleich der Expressions- und Methylierungsanalyse in Bezug auf den WHO-Grad der Gliome wurde der zweiseitige Student's T-Test verwendet. Derselbe Test kam auch bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Expression und Methylierung zur Anwendung. Als Signifikanzlevel wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgesetzt. Um die signifikante Assoziation zwischen Expression und Methylierung zu bestätigen, wurde eine Deming Modell II Regressionsanalyse durchgeführt (18). Dieser Test ist unabhängig von dem oben genannten Methylierungs-Cutoff von 17 und berücksichtigt gleichzeitig, dass X (Methylierungsscore) und Y (relative Expression) beide fehlerbehaftet sein können und unterschiedliche Standardabweichungen haben. Bei dieser Untersuchung besteht dann ein signifikanter Zusammenhang zwischen zwei Zahlenreihen, wenn der Anstieg der Ausgleichsgeraden signifikant vom Wert 0 abweicht. Als Signifikanzlevel wurde hier ebenfalls $p < 0,05$ gewählt. Überlebensdaten waren für 29 Patienten mit primärem Glioblastom verfügbar. Zur Analyse eines Zusammenhangs zwischen Expression beziehungsweise Methylierung mit dem Gesamtüberleben wurden Kaplan-Meier Überlebenskurven und log rank-Tests mittels der GraphPad Prism 4 Software errechnet.

3. Ergebnisse

Die mRNA-Expression von *NDRG2* wurde in 67 Gliomen mittels Real-time Reverser Transkriptions-PCR in Relation zu nicht-neoplastischem adulten Hirngewebe bestimmt. Eine relative Expression von kleiner 0,5 im Vergleich zum Referenzgewebe wurde als erniedrigte Expression gewertet.

Erniedrigte Expressionslevel fanden sich in 15 primären Glioblastomen (44 %), jedoch nur in 2 sekundären Glioblastomen (17 %), 2 anaplastischen Astrozytomen (18 %) und keinem der diffusen Astrozytome (0 %). Betrachtet man die einzelnen Gruppen näher, so ergibt sich die folgende Anordnung beginnend mit der niedrigsten durchschnittlichen Expression:

- primäre Glioblastome: Mittelwert 0,8; Standardabweichung 0,8
- sekundäre Glioblastome: Mittelwert 1,0; Standardabweichung 0,5
- anaplastische Astrozytome: Mittelwert 1,9; Standardabweichung 1,8
- diffuse Astrozytome: Mittelwert 2,6; Standardabweichung 1,6

Anhand des Student's T-Test zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression in den primären Glioblastomen verglichen mit den anaplastischen Astrozytomen und den diffusen Astrozytomen. Sekundäre Glioblastome zeigten gegenüber diffusen Astrozytomen eine signifikant niedrigere Expression, jedoch nicht gegenüber anaplastischen Astrozytomen ($p = 0,1$):

- pGBIV vs. AAIll: $p = 0,01$
- pGBIV vs. All: $p < 0,0001$
- sGBIV vs. All: $p = 0,005$

Um die erniedrigte mRNA-Expression auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden immunhistochemische Untersuchungen mit einem *NDRG2*-spezifischen Antikörper durchgeführt. Es standen Paraffinschnitte von 46 der 67 Tumore zur Verfügung. *NDRG2*-Immunreaktivität war im Zytoplasma der Tumorzellen nachweisbar. Als interne Kontrolle konnten in jedem Schnitt die Färbung der Endothelzellen und normaler Astrozyten herangezogen werden. Als externe Positiv-Kontrolle dienten Paraffinschnitte mit normalem Brustdrüsengewebe, die eine starke Immunreaktivität für *NDRG2* aufwiesen.

Analog zum Ergebnis der mRNA-Expression zeigten sich die geringsten Immunreaktivitäts-Scores in primären Glioblastomen:

- primäre Glioblastome: Median 0; Score von 0-2
- sekundäre Glioblastome: Median 2; Score 0-3
- anaplastische Astrozytome: Median 2; Score 1-3
- diffuse Astrozytome: Median 3; Score 3-4

In den untersuchten primären Glioblastomen fanden sich 12 Tumoren mit fokaler Immunreaktivität entsprechend einem Immunreaktivitäts-Score von 2. Die restlichen 15 Tumoren wiesen ein komplettes Fehlen der Immunreaktivität auf (Immunreaktivitäts-Score von 0).

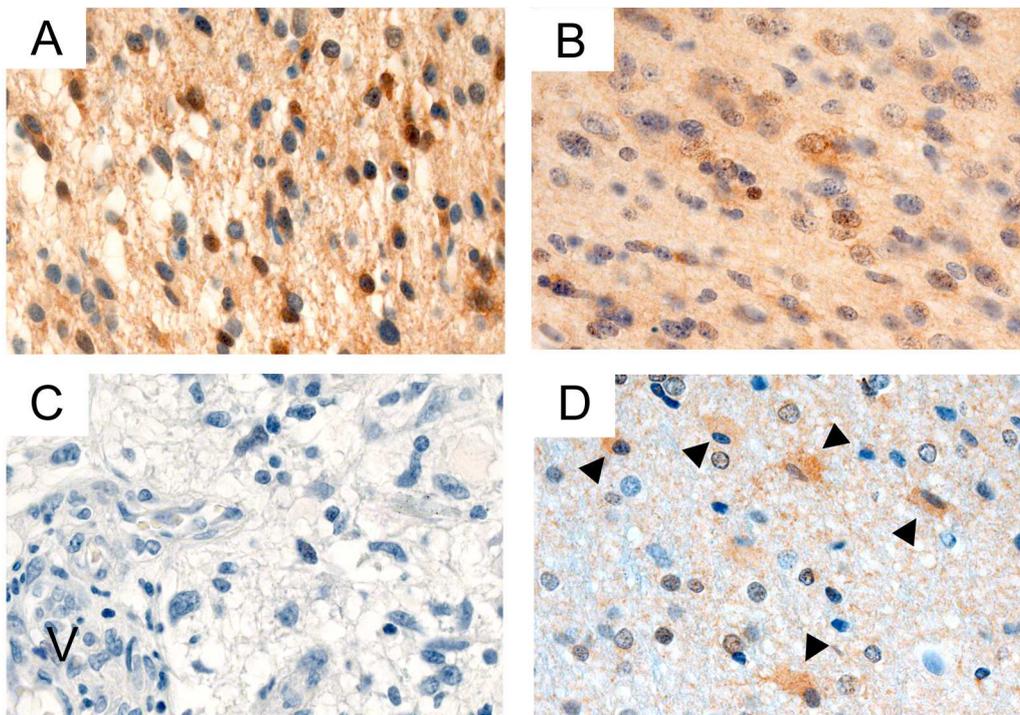


Abb. 2: Immunhistochemische Analyse der NDRG2-Proteinexpression in Gliomen. (A) Diffuses Astrozytom und (B) anaplastisches Astrozytom mit starker NDRG2-Immunreaktivität. Beide Tumoren zeigten auch auf mRNA Ebene eine normale *NDRG2*-Expression. (C) Primäres Glioblastom mit komplettem Verlust der NDRG2-Proteinexpression. (V) Pathologische Gefäße. (D) Expression von NDRG2 im Zytoplasma reaktiver Astrozyten (Pfeile) der weißen Substanz. Die Anfärbung der reaktiven Astrozyten konnte als interne Referenz für jeden Schnitt herangezogen werden. Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Die Suche nach Mutationen und Polymorphismen erfolgte für alle primären und sekundären Glioblastome mittels SSCP-Analyse und bei aberranten Elektrophoresebanden auch durch nachfolgende Sequenzierung. Insgesamt wurden 8 verschiedene Polymorphismen bei 23 Patienten nachgewiesen, die jedoch nur die nicht-kodierenden Sequenzen in Nachbarschaft zu den Exonen 2, 3, 8, 10, 14, 15 und 16 betrafen. Alle Polymorphismen bestanden aus dem Austausch einzelner Nukleotide und waren außer den homozygoten Polymorphismen IVS8-41C>T (Patient GB100D), IVS15+15C>T (Patient GB115D) und IVS16+9C>G (Patient GB152D) heterozygot.

Polymorphismen oder Mutationen der kodierenden Exone von *NDRG2* fanden sich nicht. Dies deutet darauf hin, dass Mutationen von *NDRG2* in Glioblastomen sehr selten sind und somit nicht Auslöser für die erniedrigte Expression des Gens sein können.

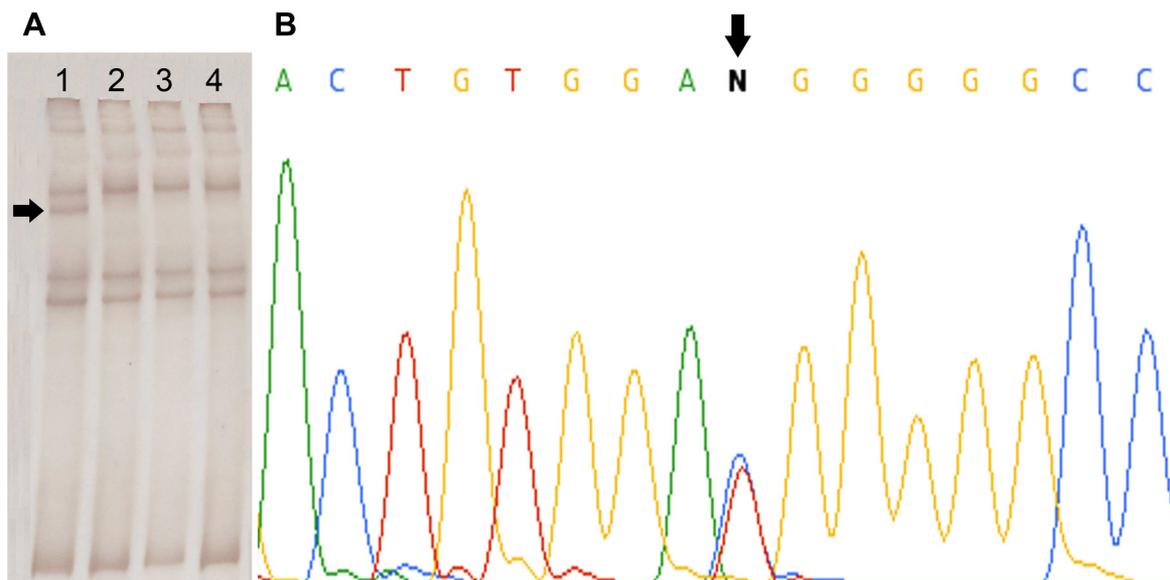


Abb. 3: Mutationsanalyse mittels SSCP-Analyse bzw. DNA-Sequenzierung. (A) SSCP-Gel mit aberranter Bande (Pfeil) für das Exon 14 von *NDRG2* im Glioblastom GB59D (Bahn 1). Die Bahnen 2-4 zeigen Kontrollfälle mit der *NDRG2*-Wildtypsequenz. (B) Sequenzierung des nicht-kodierenden Strangs von GB59D für Exon 14. Der Pfeil markiert den Basenaustausch von Guanin zu Adenin in der 3'-UTR von *NDRG2* (nt 20562108, GenBank-Accession No. NM_201535). Derselbe Basenaustausch konnte auch in der Leukozyten-DNA des entsprechenden Patienten nachgewiesen werden, was auf das Vorliegen eines Polymorphismus und nicht auf eine somatische, Tumor-assoziierte, Mutation hindeutet.

Um den Mechanismus der Herunterregulierung von *NDRG2* aufdecken zu können, wurde die Promotorregion von *NDRG2* auf Hypermethylierung hin untersucht. Die CpG-Insel von *NDRG2* umfasst insgesamt 32 CpGs, die im Bereich des

Transkriptionsstarts und des ersten Exons liegen. Ein Tumor wurde als hypermethyliert charakterisiert, wenn der oben beschriebene Methylierungsscore größer oder gleich 17 war. Eine Hypermethylierung der Promotorregion fand sich in 21 der 34 primären Glioblastome (62 %), 1 der 11 anaplastischen Astrozytome (9 %) und keinem der sekundären Glioblastome oder diffusen Astrozytome.

Die meisten Methylierungen waren in den ersten 16 CpGs lokalisiert, die unmittelbar um den Transkriptionsstart (nt 20,563,910-20,564,151) angeordnet sind.

Tab. 1: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Proteinexpression (Prot.), mRNA-Expression (mRNA), Allelverlust (LOH 14q markiert durch *), Methylierungsstatus (Meth.), Methylierungsscore (Score) und Methylierung der CpG Stellen 1-16 (CpG sites) der Promotorregion des *NDRG2*. Die entsprechenden Ergebnisse wurden durch Immunhistochemie, Real-Time Reverse Transkriptions-PCR und Sequenzierung von Natriumbisulfit-behandelter DNA gewonnen. Die Gliome sind nach den einzelnen Tumorentitäten unterteilt (Case No.) und innerhalb der vier Gruppen nach dem Methylierungsscore sortiert. NB1 und NB2 sind die nicht-neoplastischen Hirngewebskontrollen. HM-NB1 und HM-NB2 sind die in vitro methylierten Positivkontrollen der nicht-neoplastischen Hirngewebsproben. Die Tumoren sind mit GB (primäres Glioblastom), sGB (sekundäres Glioblastom), AA (anaplastisches Astrozytom) und A (diffuses Astrozytom) bezeichnet. Nicht analysierte Proben sind mit na gekennzeichnet. Auffällig ist die Häufung methylierter Tumore in der Gruppe der primären Glioblastome.

Case No.	NDRG2				CpG sites															
	Prot.	mRNA	Meth.	Score	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
HM-NB1	na	na	+	83																
HM-NB2	na	na	+	76																
GB135D	1	0.2	+	44																na
GB60D	0	0.1	+	32																na
GB81D	0	0.6	+	27																na
GB77D	na	0.5	+	26																na
GB139D	2	0.9	+	26																na
GB114D	na	0.2	+	26																na
GB53D	2	1.6	+	25																na
GB147D	1	0.7	+	25																na
GB49D	0	0.6	+	23																na
GB115D	0	0.3	+	23																na
GB97D	0	4.1	+	22																na
GB103D	na	1.0	+	21																na
GB100D*	0	0.4	+	20																na
GB96D	0	0.5	+	19																na
GB82D*	na	0.2	+	19																na
GB59D	2	1.3	+	19																na
GB85D	0	1.1	+	18																na
GB153D	2	2.3	+	18																na
GB137D	0	0.3	+	17																na
GB133D	0	0.2	+	17																na
GB106D	na	0.4	+	17																na
GB131D	0	2.2	-	15																na
GB107D	1	0.9	-	13																na
GB121D	1	0.1	-	12																na
GB112D	0	0.9	-	12																na
GB99D	na	0.2	-	11																na
GB158D*	1	0.3	-	10																na
GB140D	1	2.3	-	10																na
GB138D	na	0.2	-	10																na
GB110D	1	0.3	-	10																na
GB98D	0	1.2	-	7																na
GB130D	0	0.7	-	7																na
GB101D	0	0.6	-	7																na
GB152D	1	0.9	-	6																na
NB1	na	1.0	-	12																na
NB2	na	1.0	-	2																na
sGB235D	na	0.8	-	16																na
sGB175D	2	1.6	-	15																na
sGB240D	na	1.2	-	14																na
sGB239D	na	1.3	-	13																na
sGB4D	na	1.2	-	9																na
sGB236D	2	0.7	-	6																na
sGB234D	na	0.7	-	6																na
sGB229D	0	0.9	-	6																na
sGB748D	na	1.6	-	5																na
sGB237D	2	1.8	-	5																na
sGB119D	1	0.2	-	5																na
sGB238D	3	0.5	-	4																na
AA1D	1	0.0	+	31																na
AA71D	3	0.7	-	14																na
AA164D	na	1.5	-	11																na
AA93D	3	1.5	-	10																na
AA143D	na	3.3	-	9																na
AA142D	na	2.9	-	9																na
AA117D	2	6.4	-	9																na
AA106D	2	1.8	-	9																na
AA134D	3	0.3	-	8																na
AA103D	2	1.7	-	8																na
AA186D	2	0.5	-	0																na
A8D	4	1.6	-	14																na
A180D	na	6.3	-	12																na
A78D	4	2.1	-	10																na
A2D	na	2.8	-	10																na
A72D	3	1.2	-	8																na
A145D	3	1.2	-	8																na
A128D	3	0.8	-	7																na
A201D	na	3.5	-	6																na
A181D	na	3.0	-	6																na
A5D	na	3.0	-	5																na

* LOH 14q □ not methylated ◻ weakly methylated ◼ moderately methylated ◼ strongly methylated □ na not analyzed

Vergleicht man die Methylierungsscores in den einzelnen Tumorgruppen, so findet man die höchsten Scores bei den primären Glioblastomen:

- primäre Glioblastome: Mittelwert 18,1; Standardabweichung 8,3
- sekundäre Glioblastome: Mittelwert 8,7; Standardabweichung 4,5
- anaplastische Astrozytome: Mittelwert 10,7; Standardabweichung 7,5
- diffuse Astrozytome: Mittelwert 8,6; Standardabweichung 2,9

Entsprechend der niedrigen Expression zeigten die primären Glioblastome somit einen erhöhten Methylierungsgrad. Dies traf jedoch nicht auf die sekundären Glioblastome zu, die zwar im Durchschnitt eine erniedrigte Expression, aber einen Methylierungsgrad ähnlich der diffusen Astrozytome aufwiesen.

Der zweiseitige Student's T-Test bestätigte eine signifikant erhöhte Methylierung der Promotorregion in primären Glioblastomen verglichen mit den anderen Tumorentitäten:

- pGBIV vs. sGBIV: $p = 0,0005$
- pGBIV vs. AAll: $p = 0,01$
- pGBIV vs. All: $p = 0,001$

Um beurteilen zu können, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression besteht, wurden die Tumoren in zwei Gruppen eingeteilt. Zum Einen die hypermethylierten Tumoren ($n = 22$) mit einem Methylierungsscore größer oder gleich 17 und zum Anderen die schwach methylierten Tumoren ($n = 45$) mit einem Methylierungsscore kleiner 17. Vergleicht man die beiden Gruppen so findet sich eine signifikant erniedrigte Expression in der hypermethylierten Gruppe:

- hypermethylierte Tumoren: Mittelwert 0,8; Standardabweichung 0,9
- schwach methylierte Tumoren: Mittelwert 1,6; Standardabweichung 1,4
- Student's T-Test: $p = 0,02$

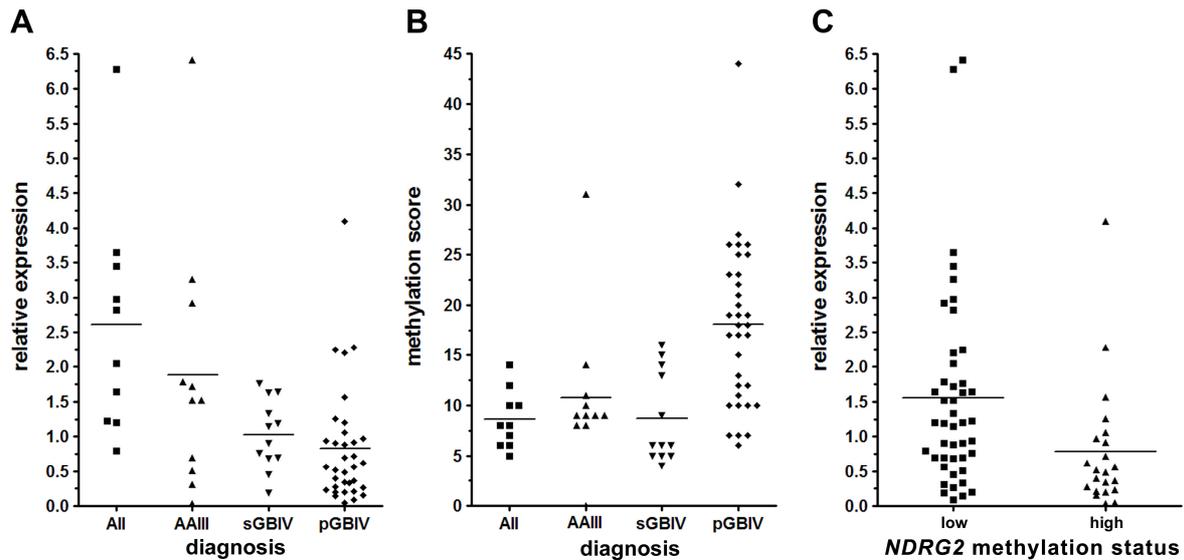


Abb. 4: Zusammenhang zwischen mRNA-Expression, *NDRG2*-Promotormethylierung und WHO-Grad der Gliome. (A) Ordinate, relative *NDRG2* mRNA-Expression der Gliome im Vergleich zu den nicht-neoplastischen Kontrollen; Abszisse, WHO-Grad der Gliome. Die relative mRNA-Expression nimmt mit zunehmendem Malignitätsgrad der Tumoren ab. (B) Ordinate, Methylierungsscore; Abszisse, WHO-Grad der Gliome. Der Methylierungsscore der primären Glioblastome ist im Vergleich mit den anderen Tumorentitäten signifikant erhöht. (C) Ordinate, relative *NDRG2* mRNA-Expression; Abszisse *NDRG2* Methylierungsstatus. Low bedeutet schwach methylierter Tumor mit einem Methylierungsscore kleiner 17. High bedeutet hypermethylierter Tumor mit einem Methylierungsscore von größer/gleich 17. Die relative mRNA-Expression ist in der Gruppe der hypermethylierten Tumoren signifikant erniedrigt.

Der statistische Zusammenhang zwischen Promotormethylierung und mRNA-Expression wurde mittels der Deming Modell II Regression Analyse auch unabhängig von dem auf 17 festgelegten Methylierungs-Cutoff untersucht. Diese Analyse berücksichtigt die unterschiedlichen Standardabweichungen der beiden erhobenen Parameter. Für einen signifikanten Zusammenhang zwischen zwei Zahlenreihen muss der Anstieg der Ausgleichsgeraden signifikant von null abweichen. Mit einer Wahrscheinlichkeit von $p = 0,04$ bestätigte sich der signifikante Zusammenhang zwischen Hypermethylierung der Promotorregion von *NDRG2* und erniedrigter mRNA-Expression.

Ergänzend wurden alle primären Glioblastome und 2 sekundäre Glioblastome hinsichtlich Allelverlust auf Chromosom 14q untersucht. In der LOH-Analyse fand sich ein Allelverlust bei 3 primären Glioblastomen (GB82D, GB100D, GB158D). Dieser zeigte sich bei den Tumoren GB100D und GB158D in allen informativen

Mikrosatellitenmarkern, der Tumor GB82D hatte in einem Marker (*D14S1023*) eine Retention des Chromosoms 14q.

Die mRNA-Expression war in allen drei Tumoren auf 20-40 % reduziert und GB82D sowie GB100D waren in der Methylierungsanalyse auch als hypermethyliert klassifiziert worden.

Zum Schluss wurden, soweit vorhanden, die klinischen Verlaufs-Daten der Patienten ausgewertet. Ziel war es, zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen Expressionsstatus beziehungsweise Promotorhypermethylierung und dem Gesamtüberleben bestand. Überlebensdaten waren für 29 Patienten mit primärem Glioblastom verfügbar. Alle Patienten waren an ihrem Tumor verstorben. Die mittlere Überlebenszeit nach Erstdiagnose waren 264 Tage. Es ließ sich jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen *NDRG2* mRNA-Expression beziehungsweise Promotorhypermethylierung und dem Gesamtüberleben feststellen.

4. Diskussion

Als Fazit der eigenen Untersuchungen kann *NDRG2* als ein Tumorsuppressorgenkandidat auf Chromosom 14q11.2 angesehen werden, der in primären Glioblastomen durch Promotorhypermethylierung transkriptionell inaktiviert wird.

Erste Hinweise auf eine Bedeutung von *NDRG2* in der Pathogenese von Glioblastomen fanden Deng et al. (5). Sie beschrieben eine verminderte Expression von *NDRG2* in Glioblastomen und konnten einen Wachstumsstopp von Glioblastomzellen durch Überexpression von *NDRG2* in Glioblastomzelllinien nachweisen. Weitere Arbeitsgruppen bestätigten die Expression von *NDRG2* in astrozytären Zellen (30, 33, 38) und eine Rolle in der Wachstumsregulation neuronaler Zellen (43). Es wurde beschrieben, dass die *NDRG2*-Expression im Gehirn durch Kortikosteroide induziert (30) und durch Antidepressiva herunterreguliert (30, 44) werden kann.

Die Rolle epigenetischer Modifikationen in der Herunterregulierung von *NDRG2* in Tumoren wurde erstmals von Lusic et al. (25) in Zusammenarbeit mit der Düsseldorfer Arbeitsgruppe von Prof. Reifenberger beschrieben. In dieser Arbeit fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen *NDRG2*-Promotorhypermethylierung und verminderter *NDRG2*-Expression in Meningeomen. Darüber hinaus zeigte sich ein Zusammenhang zwischen *NDRG2*-Promotorhypermethylierung beziehungsweise verminderter *NDRG2*-Expression und ungünstigerem klinischen Verlauf in der Gruppe von Patienten mit atypischen Meningeomen (25).

In der Folge wurde eine erniedrigte Expression von *NDRG2* bei unterschiedlichen malignen Tumoren beschrieben. Insbesondere für das Kolonkarzinom gibt es mehrere Publikationen, die eine Beteiligung von *NDRG2* in der Tumorprogression vom Adenom zum Karzinom nahelegen (4, 15, 16, 24, 36, 40). Piepoli et al. (36) stellten als epigenetischen Mechanismus der Herunterregulierung ebenfalls eine Promotorhypermethylierung bei fortgeschrittenen Kolonkarzinomen fest. Des Weiteren ergaben sich Hinweise für eine Rolle von *NDRG2* als Tumorsuppressorgen bei Leberzell- (12, 20, 34), Magen- (2), Pankreas- (12) und Nierenzellkarzinomen (26) sowie bei Mamma- (35, 41), Schilddrüsen- (51) und oralen Plattenepithelkarzinomen (9). Bei ösophagealen Plattenepithelkarzinomen konnten Shi et al. (39) sogar zeigen, dass eine erniedrigte Expression von *NDRG2* einen

unabhängigen Faktor für eine schlechte Prognose darstellt. Auch bei Melanomen (13, 14), akuten myeloischen Leukämien (45) und humanen Fibrosarkomen (13) ist eine erniedrigte *NDRG2* Expression beschrieben. Im Gegensatz dazu stellten zwei Arbeitsgruppen eine Überexpression von *NDRG2* bei extraskelettalen myxoiden Chondrosarkomen (8) und dem Morbus Alzheimer (27) fest.

In den eigenen Untersuchungen konnte an einer Serie von 67 astrozytären Tumoren eine signifikant erniedrigte Expression von *NDRG2* in Glioblastomen im Vergleich zu normalem Hirngewebe und WHO-Grad II und III Gliomen nachgewiesen werden. Als Ursache für diese Verminderung wurde eine Hypermethylierung des *NDRG2*-Promotors identifiziert. Dieser Mechanismus wurde bereits bei Meningeomen (25), Leberzellkarzinomen (20), Kolonkarzinomen (36) und oralen Plattenepithelkarzinomen (9) beschrieben. Verglichen mit primären Glioblastomen zeigten sekundäre Glioblastome eine höhere Expression und eine signifikant niedrigere Methylierungsrate. Dies bestätigt die Erkenntnisse, dass für die *de novo* Entstehung von primären Glioblastomen andere molekularbiologische Veränderungen verantwortlich sind, als für die Entwicklung eines sekundären Glioblastoms aus niedrig malignen Vorläufergliomen. Für primäre Glioblastome sind beispielsweise *EGFR*-Amplifikation und *PTEN*-Mutation charakteristische genetische Aberrationen, wohingegen für sekundäre Glioblastome *TP53*- und *IDH1*-Mutationen typisch sind (17, 31, 49). Dieser Unterschied manifestiert sich auch in epigenetischen Veränderungen bei sekundären Glioblastomen, die im Vergleich zu primären Glioblastomen vermehrt Promotorhypermethylierungen von *p14^{ARF}*, *CDKN2A*, *RB1*, *TIMP3*, *HRK* und *EMP3* aufweisen (19, 29, 31).

Unterschiedliche *NDRG2*-Expressions- und Methylierungsraten waren auch bei anaplastischen und diffusen Astrozytomen gegenüber primären Glioblastomen festzustellen. In diffusen Astrozytomen fand sich keine erniedrigte *NDRG2*-Expression, in den anaplastischen Astrozytomen nur in einem Fall (AA1D). Interessanterweise war dies auch der einzige Tumor, der eine Hypermethylierung des Promotors aufwies und kein primäres Glioblastom war. Eine erneute histologische Begutachtung bestätigte die Diagnose eines anaplastischen Astrozytoms. Leider lagen für diesen Fall keine klinischen Verlaufsdaten vor, so dass nicht überprüft werden konnte, ob die erniedrigte *NDRG2*-Expression mit einer ungünstigeren Prognose, entsprechend der eines Glioblastoms, assoziiert war.

Von den hypermethylierten primären Glioblastomen wiesen 9 Tumoren keine erniedrigte *NDRG2*-Expression auf. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Verunreinigung der Tumor-DNA durch DNA von nicht-neoplastischen Zellen, wie zum Beispiel durch reaktive Astrozyten oder Mikrogliazellen. Zur Reevaluation der Histologie standen Paraffinschnitte von 8 der Tumoren für die GFAP und CD68 Färbung bereit. In 5 von 8 Tumoren zeigten sich vermehrt reaktive Astrozyten und in allen 8 Tumoren eine Infiltration durch Mikrogliazellen. Eine andere mögliche Ursache der erhaltenen *NDRG2*-Expression wäre eine Methylierung der *NDRG2*-Promotorregion nur in einer Subpopulation der Tumorzellen. In Zusammenschau mit den eigenen immunhistochemischen Befunden könnte sowohl die Expression, als auch die Methylierung eine regionale Heterogenität aufweisen. Dies traf für 5 der 9 Tumoren zu, die in der Immunhistochemie ein heterogenes Anfärbemuster für das *NDRG2*-Protein aufwiesen.

Mehrere Studien berichteten über Allelverluste auf dem langen Arm des Chromosoms 14 in Glioblastomen mit der Vermutung, dass 14q ein oder mehrere Gliom-relevante Tumorsuppressorgene enthalte (6, 10, 11, 48). Wir stellten Allelverluste auf 14q jedoch nur in drei von insgesamt 36 untersuchten Tumoren (8 %) fest. Diese drei Tumoren wiesen alle eine deutlich erniedrigte *NDRG2*-Expression auf, darunter auch zwei mit erhöhter *NDRG2*-Promotormethylierung. Grund für die relativ niedrige Frequenz der Allelverluste dürfte die Wahl der Mikrosateliten-Marker sein, die alle eng um den *NDRG2*-Genloкус auf Chromosom 14q11.2 zu finden sind. Diese Ergebnisse lassen also die Option offen, dass neben *NDRG2* möglicherweise weitere Tumorsuppressorgene distal von *NDRG2* auf Chromosom 14 q lokalisiert sein könnten.

Analog zu den Ergebnissen bei Meningeomen (25) wurde die eigene Glioblastomserie auf einen Zusammenhang zwischen Expression und Methylierung von *NDRG2* und Überleben der Patienten hin analysiert. Es standen allerdings nur von 29 der 34 primären Glioblastompatienten klinische Verlaufsdaten zur Verfügung. Weder für die Expressions- noch für die Methylierungsdaten ergab sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben. Dies könnte zum Einen auf die kleine Patientenserie und zum Anderen auf den im Vergleich mit Meningeomen aggressiveren Verlauf der Glioblastomerkrankung mit deutlich kürzeren mittleren Überlebenszeiten zurückzuführen sein. Um Expression und Methylierung von *NDRG2* als Prognoseparameter besser beurteilen zu können, müssten

Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv mit klinischen Verlaufsdaten durchgeführt werden.

Eine Bestätigung der *NDRG2*-Promotormethylierung als Marker eines aggressiveren Tumorwachstums könnte neue Therapieprinzipien für Glioblastome eröffnen. Betrachtet man hämatologische Neoplasien, so konnte für das myelodysplastische Syndrom und die akute myeloische Leukämie ein gutes Therapieansprechen auf demethylierende Substanzen wie Azacytidin gezeigt werden (7). Neben der guten Verträglichkeit der Substanzen stellten Fenaux et al. (7) ein signifikant längeres Gesamtüberleben im Vergleich zu den üblichen supportiven Maßnahmen fest. Ob diese Ergebnisse auch auf Glioblastome übertragbar sind, könnte Gegenstand künftiger Studien sein.

Ein Augenmerk sollte auch auf die verschiedenen zellulären Signalkaskaden gelegt werden, in die *NDRG2* involviert ist. Mehrere Arbeitsgruppen berichteten, dass *NDRG2* in die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen eingreift (13, 20, 41). Im gesunden Gewebe sorgt die Expression von *NDRG2* für eine Herunterregulierung der Matrixmetalloproteinasen. Eine erniedrigte Expression von *NDRG2* mit konsekutiv erhöhter Aktivität der Matrixmetalloproteinasen führt bei Mammakarzinomen (41), Fibrosarkomen (13) und Leberzellkarzinomen (20) zu einer signifikanten Erhöhung von Invasivität und metastatischem Potenzial. Neben dem β -Catenin-Weg (14, 15) wird auch der Akt-Signalweg (1, 9, 35) über *NDRG2* gesteuert. Interessant ist auch, dass *NDRG2* im ersten Intron eine p53 Bindungsstelle besitzt (21). Liu et al. berichteten über eine Beteiligung von *NDRG2* an der Regulation von Zellzyklus und Apoptose, und konnten darüber hinaus zeigen, dass *NDRG2* auch ohne Stimulation durch p53 in der Lage ist, Apoptose auszulösen.

In Zusammenschau der eigenen Ergebnisse und der Literatur ist *NDRG2* als ein Tumorsuppressorgen zu betrachten, das durch Promotorhypermethylierung in verschiedenen Tumorentitäten herunterreguliert ist. Die eigenen Befunde zeigen, dass dieser Mechanismus bei Glioblastomen für die erniedrigte Expression bei primären nicht jedoch bei sekundären Glioblastomen verantwortlich ist. Diese Ergebnisse unterstützen auch die Hypothese, dass die Pathogenese primärer und sekundärer Glioblastome auf verschiedenen molekulargenetischen Veränderungen basieren.

5. Literaturverzeichnis

- (1) Burchfield JG, Lennard AJ, Narasimhan S, Hughes WE, Wasinger VC, Corthals GL, Okuda T, Kondoh H, Biden TJ, Schmitz-Peiffer C. Akt mediates insulin-stimulated phosphorylation of NdrG2: evidence for cross-talk with protein kinase C theta. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):18623-32.
- (2) Choi SC, Yoon SR, Park YP, Song EY, Kim JW, Kim WH, Yang Y, Lim JS, Lee HG. Expression of NDRG2 is related to tumor progression and survival of gastric cancer patients through Fas-mediated cell death. *Exp Mol Med.* 2007 Dec 31;39(6):705-14.
- (3) Choi SC, Kim KD, Kim JT, Kim JW, Yoon DY, Choe YK, Chang YS, Paik SG, Lim JS. Expression and regulation of NDRG2 (N-myc downstream regulated gene 2) during the differentiation of dendritic cells. *FEBS Lett.* 2003 Oct 23;553(3):413-8.
- (4) Chu DK, Zhang J, Shi H, Dong GL, Liu XP, Wang WZ. [Expression of candidate tumor suppressor gene N-Myc downstream-regulated gene 2 in colon cancer]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi.* 2008 Jul;11(4):354-7. Chinese.
- (5) Deng Y, Yao L, Chau L, Ng SS, Peng Y, Liu X, Au WS, Wang J, Li F, Ji S, Han H, Nie X, Li Q, Kung HF, Leung SY, Lin MC. N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int J Cancer.* 2003 Sep 1;106(3):342-7. Erratum in: *Int J Cancer.* 2003 Oct 10;106(6):984.
- (6) Dichamp C, Taillibert S, Aguirre-Cruz L, Lejeune J, Marie Y, Kujas M, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Sanson M. Loss of 14q chromosome in oligodendroglial and astrocytic tumors. *J Neurooncol.* 2004 May;67(3):281-5.
- (7) Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, Sanz G, List AF, Gore S, Seymour JF, Dombret H, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach CL, Silverman LR. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2010 Feb 1;28(4):562-9.
- (8) Filion C, Matoi T, Olshen AB, Laé M, Emnett RJ, Gutmann DH, Perry A, Ladanyi M, Labelle Y. The EWSR1/NR4A3 fusion protein of extraskeletal myxoid chondrosarcoma activates the PPAR γ nuclear receptor gene. *J Pathol.* 2009 Jan;217(1):83-93.
- (9) Furuta H, Kondo Y, Nakahata S, Hamasaki M, Sakoda S, Morishita K. NDRG2 is a candidate tumor-suppressor for oral squamous-cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 22;391(4):1785-91.
- (10) Hu J, Jiang C, Ng HK, Pang JC, Tong CY. Chromosome 14q may harbor multiple tumor suppressor genes in primary glioblastoma multiforme. *Chin Med J (Engl).* 2002 Aug;115(8):1201-4.
- (11) Hu J, Pang JC, Tong CY, Lau B, Yin XL, Poon WS, Jiang CC, Zhou LF, Ng HK. High-resolution genome-wide allelotype analysis identifies loss of chromosome 14q as a recurrent genetic alteration in astrocytic tumours. *Br J Cancer.* 2002 Jul 15;87(2):218-24.
- (12) Hu XL, Liu XP, Lin SX, Deng YC, Liu N, Li X, Yao LB. NDRG2 expression and mutation in human liver and pancreatic cancers. *World J Gastroenterol.* 2004 Dec 1;10(23):3518-21.
- (13) Kim A, Kim MJ, Yang Y, Kim JW, Yeom YI, Lim JS. Suppression of NF-kappaB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells. *Carcinogenesis.* 2009 Jun;30(6):927-36.
- (14) Kim A, Yang Y, Lee MS, Yoo YD, Lee HG, Lim JS. NDRG2 gene expression in B16F10 melanoma cells restrains melanogenesis via inhibition of Mitf expression. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008 Dec;21(6):653-64.

- (15) Kim YJ, Yoon SY, Kim JT, Song EY, Lee HG, Son HJ, Kim SY, Cho D, Choi I, Kim JH, Kim JW. NDRG2 expression decreases with tumor stages and regulates TCF/beta-catenin signaling in human colon carcinoma. *Carcinogenesis*. 2009 Apr;30(4):598-605.
- (16) Kim YJ, Yoon SY, Kim JT, Choi SC, Lim JS, Kim JH, Song EY, Lee HG, Choi I, Kim JW. NDRG2 suppresses cell proliferation through down-regulation of AP-1 activity in human colon carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2009 Jan 1;124(1):7-15.
- (17) Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*. 1999 Jan;1(1):44-51. Review.
- (18) Konings H. Use of Deming regression in method-comparison studies. *Surv Immunol Res*. 1982;1(4):371-4.
- (19) Kunitz A, Wolter M, van den Boom J, Felsberg J, Tews B, Hahn M, Benner A, Sabel M, Lichter P, Reifenberger G, von Deimling A, Hartmann C. DNA hypermethylation and aberrant expression of the EMP3 gene at 19q13.3 in Human Gliomas. *Brain Pathol*. 2007 Oct;17(4):363-70.
- (20) Lee DC, Kang YK, Kim WH, Jang YJ, Kim DJ, Park IY, Sohn BH, Sohn HA, Lee HG, Lim JS, Kim JW, Song EY, Kim DM, Lee MN, Oh GT, Kim SJ, Park KC, Yoo HS, Choi JY, Yeom YI. Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis. *Cancer Res*. 2008 Jun 1;68(11):4210-20.
- (21) Liu N, Wang L, Li X, Yang Q, Liu X, Zhang J, Zhang J, Wu Y, Ji S, Zhang Y, Yang A, Han H, Yao L. N-Myc downstream-regulated gene 2 is involved in p53-mediated apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2008 Sep;36(16):5335-49.
- (22) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- (23) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6. Review. Erratum in: *Acta Neuropathol*. 2007 Nov;114(5):547.
- (24) Lorentzen A, Vogel LK, Lewinsky RH, Saebø M, Skjelbred CF, Godiksen S, Hoff G, Tveit KM, Lothe IM, Ikdahl T, Kure EH, Mitchelmore C. Expression of NDRG2 is down-regulated in high-risk adenomas and colorectal carcinoma. *BMC Cancer*. 2007 Oct 12;7:192.
- (25) Lusk EA, Watson MA, Chicoine MR, Lyman M, Roerig P, Reifenberger G, Gutmann DH, Perry A. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7121-6.
- (26) Ma J, Jin H, Wang H, Yuan J, Bao T, Jiang X, Zhang W, Zhao H, Yao L. Expression of NDRG2 in clear cell renal cell carcinoma. *Biol Pharm Bull*. 2008 Jul;31(7):1316-20.
- (27) Mitchelmore C, Büchmann-Møller S, Rask L, West MJ, Troncoso JC, Jensen NA. NDRG2: a novel Alzheimer's disease associated protein. *Neurobiol Dis*. 2004 Jun;16(1):48-58.
- (28) Mueller W, Nutt CL, Ehrich M, Riemenschneider MJ, von Deimling A, van den Boom D, Louis DN. Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. *Oncogene*. 2007 Jan 25;26(4):583-93.
- (29) Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, Konishi N. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest*. 2005 Feb;85(2):165-75.
- (30) Nichols NR. Ndr2, a novel gene regulated by adrenal steroids and antidepressants, is highly expressed in astrocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec;1007:349-56. Review.

- (31) Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-53. Review.
- (32) Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005 Jun;64(6):479-89. Review.
- (33) Okuda T, Kokame K, Miyata T. Differential expression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system. *J Histochem Cytochem.* 2008 Feb;56(2):175-82.
- (34) Park MY, Choi SC, Lee HS, Kim D, Baek KE, Kim JT, Lim JS, Yeom YI, Chung JW, Kim JW, Myung PK, Lee HG, Kim JW, Song EY. A quantitative analysis of N-myc downstream regulated gene 2 (NDRG 2) in human tissues and cell lysates by reverse-phase protein microarray. *Clin Chim Acta.* 2008 Jan;387(1-2):84-9.
- (35) Park Y, Shon SK, Kim A, Kim KI, Yang Y, Cho DH, Lee MS, Lim JS. SOCS1 induced by NDRG2 expression negatively regulates STAT3 activation in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Nov 16;363(2):361-7.
- (36) Piepoli A, Cotugno R, Merla G, Gentile A, Augello B, Quitadamo M, Merla A, Panza A, Carella M, Maglietta R, D'Addabbo A, Ancona N, Fusilli S, Perri F, Andriulli A. Promoter methylation correlates with reduced NDRG2 expression in advanced colon tumour. *BMC Med Genomics.* 2009 Mar 3;2:11.
- (37) Qu X, Zhai Y, Wei H, Zhang C, Xing G, Yu Y, He F. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. *Mol Cell Biochem.* 2002 Jan;229(1-2):35-44.
- (38) Shen L, Zhao ZY, Wang YZ, Ji SP, Liu XP, Liu XW, Che HL, Lin W, Li X, Zhang J, Yao LB. Immunohistochemical detection of NdrG2 in the mouse nervous system. *Neuroreport.* 2008 Jun 11;19(9):927-31.
- (39) Shi H, Li N, Li S, Chen C, Wang W, Xu C, Zhang J, Jin H, Zhang H, Zhao H, Song W, Feng Q, Feng X, Shen X, Yao L, Zhao Q. Expression of NDRG2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2010 Feb 11.
- (40) Shi H, Jin H, Chu D, Wang W, Zhang J, Chen C, Xu C, Fan D, Yao L. Suppression of N-myc downstream-regulated gene 2 is associated with induction of Myc in colorectal cancer and correlates closely with differentiation. *Biol Pharm Bull.* 2009 Jun;32(6):968-75.
- (41) Shon SK, Kim A, Kim JY, Kim KI, Yang Y, Lim JS. Bone morphogenetic protein-4 induced by NDRG2 expression inhibits MMP-9 activity in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jul 24;385(2):198-203.
- (42) Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.
- (43) Takahashi K, Yamada M, Ohata H, Honda K, Yamada M. NdrG2 promotes neurite outgrowth of NGF-differentiated PC12 cells. *Neurosci Lett.* 2005 Nov 18;388(3):157-62.
- (44) Takahashi K, Yamada M, Ohata H, Momose K, Higuchi T, Honda K, Yamada M. Expression of NdrG2 in the rat frontal cortex after antidepressant and electroconvulsive treatment. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2005 Sep;8(3):381-9.
- (45) Tschan MP, Shan D, Laedrach J, Eyholzer M, Leibundgut EO, Baerlocher GM, Tobler A, Stroka D, Fey MF. NDRG1/2 expression is inhibited in primary acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2010 Mar;34(3):393-8.

- (46) van den Boom J, Wolter M, Kuick R, Misek DE, Youkilis AS, Wechsler DS, Sommer C, Reifenberger G, Hanash SM. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 2003 Sep;163(3):1033-43.
- (47) Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, Heese O, Krex D, Nikkhah G, Pietsch T, Wiestler O, Reifenberger G, von Deimling A, Loeffler M. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 1;27(34):5743-50.
- (48) Wooten EC, Fults D, Duggirala R, Williams K, Kyritsis AP, Bondy ML, Levin VA, O'Connell P. A study of loss of heterozygosity at 70 loci in anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme with implications for tumor evolution. *Neuro Oncol.* 1999 Jul;1(3):169-76.
- (49) Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009 Feb 19;360(8):765-73.
- (50) Zhang J, Li F, Liu X, Shen L, Liu J, Su J, Zhang W, Deng Y, Wang L, Liu N, Han W, Zhang J, Ji S, Yang A, Han H, Yao L. The repression of human differentiation-related gene NDRG2 expression by Myc via Miz-1-dependent interaction with the NDRG2 core promoter. *J Biol Chem.* 2006 Dec 22;281(51):39159-68.
- (51) Zhao H, Zhang J, Lu J, He X, Chen C, Li X, Gong L, Bao G, Fu Q, Chen S, Lin W, Shi H, Ma J, Liu X, Ma Q, Yao L. Reduced expression of N-Myc downstream-regulated gene 2 in human thyroid cancer. *BMC Cancer.* 2008 Oct 22;8:303.

6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Guido Reifenberger für die Überlassung des Themas und die stets freundliche Unterstützung. Besonders danke ich Ihm auch für die Geduld während des langen Prozesses der Verschriftlichung meiner Ergebnisse.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch beim gesamten Team der Neuropathologie für den immer netten und hilfsbereiten Umgang miteinander.

Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Marietta Wolter für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und Ihr immer offenes Ohr für die kleinen und großen Probleme des Laboralltags.

Herrn PD Dr. Markus J. Riemenschneider danke ich für die Hilfestellung bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen und die tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Publikation.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. rer. nat. Peter Roerig für die Einarbeitung in das Thema und die verwendeten Methoden.

Frau Britta Friedensdorf danke ich für die Tipps und Tricks des Gelgießens und Ihre Hilfe während meiner Labortätigkeit.

Frau Christa Mähler danke ich für die freundliche Betreuung im immunhistologischen Labor und die Anfertigung der Schnitte.

Für die Durchführung der Prüfung danke ich Herrn Prof. Dr. med. Rainer Haas, der freundlicherweise auch das Korreferat übernommen hat, und Herrn Prof. Dr. med. Michael Sabel.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Frau, meinen Eltern und Geschwistern und meinen Freunden. Erst durch ihre liebevolle Unterstützung war es möglich, auch in schwierigen Zeiten, den Blick nach Vorne nicht zu verlieren und sich den neuen Herausforderungen zu stellen.

7. Lebenslauf

Name: Martin Tepel

Anschrift: Himmelgeisterstraße 79
40225 Düsseldorf

E-mail: martintepel@aol.com

Geburtsdatum: 04.06.1983

Geburtsort: Peine

Familienstand: Verheiratet mit Yekaterina Tepel

Eltern: Heinrich Tepel
Gabriele Tepel

Geschwister: Michael, Joachim und Jessica Tepel

Berufsweg:

seit 02/2009

Assistenzarzt in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und
Klinische Immunologie der Universitätsklinik Düsseldorf

12/2008

Erteilung der Approbation als Arzt

8. Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur Rolle des Gens N-myc downstream-regulated gene 2 (*NDRG2*) auf 14q11.2 in der Pathogenese von astrozytären Gliomen des Erwachsenenalters. Hierbei sollte insbesondere der Frage nachgegangen werden, welche molekularen Mechanismen der in der Literatur beschriebenen verminderten Expression von *NDRG2* in Glioblastomen zugrundeliegen. Insgesamt wurden 67 humane astrozytäre Tumoren untersucht, darunter 10 diffuse Astrozytome WHO-Grad II, 11 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III, 12 sekundäre Glioblastome WHO-Grad IV und 34 primäre Glioblastome WHO-Grad IV. Aus Gewebeproben der Tumoren wurden DNA und RNA isoliert und mittels Real-time Reverse Transkriptions-PCR die Expression des *NDRG2*-Transkripts quantitativ bestimmt. Eine Mutationsanalyse dieses Gens erfolgte durch SSCP-Analysen und nachfolgende DNA-Sequenzierung. Hieran schloss sich eine Allelverlustanalyse zum Nachweis von Verlusten der Heterozygotie am *NDRG2*-Genloкус an. Die Bestimmung des Methylierungsstatus der *NDRG2*-Promotorregion erfolgte durch Sequenzierung Natriumbisulfit-behandelter DNA. Die Untersuchungen wurden durch die immunhistochemische Darstellung der *NDRG2*-Proteinexpression nach Inkubation mit einem *NDRG2*-spezifischen polyklonalen Antikörper an Schnittpräparaten ergänzt.

Die eigenen Experimente bestätigten eine verminderte Expression von *NDRG2* auf mRNA- und Proteinebene in Glioblastomen im Vergleich zu normalem Hirngewebe und WHO-Grad II und III Gliomen. Es fanden sich jedoch keine Mutationen oder gehäuften Allelverluste in den untersuchten Tumoren. Als molekulare Ursache der verminderten Expression zeigte sich eine Hypermethylierung der *NDRG2*-Promotorregion in 62 % der untersuchten primären Glioblastome. Im Unterschied hierzu wiesen sekundäre Glioblastome und diffuse Astrozytome keine Hypermethylierung des *NDRG2* Promotors auf. Unter den anaplastischen Astrozytomen fiel lediglich ein Tumor mit *NDRG2*-Promotorhypermethylierung auf. Der Zusammenhang zwischen aberranter Methylierung des *NDRG2*-Promotors und erniedrigter *NDRG2*-Expression erwies sich als statistisch signifikant.

Zusammenfassend sprechen die eigenen Befunde somit dafür, dass *NDRG2* ein Tumorsuppressorgen ist, dessen Transkription und Expression in der Mehrheit primärer Glioblastome durch eine aberrante Methylierung seiner Promotorregion

herunterreguliert wird und dadurch zur Pathogenese von primären Glioblastomen, den häufigsten ZNS-eigenen Tumoren des Erwachsenenalters, beiträgt.