

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

**Identifizierung epigenetisch inaktiver Tumorsuppressorgene in
glialen Tumoren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Laura Hofmann

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger
Korreferent: PD Dr. med. Michael Sabel

Zusammenfassung (Abstract)

Eine charakteristische molekulargenetische Veränderung in oligodendroglialen Tumoren sind kombinierte Allelverluste, d.h. ein sog. *Loss of Heterozygosity* (LOH) auf den Chromosomenarmen 1p und 19q (LOH 1p/19q). Mit dieser Veränderung sind besseres Ansprechen auf Chemotherapie und längeres Überleben im Vergleich zu Gliomen ohne diese genetische Veränderung assoziiert. In diesem Zusammenhang wurden Tumor-relevante Gene mit einer verstärkten Promotormethylierung identifiziert. Epigenetische Veränderungen und insbesondere Promotormethylierung stellen einen Mechanismus der Inaktivierung Tumor-relevanter Gene dar. Im Rahmen eines globalen Screening-Ansatzes mittels *Differential Methylation Hybridization* wurde in Vorarbeiten zu dieser Dissertationsschrift für die Kandidatengene *ADM*, *CGI69* und *CLSTN1* in Tumorproben mit LOH 1p/19q eine Promotorhypermethylierung gefunden. In der vorliegenden Arbeit wurden die genannten drei Gene weitergehend hinsichtlich ihrer Promotormethylierung, Expression und prognostischen Relevanz in diffusen Gliomen hin untersucht.

Insgesamt wurde eine Kohorte von 53 oligodendroglialen und 37 astrozytären Tumoren zunächst bzgl. des Promotormethylierungsstatus der drei Kandidatengene durch Natriumbisulfit-Sequenzierung und mittels *Combined Bisulfite Restriction Analysis* (COBRA) untersucht. Generell konnte für die untersuchten Gene eine häufigere Promotormethylierung in Tumoren mit LOH 1p/19q als in Tumoren ohne diesen molekularen Marker bestätigt werden. Oligodendrogliome wiesen eine häufigere und stärker ausgeprägte Promotormethylierung auf als Astrozytome. Die *ADM*-mRNA-Expressionsanalysen ergaben eine generell höhere Expression in den Tumorproben im Vergleich zu Normalgehirngewebe, welches eine geringere *ADM*-Expression trotz fehlender Promotormethylierung aufwies. Innerhalb des Tumorkollektivs fand sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen *ADM*-Promotormethylierung und *ADM*-mRNA-Expression. Tendenziell ergab sich eine höhere Methylierungsrate und eine niedrigere mRNA-Expression in Gliomen mit LOH 1p/19q. Ein positiver *ADM*-Methylierungsstatus in Gliomen war signifikant mit einer längeren Überlebenszeit der Patienten assoziiert.

Der *CGI69*-Promotor war in den meisten Fällen der eigenen Tumorserie methyliert. Zwischen Methylierungsstatus und mRNA-Expression konnte in den untersuchten Gliomen kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Die Promotorregion von *CLSTN1* war in der Mehrzahl der analysierten Gliome methyliert. Methylierte Tumoren zeigten aber eine stärkere Expression der zugehörigen mRNA als unmethylierte Tumoren. Die *CLSTN1*-mRNA-Expression war in Oligodendrogliomen signifikant stärker als in Astrozytomen. Insgesamt exprimierten die analysierten Gliome *CLSTN1* geringer als das Normalgehirngewebe. Zwischen LOH 1p/19q und *CLSTN1* mRNA-Expression bestand kein Zusammenhang. Die Überlebenszeit der Patienten war tendenziell länger für Patienten, deren Tumoren einen methylierten *CLSTN1*-Promotor aufwiesen.

In mRNA-Expressionsanalysen an Gliomzelllinien vor und nach einer demethylierenden Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin zeigten alle drei Kandidatengene zumindest in einem Teil der untersuchten Zelllinien einen Expressionsanstieg nach der 5-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung, wobei der *ADM*-Promotor in den untersuchten Zelllinien allerdings nicht methyliert war. Die eigenen Ergebnisse sprechen für von Gen zu Gen unterschiedliche Zusammenhänge zwischen dem Promotormethylierungsstatus und der Genexpression, deren Regulation demnach komplex ist und in Gliomen nicht allein durch den Grad der jeweiligen Promotormethylierung determiniert wird. Für *ADM* und *CLSTN1* deuten die eigenen Resultate darauf hin, dass eine verstärkte Promotormethylierung in diffusen Gliomen mit einer besseren Prognose assoziiert ist. Es steht zu vermuten, dass die Methylierung dieser Gene im Zusammenhang mit dem kürzlich identifizierten *Glioma-CpG Island Methylator Phenotype* (G-CIMP) steht, der insbesondere in *IDH1*-mutanten diffusen Gliomen beobachtet wird.

Verwendete Abkürzungen

ADM	Adrenomedullin
APS	Ammoniumpersulfat
ARF1	ADP-ribosylation factor 1
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
CGI69	Solute Carrier Family 25 Member 39
CLSTN1	Calsyntenin 1
COBRA	Combined Bisulfite Restriction Analysis
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMH	Differential Methylation Hybridization
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP/ddNTP	Deoxy-/Dideoxynukleotid
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
LOH	Loss of Heterozygosity
mRNA	messenger RNA
NaOAc	Natriumacetat
PAA	Polyacrylamid
pd(N)6	Random Hexamer Phosphorylated
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Real time Polymerasekettenreaktion
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris, EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
WHO	World Health Organization

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Grundlagen der Tumorentstehung	2
1.1.1	Onkogene	6
1.1.2	Tumorsuppressorgene	8
1.1.3	Epigenetik und Tumorentstehung	9
1.1.4	DNA-Methylierung	10
1.2	Gliome	12
1.3	Oligodendrogliale Tumoren	13
1.3.1	Definition.....	13
1.3.2	Einteilung und Epidemiologie	13
1.3.3	Molekulargenetik der oligodendroglialen Tumoren.....	14
1.3.4	Epigenetische Veränderungen in oligodendroglialen Tumoren	17
1.4	Astrozytäre Tumoren	19
1.4.1	Definition.....	19
1.4.2	Einteilung und Epidemiologie der Astrozytome	20
1.4.3	Molekulargenetik der astrozytären Tumoren.....	20
1.4.4	Epigenetische Veränderungen in astrozytären Tumoren	24
1.5	Oligoastrozytäre Tumoren	26
1.5.1	Definition des Oligoastrozytoms.....	26
1.5.2	Einteilung und Epidemiologie	26
1.5.3	Molekulargenetik der oligoastrozytären Tumoren.....	26
1.6	Klinik und Therapie der Gliome.....	28
1.7	Untersuchung der Kandidatengene <i>ADM</i> , <i>CGI69</i> und <i>CLSTN1</i> in glialen Tumoren ...	29
2	Material und Methoden	31

2.1	Material	31
2.1.1	Tumorgewebe und Referenzgewebe	31
2.1.2	Zelllinien	32
2.1.3	Oligonukleotide	32
2.1.4	Puffer und Lösungen	34
2.1.5	Kits	35
2.1.6	Enzyme	35
2.1.7	Geräte	35
2.2	Methoden	37
2.2.1	PCR	37
2.2.2	cDNA-Synthese aus mRNA	38
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.4	Methylierungsspezifische PCR und Natriumbisulfit-Behandlung	40
2.2.5	Sequenzierung der Natriumbisulfit-behandelten DNA	41
2.2.6	Kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse (COBRA, Combined Bisulfite Restriction Analysis)	46
2.2.7	Vorarbeiten: Zelllinienbehandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin	48
2.2.8	Real-time RT-PCR (TaqMan) zum semiquantitativen Nachweis der Genexpression	49
2.2.9	Statistische Auswertung der Ergebnisse	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Ergebnisse der molekularen Analysen des Adrenomedullin (<i>ADM</i>)-Gens	54
3.1.1	Natriumbisulfit-Sequenzierung	55
3.1.2	Kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse (COBRA)	58
3.1.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung und der COBRA	59

3.1.4	<i>ADM</i> -Expressionsanalysen in Gliomzelllinien mit und ohne Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin	60
3.1.5	mRNA-Expressionsanalyse	61
3.1.6	Korrelation der Ergebnisse der Methylierungsanalyse und der mRNA-Expression	64
3.1.7	Überprüfung der prognostischen Bedeutung der <i>ADM</i> -Promotormethylierung und mRNA-Expression	65
3.2	Ergebnisse der molekularen Analysen des Solute Carrier Family 25 Member 39 (<i>CGI69</i> bzw. <i>SLC25A39</i>)-Gens	66
3.2.1	Natriumbisulfit-Sequenzierung	67
3.2.2	Kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse (COBRA)	70
3.2.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung und der COBRA	72
3.2.4	Funktionelle Bedeutung der <i>CGI69</i> -Promotormethylierung: Expressionsanalysen der Gliomzelllinien	72
3.2.5	mRNA-Expressionsanalyse	73
3.2.6	Korrelation der Ergebnisse der Methylierungsanalyse und der mRNA-Expression	75
3.2.7	Überprüfung der prognostischen Bedeutung der Promotormethylierung und mRNA-Expression	76
3.3	Ergebnisse der molekularen Analysen des Calsyntenin 1 (<i>CLSTN1</i>)-Gens	77
3.3.1	Natriumbisulfit-Sequenzierung	78
3.3.2	Kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse (COBRA)	80
3.3.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung und der COBRA	82
3.3.4	<i>CLSTN1</i> -Expressionsanalysen in Gliomzelllinien mit und ohne 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung	83
3.3.5	mRNA-Expressionsanalyse	84
3.3.6	Korrelation der Ergebnisse der Methylierungsanalyse und der mRNA-Expression	87

3.3.7	Überprüfung der prognostischen Bedeutung der <i>CLSTN1</i> - Promotormethylierung und mRNA-Expression in Gliomen.....	88
4	Diskussion.....	89
4.1	Promotormethylierung und Genrepression.....	89
4.2	Adrenomedullin (ADM)	90
4.3	Solute Carrier Family 25 Member 39 (CGI69)	94
4.4	Calsyntenin (<i>CLSTN1</i>).....	96
4.5	Schlussfolgerung.....	98
	Literaturverzeichnis	100

Danksagung

Eidesstattliche Versicherung

1 Einleitung

Oligodendrogliale Tumoren zeichnen sich im Vergleich zu astrozytären Tumoren dadurch aus, dass sie in der Mehrzahl der Fälle gut auf eine Chemotherapie mit DNA-Alkylantien ansprechen und mit einer deutlich längeren Überlebenszeit assoziiert sind. Obwohl seit Jahren bekannt ist, dass gutes Ansprechen auf Chemotherapie und günstige Prognose mit Allelverlusten (LOH, Loss of Heterozygosity) auf den Chromosomenarmen 1p und 19q korrelieren, sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bislang unbekannt. Erst kürzlich konnten mit Hilfe genomweiter DNA-Sequenzierungen zwei potentielle Tumorsuppressorgene auf 1p (*FUBP*) und 19q (*CIC*) identifiziert werden, die Mutationen in oligodendroglialen Tumoren aufweisen [1, 2]. Aus anderen Arbeiten geht hervor, dass epigenetische Veränderungen und im Besonderen eine aberrante Promotormethylierung alternative Mechanismen der Inaktivierung von Tumor-relevanten Genen darstellen. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe an oligodendroglialen Tumoren wurden mittels eines genomweiten Analyseverfahrens, welches Gene mit verändertem DNA-Methylierungsmuster identifiziert, der sogenannten *Differential Methylation Hybridisation* (DMH), mehrere interessante Kandidatengene identifiziert, die im Vergleich zu normalem Hirngewebe eine Hypermethylierung des Promotors im Tumorgewebe aufwiesen. In dieser Arbeit werden drei ausgewählte Kandidatengene, die für Adrenomedullin (*ADM*), Solute Carrier Family 25 Member 39 (*CGI69* bzw. *SLC25A39*) und Calsyntenin 1 (*CLSTN1*) kodieren, an einem erweiterten Kollektiv aus oligodendroglialen und astrozytären Tumoren hinsichtlich ihrer Promotormethylierung und mRNA-Expression analysiert und durch den Vergleich mit histologischen Befunden und klinischen Verlaufsdaten der zugehörigen Patienten auf ihre mögliche Relevanz als diagnostische bzw. prognostische Marker hin untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es somit letztlich, die molekularen Grundlagen glialer Tumoren besser zu verstehen und neue molekulare Marker zu identifizieren, die möglicherweise eine Vorhersage des individuellen Ansprechens auf eine adjuvante Therapie und/oder der Prognose erlauben.

1.1 Grundlagen der Tumorentstehung

In einer gesunden Zelle kontrollieren verschiedene molekulare Mechanismen und Signalwege Proliferation, Differenzierung und Zelltod. Die Entstehung von Tumorzellen aus normalen menschlichen Zellen stellt einen Prozess dar, der mehrere Schritte erfordert. Genetische bzw. epigenetische Veränderungen können dabei zu molekularen Veränderungen führen, die der betroffenen Zelle Wachstumsvorteile verschaffen, den normalen Kontrollmechanismen entziehen und so zur Entstehung von Krebszellen führen.

Als Grundlage für die maligne Transformation einer Zelle werden die folgenden sieben Kriterien angesehen (s. Abb. 1):

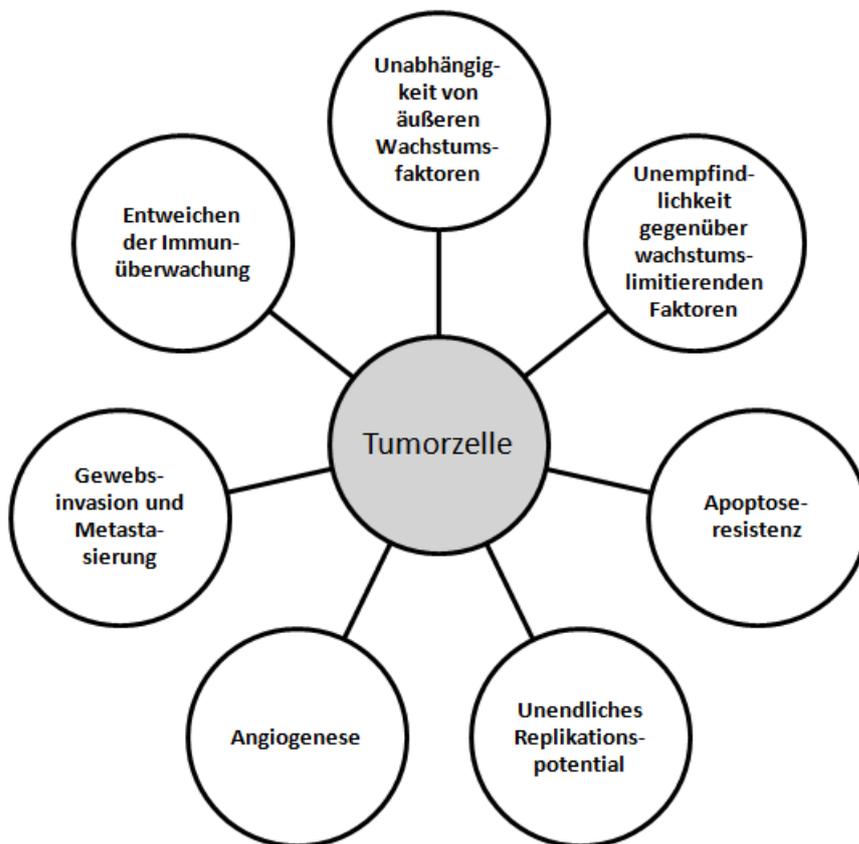


Abb. 1: Charakteristika von Tumorzellen als Grundlage für maligne Transformation (modifiziert nach Ref. [3]).

1. Zunächst muss die Zelle **unabhängig von äußeren Wachstumsfaktoren** sein, sich also mit Wachstumssignalen selbst versorgen können. Als anschauliches Beispiel lässt sich

die autokrine Stimulation durch den Plättchenwachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor, PDGF*) anführen. Wird eine Zelle durch das *Simian Sarcoma Virus (SSV)* infiziert, veranlasst dies die Zelle zur Sekretion großer Mengen an PDGF-ähnlichen Proteinen. Gleichzeitig sind an der Oberfläche derselben Zelle PDGF-Rezeptoren vorhanden, die nun stimuliert werden. So kommt es zu einer massiven Rezeptorstimulation und dadurch zu einem kontinuierlichen Überfluten der Zelle mit wachstumsstimulierenden Signalen [4]. Auch eine Rezeptor-Überexpression kann zu überschießender Proliferation führen. Dies ist zum Beispiel bei der Überexpression des HER2/neu-Rezeptors in Magen- und Brustkarzinomen der Fall [5]. Weiterhin kann es durch Veränderungen des Rezeptors selbst zu einer konstanten Stimulierung der Zelle kommen, so wie beim häufig in Glioblastomen mutierten EGF-Rezeptor, bei dem eine Deletion der extrazellulären Domäne unabhängig von der Ligandenbindung zur konstitutiven Rezeptoraktivierung und Zellproliferation führt [6].

2. Neben der Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren muss die Zelle eine **Unempfindlichkeit gegenüber wachstumslimitierenden Faktoren** aufweisen. Es gibt zum einen lösliche Wachstumsinhibitoren und solche, die an die extrazelluläre Matrix oder an die Oberflächen von umgebenden Zellen gebunden sind. Die inhibierenden Signale werden von der Zelle über Transmembranrezeptoren empfangen, die an intrazelluläre Signalwege gekoppelt sind. Über zwei unterschiedliche Mechanismen kann die Zellproliferation verhindert werden. Entweder kann die Zelle in die G₀-Phase des Zellzyklus versetzt werden, oder sie wird in einen postmitotischen Zustand versetzt, der normalerweise einer Differenzierung gleichkommt. Normale Zellen sind fähig, auf Antiproliferations Signale zu reagieren. Dieser Mechanismus basiert unter anderem auf Proteinen, die den Übergang der Zelle von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus regeln. Viele Signalwege in diesem Zusammenhang laufen über das Retinoblastom-Protein (pRb). Wenn diese Signalwege defekt sind, kommt es zu einem Verlust der wachstumshemmenden Wirkung [3]. Der zweitgenannte Mechanismus, also dass Zellen in einen postmitotischen Zustand versetzt werden, wird ebenfalls von Tumorzellen umgangen. Hier spielt z.B. das *c-Myc* Onkogen, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert, eine wichtige Rolle. Während der

normalen Zellentwicklung hat Myc eine wachstumsstimulierende Wirkung, die durch einen anderen Faktor, Max, antagonisiert werden kann. Dies geschieht durch alternative Komplexe von Max mit einer Gruppe von Mad-Transkriptionsfaktoren. Diese Mad-Max-Komplexe können nun differenzierungsinduzierende Signale hervorbringen [7]. Ist aber c-Myc überexprimiert, kann es zu einem Überwiegen der Myc-Max-Komplexe und somit zum Zellwachstum anstatt von Zelldifferenzierung kommen.

3. Außerdem muss die Zelle **dem programmierten Zelltod, d.h. der sogenannten Apoptose, entkommen**. Die Fähigkeit von Tumorzellen die Apoptose zu umgehen, wird als ein Charakteristikum der meisten, wenn nicht aller Krebsformen angesehen. Beim Mechanismus des programmierten Zelltods lassen sich grob zwei Anteile unterscheiden. Zunächst gibt es einen sensorischen Teil in Form von Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die Überlebens- und Todesfaktoren binden und zum anderen intrazelluläre Sensoren, die zum Beispiel auf DNA-Schäden oder durch Onkogene hervorgerufene Imbalancen reagieren. Zudem spielen in Geweben Zell-Zell-Kontakte eine Rolle, die, wenn sie aufgelöst werden, Apoptose zur Folge haben. Der Effektoranteil des Mechanismus wird durch den sensorischen Teil aktiviert und führt die Apoptose aus. Bestandteile sind unter anderem das Tumorsuppressorgen *p53*, das aus Mitochondrien stammende Cytochrom c und diverse Caspasen [3].
4. Weiterhin muss die Zelle ein **unendliches Replikationspotential** besitzen. Normale Zellen haben eine limitierte Generationenzahl, sie können sich also nur begrenzt teilen und vermehren. Sie geraten letztendlich in das Stadium der replikativen Seneszenz. Die replikative Seneszenz kann in Zellkulturen durch das Ausschalten der *pRb*- und *p53*-Tumorsuppressorgene umgangen werden. Nach einigen weiteren Generationen aber gelangen die Zellen in ein Stadium, das „Krise“ genannt wird. Hier kommt es zu End-zu-End-Verbindungen von Chromosomen und damit zu einer karyotypischen „Unordnung“ mit massivem Zelluntergang. Eine wichtige Rolle spielen hier die Telomere an den Chromosomenenden, die bei jeder Zellteilung kürzer

werden und so einen limitierenden Faktor für die Replikationsfähigkeit einer Zelle darstellen. Während dieses Prozesses entstehen jedoch auch immer wieder Zellen, die diesem Schicksal entkommen und unsterblich, das heißt immortalisiert werden. Ein Vorgang, wie er auch bei der Tumorprogression vorkommt [8].

5. Ein weiterer Punkt, der erfüllt sein muss, ist die durch **Angiogenese** sichergestellte nutritive Versorgung der Tumorzellen. Auch diese Fähigkeit wird während der Tumorprogression erworben. Um zu überleben, muss eine Zelle in maximal circa 100 µm Nähe zu einem Blutgefäß liegen. Die Angiogenese wird von einem Gleichgewicht aus proliferativen und antiproliferativen Signalen gesteuert. Auch hier spielen auf Endothelzellen gelegene Transmembranrezeptoren und lösliche Faktoren eine Rolle. Beispielhaft zu nennen ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der an Tyrosinkinase-Rezeptoren der Endothelzellen bindet und eine Gefäßneubildung initiiert. Ein Beispiel für Angiogenese-hemmende Faktoren ist das Thrombospondin-1, welches an CD36, ebenfalls ein Transmembranrezeptor auf Endothelzellen, bindet [3]. Das Auftreten der Fähigkeit zur Neoangiogenese während der Tumorprogression wird „angiogenic switch“ genannt [9]. Dieser wird wahrscheinlich durch eine Verschiebung des Gleichgewichts von anti- zu proangiogenetischen Faktoren induziert [3].

6. Ein weiteres Charakteristikum von Tumorzellen ist die **Fähigkeit zur Gewebsinvasion und Metastasierung**. Hier spielen Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, also z.B. Mitglieder der Immunglobulin- und calciumabhängigen Cadherin-Familien, eine wichtige Rolle. Auch zu nennen sind Integrine, die die Zellen mit der Extrazellulärmatrix verbinden. Ein gut untersuchtes Beispiel für Adhäsionsmoleküle ist das E-Cadherin. Verbinden sich zwei dieser E-Cadherin-Moleküle, so führt dies unter anderem zur Weiterleitung von Antiwachstumssignalen. Außerdem wird durch dieses „Errichten von Brücken“ zwischen den Epithelzellen die Integrität des Gewebes ermöglicht [10]. In vielen epithelialen Tumoren ist diese Funktion nicht mehr intakt [11]. In diesem Zusammenhang ist auch der Mechanismus der epithelialen-mesenchymalen

Transition zu nennen. Dieses Programm wird normalerweise von Zellen während der Embryogenese und während der Wundheilung genutzt und befähigt sie zur Invasion und Motilität [10, 12]. Das gleichzeitige Auftreten einer Verminderung von Zell-Zell-Kontakten durch die Unterdrückung der Transkription von Cadherinen und die Entwicklung von mesenchymalen Eigenschaften stellen zentrale Eigenschaften der epithelialen-mesenchymalen Transition dar. Diese ist mit Anfangsstadien der Karzinogenese, der Tumorzellinvasion und mit Tumorrezidiven assoziiert [12].

7. Schließlich muss die **Zelle der Immunüberwachung entweichen**. Eine Möglichkeit der Zelle der sog. *Immunosurveillance* zu entkommen ist, dass sie nur schwach antigen wirkt. Sie kann auch zuvor als starkes Antigen gewirkt haben und schwächer antigen wirkende Varianten hervorgebracht haben. Tumor-assoziierte Antigene (TAA) können mit der Tumorprogression supprimiert werden. Ein anderer Mechanismus besteht in der Freisetzung von Faktoren wie IL-10 und TGF- β , die Immunzellen eliminieren und die lokale Immunantwort auf den Tumor unterdrücken können. Auch können Tumorzellen regulatorische T-Zellen anlocken, die zytotoxische T-Zellen inaktivieren [13].

Alle diese Eigenschaften ermöglichen es der Krebszelle, die Verteidigungsmechanismen des Organismus gegen eine maligne Entartung zu überwinden und sich unabhängig zu vermehren.

1.1.1 Onkogene

Aus Protoonkogenen, also normalen, für das Zellwachstum erforderlichen Genen, können sogenannte zelluläre (c-)Onkogene entstehen, die tumorauslösend wirken. Daneben gibt es virale Onkogene, die von Viren in die Zellen eingeschleust werden [14]. Generell entstehen Onkogene durch genetische Veränderungen, die entweder zu einer Vermehrung des Proteinprodukts eines Gens oder zu einem Anstieg der intrinsischen Aktivität der jeweiligen Proteine führen. Veränderungen, die Gene zu Onkogenen aktivieren, lassen sich drei großen Klassen zuordnen [15]:

1. **Translokation oder Transposition von DNA innerhalb des Genoms:** Krebszellen zeigen häufig gebrochene und falsch wieder verbundene Chromosomen, wodurch Fragmente transloziert werden. Hierdurch kann ein Gen zum Beispiel hinter einem sehr aktiven Promotor zu liegen kommen und dadurch in seiner Expression erheblich verstärkt werden. Dies kann auch durch die Transposition von einem Gen oder einem Promotor innerhalb eines Chromosoms geschehen.
2. **Amplifikation eines Protoonkogens:** Die Anzahl der Kopien des Protoonkogens in der Zelle wird erhöht.
3. **Punktmutationen in einem Protoonkogen:** Die Aktivität des Proteinprodukts eines Protoonkogens kann verstärkt, oder es kann gegen Degradierung unempfindlicher werden.

Onkogene erwirken eine permanente Aktivierung der zu Zellwachstum führenden Signalwege. Dabei können sie unterschiedlichen Gruppen angehören [16]:

- **Wachstumsfaktoren** (z.B. *sis*-Onkogen, *int*-Onkogen),
- **transmembranäre Wachstumsfaktorrezeptoren** (z.B. *erbB*-Onkogen, *fms*-Onkogen),
- **membranassoziierte Tyrosinkinase** (z.B. *abl*-Onkogen),
- **membranassoziierte Guaninnukleotid-bindende Proteine** (z.B. *ras*-Onkogen),
- **zytosolische Serin-Threoninkinase** (z.B. *raf-mil*-Onkogen, *mos*-Onkogen),
- **zytosolische Hormonrezeptoren** (z.B. *erbA*-Onkogen),
- **Transkriptionsfaktoren** (z.B. *fos*-, *jun*-, *myc*-, *myb*-, *rel*-Onkogene) und
- **Apoptoseinhibitoren** (z.B. *bcl2*-Onkogen).

1.1.2 Tumorsuppressorgene

Eine ebenso wichtige Rolle in der Krebsentstehung wie die Onkogene spielen ihre „Gegenspieler“, die Tumorsuppressorgene. Diese haben eine supprimierende Wirkung auf die Zellproliferation. Die Proteinprodukte der Tumorsuppressorgene können unterschiedliche Funktionen haben. Einige sind verantwortlich für die Reparatur defekter DNA, andere kontrollieren die Adhäsion von Zellen untereinander oder an die Extrazellulärmatrix, die in normalen Geweben unabdingbar und in Krebszellen häufig gestört ist [17].

Für die Entwicklung von Malignität ist häufig der Verlust genetischer Information verantwortlich. Tumorsuppressorgene sind in Krebszellen oft inaktiv, zum Beispiel kann ein Allelverlust bestehen. Im Gegensatz zu Onkogenen haben Tumorsuppressorgene bezüglich des Zellphänotyps eine rezessive Wirkung. In Anwesenheit eines Wildtypallels ist dieses bestimmend für den Phänotyp. Deshalb ist normalerweise der Verlust beider Allele notwendig, um den Zellphänotyp zu ändern. Der Verlust der Tumorsuppressorgen-Funktion kann entweder durch eine genetische Mutation oder durch epigenetisches Gen-Silencing, z.B. über eine Promotormethylierung zustande kommen [18].

Ein gut untersuchtes Beispiel für Tumorsuppressorgene ist das Retinoblastom-Gen, *Rb*. Retinoblastome sind Tumoren des Kindesalters, die als sporadische und als familiäre Form vorkommen. Die sporadische Form entsteht meist unifokal. Die familiäre Form tritt typischerweise bilateral, beziehungsweise multifokal auf. Die Untersuchungen von *Rb* weisen auf einen zweistufigen Mechanismus in der Entstehung des Retinoblastoms hin. Nach dem „Two-Hit-Modell“ von Knudson sind zwei aufeinander folgende schädigende genetische Ereignisse notwendig, um aus einer gesunden Zelle eine Krebszelle zu machen. Bei familiären Krebsformen wird die erste Veränderung, das heißt der erste „Hit“, also ein mutiertes Allel des Tumorsuppressorgens vererbt. Erst durch den Verlust des zweiten Allels kommt es zur Retinoblastomentstehung [19].

Bei der sporadischen Form des Retinoblastoms müssen zwei somatische Mutationen erfolgen, um zu einem Krebsphänotyp zu führen. Wird ein Wildtypgen in eine Retinoblastomzelle eingeschleust, zeigt es eine tumorsupprimierende Wirkung [20].

1.1.3 Epigenetik und Tumorentstehung

Wie schon erwähnt, kann epigenetisches Gen-Silencing über eine Promotormethylierung zu einem Verlust der Expression der entsprechenden Genprodukte und damit einem Verlust ihrer tumorsupprimierenden Wirkung führen.

Der Begriff Epigenetik bezieht sich auf das Studium vererbbarer Veränderungen von Genfunktion, die nicht die Gensequenz betreffen [21]. Während die genetische Information die Basis für die Synthese aller Proteine darstellt, kommt der Epigenetik in zellulären Prozessen eher eine regulierende Rolle zu. Sie bestimmt, wie, wo und wann die genetische Information genutzt wird [22]. Die grundsätzlichen Mechanismen der Epigenetik sind DNA-Methylierung und Histon-Modifikation.

Um zu gewährleisten, dass Proteine dem Zellbedarf entsprechend synthetisiert werden, bedienen sich die Zellen der Verpackung ihrer DNA in Chromatin. Die Nukleinsäure wird zunächst um Oktamere von globulären Histonproteinen gewickelt, wodurch sogenannte Nukleosomen entstehen. Diese werden wiederum zu Chromatin angeordnet. Das Chromatin existiert in zwei unterschiedlichen Formen. Die kondensierte Form stellt den inaktiven Zustand dar, die offene Form den aktiven, in dem die Gene abgelesen werden können. Diese beiden Chromatinzustände sind dynamisch veränderlich, wodurch sie den jeweiligen Zellbedürfnissen angepasst werden können. Dies geschieht durch reversible Methylierung von DNA und Histon-Modifikation.

Bei den beteiligten Enzymen handelt es sich um

- **DNA-Methyltransferasen** (DNMTs), die für die DNA-Methylierung zuständig sind [22],
- **Histon-Deacetylasen** (HDACs), welche Acetylgruppen von Histonen entfernen (deacetylierte Histone signalisieren inaktives Chromatin),
- **Histon-Acetylasen**, welche die für eine Genaktivierung notwendigen Acetylierungen von Histonen durchführen,
- **Histon-Methyltransferasen**, die eine N-terminale Methylierung von Histonen und damit Inaktivität erwirken und

- verschiedene methylierte DNA-bindende Proteine (MBDs), wie z.B. das **Methylcytosin-Bindeprotein MeCP₂**. MeCP₂ bindet einerseits spezifisch an methylierte DNA und andererseits an verschiedene weitere Proteine, die als Komplex zur Verdichtung des Chromatins beitragen [23].

Eine Störung der genannten Mechanismen kann eine Fehlregulation der Genexpression bewirken [21]. Die DNA-Methylierung stellt den bestuntersuchten Mechanismus epigenetischer Modifikation dar.

1.1.4 DNA-Methylierung

Methylierung ist eine epigenetische Modifikation der DNA, die durch verschiedene DNA-Methyltransferasen (DNMT1, 3a und 3b) katalysiert wird. So wie die strukturellen Veränderungen wird auch das spezifische Methylierungsmuster bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Die Funktion der DNA-Methylierung ist vielfältig. Sie spielt eine Rolle bei der transkriptionellen Repression von Genen, in der Chromatinstruktur-Modulation, der X-Chromosom-Inaktivierung, beim genomischen *Imprinting* und der Unterdrückung von repetitiven und parasitären DNA-Sequenzen [22].

Das menschliche Genom enthält einen hohen Anteil an methyliertem Cytosin (5-Methylcytosin). Bei Wirbeltieren sind nur Cytosin-Reste in der Dinukleotidfolge 5'-CpG-3' methyliert. Das CpG-Dinukleotid ist im Genom unterrepräsentiert, d.h. dieses enthält nur etwa 20% der statistisch zu erwartenden CpG-Dinukleotide. Dies liegt daran, dass durch eine Deaminierung von 5-Methylcytosin Thymin, also eine Mutation entsteht [24]. Eine Ausnahme stellen kurze, 0,5-4 kb lange Regionen dar, die reich an CpG-Dinukleotiden sind und deshalb auch CpG-Inseln genannt werden. *Per definitionem* bestehen diese CpG-Inseln aus mindestens 500 bp und über 55% Cytosin und Guanin. Das Verhältnis von gemessenem CpG-Anteil zum statistisch zu erwartenden CpG-Anteil beträgt mindestens 0,65 [25]. Im menschlichen Genom existieren circa 30 000 dieser DNA-Sequenzen. Die CpG-Inseln finden sich in proximalen Promotorregionen fast der Hälfte aller Gene. Sie sind in gesunden Zellen im Allgemeinen unmethyliert [26]. Im Gegensatz dazu sind in Tumorzellen die CpG-Inseln verschiedener Tumorsuppressorgene häufig stark methyliert, was zu einer Unterdrückung

der Transkription der betroffenen Gene führt [27]. Demgegenüber kann eine Hypomethylierung genregulatorischer Sequenzen eine verstärkte Transkription nach sich ziehen. Bei genetischen Veränderungen reicht häufig eine einzelne Mutation aus, um einen bestimmten Signalweg zu unterbrechen. Im Unterschied dazu kommen verschiedene epigenetische Veränderungen, anders als genetische Mutationen, häufig gemeinsam in einem Signalweg vor [3].

Die Methylierung von DNA stellt für die Zelle einerseits einen wichtigen Mechanismus der Genregulation dar, andererseits ist sie auch eine potentielle Schwachstelle. So sind die Methylierungsmuster in Krebszellen regelmäßig verändert und man findet neben regionspezifischen Hypermethylierungen im Allgemeinen auch eine globale Hypomethylierung, die eine genomische Instabilität begünstigt [22].

Die Identifizierung von in Krebszellen hyper- oder hypomethylierten Genen könnte helfen, molekulare Mechanismen der Tumorentstehung und -progression zu verstehen [27]. Es sind bereits einige tumorrelevante Gene entdeckt worden, die in bestimmten Krebsformen durch Hypermethylierung in ihrer Transkription unterdrückt werden. Beispiele sind das DNA-Reparaturgen *MGMT* (*O*-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) [28], die Zellzyklus-Inhibitoren *CDKN2A* und *B* (*Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitoren 2A und 2B*) [29, 30] und *RASSF1* (*Ras Association Domain Family Protein 1 Gen*) [31-33].

Mehrere Arbeiten haben bereits über die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen und anderen Genen in glialen Tumoren berichtet. Hierzu gehören *CDKN2A* [34, 35], *CDKN2B*, *P14^{ARF}* [34], *RB1*, *TP73* [36], *DAPK1* [37] und *MGMT* ([28]). Die klinische Bedeutung solcher Erkenntnisse lässt sich an einer Studie von Hegi *et al.* (2005) veranschaulichen. Diese Autoren stellten fest, dass Glioblastom-Patienten, deren Tumoren eine Methylierung des *MGMT*-Promotors aufweisen, von einer zusätzlich zur Radiotherapie gegebenen Chemotherapie mit Temozolomid profitieren. Die mittlere Überlebenszeit lag bei dieser kombinierten Therapie bei 21,7 Monaten. Bei Patienten, die nur mit Radiotherapie behandelt wurden, dagegen nur bei 15,3 Monaten. Im Gegensatz dazu wurde kein signifikanter Therapieerfolg bei zusätzlicher Chemotherapie für Patienten mit Glioblastomen ohne *MGMT*-Promotormethylierung festgestellt [38].

1.2 Gliome

In dieser Arbeit wird auf oligodendrogliale, astrozytäre und oligoastrozytäre Tumoren eingegangen, die alle zu der Gruppe der Gliome gehören. Ein Auszug der WHO-Klassifikation diffuser glialer Tumoren ist in Abb. 2 dargestellt.

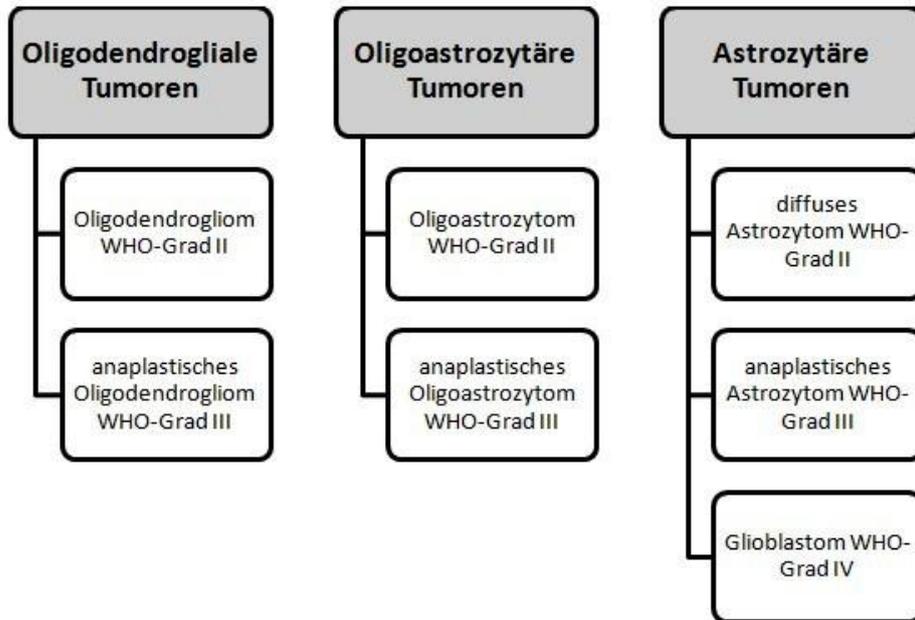


Abb. 2: WHO-Klassifikation der hier besprochenen diffusen Gliome.

1.3 Oligodendrogliale Tumoren

1.3.1 Definition

Oligodendrogliale Tumoren gehören zu den neuroepithelialen Tumoren. Beim **Oligodendrogliom WHO-Grad II** (O II) handelt es sich um ein diffus infiltrierendes, gut differenziertes Gliom. Es besteht aus neoplastischen Zellen, die eine morphologische Ähnlichkeit mit Oligodendrogliazellen besitzen. Typischerweise sind diese Tumoren in den zerebralen Hemisphären lokalisiert [39].

Beim **anaplastischen Oligodendrogliom WHO-Grad III** (AO III) handelt es sich um ein Oligodendrogliom mit fokalen oder diffusen Malignitätsmerkmalen und einer schlechteren Prognose [40].

1.3.2 Einteilung und Epidemiologie

Zu der Gruppe der Oligodendroglione gehören Tumoren mit einem kontinuierlichen Spektrum von gut differenzierten Neoplasien bis hin zu hoch malignen Tumoren. Die gut differenzierten Tumoren werden als WHO-Grad II eingestuft, anaplastische Oligodendroglione als WHO-Grad III. Außerdem unterscheidet man zwischen Oligodendroglionen und Oligoastrozytomen, die zusätzlich eine astrozytäre Komponente aufweisen [40].

O II stellen circa 2% aller primären Hirntumoren [41] und 5-6% aller Gliome dar [39]. Die Inzidenz liegt bei 0,32/100.000 Personen/Jahr [41]. Der Altersgipfel liegt bei etwa 41 Jahren [41, 42]. Bei Kindern kommen Oligodendroglione selten vor. Männer sind mit einem Geschlechterverhältnis von 1,1:1 etwas häufiger betroffen als Frauen. Die weiße Bevölkerung ist mit einem Verhältnis von 2,7:1 deutlich häufiger betroffen als die schwarze. Die 5-Jahres-Überlebensrate wird mit circa 72% beziffert, die 10-Jahres-Überlebensrate mit 56% [41].

AO III repräsentieren etwa 1% der primären Hirntumoren und 20-35% der oligodendroglialen Tumoren. Die jährliche Inzidenz liegt bei circa 0,17/100.000 Personen/Jahr. Die Prognose ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 45% und einer 10-Jahres-Überlebensrate von 34% ungünstiger als die der O II. Auch hier sind Männer mit einem Verhältnis von 1,3:1 häufiger betroffen als Frauen und Menschen mit weißer Hautfarbe doppelt so häufig wie Menschen mit schwarzer Hautfarbe. Das mittlere Alter bei der Diagnosestellung liegt bei 49 Jahren [41]. AO III können entweder *de novo* entstehen oder aus einem vorbestehenden O II [40].

Die Ätiologie des Oligodendroglioms ist unklar [39]. Als mögliche Ursache werden chemische Karzinogene in Betracht gezogen. Auch eine virale Tumorgenese, in der das JC-Virus eine Rolle spielt, wird nicht ausgeschlossen [43]. Oligodendrogliome entstehen meist in der Hirnrinde und in der weißen Substanz der zerebralen Hemisphären. Der Frontallappen ist in 50-65% der Fälle betroffen, gefolgt von Temporal-, Parietal- und Okzipitallappen [39].

1.3.3 Molekulargenetik der oligodendroglialen Tumoren

Die kennzeichnende Veränderung in oligodendroglialen Tumoren ist die gleichzeitige Deletion des kurzen Arms des Chromosom 1 und des langen Arms des Chromosom 19 (s. Abb. 3). Diese wird in 80-90% der O II gefunden [44-46]. Dabei zeigen die meisten Tumoren den Verlust einer ganzen Kopie von 1p und 19q aufgrund einer unbalancierten Translokation (t(1;19) (q10;p10)) [47]. Bei AO III kommt dieser kombinierte Allelverlust in etwa 50-70% der Fälle vor, also etwas seltener als bei O II. Die häufige Koinzidenz der Allelverluste auf den genannten Chromosomenarmen ist auffällig und wirft die Frage auf, ob ein synergistischer Effekt ursächlich ist und die Tumoren durch diesen gleichzeitigen Verlust einen selektiven Wachstumsvorteil erlangen [46]. Die genannte Veränderung findet sich häufiger bei Tumoren, die im Frontal-, Parietal- und Okzipitallappen liegen, als bei solchen im Temporallappen, in der Insula oder im Diencephalon [39].

Das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* auf 9p21 ist in bis zu einem Drittel der AO III deletiert. Dies ist besonders häufig bei AO III ohne LOH 1p/19q der Fall. Solche AO III, die eine homozygote Deletion von *CDKN2A* aufweisen, zeigen zudem häufig Verluste der

benachbarten Gene *p14^{ARF}* und *CDKN2B*, beides Tumorsuppressorgene [48]. *CDKN2A* und *CDKN2B* kodieren für Proteine, die eine direkte regulatorische Rolle in der G1/S-Phase des Zellzyklus einnehmen [49, 50]. In einer kleinen Anzahl AO III konnten Punktmutationen oder eine homozygote Deletion von *CDKN2C* auf 1p32 nachgewiesen werden [51, 52].

Die auf 1p gelegenen Gene *SHREW1*, *TP73* und *RAD54* waren in Oligodendrogliomen mit 1p-Deletion in verschiedenen Studien vermindert exprimiert. Diese reduzierte Expression war teilweise mit einer Promotorhypermethylierung assoziiert, jedoch nie mit Mutationen [53, 54]. Kandidatengene auf 19q, von denen bisher berichtet wurde, sind *p19ORhoGA*, das *myelin-related epithelial membrane protein gene 3*, *ZNF342* und *PEG3* [39]. Erst kürzlich wurden mit *FUBP1* und *CIC* zwei neue interessante Tumorsuppressorkandidaten identifiziert, wobei insbesondere *CIC* besonders häufig in oligodendroglialen Tumoren mutiert vorliegt [1, 2].

Weitere genetische Veränderungen in O II sind Gewinne auf Chromosom 7 und Verluste auf den Chromosomen 4, 6, 11p, 14 und 2 [45]. Verluste auf den Chromosomen 9 und 10 kommen häufiger in anaplastischen Varianten vor [55]. Verluste von 17p und *TP53*-Mutationen, die in astrozytären Tumoren häufig sind, kommen bei Oligodendrogliomen selten vor und wenn, dann nahezu ausschließlich in Tumoren ohne 1p/19q-Deletionen [45]. Veränderungen, die gehäuft in AO III gefunden wurden, sind Zugewinne auf den Chromosomen 7 und 15q und Verluste auf den Chromosomen 4q, 6, 9p, 10q, 11, 13q, 18 und 22q. Eine Deletion von 10q kommt hier in etwa 10% der Fälle vor [40].

Trost *et al.* führten die Methode der komparativen genomischen Hybridisierung an 70 Tumoren durch, darunter 40 Oligodendrogliome und 30 Oligoastrozytome. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die häufigsten Aberrationen Verluste von 19q (64%), 1p (59%), 9p (26%), 4q (21%), 10q (19%), 18q (17%) und Zugewinne von 7q (24%), 19p (19%) und 7p (17%) sind. In ihrer Studie bestätigten sie auch, dass ein kombinierter 1p/19q-Verlust mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert ist. Außerdem zeigten sie, dass Zugewinne auf den Chromosomen 7, 8q, 19q und 20 und Verluste auf den Chromosomen 9p, 10, 18q und Xp mit kürzerem Überleben korrelieren [56].

Weniger als 10% der AO III zeigen eine Amplifikation der Protoonkogene *EGFR*, *PDGFRA*, *MYC*, *CDK4*, *MDM2* oder *MDM4* [40]. Die durchschnittliche Anzahl an chromosomalen und

genetischen Aberrationen steigt mit dem WHO-Grad. AO III zeigen also mehr Veränderungen als O II. Es ist folglich anzunehmen, dass es bei einer malignen Progression zu einer Akkumulation von verschiedenen genetischen Veränderungen kommt [46].

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Mutationen im *Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1)*-Gen und seltener im *IDH2*-Gen in der Mehrheit der diffusen Astrozytome, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome der WHO-Grade II und III sowie der sekundären Glioblastome (WHO-Grad IV) zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Tumorentstehung nachweisbar sind und somit eine entscheidende Bedeutung für die Initiierung der Tumorentstehung haben dürften [57, 58] (s. Abb. 3). Isocitratdehydrogenasen (IDH) sind Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP⁺; IDH1 und IDH2)- oder Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD⁺, IDH3)-abhängig und katalysieren die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat (ICT) in α -Ketoglutarat (α -KG), wobei von den fünf bekannten *Isocitratdehydrogenase (IDH)*-Genen lediglich die NADPH-abhängigen *IDH1* (lokalisiert im Zytoplasma, Peroxisomen und endoplasmatischen Retikulum) und *IDH2* (Lokalisation in den Mitochondrien) eine Bedeutung für die Tumorgenese der Gliome haben. Die drei NAD-abhängigen Isocitratdehydrogenasen sind ausschließlich in Mitochondrien lokalisiert und Bestandteil des Krebs-Zyklus [59].

In einem Genom-weiten Sequenzierungsansatz von Glioblastomen konnten Parson *et al.* [60] zeigen, dass *IDH1* häufig in sekundären Glioblastomen (WHO-Grad IV) mutiert ist. Nachfolgende Studien konnten dies bestätigen und zusätzlich zeigen, dass *IDH1*-Mutationen in primären Glioblastomen (WHO-Grad IV) mit bis zu 5-10% selten auftreten, dagegen in sekundären Glioblastomen (WHO-Grad IV) ein sehr häufiges Ereignis darstellen [57, 58]. Klinisch sind sowohl bei Glioblastomen, als auch bei anaplastischen Astrozytomen Mutationen im *IDH1*-Gen signifikant mit einer deutlich günstigeren Prognose assoziiert [57, 61]. Multivariate Analysen haben ergeben, dass *IDH1*-Mutationen den zur Zeit stärksten unabhängigen günstigen prognostischen Faktor darstellen [61-63].

1.3.4 Epigenetische Veränderungen in oligodendroglialen Tumoren

Neben den genannten genetischen Veränderungen sind bereits mehrere Gene bekannt, deren Expression in Oligodendrogliomen in unterschiedlichem Maße durch aberrante Promotormethylierung, also durch epigenetische Mechanismen, reprimiert wird. Dazu gehören u.a. *CDKN2A*, *CDKN2B*, *RB1*, *p14^{ARF}*, *TP73*, *DAPK1*, *ESR1*, *THBS* und *TIMP3* [39]. Besonders bei Tumoren mit 1p/19q-Verlust ist die Expression von *MGMT* auf 10q26 durch Promotorhypermethylierung vermindert [28]. Außerdem ist die Expression von *CITED4* auf 1p34.2 in der großen Mehrheit der Oligodendrogliome mit LOH1p/19q epigenetisch durch Promotormethylierung reprimiert. Diese Veränderung scheint einen positiven prognostischen Wert zu haben [64]. Zudem ist *EMP3* auf 19q13.3 in oligodendroglialen und astrozytären Tumoren häufig hypermethyliert und zeigt entsprechend veränderte Expressionsmuster [65]. Auch das auf 19q13 gelegene *ZNF342*, ein Zinkfingergen, ist in seiner Expression spezifisch in O II vermindert und kann in Zelllinien durch die Behandlung mit einem demethylierenden Agens wieder hochreguliert werden [66].

Ein großer Teil der Oligodendrogliome zeigt eine gleichzeitige Hypermethylierung von multiplen Genen. Deshalb scheint ein genereller Defekt in der Regulierung der DNA-Methylierung zugrundezuliegen [39], der zu einer als *CpG island methylator phenotype* beschriebenen Veränderung führt [67] und mechanistisch in aktuellen Arbeiten auf Mutationen der *IDH1* oder *IDH2* Gene zurückgeführt werden konnte, die zu einer Akkumulation eines Neometaboliten, 2-Hydroxyglutarat, in den Gliomzellen führen, welches eine Vielzahl von α -Ketoglutarat-abhängigen Enzymen inhibiert, darunter Histondemethylasen und Tet-Hydroxylasen, was letztlich zu einer globalen Hypermethylierung von Histonen und DNA führt [68, 69].

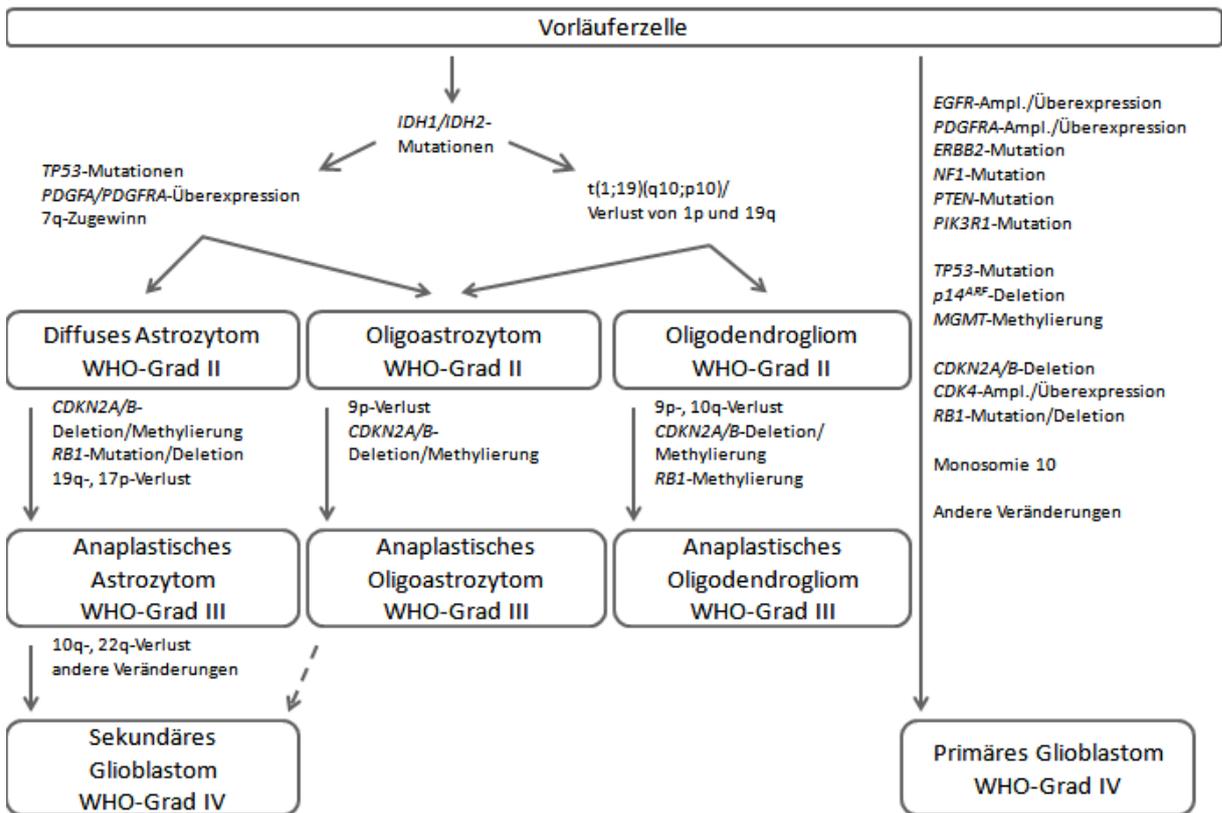


Abb. 3: Ausgewählte (epi-)genetische Veränderungen während der Entstehung von Gliomen. Modifiziert nach Ref. [70].

1.4 Astrozytäre Tumoren

1.4.1 Definition

Wie auch die oligodendroglialen Tumoren gehören die astrozytären Tumoren zu den neuroepithelialen Neoplasien [71]. Es handelt sich um Gliome, deren Tumorzellen morphologische Ähnlichkeiten zu astrozytären Zellen aufweisen. Sie werden in pilozytische Astrozytome WHO-Grad I, subependymale Riesenzellastrozytome WHO-Grad I, pleomorphe Xanthoastrozytome WHO-Grad II, diffuse Astrozytome WHO-Grad II, anaplastische Astrozytome WHO-Grad III und Glioblastome WHO-Grad IV eingeteilt [72]. In dieser Arbeit wird auf das diffuse Astrozytom WHO-Grad II, das anaplastische Astrozytom WHO-Grad III sowie primäre und sekundäre Glioblastome WHO-Grad IV eingegangen.

Das **diffuse Astrozytom WHO-Grad II (A II)** ist ein langsam wachsender Tumor, der relativ hoch differenzierte Tumorzellen enthält und vorwiegend bei jungen Erwachsenen vorkommt. Häufig ist es supratentoriell, vor allem im Frontal- und Temporallappen lokalisiert. Es kommt jedoch auch im Hirnstamm und Rückenmark vor. Es besteht eine Tendenz zur Progression zum anaplastischen Astrozytom WHO-Grad III und letztlich zum sekundären Glioblastom WHO-Grad IV [73].

Das **anaplastische Astrozytom WHO-Grad III (AA III)** ist ein diffus infiltrierender, bösartiger Tumor des Erwachsenenalters. Es liegt meist in den Großhirnhemisphären und zeigt Zeichen von Malignität. Es kann aus einem A II oder *de novo* entstehen [71, 74]. Die Vorzugslokalisationen entsprechen denen des A II [74].

Das **Glioblastom WHO-Grad IV (GB IV)** ist ein astrozytärer Tumor des Erwachsenenalters mit hoher Malignität und äußerst schlechter Prognose. Die meisten Glioblastome entstehen *de novo* in den Großhirnhemisphären [71, 75]. Sie werden auch als **primäre Glioblastome WHO-Grad IV (pGB IV)** bezeichnet. **Sekundäre Glioblastome WHO-Grad IV (sGB IV)** entstehen durch Progression aus vorbestehenden A II oder AA III. Sie repräsentieren weniger als 10% der Glioblastome [75]. Die Diagnose eines sGB IV setzt einen klinischen bzw. bildgebenden oder histologischen Beweis der Entwicklung aus einem weniger malignen Gliom voraus [76].

1.4.2 Einteilung und Epidemiologie der Astrozytome

Das **A II** stellt 10-15% der astrozytären Tumoren dar. Hierunter werden das fibrilläre, das gemistozytische und das protoplasmatische Astrozytom zusammengefasst. Die Inzidenz liegt bei etwa 0,54/100.000 Personen/Jahr [41]. Nach der WHO-Klassifikation liegt der Altersgipfel bei 30-40 Jahren [73]. Das CBTRUS gibt ein medianes Alter bei der Diagnosestellung von 47 Jahren an. Das Verhältnis von Männern zu Frauen liegt bei 1,18:1. Die 5-Jahres-Überlebensrate wird mit 38%, die 10-Jahres-Überlebensrate mit 31% angegeben [41].

Das **AA III** stellt 3,2% aller Hirntumoren dar. Die Inzidenz liegt bei 0,47/100.000 Personen/Jahr [41]. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung liegt bei 45 Jahren [74]. Das mediane Alter wird von CBTRUS mit 51 Jahren angegeben. Das Verhältnis von erkrankten Männern zu Frauen liegt bei 1,47:1. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 29%, die 10-Jahres-Überlebensrate bei 22% [41].

Das **GB IV** ist mit 20,3% der häufigste primäre Hirntumor [41] und stellt 60-75% der astrozytären Tumoren dar [75]. Die Inzidenz wird mit 3,05/100.000 Personen/Jahr angegeben [41]. Diese Angabe umfasst allerdings nur pGB IV, da nur Primär Diagnosen in die Inzidenzrate eingerechnet werden. Das GB IV kann in jedem Lebensalter auftreten, der Altersgipfel liegt zwischen 45 und 75 Jahren [75]. Das CBTRUS gibt das mediane Erkrankungsalter mit 64 Jahren an [41], eine Studie im Kanton Zürich in der Schweiz kam zu einem mittleren Alter von 61 Jahren bei Diagnosestellung [77]. sGB IV treten signifikant früher auf (mittleres Erkrankungsalter 45 Jahre) als pGB IV [75]. Männer erkranken mit einem Verhältnis von 1,62:1 häufiger als Frauen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt für das GB IV bei nur 3%, die 10-Jahres-Überlebensrate bei 2% [41]. Patienten mit sGB IV überleben im Schnitt etwas länger als Patienten mit pGB IV [75].

1.4.3 Molekulargenetik der astrozytären Tumoren

Astrozytome treten weit überwiegend sporadisch auf. Sehr selten sind dagegen Astrozytome im Rahmen von vererbten Tumorsyndromen, wie z.B. dem Li-Fraumeni-Syndrom, einem autosomal dominant vererbten Tumorprädispositions-Syndrom, das durch Mutationen im

TP53-Gen auf 17p13.1 verursacht wird, oder der erblichen multiplen Enchondromatose Typ 1 [73].

Das *TP53*-Gen auf Chromosom 17p kodiert für den Tumorsuppressor p53. p53 spielt eine wichtige Rolle in einer großen Anzahl von zellulären Prozessen wie dem Zellzyklusarrest, Reaktion auf DNA-Schädigung, Apoptose, Angiogenese und Differenzierung [78]. Die Mutation von *TP53* wird auch als „genetischer Fingerabdruck der Astrozytome“ bezeichnet (s. Abb. 3). Sie kommt am häufigsten in gemistozytären Astrozytomen (A II) vor (88%). Fibrilläre Astrozytome (A II) zeigen Mutationen in 53% bzw. 63%, OA II in 44% und O II in 13% der Fälle [44, 79]. Unter den *TP53*-Mutationen sind bei Astrozytomen G:C→A:T-Transitionen, vorwiegend an CpG-Dinukleotiden, am häufigsten. Der bestuntersuchte Mechanismus der Entstehung dieser Veränderung ist die Deaminierung von 5-Methylcytosin an CpG-Sites, wodurch es zu einem Ersatz von 5-Methylcytosin durch Thymin kommt [42]. In niedriggradigen Astrozytomen fällt eine Korrelation von vorliegender *TP53*-Mutation und Promotormethylierung des *MGMT*-Gens auf [80].

Noch häufiger als *TP53*-Mutationen sind in A II, AA III und sGB IV allerdings Mutationen im *IDH1* oder (seltener) *IDH2* Gen, die in ca. 60 – 70 % dieser Tumoren zu detektieren sind und vermutlich die früheste Veränderung in der Tumorentstehung darstellen [57, 58] (s. Abb. 3).

Eine weitere Veränderung, die in astrozytären Tumoren vorkommt, betrifft den Wachstumsfaktor PDGF (*Platelet-derived growth factor*). In normalen Zellen reguliert PDGF verschiedene Prozesse, darunter Zellproliferation, -differenzierung und -migration. In Astrozytomen sind PDGF und seine Rezeptoren häufig überexprimiert. In Studien mit astrozytären Zelllinien wurde gezeigt, dass die Zellen *PDGFR-α* exprimieren und abhängig vom WHO-Grad mit Zellteilung auf PDGF reagieren [81].

Die häufigsten genomischen Imbalancen in **A II** sind Gewinne der Chromosomenarme 7q und 8q [82, 83]. Polysomie von 7q stellt einen negativen prognostischen Faktor dar [84]. Außerdem sind Allelverluste auf dem langen Arm von Chromosom 22 (LOH22q, 17% der Astrozytome) und Deletionen von Chromosom 6 (14%) zu nennen. Die häufigsten Veränderungen bezüglich der Chromosomenanzahl sind Zugewinne von 7q, 5p, 9 und 19p und Verluste von 19q und Xp [73].

In **AA III** kommt neben einer *TP53*-Mutation häufig ein Heterozygotieverlust an 17p (50-60%) vor. Weiterhin bestehen häufig Allelverluste auf 10q (35-60%) und seltener *PTEN*-Mutationen (18-23%). In AA III kommen Allelverluste auf 22q in 20-30% der Fälle vor. Ein Allelverlust auf 19q kommt im Vergleich zu niedriggradigen Astrozytomen in der anaplastischen Variante häufiger vor (46%). In etwa einem Drittel der AA III besteht ein Allelverlust auf 6q [74]. Mutationen in Genen, die Bestandteile des RB1-Signalwegs darstellen (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *RB1*, und *CDK4*) korrelieren mit einer schlechten Prognose von Patienten mit AA III [85].

GB IV zeigen die höchste Rate an genomischen Veränderungen unter den Gliomen. Primäre und sekundäre Glioblastome sollten als unterschiedliche Entitäten betrachtet werden, da sie über Störungen unterschiedlicher genetischer Signalwege entstehen. Ihnen gemeinsam ist eine hohe Rate an Allelverlusten auf 10q [86].

Die häufigste Genamplifikation in pGB IV ist die des *EGFR* (*epidermal growth factor receptor gene*) Gens auf Chromosom 7. Die amplifizierten *EGFR*-Gene kommen meist als extrachromosomale *double-minute Elemente* vor [75]. *Double-minutes* sind extrachromosomale Chromatinkörper, die keine Zentromere besitzen und folglich bei der Zellteilung ungleich aufgeteilt werden [87]. Diese Veränderung kommt häufiger in pGB IV als in sGB IV vor (40% versus 8%) [75, 88, 89]. Die *EGFR*-Amplifikation ist mit einer *EGFR*-Überexpression auf mRNA- und Proteinebene assoziiert. Viana-Pereira *et al.* ermittelten jeweils eine Amplifikation und Überexpression in 48% bzw. 53% der GB IV, fanden allerdings keinen Zusammenhang zwischen *EGFR*-Veränderungen und der Überlebenszeit der Patienten [90].

Auffällig ist, dass die *EGFR*-Amplifikation nicht bei Patienten unter 35 Jahren beobachtet wird. Sie ist häufig mit strukturellen Veränderungen und trunkierten Proteinvarianten vergesellschaftet. Die häufigste Variante ist EGFRvIII, welches in etwa 50% der Glioblastome mit *EGFR*-Amplifikation vorkommt. Diese Variante ist Liganden-unabhängig konstitutiv aktiviert und führt zu Zellproliferation über PI3-Kinase-, RAS- und Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalwege. Punktmutationen von *EGFR* sind selten (3-5%) [75].

In 30-40% der Fälle und fast ausschließlich in pGB IV ist das *PTEN*-Gen mutiert. *PTEN* ist Teil des **PI3K/PTEN/AKT-Signalwegs**, der über eine Bindung von Wachstumsfaktoren an EGFR und andere Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert wird.

Der **p53/MDM2/p14^{ARF}-Signalweg** ist ebenfalls in GB IV verändert. Der p53-Signalweg spielt insbesondere eine wichtige Rolle in der Entstehung von sGB IV. *TP53*-Mutationen gehören nach *IDH1-/IDH2*-Mutationen zu den ersten detektierbaren genetischen Veränderungen in zwei Dritteln der niedriggradigen diffusen Vorläufer-Astrozytome. In gesunden Zellen wird infolge DNA-Schädigung p53 aktiviert. Der Verlust einer normalen p53-Funktion kann aus einer veränderten Expression von *p53*, *MDM2* oder *p14^{ARF}* entstehen [76]. *TP53*-Mutationen sind in niedriggradigen Gliomen und sGB IV häufiger anzutreffen als in pGB IV. G:C→A:T-Mutationen von *TP53* kommen häufiger in sGB IV vor (56%) als in pGB IV (30%) [42]. Die Amplifikation von *MDM2* (*murine double minute 2*) kommt in ca. 10% der GB IV vor und ausschließlich in pGB IV ohne *TP53*-Mutation [76]. Das Genprodukt *MDM2* bindet an p53 und inaktiviert dieses [75]. Der Verlust von *p14^{ARF}*-Expression wird in GB IV in 76% der Fälle gesehen. Dieser Verlust korreliert typischerweise mit einer homozygoten Deletion oder einer Promotormethylierung von *p14^{ARF}*. Eine Promotormethylierung kommt zwar in sGB IV häufiger vor als in pGB IV, jedoch wird bezüglich der Gesamtanzahl von Veränderungen, also homozygoter Deletion und Promotormethylierung, kein Unterschied in den Untergruppen gesehen [80].

Der **p16^{INK4a}/RB1-Signalweg** scheint sowohl in der Entstehung von pGB IV als auch in sGB IV eine Rolle zu spielen. Das Retinoblastom-Protein (RB1) kontrolliert den Übergang von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus. RB1 wird vom CDK4/cyclin-Komplex phosphoryliert, wodurch der Transkriptionsfaktor *E2F-Gene* aktiviert, die die G₁-S-Transition vermitteln. p16^{INK4a} bindet an CDK4, hemmt den CDK4/Cyclin-Komplex und inhibiert so die G₁-S-Transition. Der Verlust einer normalen RB1-Funktion kann also durch veränderte Expression von *RB1*, *p16^{INK4a}*, oder *CDK4* zustande kommen [76].

Homozygote Deletionen von *p16^{INK4a}* kommen häufiger in pGB IV als in sGB IV vor, jedoch gibt es keinen Unterschied bezüglich der Gesamtanzahl an Veränderungen, homozygote Deletionen und Promotormethylierung zusammengenommen [80]. Eine Promotormethylierung von *RB1* kommt in sGB IV häufiger vor als in der primären Variante

(43% versus 14%). Dabei besteht in 85% der Fälle mit *RB1*-Expressionsverlust eine Hypermethylierung des Promotors, während 93% der Tumoren mit *RB1*-Expression einen normalen *RB1*-Genstatus aufweisen [92]. Es besteht also eine deutliche Korrelation von Methylierung und Expression von *RB1*. Die *RB1*-Methylierung wird nicht in A II und AA III gesehen, hinweisend auf ein spätes Ereignis in der Progression [76].

Zudem kommen in GB IV regelmäßig Mutationen des *NF1*-Gens (14%), des *ERBB2*-Gens (8%) und des *PIK3R1*-Gens (10%) vor [93].

Neben den genannten Signalwegen kommen in GB IV verschiedene **Heterozygotieverluste** vor. Der sowohl in primären als auch in sekundären GB IV am häufigsten vorkommende Allelverlust ist der von Allelen auf 10q (60-80%) [94-96]. Allelverluste auf 10p kommen dagegen fast ausschließlich in pGB IV vor [96], d.h. ein kompletter Verlust von Chromosom 10 ist typisch für die primäre Variante. Allelverluste auf 22q kommen signifikant häufiger bei sGB IV (82%) als bei pGB IV (41%) vor [97]. Allelverluste auf 19q sind häufiger in sGB IV (54%), dagegen selten in pGB IV (6%). Allelverluste auf 1p kommen in den beiden Varianten ähnlich häufig vor (pGB IV 12%, sGB IV 15%). Deletionen auf 13q fanden sich in 12% der pGB IV und in 38% der sGB IV [98].

Auf die Bedeutung von *IDH1* bzw. *IDH2* wurde bereits weiter oben eingegangen. Wichtig ist hier nochmals festzuhalten, dass Mutationen dieser Gene hauptsächlich in sGB IV sowie in pGB IV von jüngeren Patienten vorkommen, insgesamt aber nur in etwa 5-8% aller pGB IV nachweisbar sind [57, 58].

1.4.4 Epigenetische Veränderungen in astrozytären Tumoren

Gonzales-Gomez *et al.* fanden in niedriggradigen Astrozytomen eine Hypermethylierung von *MGMT*, *THBS1*, *TIMP-3* und *p16^{INK4A}* in jeweils mindestens 45% der Fälle, dagegen ermittelten sie für *GSTP1*, *DAOK* und *p14^{ARF}* Methylierungsraten von weniger als 10% [99]. Eine Promotormethylierung von *p14^{ARF}* fand sich in 26% der **A II** und war mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten assoziiert [79].

Eine *MGMT*-Promotormethylierung wurde in 48% der **A II** gesehen. Diese Veränderung ist weiterhin assoziiert mit *TP53*-Mutationen, d.h. 92% der niedriggradigen Astrozytome mit *MGMT*-Methylierung zeigen gleichzeitig eine *TP53*-Mutation, während nur 39% der Fälle ohne *MGMT*-Methylierung diese Mutation aufwiesen [100]. Außerdem gibt es häufiger G:C→A:T-Transitionsmutationen an *CpG-Sites* in niedriggradigen Astrozytomen mit *MGMT*-Mutation (58%) als in solchen, die diese Veränderung nicht aufweisen (11%) [100].

In **GB IV** ist der Promotor von *MGMT* in etwa 40% der pGB IV und etwa 60-70% der sGB IV methyliert [70]. Die Methylierung korreliert mit einem längeren Überleben von Patienten unter Temozolomid-Therapie. Außerdem gehäuft vorkommende Promotormethylierungen in GB IV betreffen *p14^{ARF}*, *RB1* und *TIMP-3*. Sie kommen häufiger in der sekundären als in der primären Variante vor [75].

1.5 Oligoastrozytäre Tumoren

1.5.1 Definition des Oligoastrozytoms

Beim **Oligoastrozytom WHO-Grad II** (OA II) handelt es sich um ein diffus infiltrierendes Gliom, das aus einer Mischung von neoplastischen Zellen besteht, die den Tumorzellen von O II und A II ähneln [101]. Das **anaplastische Oligoastrozytom WHO-Grad III** (AOA III) ist durch Malignitätszeichen wie erhöhte Zellularität, nukleäre Atypie, zellulärer Pleomorphismus und erhöhte mitotische Aktivität gekennzeichnet [101].

1.5.2 Einteilung und Epidemiologie

OA II kommen mit einer Inzidenz von 0,1/100.000 Personen/Jahr vor [42]. Vornehmlich sind Erwachsene mittleren Alters betroffen, der Altersgipfel liegt bei 35-45 Jahren [101]. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 40 Jahren. Die mittlere Überlebenszeit liegt bei 85 Monaten, die 5-Jahresüberlebensrate bei 70% und die 10-Jahres-Überlebensrate bei 49% [42]. Männer sind mit einer Geschlechterverteilung von 1,3-1,7:1 häufiger betroffen als Frauen [101]. Die Inzidenz der **AOA III** liegt bei 0,08/100.000 Personen/Jahr. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 46 Jahren [42]. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (1,15:1) [102]. Beide Tumorformen sind überwiegend in den Großhirnhemisphären lokalisiert, am häufigsten im Frontallappen, gefolgt vom Temporallappen. Die Ätiologie der oligoastrozytären Tumoren ist unklar, eventuell spielt das JC-Virus eine Rolle [43, 103].

1.5.3 Molekulargenetik der oligoastrozytären Tumoren

Die Veränderungen in **OA II** ähneln denen in oligodendroglialen und astrozytären Tumoren. Auch hier besteht häufig, in 30-50% der Fälle, ein kombinierter Allelverlust von 1p und 19q [101, 104], der für oligodendrogliale Tumoren typisch ist. Etwa 30% der Oligoastrozytome zeigen ein mutiertes *TP53*-Gen, welches typischerweise in astrozytären Tumoren

vorgefunden wird (s. Abb. 3). So traten in einer Studie von Ohgaki *et al.* *TP53*-Mutationen in gemistozytären A II in 88%, in fibrillären A II in 53% und in OA II in 44% der Fälle auf, jedoch nur in 13% der O II. Kombinierte Allelverluste von 1p/19q werden typischerweise in Tumoren ohne *TP53*-Mutationen und besonders häufig in O II gefunden (69%), gefolgt von OA II (45%). Sie sind selten in Astrozytomen (fibrilläre A II: 7%, gemistozytäre A II: 0%) [42]. Qu *et al.* zeigten, dass in der großen Mehrzahl der Fälle (9/11) die oligodendrogliale und die astrozytäre Komponente eines Tumors den gleichen Genotyp besaßen. In wenigen Tumoren (2/11) zeigten die Komponenten unterschiedliche Muster. Ein Tumor zeigte in seiner oligodendroglialen Komponente einen kombinierten Allelverlust von 1p und 19q und in der astrozytären Komponente eine *TP53*-Mutation. In einem anderen Tumor fanden die Autoren einen LOH1p/19q-Verluste im oligodendroglialen Anteil, jedoch auch Tumoranteile ohne 1p-Verluste. Die Funde in den beiden letztgenannten Tumoren könnten auf eine Entstehung von einzelnen oligoastrozytären Tumoren aus unterschiedlichen Zellklonen hindeuten [105]. Allerdings haben die meisten Oligoastrozytome entweder *TP53*-Mutationen oder kombinierte 1p/19q-Allelverluste in beiden histologischen Komponenten. Diese Tatsache spricht eher für die Tumorentstehung aus einer einzigen Vorläuferzelle [101]. Oligoastrozytome zeigen wie Oligodendrogliome und diffuse Astrozytome in bis zu 80% der Fälle *IDH1*- oder *IDH2*-Mutationen [57, 58].

AOA III zeigen die Veränderungen, die auch die WHO-Grad-II-Tumoren besitzen: *IDH1/2*-Mutationen und LOH 1p/19q oder *TP53*-Mutationen. Außerdem sind in AOA III viele Veränderungen zu finden, die auch bei oligodendroglialen und astrozytären Tumoren eine Progression anzeigen. Dazu gehören Allelverluste auf 9p, homozygote Deletionen von *CDKN2A*, sowie Allelverluste auf den Chromosomen 10 und 11p [101].

1.6 Klinik und Therapie der Gliome

Zwei Drittel der Gliom-Patienten werden durch Krampfanfälle auffällig. Außerdem kommen häufig Kopfschmerzen und andere Zeichen erhöhten Hirndrucks vor. Auch kommt es zu fokalen neurologischen Ausfällen und kognitiven sowie mentalen Veränderungen [106-108].

Oligodendrogliale Tumoren, insbesondere AO III und AOA III, sprechen häufig gut auf Strahlen- und Chemotherapie an [109]. Die mikroskopische morphologische Diagnostik steht am Anfang der Erstellung eines Therapiekonzeptes. Bei Gliomen ist der operative Eingriff meist zugleich eine diagnostische und therapeutische Maßnahme. In niedriggradigen Gliomen (WHO-Grad II) ist die Bedeutung der *MGMT*-Promotormethylierung nicht hinreichend belegt und z.T. widersprüchlich mit teilweise günstiger [110] aber auch ungünstiger Prognose [111]. Die Standardtherapie für niedriggradige Gliome wird kontrovers diskutiert. Während einige Autoren die frühzeitige Resektion befürworten, empfehlen andere, wenn möglich, zunächst eine engmaschige Verlaufskontrolle. Grundsätzlich ist in jedem Fall aber eine bioptische Diagnosesicherung notwendig. Als ergänzende Therapieoptionen zur Operation stehen sowohl Chemotherapie als auch Bestrahlung zur Verfügung, wobei es bislang keine sicheren Daten dafür gibt, dass eine frühzeitige Therapie das Gesamtüberleben begünstigt [112]. In anaplastischen oligodendroglialen Tumoren ist die *MGMT*-Promotormethylierung prognostisch, unabhängig von der Art der Behandlung, d.h. Radiotherapie, Chemotherapie oder deren Kombination [113]. In der NOA-4 Studie fand sich eine Assoziation von längerem progressionsfreien Intervall und *MGMT*-Promotormethylierung in anaplastischen Gliomen, wobei dieser Effekt auch in der Patientengruppe nachweisbar war, die nur mit Strahlentherapie behandelt wurde [61]. Anaplastische astrozytäre Gliome des WHO-Grad III werden nach Möglichkeit immer postoperativ bestrahlt oder mit Chemotherapie behandelt [61]. Beim Glioblastom (WHO-Grad IV) besteht der Therapiestandard aus Operation, Bestrahlung und konkomitanter sowie adjuvanter Chemotherapie mit Temozolamid [108].

Für die Prognose wichtige Faktoren sind der Allgemeinzustand des Patienten, der mithilfe des Karnofsky-Index (sogenannter Aktivitäts-Index zur Beurteilung der Aktivität des Patienten unter Einbeziehung körperlicher und sozialer Faktoren [114] bestimmt wird) und das Patientenalter [108]. Bezüglich der Molekulargenetik gibt es derzeit drei Biomarker, die als aussagekräftige prognostische Marker in Gliomen anzusehen sind. Zum einen

kombinierte Allelverluste auf 1p und 19q insbesondere in oligodendroglialen Tumoren, die *MGMT*-Promotorhypermethylierung in Glioblastomen und anaplastischen Gliomen, sowie Mutationen des *IDH1*- und *IDH2*-Gens in diffusen Gliomen. Die *IDH1*-Mutationen wurden kürzlich als wichtigster prognostischer Marker in diffusen Gliomen identifiziert [61, 62].

1.7 Untersuchung der Kandidatengene *ADM*, *CGI69* und *CLSTN1* in glialen Tumoren

Im Rahmen der zu Beginn erwähnten Vorarbeiten wurde für die genomweite Analyse von Tumorgeweben auf *de novo*-Methylierungen eine Mikroarray-basierte Methode (*differential methylation hybridisation*, DMH) mit 7680 CpG-reichen Fragmenten eingesetzt. Dafür standen jeweils zehn AO III mit bzw. ohne kombinierten Allelverlust von 1p und 19q zur Verfügung. Die genomische DNA wurde dabei zunächst durch ein häufig schneidendes Restriktionsenzym (*MseI*) verdaut und zwei Adaptoren ligiert. Dann wurde sie mit zwei methylierungssensitiven Restriktionsenzymen (*BstUI*, *HpaII*) geschnitten. Die Restriktionsfragmente wurden über Adaptersequenzen amplifiziert, mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und zusammen mit ebenso aufbereiteter Normalgewebe-DNA auf Mikroarrays mit CpG-reichen Sequenzen hybridisiert. Die Mikroarrays wurden schließlich über einen Mikroarray-Scanner eingelesen. *De novo* methylierte oder demethylierte Sequenzen konnten über ihr Hybridisierungssignal erkannt werden. Mittels Natriumbisulfit-Sequenzierung als unabhängige Methode wurden die identifizierten Kandidatengene validiert. Von den 7680 CpG-reichen Fragmenten zeigten 448 Klone in mindestens einem Tumor Hinweise auf eine *de novo*-Methylierung. Es waren keine quantitativen Unterschiede zwischen Tumoren mit bzw. ohne LOH1p/19q festzustellen. 285 Klone wurden sequenziert und identifiziert, darunter 161 Gene und mRNAs. Von diesen wurden 30 Kandidatengene ausgewählt, die entweder in mindestens 40% der Tumoren einer Gruppe (mit/ohne LOH1p/19q) ein rotes, d.h. ein auf Hypermethylierung hinweisendes Signal aufwiesen, funktionell interessant erschienen oder in interessanten chromosomalen Regionen lagen. Diese 30 Kandidatengene wurden anschließend stichprobenartig mittels Natriumbisulfit-Sequenzierung auf ihre Promotormethylierung hin verifiziert. Dafür wurde von jeweils drei Tumoren mit rotem Signal in der DMH und von Kontrollgewebe ein Fragment der

Promotorregion amplifiziert, kloniert und anschließend sequenziert. Eine Hypermethylierung fand sich ausschließlich in Tumorgeweben, nicht aber im Kontrollgewebe.

Basierend auf diesen Vorarbeiten wurden die Kandidatengene *ADM* (11p15.4), *CGI69* (17q21.31) und *CLSTN1* (1p36.22) ausgewählt, die in den DMH-Experimenten in Tumoren mit LOH1p/19q eine Methylierung in der jeweiligen Promotorregion aufwiesen. Diese Gene wurden in der vorliegenden Arbeit an einem erweiterten Kollektiv aus oligodendroglialen und astrozytären Tumoren hinsichtlich Promotormethylierung und mRNA-Expression analysiert und durch den Vergleich mit klinischen Verlaufsdaten auf ihre mögliche Relevanz als diagnostische bzw. prognostische Marker hin untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tumorgewebe und Referenzgewebe

In die Tumorserie aufgenommen wurden gliale Tumoren von Patienten, die im Zeitraum von 1990 bis 2004 in der Neurochirurgischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf behandelt wurden. Alle untersuchten Tumorproben wiesen einen histologisch bestimmten Tumorzellanteil von mindestens 80% auf. Die operativ entfernten Tumorproben wurden unmittelbar nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Die Extraktion der Nukleinsäuren wurde bereits in Vorarbeiten durchgeführt. Die Tumoren wurden am Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität gemäß der WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems beurteilt und klassifiziert [72]. Für die experimentellen Untersuchungen der Tumorproben lag ein Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät (Studennummer 2696) vor.

Es standen insgesamt Tumorproben von 90 Patienten zur Verfügung (16 O II, acht OA II, 21 AO III, acht AOA III, acht A II, neun AA III, neun sGB IV und elf pGB IV). Von 77 Patienten lagen klinische Verlaufsdaten vor. Bei den entsprechenden Tumoren handelte es sich um neun O II, zwei OA II, acht A II, 23 AO III, zehn AOA III, acht AA III, sieben sGB IV und zehn pGB IV. Das mittlere Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag bei 51 Jahren (Spannweite: 25 - 91 Jahre). Das Geschlechterverhältnis war fast ausgeglichen ($m : w = 1,05$).

Als Referenzgewebe dienten nicht tumorös veränderte Hirngewebeproben. Für die Expressionsanalysen standen folgende kommerziell erhältliche Normalgehirnproben zur Verfügung: Hirn (gesamt), Rinde, Frontallappen, Parietallappen, Temporallappen, Okzipitallappen und Corpus callosum (Biochain, Hayward, CA, USA) und zwei weitere kommerziell erhältlich Normalhirngewebs-RNA-Proben (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA, und Stratagene, La Jolla, CA, USA). Zusätzlich stand eine Probe von einem Patienten zur Verfügung, der im Rahmen einer Temporallappenresektion bei chronischer Epilepsie

chirurgisch behandelt worden war. Als Referenzgewebe bei den Methylierungsanalysen wurden sechs Gehirngewebeprobe von Patienten verwendet, die ebenfalls durch Temporallappenresektion bei chronischer Epilepsie chirurgisch behandelt worden waren.

2.1.2 Zelllinien

Die Expressions- und Methylierungsanalysen wurden an den folgenden fünf Glioblastomzelllinien durchgeführt: A178, LN428, U87MG, U373MG und A172. Diese Zelllinien wurden von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) erworben.

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Sequenzen, die über die UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) erhältlich waren, abgeleitet (Tab. 1). Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bzw. Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland, synthetisiert. Die Stammlösungen hatten eine Konzentration von 100 pmol/μl. Die *Primerstocks* wurden in 5 mM Tris-HCl, pH 7,0 gelöst. Für die Reaktionen wurden diese Stammlösungen im Verhältnis 1:10 mit *Aqua dest.* verdünnt, so dass die Endkonzentration bei 10 pmol/μl lag.

Gen	Primername	Primersequenz (5'→3')	Methode	Amplikon- größe/bp
ADM	ADM_taq_F1	AGTCGTGGGAAGAGGGAACT	RT-PCR	196
	ADM_taq_R1	CCCTGGAAGTTGTTTCATGCT	RT-PCR	
	ADM_bs/not_F6	GCGGCCGCGTTTTTGGGGGATTAGTGAGTT	NBS	248
	ADM_bs_R6.2	TAAAATCCTTATCCAAAACCCATAC	NBS	
	ADM_bs_fw	TTTGAGGTTATAGTTTTTTAGGTTT	COBRA	435
	ADM_bs_rv	TAAATAACCAACTCTAATTCCTATA	COBRA	
CGI69	CGI69_taq_F1	GACTCCACCTGGCTGCTG	RT-PCR	161
	CGI69_taq_R2	CTGGTTCAGCCTCTGGAAGA	RT-PCR	
	CGI69_bs/Not_F1D	GCGGCCGCGAGAGTTTTGAGATTTAGAAGAA ATT	NBS	303
	CGI69_bs_R1D	ATTACAAAACAAACCTACAATA	NBS	
	CGI69_BS_F2	TGTAGTTGTAGGTTTGTGTTTGTAAAT	COBRA	287
	CGI69_BS_R2	ACCTTAACAACRCATTTTCACCAA	COBRA	
CLSTN1	CLSTN1_taq_F	GGAGCTAGAAACCAGCCACA	RT-PCR	195
	CLSTN1_taq_R	GCCGTTGAACTCAAACACCT	RT-PCR	
	CLSTN1_bs/not_F4 D	GCGGCCGCGAAGTGATAAGGGTRTTTTGGGT	NBS	200
	CLSTN1_bs_R1D	AAACTATATCCCTTTCCCTAA	NBS	
	CLSTN1_BS_fw	AGTGAATTTAGGATAGATTTT	COBRA	395
	CLSTN1_BS_rv	AAACTATATCCCTTTCCCTAA	COBRA	
ARF1	ARF1 F	GACCACGATCCTCTACAAGC	RT-PCR	111
	ARF1 R3	TCCCACAGTGAAGCTGATG	RT-PCR	

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide (RT-PCR = Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, NBS = Natriumbisulfit-Sequenzierung, COBRA = Combined Bisulfite Restriction Analysis).

2.1.4 Puffer und Lösungen

Die in den eigenen Untersuchungen eingesetzten Puffer und Lösungen sind in Tab. 2 zusammengefasst.

1 x TEE-Puffer	10 mM Tris HCL 1mM EDTA, pH 8,0 ad 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
10 x TAE-Puffer	400 nM Tris-Base 200 mM NaOAc 10 mM EDTA, pH 8,0
10 x TBE-Puffer	900 mM Tris-Base 900 mM Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0
6 x Ladepuffer	0,25% Bromphenol-Blau 0,25% Xylencyanol FF 30% Glycerol in 1 x TE
Formamid-Ladepuffer	9 ml Formamid 20 µl 5 N NaOH, pH 8,0 200 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 1ml Farbstofflösung (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol)
ABI-Ladepuffer	4 ml Formamid 1 ml 0,5 M EDTA pH 8.0 250 mg Blue Dextran
Ethidiumbromid-Lösung	0,5 µg/ml
DNA-Leiter 100 bp	PeqLab, Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen.

2.1.5 Kits

Tab. 3 gibt einen Überblick über die in den eigenen Untersuchungen eingesetzten molekularbiologischen Kits.

	Hersteller
EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	Zymo Research Corp., Orange, CA, USA
Jetquick PCR-Product Purification Spin Kit	Genomed Molekularbiologische und Diagnostische Produkte GmbH, Löhne, Deutschland
SYBR® Green PCR Master Mix	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Tabelle 3: Verwendete Kits.

2.1.6 Enzyme

Tab. 4 fasst die in den eigenen Untersuchungen eingesetzten Enzyme zusammen.

	Hersteller
Qiagen Hot Star Taq	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Bsh12361 (#FD0924)	Fermentas, Burlington, Kanada
Taqal (#FD0674)	Fermentas, Burlington, Kanada

Tabelle 4: Verwendete Enzyme.

2.1.7 Geräte

Eine Übersicht über die wichtigsten in den eigenen Untersuchungen benutzten Laborgeräte findet sich in der nachfolgenden Tab. 5.

	Modell	Hersteller
Real-time PCR-Thermocycler	GeneAmp 5700 SDS	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
PCR-Thermocycler	Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge	Rotofix 32	Hettich Laborapparate, Bäch, Schweiz
Tischzentrifuge	5417	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge	EBA 12R	Hettich Laborapparate, Bäch, Schweiz
Geldokumentationssystem	GelDoc1000 System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Gelkammern für Agarosegele	Sub-Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Sequenzierer	Cycle Sequencer ABI377	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Spektrophotometer	NanoDrop™1000	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 5: Verwendete Geräte.

2.2 Methoden

2.2.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR) ermöglicht es, ein gewünschtes Fragment von Nukleinsäuren *in vitro* zu vermehren. Hierfür benötigt es ein Startstück, den sogenannten Primer. Das ist eine kurze Sequenz, die zum vorliegenden Strang komplementär ist. Von hier ausgehend synthetisiert die Polymerase dann einen Komplementärstrang.

Der Prozess besteht aus drei Schritten:

1. Die doppelsträngige DNA, die amplifiziert werden soll, wird zusammen mit der Taq Polymerase, Mg^{2+} , den vier Deoxyribonukleotid-Triphosphat-Monomeren (dNTPs) und zwei Primern (jeweils ca. 20 Basen) auf 95°C erhitzt. Die Primer sind jeweils komplementär zu einem Endstück des Zielsegments. Bei einer Temperatur von 95°C zerfällt die DNA in zwei Einzelstränge.
2. Jetzt wird die Temperatur auf die Anlagerungs-Temperatur gesenkt. Die Primer können sich nun an die zu ihnen komplementären Sequenzen an den Enden des Zielsegments anlagern. Die Temperatur liegt für die in dieser Arbeit verwendeten Primer bei 56-60 °C, wobei diese Temperatur etwa 5°C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen sollte.
3. Die Temperatur wird auf 72°C angehoben. In diesem Schritt katalysiert das Enzym vom Primer ausgehend den Aufbau des neuen Strangs. Nach Beendigung der Replikation beider Stränge liegen jeweils zwei identische Stränge vor.

Der Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Synthese kann nun wiederholt werden [115].

Die PCRs wurden in einem Thermocycler der Firma Biometra nach folgenden Protokollen durchgeführt:

Reaktionsgemisch

Matrizen-Nukleinsäure	20-100 ng
10 x PCR-Puffer (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl
2 mM dNTP-Gemisch	2,5 µl
forward Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
reverse Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Taq DNA Polymerase (5 u/µl)	0,2 µl
<i>Aqua dest.</i>	ad 25 µl

Reaktionsschritte

95°C	15 min	Initiale Aktivierung der <i>HotStar Taq</i>
95°C	30 s	Denaturierung
56-60 °C	30 s	Anlagerung
72°C	30 s	Elongation
Wiederholung der letzten drei Schritte für insgesamt 35-45 Zyklen		
72°C	5 min	Auffüllen der Doppelstränge
4°C	∞	Kühlung bis zur Entnahme

2.2.2 cDNA-Synthese aus mRNA

Komplementäre DNA (cDNA, complementary DNA) enthält nur solche DNA-Moleküle, deren Sequenz komplementär zu den in der jeweiligen Zelle vorhandenen mRNA-Molekülen ist. Sie entspricht also den in der Zelle exprimierten RNAs. Das Ausgangsmaterial für die Herstellung von cDNA ist die Gesamt-RNA der Zelle.

Mit dem Enzym *reverse Transkriptase* ist es möglich, RNA in DNA umzuschreiben [15]. Das Enzym benötigt für die DNA-Synthese einen Startpunkt, den Primer. Als Primer werden

Oligonukleotide von sechs Basen Länge verwendet. Ihre Sequenz ist zufällig. Die Primer binden an komplementäre Sequenzen der RNA.

Für die cDNA-Synthese wurden 3 µg Gesamt-RNA in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser auf 30,4 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde für fünf Minuten bei 70°C denaturiert und dann auf Eis gekühlt. Außerdem wurde ein Reaktionsgemisch nach folgendem Protokoll angesetzt:

Reaktionsgemisch	
0,1 M DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	0,4 µl
RNAsin (40.000 U/ml, Promega, Madison, WI, USA)	1,0 µl
BSA (2,9 mg/ml)	1,7 µl
dNTP-Gemisch (25 µM je dNTP)	2,5 µl
pd(N)6 (1,5 µg/µl, Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland)	3,0 µl
5 x H-RT-Puffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	10,0 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	1,0 µl
Gesamtvolumen	19,6 µl

Das Gesamtvolumen von 19,6 µl wurde nun zu den 30,4 µl RNA-Lösung gegeben, vermischt und bei 42°C für 50 Minuten inkubiert. Dann wurde die Temperatur für zehn Minuten auf 70°C hochgefahren, um die *reverse Transkriptase* zu inaktivieren. Hiermit war die cDNA-Synthese abgeschlossen. Um das Ergebnis zu überprüfen wurde nun ein Fragment der cDNA des *γ-Actin F*-Gens amplifiziert. Das Reaktionsprodukt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und die Banden qualitativ und quantitativ überprüft.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde angewendet, um PCR-Produkte, DNA und RNA aufzutrennen und sichtbar zu machen. Es wurden Gele mit Agarose-Konzentrationen von 1,5-3% verwendet.

Je nach gewünschter Konzentration wurde eine entsprechende Menge Agarose in einem passenden TAE-Puffer-Volumen aufgeköcht. Danach wurden je 100 ml TAE-Agarose-Gemisch 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) zugegeben. Dann wurde das Gemisch in einen Gelträger gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Es wurde abgewartet bis das Gel vollständig polymerisiert war. Das feste Gel konnte nun in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Laufkammer eingesetzt werden. Die Proben wurden dann mit einem entsprechenden Volumen 6 x-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 180 V aufgetrennt. Bei jedem Lauf wurde eine 100-Basenpaar-Leiter mitgeführt, anhand derer die Fragmentlängen der Proben abgelesen werden konnten. Wenn der Blaumarker (Bromphenolblau) des Ladepuffers etwa die Mitte des Gels erreicht hatte, wurde der Lauf gestoppt und das Gel der Kammer entnommen. Es wurde unter UV-Licht im GelDoc 1000-System betrachtet und digital dokumentiert.

2.2.4 Methylierungsspezifische PCR und Natriumbisulfit-Behandlung

Die Methode der Natriumbisulfit-Behandlung von DNA hat zum Ziel, methylierte von unmethylierten Cytosin-Basen zu unterscheiden. Durch diese Behandlung der DNA wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, während 5-Methyl-Cytosin unverändert bleibt (s. Abb. 4). Die in Uracil umgewandelten Basen werden bei einer späteren PCR-Amplifikation und Sequenzierung als Thymin registriert. Das methylierte Cytosin wird weiterhin als Cytosin gelesen.

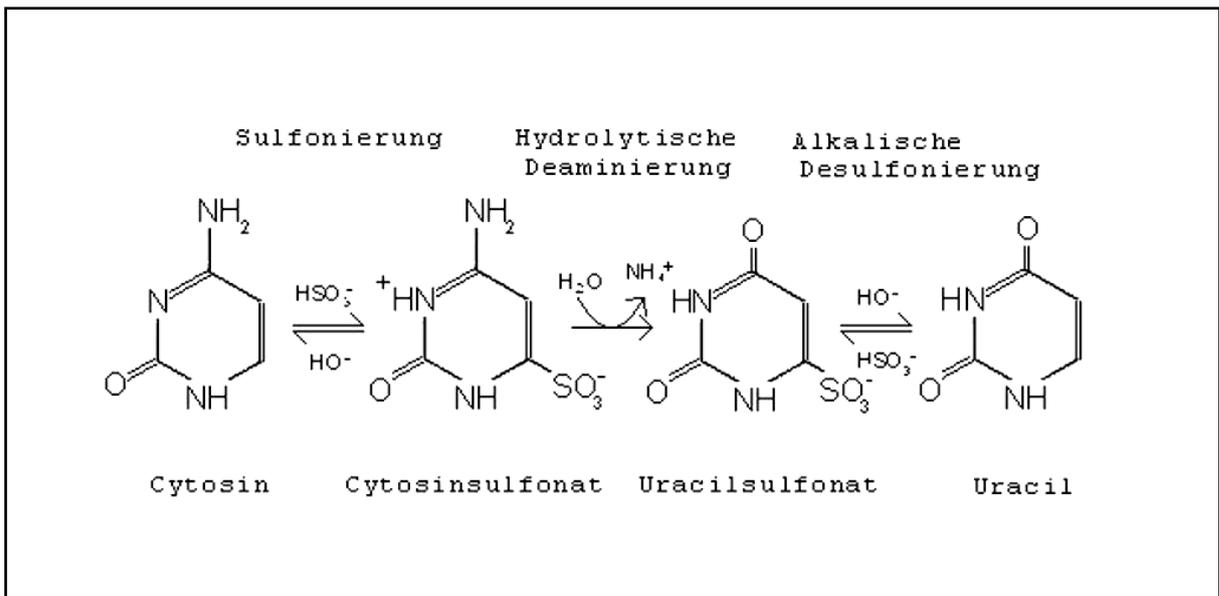


Abb. 4: Strukturformel von nicht methyliertem Cytosin und die Umwandlung in Uracil bei der Natriumbisulfit-Behandlung.

Ein Cytosin-Molekül kann über sein C₅-Atom Addukte bilden, zum Beispiel mit einem Bisulfit-Ion. Diese relativ langsame Reaktion mit Natriumbisulfit wird bei saurem pH-Wert (pH 5,0) katalysiert und ist einzelstrangspezifisch. In wässriger Lösung wird das Cytosin-Bisulfit-Addukt unter Abspaltung der NH₂-Gruppe zum Uracil-SO₃-Derivat desaminiert und durch eine abschließende Alkali-Behandlung zu Uracil desulfoniert. Für die Natriumbisulfit-Behandlung wurde das *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* gemäß den Angaben des Herstellers verwendet (Zymo Research, Orange, CA, USA).

2.2.5 Sequenzierung der Natriumbisulfit-behandelten DNA

Zur Untersuchung des Methylierungsmusters aller CpG-Dinukleotide in einer bestimmten Gen- bzw. Promotorregion steht die direkte Sequenzierung Natriumbisulfit-behandelter DNA zur Verfügung.

Hierfür wurde die zu untersuchende Sequenz nach der Natriumbisulfit-Behandlung zunächst durch eine PCR amplifiziert. Dafür wurden in Abhängigkeit von der untersuchten Gensequenz die folgenden Protokolle verwendet:

ADM / CGI69

10 x PCR-Puffer	2,5 µl
2 mM dNTP	2,5 µl
forward Primer Zielgen	1,5 µl
reverse Primer Zielgen	1,5 µl
Taq Polymerase	0,125 µl
Aqua dest.	15,875 µl

CLSTN1

10 x PCR- Puffer	2,5 µl
2 mM dNTP	2,5 µl
forward Primer Zielgen	1,5 µl
reverse Primer Zielgen	1,5 µl
Taq Polymerase	0,125 µl
Aqua dest.	10,875 µl
5 x Faktor Q	5 µl

**Thermocycler
Einstellungen**

95°C	15 min	Initiale Aktivierung der Polymerase
95°C	30 s	Denaturierung
56°C	30 s	Anlagerung
72°C	30 s	Elongation
Wiederholung der drei letzten Schritte für insgesamt 45 Zyklen		
72°C	5 min	Auffüllen der Doppelstränge
4°C	∞	Kühlung bis zur Entnahme

Daraufhin wurden die jeweiligen PCR-Produkte mithilfe des *Jetquick PCR-Product Purification Spin Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (Genomed, Löhne, Deutschland).

Ein Aliquot jedes aufgereinigten PCR-Produktes wurde nach der *Dye-Terminator*-Methode der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) sequenziert. Diese folgt dem Prinzip der Kettenabbruch-Reaktion nach Sanger [116]. Diese Sequenzierreaktion basiert auf einer statistisch verteilten Unterbrechung der Synthese des Komplementärstranges. Zusätzlich zu den normalen Deoxynukleotiden (dNTPs) sind dem verwendeten Nukleotidgemisch Dideoxynukleotide (ddNTPs) zugesetzt. Diese besitzen keine 3'-OH-Gruppe. Wird ein markiertes Nukleotid in den entstehenden Strang eingebaut, so führt dies zum Abbruch der Synthesereaktion [117]. Bei der *Dye-Terminator*-Methode sind die genannten ddNTPs fluoreszenzmarkiert. Die vier verschiedenen Farbmoleküle emittieren nach Anregung durch einen Argonlaser Licht verschiedener Wellenlängen. Bei dieser PCR wird im Gegensatz zur herkömmlichen Reaktion nur ein einzelnes Oligonukleotid und kein Oligonukleotidpaar eingesetzt. Folglich verläuft die Synthese nur in eine Richtung.

Markierungsreaktion

BigDye Termination V.1.1 Cycle Sequencing Kit Mix	2 μ l
Oligonukleotid (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
PCR-Produkt	2-7,5 μ l
<i>Aqua dest.</i>	ad 10 μ l

**Thermocycler
Einstellungen**

96°C	10 s	Denaturierung
50°C	5 s	Anlagerung
60°C	4 min	Elongation
Wiederholung der drei Schritte für insgesamt 25 Zyklen.		
4°C	∞	Kühlung bis zur Entnahme

Das Reaktionsprodukt wurde zusammen mit 25 µl 100%-igem Ethanol und 1 µl mit Dextranblau angefärbtem 3 M Natrium-Acetat pH 4,6 in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben und vermischt. Die Mischung wurde bei 4°C mit 14000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal mit 200 µl 70%-igem Ethanol gewaschen.

Das Pellet wurde für 15 Minuten in einem Heizblock bei 42°C getrocknet und dann in 4 µl ABI-Ladepuffer aufgenommen. Dann wurde das Sequenziergel hergestellt:

Herstellung des Sequenziergels

Urea	21 g
PAA 29 : 1, 3,3%	8,4 ml
10 x TBE	6 ml
<i>Aqua dest.</i>	20 ml
APS 10%	350 µl
TEMED	30 µl

Der Harnstoff wurde in den restlichen Bestandteilen gelöst. Dann wurden 350 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat) und 30 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) zum Polymerisieren zugegeben. Das Gel wurde zwischen zwei gereinigten Glasplatten gegossen.

Nach der vollständigen Auspolymerisierung wurden jeweils 2 µl der Proben auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer Laufzeit von acht Stunden bei 2500 Volt, 48 Watt und 51°C Geltemperatur in einem semiautomatischen Sequenziergerät (ABI377, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ausgewertet wurden die Ergebnisse mittels der *ABI Sequencing Software*.

Das Methylierungsmuster wurde in den Gliomen der Tumorserie und Normalgehirnproben durch die Sequenzierung von Natriumbisulfit-behandelter DNA untersucht. Die Methylierung der CpG-Dinukleotide wurde wie folgt analysiert. Die DNA wurde mit Hilfe des *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* (Zymo Research Corp., Orange, CA, USA) mit Natriumbisulfit-behandelt. Dann wurde ein bestimmtes Fragment durch eine PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer und die Fragmentlokalisationen sind in Tab. 1 ersichtlich. Daraufhin wurde das PCR-Produkt mit dem *Jetquick PCR-Product Purification Spin Kit* (Genomed, Löhne, Deutschland) aufgereinigt. Letztlich wurde das Produkt direkt durch die *Dye Terminator*-Methode sequenziert. Der Methylierungsstatus wurde wie in Abb. 5 dargestellt klassifiziert.

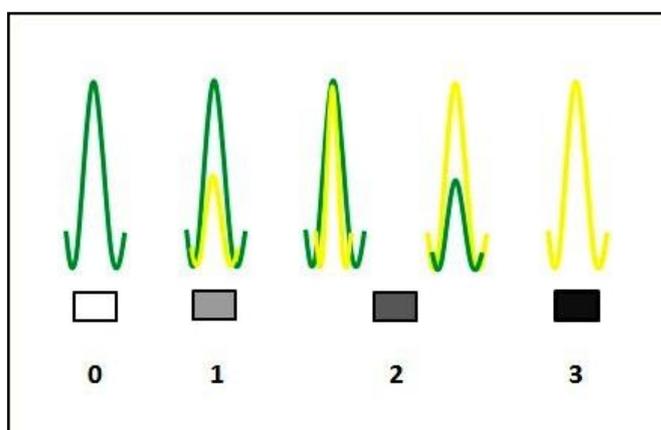


Abb. 5: Bewertung des Methylierungsstatus anhand der Sequenzierungsergebnisse der Natriumbisulfit-behandelten DNA. 0 = nur T-peak (bzw. C-peak kleiner 10% des T-peaks); 1 = C-peak bis zu 50% des T-peaks; 2 = C-peak und T-peak gleich groß bzw. C-peak doppelt so groß wie der T-peak; 3 = nur C-peak bzw. T-peak kleiner 10% des C-peaks. Der T-peak ist grün, der C-peak gelb dargestellt.

Die Tumoren wurden zwei Gruppen zugeordnet. Eine Gruppe umfasste solche ohne Methylierung. Hierzu gehörten die Tumoren mit einem Methylierungswert von 1, 2 oder 3 in weniger als 50% der untersuchten CpG-Dinukleotide. Die zweite Gruppe umfasste Tumoren mit einem Methylierungswert von 1, 2 oder 3 in mehr als 50% der CpG-Dinukleotide.

2.2.6 Kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse (COBRA, Combined Bisulfite Restriction Analysis)

Die kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse ist eine quantitative Technik, mit der DNA-Methylierung an ausgesuchten Genloci in kleinen Mengen genomischer DNA untersucht werden kann. Bei dieser Methode wird ein Restriktionsenzym-Verdau genutzt, um methylierungsabhängige Sequenzunterschiede in Natriumbisulfit-behandelter DNA zu analysieren.

Zunächst wird die DNA mit Natrium-Bisulfit-behandelt (s. 2.2.4). Dann wird sie mittels PCR amplifiziert. Das Ergebnis dieser beiden Schritte ist, dass unmethylierte Cytosinreste als Thymin und methylierte Cytosinreste als Cytosin gelesen werden. Die Primer, die in der PCR genutzt werden, beinhalten keine CpG-Dinukleotide, sodass die Amplifizierung der Proben unabhängig vom jeweiligen Methylierungsstatus abläuft [118].

Die Erkennungsstellen der hier verwendeten Restriktionsenzyme *Bsh1236I* und *TaqI* bleiben nach der Bisulfit-Modifikation nur erhalten, wenn sie methyliert waren. An unmethylierten Erkennungsstellen werden die PCR-Produkte nicht geschnitten. Mit dieser Technik ist eine schnelle Analyse des Methylierungs-Zustands eines Gens in einer großen Anzahl von Proben möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden die PCR-Produkte von *ADM*, *CLSTN1* und *CGI69* mit dem Restriktionsenzym *Bsh1236I* (Erkennungsstelle CG[^]CG) und *CGI69* zusätzlich mit dem Restriktionsenzym *TaqI* (Erkennungsstelle T[^]CGA) verdaut und anschließend auf ein 2,5%-iges Agarosegel geladen. Das Amplikon von *ADM* ist 435 bp lang und besitzt vier *Bsh1236I*-Erkennungsstellen. Bei vollständiger Methylierung entstehen nach dem Verdau fünf Fragmente mit 42, 14, 252, 18 und 105 bp Länge. Die Fragmentgröße 18 bp und 105 bp sind näherungsweise durch das CG-Repeat CGCGCG und die daraus resultierenden unterschiedlichen Schnittmöglichkeiten bedingt (s. Abb. 10). Das Amplikon von *CGI69* ist 287 bp lang und besitzt jeweils zwei *Bsh1236I*- und *TaqI*-Erkennungsstellen. Bei vollständiger

Methylierung entstehen nach dem Verdau jeweils drei Fragmente mit 69, 176 und 38 bp bzw. 140, 44 und 104 bp Länge. Die Fragmentgrößen 176 und 38 bp für *Bsh1236I* sind näherungsweise durch das CG-Repeat CGCGCG und die daraus resultierenden unterschiedlichen Schnittmöglichkeiten bedingt (s. Abb. 19). Das Amplikon von *CLSTN1* ist 395 bp lang und besitzt fünf *Bsh1236I*- und zwei *TaqI*-Erkennungsstellen. Bei vollständiger Methylierung entstehen nach dem Verdau für *Bsh1236I* sechs Fragmente mit 66, 24, 94, 153, 10 und 46 bp Länge. Die Fragmentgrößen 153 und 10 bp sind näherungsweise durch das CG-Repeat CGCGCG und die daraus resultierenden unterschiedlichen Schnittmöglichkeiten bedingt. Für *TaqI* resultieren drei Fragmente mit 164, 29 und 202 bp Länge (s. Abb. 26). Unmethylierte Erkennungsstellen werden durch die Bisulfit-Modifikation von den Enzymen nicht erkannt. So entstehen abhängig vom Methylierungsstatus unterschiedliche Fraktionen von PCR-Fragmenten, welche die Relation an DNA-Methylierung an dieser Stelle in der zugrundeliegenden genomischen DNA widerspiegeln.

Verdaureaktion

PCR-Produkt	5 µl
Puffer (Fast Digest®)	2 µl
<i>Aqua dest.</i>	12 µl
Enzym	1 µl
Inkubation für 5 min. bei 37°C (<i>Bsh1236I</i>), bzw. 65°C (<i>TaqI</i>)	

2.2.7 Vorarbeiten: Zelllinienbehandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Die Substanz 5-Aza-2'-Deoxycytidin hat eine demethylierende Wirkung. Sie wird während der Replikation in die DNA integriert. Sie stellt ein Cytidin-Analogon dar. Die Carbongruppe an Position fünf des Pyrimidinrings ist hier durch eine Nitrogruppe ersetzt (s. Abb. 6).

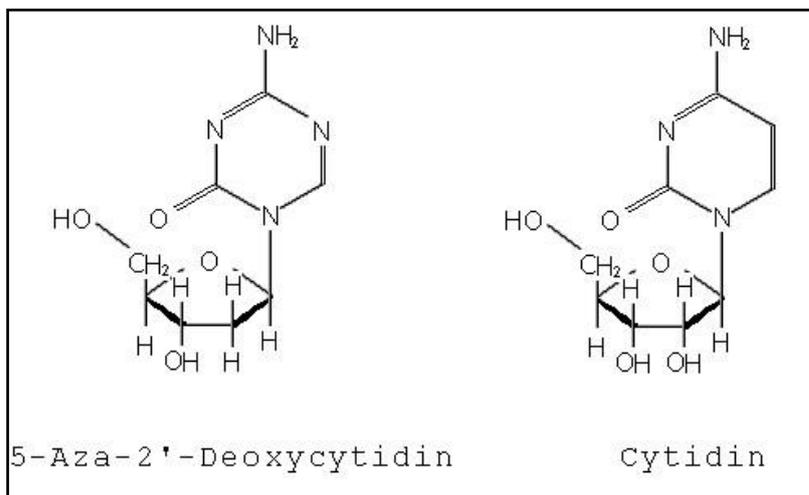


Abb. 6: Strukturformeln des Cytidin-Analogons 5-Aza-2'-Deoxycytidin und von Cytidin.

Eingebaut in die DNA kommt es zu einer kovalenten Bindung mit dem Enzym *DNA-Cytosin-C₅-Methyltransferase 1 (DNMT1)*. DNMT1 methyliert den neu synthetisierten DNA-Strang nach seiner Replikation. So wird sichergestellt, dass das Methylierungsmuster auf die Tochterstränge übernommen wird. Durch die Bindung von 5-Aza-2'-Deoxycytidin an DNMT1 wird dieses nicht-kompetitiv gehemmt, so dass der neu synthetisierte Strang unmethyliert bleibt. Nach zwei Replikationszyklen erhält man vollständig demethylierte DNA. Durch eine Demethylierung kann die Expression von Genen, die durch Methylierung inhibiert ist, gesteigert werden [119].

5-Aza-2'-Deoxycytidin hat außerdem eine toxische Wirkung. Unter anderem führt es zur Dekondensation von Chromatin, zur Veränderung der DNA-Replikationszeit und zu Chromosomenbrüchen. Hinzu kommen mutagene Effekte von 5-Azacytosin-DNMT1-Addukten. Es standen die mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten Zelllinien A178, U87MG, LN428, A172 und U373MG zur Verfügung. Die Zelllinien wurden unter Standardbedingungen

gezüchtet (1), sowie unter vier unterschiedlichen Bedingungen mit 0,5 μM (2), 1,0 μM (3), 2,5 μM (4) oder 5,0 μM (5) 5-Aza-2'-Deoxycytidin. Die DNA der Zelllinien für die hier durchgeführten Experimente wurde von Herrn PD Dr. A. Waha (Institut für Neuropathologie, Bonn) zur Verfügung gestellt. Es wurden Expressionsanalysen mittels Real-time RT-PCR sowohl für die behandelten als auch die nichtbehandelten Zelllinien durchgeführt.

2.2.8 Real-time RT-PCR (TaqMan) zum semiquantitativen Nachweis der Genexpression

Ziel der Real-time Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (Real-time RT-PCR) war es, die relative Expression von mRNA zu analysieren. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, bei der nur das Endprodukt bestimmt wird, wird bei der Real-time RT-PCR das entstehende Produkt kontinuierlich nach jedem Zyklus gemessen. Eine quantitative Bestimmung der Produktmenge ist hierbei nur in der exponentiellen Phase der Reaktion möglich, da hier die Produkt-Zunahme mit der in der Reaktion eingesetzten Matrizenmenge direkt korreliert [120].

Bei dieser Methode wird jeweils ein Oligonukleotidpaar verwendet. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR[®] Green* dem Reaktionsmix zugesetzt. Dieser Farbstoff steigert seine Fluoreszenz durch Interkalieren in die doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenzstärke, die nach jedem abgelaufenen Zyklus detektiert wird, korreliert mit der Menge der produzierten Doppelstränge.

Jede Gewebeprobe wurde in einem doppelten Ansatz analysiert. Als Referenzgen diente *ARF-1* (*ADP-Ribosylierungsfaktor-1*, NCBI GenBank-Zugangsnummer M.36340). Als Normalgewebe wurden nicht neoplastisch veränderte Hirnproben (s. 2.1.1.) verwendet. Vor Beginn der Expressionsanalysen der Tumorserie wurden die optimalen Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen Primerpaare ermittelt.

ADM

Probe	5 µl
Mastermix SYBR® Green	12,5 µl
forward Primer	0,25 µl
reverse Primer	0,25 µl
<i>Aqua dest.</i>	7 µl

CGI69

Probe	5 µl
Mastermix SYBR® Green	12,5 µl
forward Primer	4,5 µl
reverse Primer	1,5 µl
<i>Aqua dest.</i>	1,5 µl

CLSTN1 und ARF1

Probe	5 µl
Mastermix SYBR® Green	12,5 µl
Forward Primer	1,5 µl
Reverse Primer	1,5 µl
<i>Aqua dest.</i>	4,5 µl

Die Ansätze wurden in 96-Well-Platten pipettiert. Die Reaktion wurde im *Gene Amp 5700 Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt.

Reaktionsschritte

95°C	10 min	Denaturierung
95°C	15 s	Denaturierung
60°C	1 min	Anlagerung und Elongation
4°C	∞	Kühlung bis zur Entnahme

Während der PCR wurde die Fluoreszenz-Zunahme nach Anregung mit einer Wellenlänge von 485 nm von der CCD Kamera kontinuierlich gemessen. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Ergebnisse mit Hilfe der *GeneAmp 5700 Software* ausgewertet. Aus den erhobenen Daten wurde durch das Auftragen der logarithmischen relativen Produktzunahme gegen die Zyklenzahlen eine Verlaufskurve der Fluoreszenz-Intensität erstellt. Es wurde bei der Auswertung darauf geachtet, dass der *Threshold*-Wert so gewählt wurde, dass möglichst alle Verlaufskurven in dem exponentiellen Anteil geschnitten wurden (s. Abb. 7).

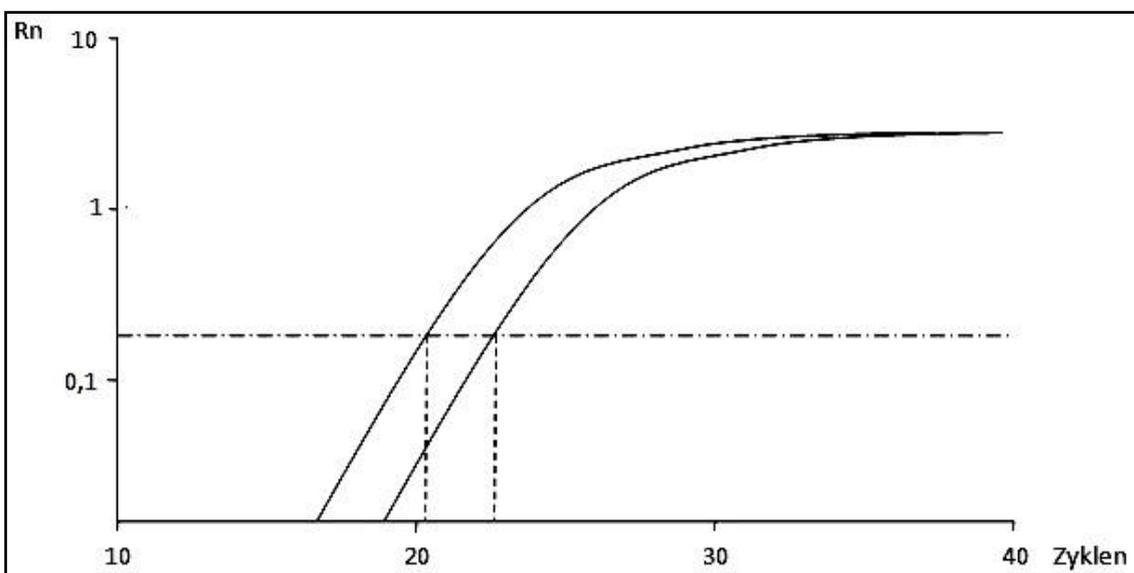


Abb. 7: Darstellung von typischen Kurvenverläufen in der Real-time RT-PCR. Eine nach rechts verlagerte Kurve entspricht einer geringeren mRNA-Expression.

Hieraus ergaben sich C_T -Werte, die zur Quantifizierung der relativen mRNA-Expression benutzt wurden. Der C_T -Wert ist hierbei ein fester Schwellenwert, der oberhalb der Basisfluoreszenz liegt. Aus diesen Daten wurde dann die relative mRNA-Expression der untersuchten Probe im Vergleich zu einer mitgeführten Kontrollprobe errechnet. Durch die Methode der Real-time RT-PCR lässt sich die mRNA-Expression von Genen sehr sensitiv bestimmen, jedoch wird keine Aussage über die Größe des Amplikons gemacht. Deshalb wird am Ende der Reaktion eine Dissoziationskurve erstellt. Die untersuchten Proben sollten einen scharfen Peak bei der Schmelztemperatur des Amplikons zeigen. Die mitgeführten Leerkontrollen dürfen keine signifikanten Fluoreszenzsignale aufweisen.

In dieser Arbeit wurde die komparative C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$) eingesetzt. Mit dieser Methode lässt sich die Expression von Genen relativ zur Expression eines Referenzgens quantifizieren. Als Referenzgene dienen sogenannte Haushaltsgene, also Gene, die in allen Zellen und Geweben möglichst gleichstark exprimiert werden. Hier wurde *ARF1* als Referenzgen verwendet (s. 2.1.3), das gemäß Vorarbeiten der Arbeitsgruppe in Gliomen unterschiedlicher WHO-Grade relativ gleichförmig exprimiert wird.

Wie schon erwähnt, wurde jede Tumorprobe doppelt gemessen. Deswegen wurde zunächst der Mittelwert der beiden C_T -Werte ermittelt. Dann wurde die Differenz der Mittelwerte von Ziel- und Kontrollgen errechnet ($\Delta C_T = \text{Mittelwert } C_T(\text{Zielgen}) - \text{Mittelwert } C_T(\text{Referenzgen})$). Dann wurde der $\Delta\Delta C_T$ -Wert ermittelt. Dieser errechnet sich aus der Differenz der ΔC_T -Werte der Tumorproben und der ΔC_T -Werte der Normalgewebeproben. Durch diesen Schritt werden die Kontrollgewebewerte gleich null gesetzt. So stellt man die Werte der Tumorproben in Relation zu denen des Normalgewebes dar. Letztendlich werden die $\Delta\Delta C_T$ -Werte entlogarithmiert ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). Dadurch erhält man die relative mRNA-Expression des Zielgens im Tumorgewebe. In jedem Lauf wurde eine bestimmte Matrize (Universal Human Reference RNA, Stratagene, La Jolla, CA, USA) als Kontrollprobe mitgeführt, um die verschiedenen Läufe untereinander vergleichen zu können und um die Expressionswerte der Proben auf einen gemeinsamen Wert beziehen zu können.

2.2.9 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die statistischen Analysen der Ergebnisse wurde die Software *IBM® SPSS® Statistics 18* (SPSS Inc., IBM, Chicago, IL, USA) verwendet. Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten statistischen Tests kurz erläutert.

Der **Mann-Whitney-Test** wurde für Vergleiche der Mittelwerte einer Variable zweier Fallgruppen verwendet. Es wird keine Gaußsche Normalverteilung vorausgesetzt. Es wurde jeweils die exakte Signifikanz angegeben.

Kaplan-Meier Überlebensanalysen wurden zum Vergleich der Überlebenszeit der Patienten in verschiedenen Fallgruppen mittels **Log-Rang-Test** durchgeführt.

Der **exakte Test nach Fisher** wurde für die Untersuchung von Zusammenhangsmaßen in Kreuztabellen mit geringen Fallzahlen genutzt. Es wurde jeweils die zweiseitige exakte Signifikanz angegeben.

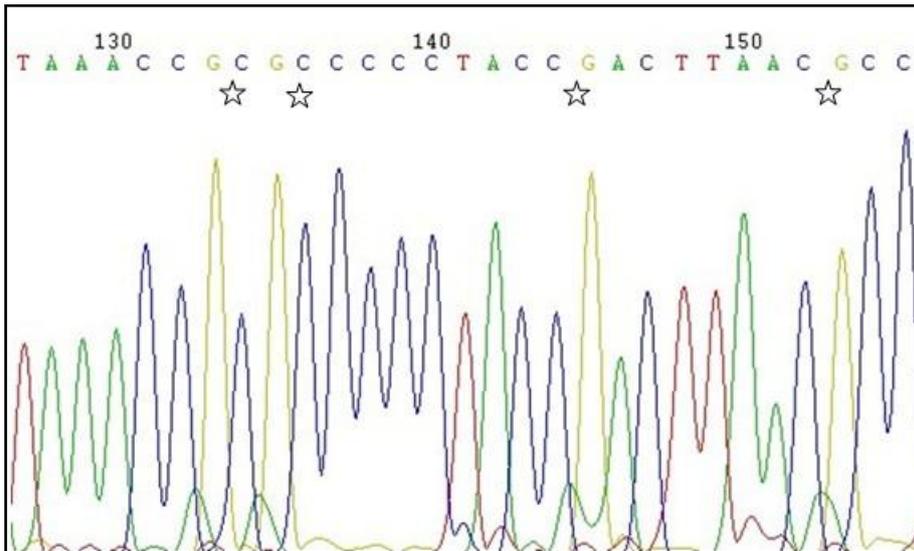
In den statistischen Tests wurde jeweils von einem Signifikanzniveau von 5% ausgegangen.

hinterlegen Sequenzabschnitte bezeichnen die Schnittstellen für *TaqI*. Das blau hinterlegte ATG kennzeichnet den Transkriptionsstart von ADM. Nach einem vollständigen Verdau ergeben sich folgende Fragmentgrößen: *Bsh1236I*: 42, 14, 252, 18, 105 bp (Fragmentgröße näherungsweise, bedingt durch die CpG-Repeats CGCGCG und den daraus resultierenden unterschiedlichen Schnittmöglichkeiten), *TaqI*: 314, 121 bp.

3.1.1 Natriumbisulfit-Sequenzierung

Zur Validierung der DMH-Daten aus den Vorarbeiten wurde die Natriumbisulfit-Sequenzierung zur Analyse des Methylierungsstatus und zur Bestimmung des Methylierungsmusters an einem erweiterten Kollektiv von insgesamt 32 oligodendroglialen Tumoren, darunter drei O II, ein OA II, 21 AO III und sieben AOA III, sowie sieben Normalgehirnproben durchgeführt (s. 2.1.1.). Insgesamt waren 20 Tumoren nach den in 2.2.5 dargestellten Bewertungskriterien methyliert und 14 nicht methyliert. Eins von drei O II, das OA II, 14 der 21 AO III und drei der sieben AOA III waren methyliert (s. exemplarisch Abb. 9). Die Normalgehirnproben waren unmethyliert. Zusätzlich wurde eine Methylase-behandelte Normalgehirnprobe als Positivkontrolle für die Methylierungsanalysen mit untersucht.

a)



b)

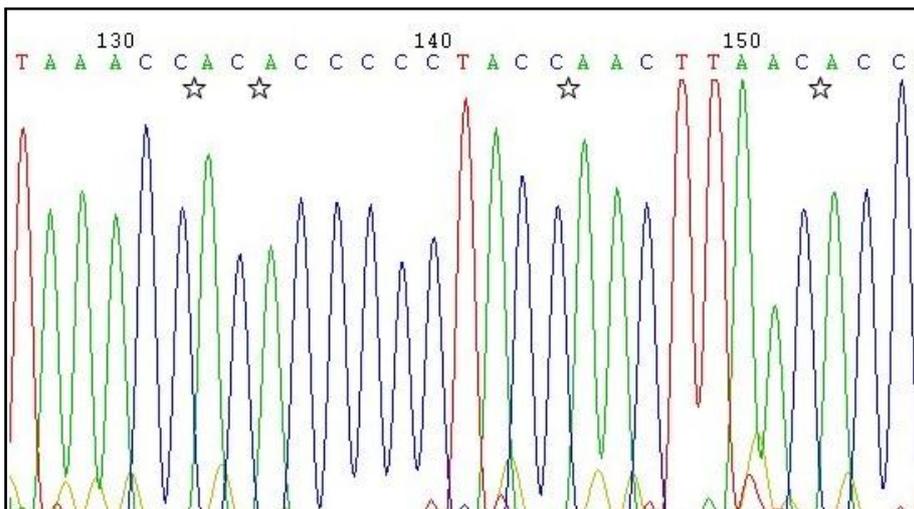


Abb. 9: Beispielhaft ausgewählte Resultate der Sequenzierung von Teilen der 5'-CpG-Insel des *ADM*-Gens nach Natriumbisulfit-Behandlung in (a) einem anaplastischen Oligodendrogliom (AO37) und in (b) einer Normalgehirnprobe. Die einzelnen CpG-Dinukleotide sind mit einem Stern markiert. In der Tumorprobe (a) sind die CpG-Dinukleotide methyliert, in der Normalgehirnkontrolle (b) dagegen nicht. Gezeigt sind Resultate der Sequenzierung des reversen Strangs.

Die vollständigen Ergebnisse sind mit den COBRA- und Expressionsdaten im Zusammenhang mit dem LOH1p/19q-Status in Tab. 6 abgebildet.

Diag.	Case	LOH 1p	LOH 19q	BS	COBRA	Expr.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	Meth. %		
O II	O15	+	+	-	-																				18,52		
O II	O18	+	+	+	-																					40,74	
O II	O21	+	+	-	-																					0,00	
OA II	OA2	-	+	+	+	n.s.																				55,50	
AO III	AO8	-	+	-	-																					0,00	
AO III	AO11	-	-	-	-																					0,00	
AO III	AO17	-	-	+	-																					72,22	
AO III	AO18	+	+	+	+																					62,36	
AO III	AO19	+	+	+	+																					64,81	
AO III	AO20	+	-	-	-																					0,00	
AO III	AO21	+	+	+	+																					24,07	
AO III	AO22	-	-	-	-																					0,00	
AO III	AO23	+	+	+	+																					51,85	
AO III	AO24	-	-	+	-																					48,15	
AO III	AO25	+	+	-	+																					20,37	
AO III	AO26	+	+	-	-	n.s.																				0,00	
AO III	AO29	+	+	+	+	n.s.																				61,11	
AO III	AO32	+	+	+	+																					57,41	
AO III	AO35	+	+	+	-																					33,33	
AO III	AO36	+	+	-	-																					14,81	
AO III	AO37	+	+	+	+																					55,56	
AO III	AO38	+	-	+	+																					61,11	
AO III	AO39	+	+	+	-																					53,26	
AO III	AO63	+	+	+	+																					57,41	
AO III	AO84	+	+	+	-	n.s.																				48,15	
AOA III	AOA7	+	-	-	-																					0,00	
AOA III	AOA12	+	+	-	-																					1,85	
AOA III	AOA13	-	-	+	+																					68,52	
AOA III	AOA14	+	+	+	+																					33,33	
AOA III	AOA18	+	+	-	-																					0,00	
AOA III	AOA44	-	-	-	+																					0,00	
AOA III	AOA77	+	+	+	+																					57,41	
NB	NB1			-	n.s.	n.s.																				0,00	
NB	NB2			-	n.s.	n.s.																					0,00
NB	NB3			-	n.s.	n.s.																					0,00
NB	NB4			-	n.s.	n.s.																					3,70
NB	NB5			-	n.s.	n.s.																					3,70
NB	NB6			-	n.s.	n.s.																					0,00
NB	NB7			-	n.s.	n.s.																					3,70
NB MB	NB MB			+	n.s.	n.s.																					66,66

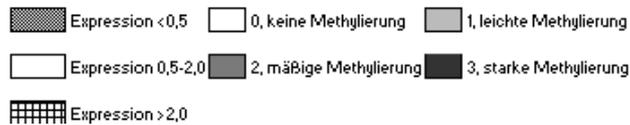


Tabelle 6: Methylierungsmuster der 5'-CpG-Insel von *ADM* in 32 Gliomen, sieben Normalgehirngewebeproben und einer Methylase-behandelten Positivkontrolle (MB NB). Der Methylierungsstatus wurde mittels Natriumbisulfid-Sequenzierung an 18 CpG-Stellen wie unter 2.2.5 beschrieben erhoben. Neben den prozentualen Methylierungswerten sind zusätzlich die Ergebnisse der COBRA, die relative mRNA-Expression sowie der LOH-Status (+ = Allelverlust, - = kein Allelverlust) angegeben.

3.1.2 Kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse (COBRA)

Die Serie aus oligodendroglialen Tumoren wurde nochmals erweitert, um auch den Methylierungsstatus in astrozytär differenzierten Tumoren zu untersuchen. Für diese Untersuchung wurde die COBRA verwendet. Es wurden insgesamt 88 Gliome untersucht. In 28 Tumoren war eine Methylierung des *ADM*-Promotors nachweisbar (3/11 O II, 1/4 OA II, 5/11 AO III, 13/26 AOA III, 3/8 A II, 1/9 AA III, 2/9 s GB IV, 0/10 pGB IV).

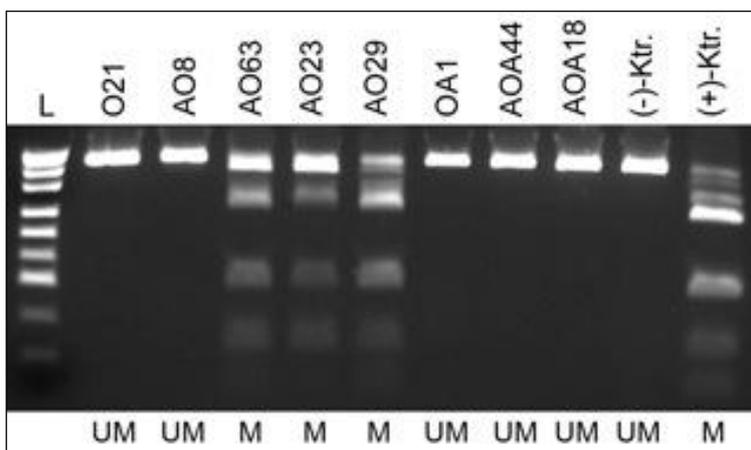


Abb. 10: Ausgewählte Ergebnisse der COBRA für *ADM*. Die methylierten Tumoren weisen bis zu fünf Fragmente auf, entsprechend der unterschiedlich starken Promotormethylierung und dem konsekutiven Enzymverdau. Die unmethylierten Tumoren zeigen nur ein einzelnes, ungeschnittenes PCR-Fragment. 100bp-Leiter; UM: nicht methylierter Tumor; M: methylierter Tumor; (-)-Ktr.: Negativ-Kontrolle, (+)-Ktr.: vollständig geschnittene, Sssl-behandelte Positiv-Kontrolle.

Basierend auf den Methylierungsuntersuchungen mittels COBRA konnte festgestellt werden, dass Tumoren mit oligodendroglialer Komponente (22/52, 42%) signifikant häufiger methyliert waren als astrozytäre Tumoren (6/36, 17%) (Exakter Test nach Fisher: $p = 0,019$).

Während in pGB IV (0/10, 0%) keine *ADM*-Methylierung nachweisbar war, zeigten die niedriggradigen Tumoren O II und OA II (4/15, 27%) und A II (3/8, 38%) sowie die sGB IV (2/9, 22%) und AA III (1/9, 11%) eine erhöhte Methylierungsrate. Die häufigste Promotormethylierung fand sich in den anaplastischen oligodendroglialen Tumoren AO III und AOA III (18/37, 49%) (s. Abb. 11).

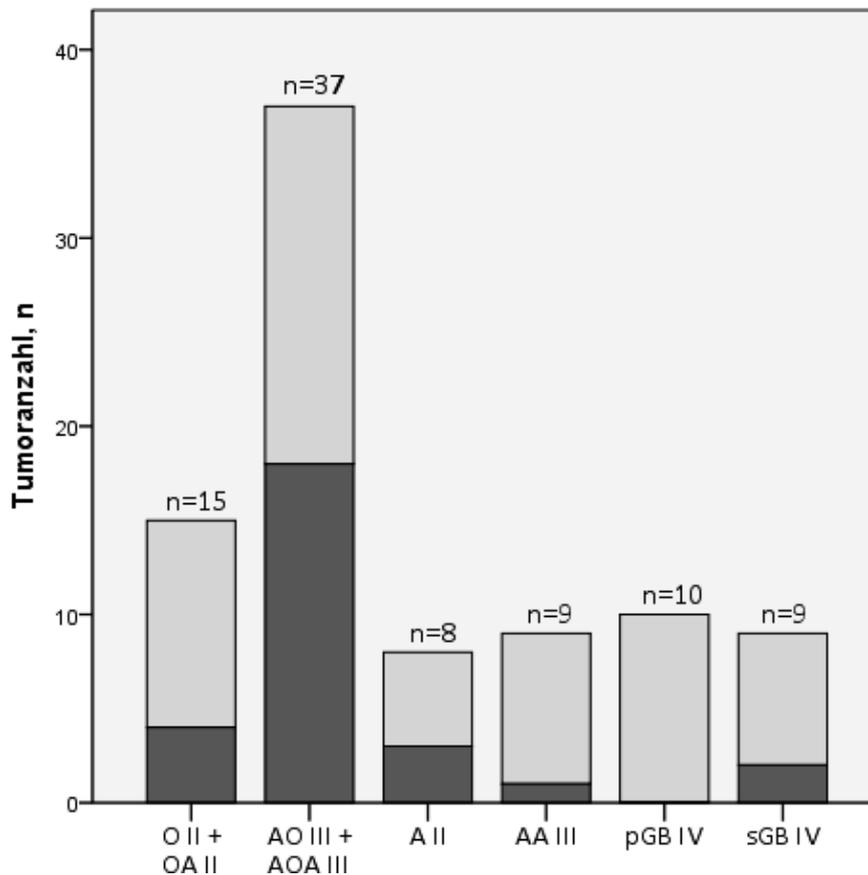


Abb. 11: Anzahl der ADM-methylierten und -unmethylierten Tumoren in den verschiedenen Tumorgruppen. Die Ergebnisse basieren auf mittels COBRA erhobenen Daten. Dunkel dargestellt sind die ADM-methylierten Tumoren. Die Gesamtzahl der in den einzelnen Gruppen untersuchten Patientenproben ist oberhalb der jeweiligen Balken angegeben.

Im Kollektiv der AO III und AOA III ergab sich kein signifikanter Zusammenhang von Methylierungs- und LOH-Status (mit LOH1p/19q: 12/20 (60%) methyliert, ohne LOH1p/19q: 6/16 (38%) methyliert, Exakter Test nach Fisher: $p = 0,315$).

3.1.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung und der COBRA

32 oligodendrogliale Tumoren konnten mit beiden Analyseverfahren untersucht werden (drei O II, ein OA II, 21 AO III und sieben AOA III, vgl. Tab. 6). Dreizehn Proben wurden durch beide Verfahren als methyliert erkannt, zwölf Proben durch beide als nicht methyliert. Eine Probe wurde in der COBRA als methyliert und in der Natriumbisulfit-Sequenzierung als nicht

methyliert ermittelt. Sechs Proben waren in der Natriumbisulfit-Sequenzierung methyliert und in der COBRA unmethyliert.

3.1.4 *ADM*-Expressionsanalysen in Gliomzelllinien mit und ohne Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Um der Frage nachzugehen, ob eine demethylierende Behandlung von Glioblastomzelllinien einen Einfluss auf die *ADM*-Genexpression hat, wurde die Real-time RT-PCR für die Zelllinien A178, U87MG, A172, U373MG und LN428 vor und nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Aza-2'-Deoxycytidin ermittelt. Für die Zelllinien A178, U373MG und A172 fand sich ein Anstieg des Expressionsniveaus durch die Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin. In der Zelllinie U87MG fand sich kein Expressionsanstieg. Die Zelllinie LN428 sowie die Normalgehirnproben zeigten keine *ADM*-Expression (s. Abb. 12).

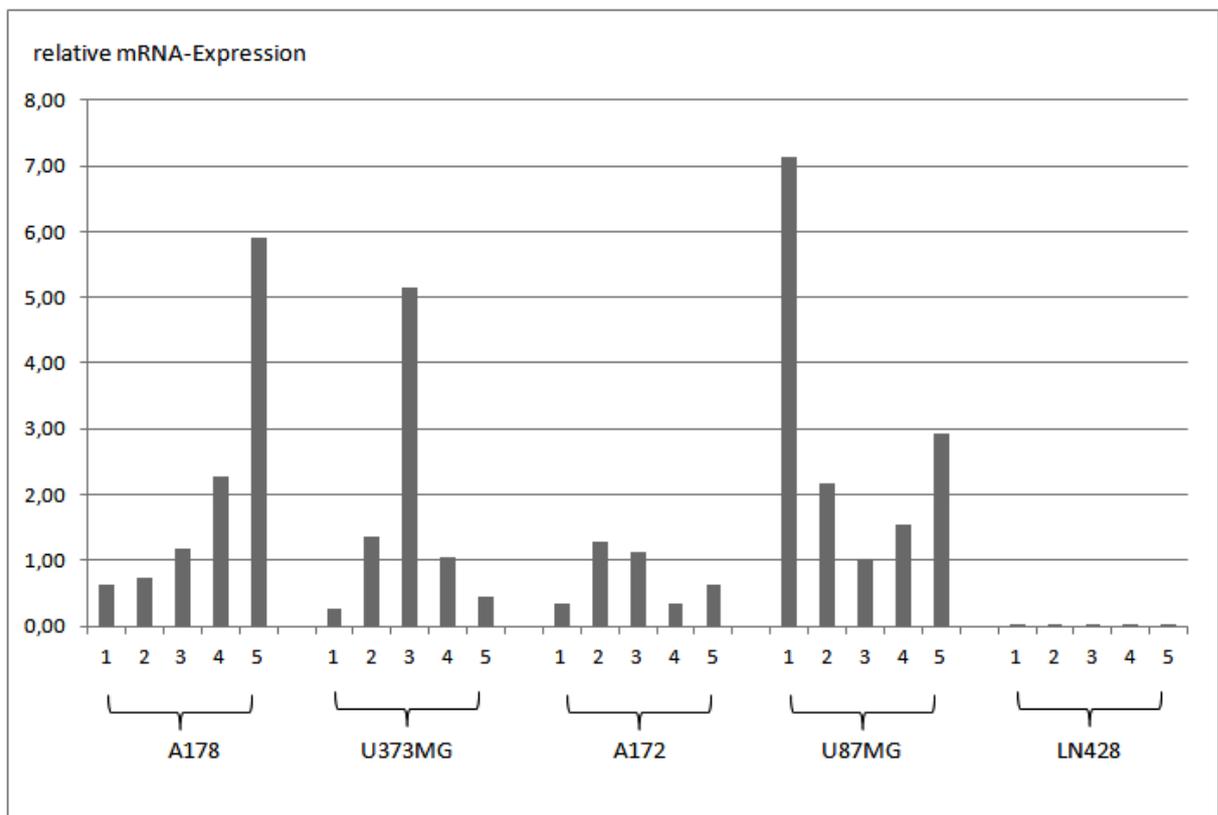


Abb. 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expressionsanalyse von *ADM* in den Gliomzelllinien A178, U373MG, A172, U87MG und LN428 vor und nach der Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin. Die Zelllinien wurden entweder unter Standardbedingungen gezüchtet (1), oder unter vier unterschiedlichen Bedingungen: 0,5 μ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin (2), 1,0 μ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin (3), 2,5 μ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin (4) oder 5,0 μ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5). Angegeben sind die Expressionswerte in Relation zur Universal-RNA.

Die unbehandelten Zelllinien A178, U373MG und A172 wurden mittels COBRA auf ihren *ADM*-Promotor-Methylierungsstatus hin untersucht. Der *ADM*-Promotor erwies sich dabei in diesen Zelllinien als nicht methyliert, so dass die Steigerung der *ADM*-Expression nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung vermutlich einen indirekten Effekt darstellt.

3.1.5 mRNA-Expressionsanalyse

Die *ADM*-Genexpressionsanalysen in humanen Gliomen wurden mittels Real-time RT-PCR an einer Serie von 82 Gliomen mit in ausreichender Menge und Qualität verfügbarer RNA durchgeführt. Diese Serie setzte sich aus neun O II, zwei OA II, 24 AO III, elf AOA III, acht A II,

acht AA III, neun sGB IV und elf pGB IV zusammen. Als Kontrolle wurden zusätzlich zehn Normalgehirnproben analysiert (s. 2.1.1). Als Referenzgen diente *ARF1* (s. 2.1.3 und 2.2.8).

Die Expression in den Normalgehirnproben lag gemittelt bei 0,04, d.h. es konnte keine nennenswerte Expression von *ADM* in gesundem Gehirngewebe nachgewiesen werden. Deshalb werden hier die Ergebnisse der Expressionsanalyse in den einzelnen Tumoren relativ zur Expression in humaner Universal-RNA (Stratagene) angegeben. Eine relativ zur Universal-RNA verminderte Expression ($<0,5$) zeigten vermehrt die oligodendroglialen Tumoren (7/9 O II, 2/2 OA II, 15/24 AO III und 10/11 AOA III gegenüber 3/8 A II, 3/8 AA III, 2/9 sGB IV und 2/11 pGB IV). Eine deutlich erhöhte Expression ($>2,0$) fand sich in elf Tumoren (0/9 O II, 0/2 OA II, 0/8 A II, 3/24 AO III (12,5%), 0/11 AOA III, 3/8 AA III (38%), 1/9 sGB IV (11%) und 4/11 pGB IV (36%) (s. Abb. 13).

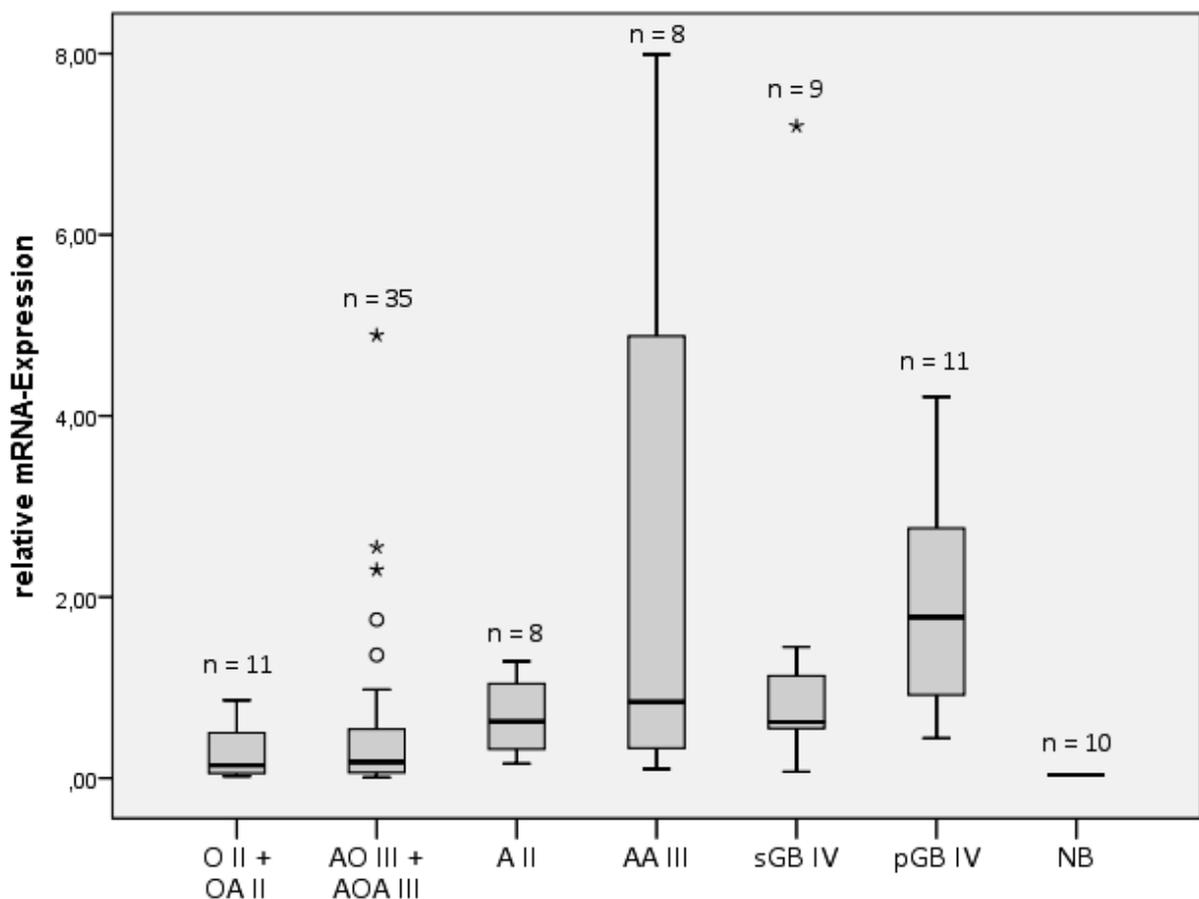


Abb. 13: Boxplot der *ADM* mRNA-Expression in den verschiedenen Diagnosegruppen und normalem Hirngewebe (NB). Die angegebenen Expressionswerte sind normalisiert auf die Expression von *ARF1* und relativ zur normalisierten *ADM*-Expression im Human Universal RNA-Standard kalkuliert.

Die 36 astrozytären Tumoren der Serie zeigten eine signifikant höhere relative *ADM*-Expression als die 46 Gliome mit oligodendroglialer Komponente (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,001$). Die Mittelwerte der mRNA-Expression lagen bei 1,64 versus 0,50, der Median bei 0,78 versus 0,17 (s. Abb. 14).

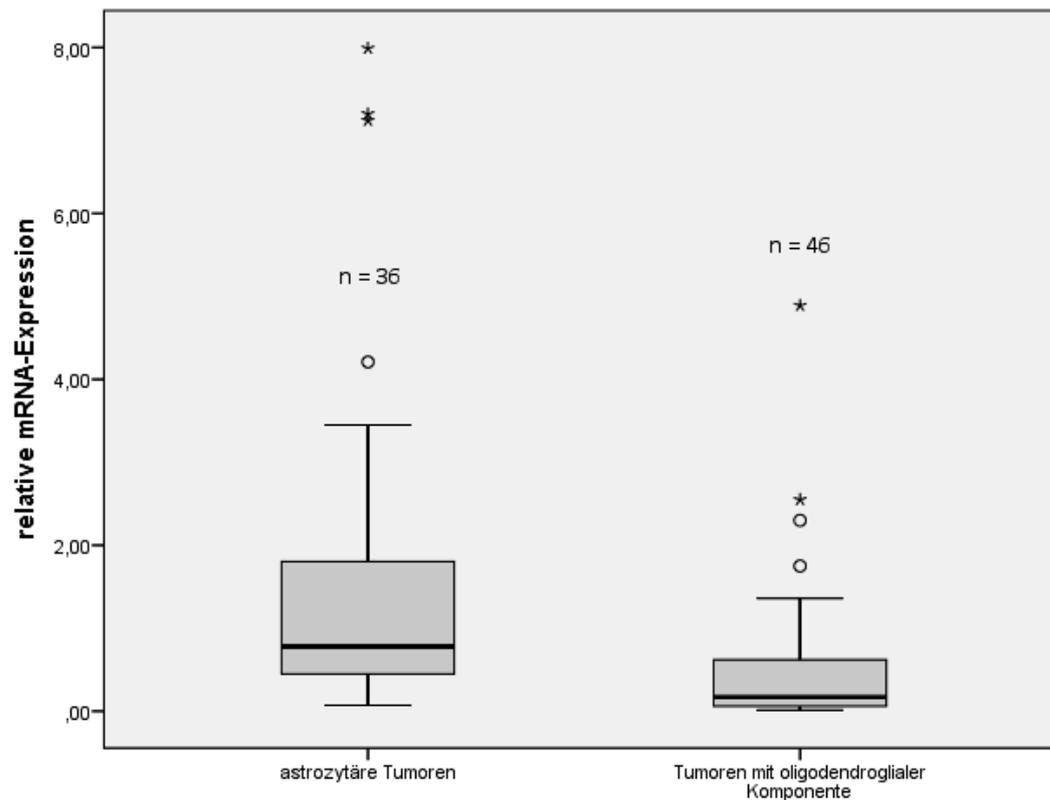


Abb. 14: Boxplot mit der Verteilung der *ADM*-Expressionswerte relativ zum Human Universal RNA-Standard getrennt für astrozytäre und oligodendrogliale Tumoren. Die 36 astrozytären Tumoren der Serie zeigten eine signifikant höhere *ADM*-Expression als die 46 Gliome mit oligodendroglialer Komponente (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,001$).

Für das Kollektiv von AO III und AOA III wurden die Expressionswerte jeweils für Tumoren mit und ohne kombinierte Allelverluste auf 1p und 19q analysiert. Die Tumoren mit diesen Allelverlusten ($n = 18$, Mittelwert 0,31, Median 0,11) zeigten niedrigere Expressionswerte als die Tumoren ohne 1p/19q-Verluste ($n = 16$, Mittelwert 0,82, Median 0,22). Der Expressionsunterschied war allerdings nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,198$).

3.1.6 Korrelation der Ergebnisse der Methylierungsanalyse und der mRNA-Expression

Die Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung und der COBRA im Zusammenhang mit dem LOH 1p/19q-Status und dem Expressionsniveau sind für das *ADM*-Gen in Tab. 6 dargestellt.

In der Tumorserie zeigten *ADM*-methylierte Tumoren (n = 26) tendenziell niedrigere Expressionswerte in der RT-PCR als unmethylierte Tumoren (n = 54), es bestand jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus und relativer Expression (Mittelwert 0,56 versus 1,24, Median 0,39 versus 0,50, Mann-Whitney-U-Test: p = 0,162) (s. Abb. 15).

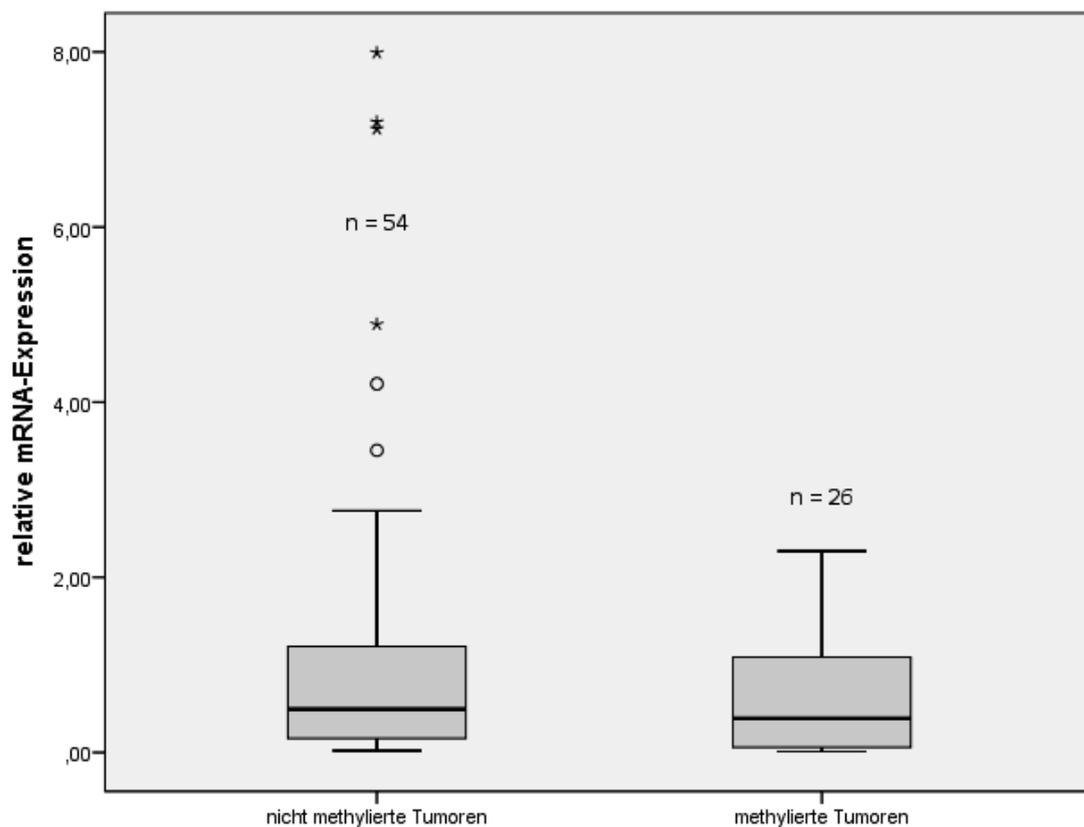


Abb. 15: Darstellung der *ADM* mRNA-Expression vergleichend für unmethylierte und methylierte Tumoren (Mann-Whitney-U-Test: p = 0,162).

3.1.7 Überprüfung der prognostischen Bedeutung der *ADM*-Promotormethylierung und mRNA-Expression

Um die prognostische Bedeutung der *ADM*-Expression bzw. -Promotormethylierung zu untersuchen, wurden Kaplan-Meier-Analysen für die Gruppe von Patienten mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren durchgeführt. Innerhalb dieses Kollektivs fanden sich nur drei Tumoren mit einer relativen *ADM*-Expression von über 2,0, bzw. vier Tumoren mit einer relativen Expression >1 so dass eine Gruppenbildung zur Überlebensanalyse nicht sinnvoll erschien. Dagegen war die Gesamtüberlebenszeit der Patienten mit *ADM*-Promotormethylierung ($n = 15$, Median: 3660 Tage, Mittelwert: 3556 Tage) signifikant länger als die der Patienten mit unmethyliertem *ADM*-Promotor ($n = 18$, Median: 859 Tage, Mittelwert: 1579 Tage, Log Rang Test: $p = 0,005$) (s. Abb. 16).

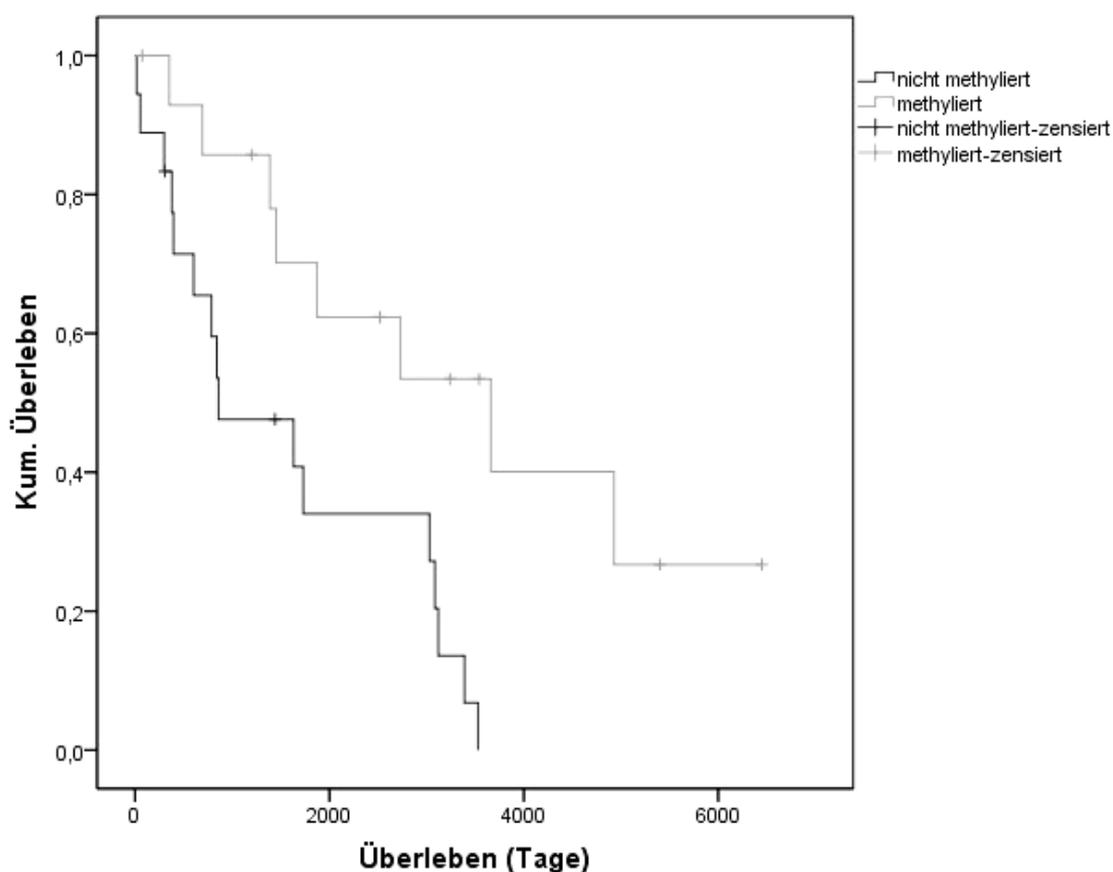
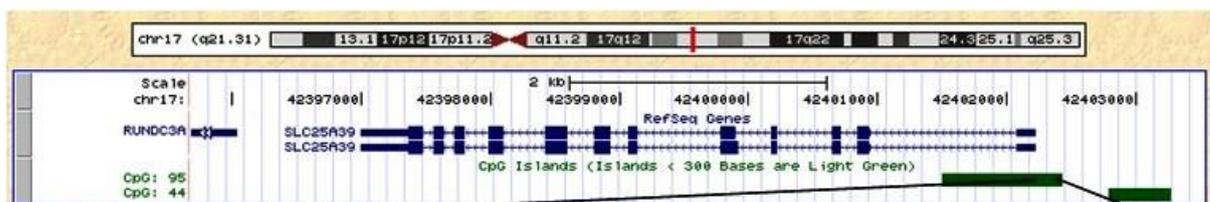


Abb. 16: Kaplan-Meier Überlebenskurve für Patienten mit AO III oder AOA III mit ($n = 15$) und ohne ($n = 18$) *ADM*-Promotormethylierung, Log Rang: $p = 0,005$.

3.2 Ergebnisse der molekularen Analysen des Solute Carrier Family 25 Member 39 (CGI69 bzw. SLC25A39)-Gens

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 17) zeigt zur Übersicht ein Piktogramm des CGI69-Gens und dessen Lokalisation auf Chromosom 17. Darunter ist der untersuchte Natriumbisulfit-modifizierte Sequenzabschnitt mit den verwendeten Primern und den jeweiligen Schnittstellen der Restriktionsenzyme und den untersuchten CpG-Positionen dargestellt.



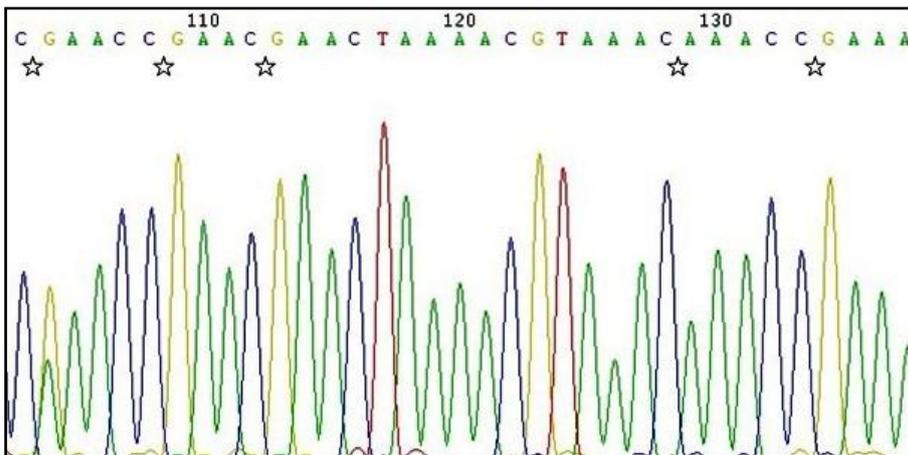
tatCGCGttCGgtttgtggttaatttattttaataataatttattgtaaagagttttgagatttaga
 agaaattacGatacGagagtaattaatattaaaaCGtCGatgttttttCGtatttagtgtttttt
 ttttCGCGtagagttatttCGggttttaggCGaggttgtgatattgtttaagggttaCGCGaagggtg
 gatttggtttttatggttttttCGttttttCGgttgtttaCGttagtCGtCGgttCGgg
 ttgtagtttagttaatttagtggCGtatattCGCGCGgggttttgtggtttataaagCGtttEgt
 gttgtaggtttgtttttgtaaattgaaaaatgggggCGatgttaaggCGgCGagagaagtCGtCGC
 GaagtttttaagttCGgCGggtagtCGgtaagtaattCGtCGtatttgtgtggtttttCGgCG
 atttCGAagaatttatttttattgtCGtCGttaCGtatttgaggataTCGaggaagagggttagtg
 CGttattttCGtCGtttagaaggCGttgggttttagtgtCGCGCGGgtCGgggCGgggttggt
 gaaaatCGttgttaaggtCGgCGCGgCGgtttaCGtttgggaatttagtattttCGAagatCGag
 ...1.716 bp...
 tttgaggtttggttttaggattgaagttttaagATGgttgattaggattttgCGggtattagttt

Abb. 17: Piktogramm von Chromosom 17 mit Darstellung des CGI69 (SLC25A39)-Gens und den assoziierten CpG-Inseln ([http://genome.ucsc.edu;assembly Feb.2009 \(GRCh37/hg19\)](http://genome.ucsc.edu;assembly Feb.2009 (GRCh37/hg19))). Darunter ist der untersuchte Ausschnitt der Promotorsequenz nach Natriumbisulfit-Behandlung abgebildet. Die CG-Dinukleotide sind als methyliert, d.h. nicht konvertiert dargestellt. Alle CpG-Dinukleotide sind unterstrichen dargestellt. Die Sequenzabschnitte mit grüner bzw. roter Schrift bezeichnen die Primer für die Natriumbisulfit-Sequenzierung (Fragmentgröße: 303 bp) mit 22 CpG Positionen. Die grün bzw. rot hinterlegten Sequenzabschnitte bezeichnen die Primer für die COBRA (Fragmentgröße: 287 bp). Die gelb hinterlegten Sequenzabschnitte bezeichnen die Schnittstellen für Bsh1236I, die orange hinterlegten Sequenzabschnitte bezeichnen die Schnittstellen für TaqI. „...1.716 bp...“ gibt die nicht dargestellten Basenpaare der Sequenz an. Das blau hinterlegte ATG kennzeichnet den Transkriptionsstart von CGI69. Nach einem vollständigen Verdau ergeben sich folgende Fragmentgrößen: Bsh1236I: 69, 176, 38 bp (Fragmentgröße näherungsweise, bedingt durch das CpG-Repeat CGCGCGCG und den daraus resultierenden unterschiedlichen Schnittmöglichkeiten), TaqI: 140, 44,103 bp.

3.2.1 Natriumbisulfit-Sequenzierung

Eine Natriumbisulfit-Sequenzierung der 5'-CpG-Insel von *CGI69* wurde für 38 Tumoren durchgeführt, die alle in der untersuchten Sequenz methyliert waren. Darunter waren sechs O II, drei OA II, 22 AO III und sieben AOA III. Es wurden sechs Normalgehirnproben mitgeführt, von denen zwei unmethyliert waren, drei eine deutlich geringere Methylierungsrate aufwiesen als die Mehrheit der Tumoren und eine Probe eine starke Methylierung zeigte. Die Methylase-behandelte Positivkontrolle war stark methyliert. Exemplarisch sind Ausschnitte aus den Ergebnissen der Sequenzierung von einer unmethylierten Normalgehirnprobe und einer Tumorprobe in Abb. 18 dargestellt. Die Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung sind gemeinsam mit den Ergebnissen der COBRA und der Expressionsanalyse im Zusammenhang mit dem LOH 1p/19q-Status in Tab. 7 ersichtlich.

a)



b)

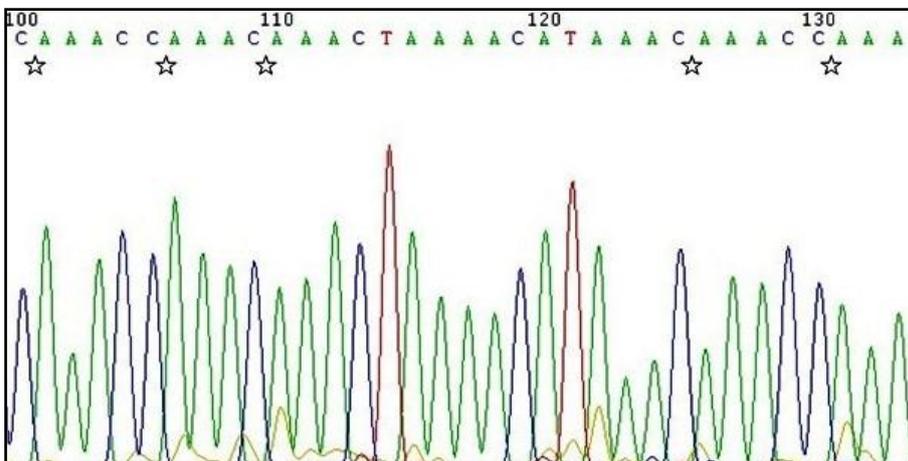
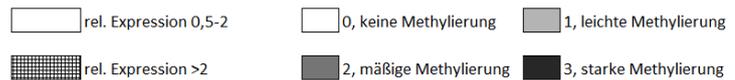


Abb. 18: Beispiele der Sequenzierungsanalysen von Teilen der *CGI69* assoziierten 5'-CpG Insel in (a) einem AO III (AO63) und in (b) einer Normalgehirnprobe nach Natriumbisulfitbehandlung der DNA. Die einzelnen CpG-Dinukleotide sind mit einem Stern markiert. In der Tumorprobe (a) sind die CpG-Dinukleotide methyliert, in der Normalgehirnkontrolle (b) dagegen nicht. Die Sequenzierung des reversen Strangs ist abgebildet.

Diag	Case PC	LOH 1p	LOH 19q	BS	COBRA	rel. Expr.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	Meth. %		
O II	O14	+	+	+	+																				76,47	
O II	O15	+	+	+	+																					92,16
O II	O17	+	-	+	+																					45,1
O II	O18	+	+	+	+																					92,16
O II	O21	+	+	+	+																					74,51
O II	O23	+	+	+	+																					72,55
OA II	OA1	+	+	+	+																					84,31
OA II	OA2	-	+	+	+	n.a.																				84,31
OA II	OA6	-	-	+	+																					74,51
AO III	AO8	-	+	+	+																					70,59
AO III	AO11	-	-	+	-																					70,59
AO III	AO17	-	-	+	+																					62,75
AO III	AO18	+	+	+	+	n.a.																				82,35
AO III	AO19	+	+	+	+																					92,16
AO III	AO20	+	-	+	+																					56,89
AO III	AO21	+	+	+	-																					70,59
AO III	AO22	-	-	+	+																					84,31
AO III	AO23	+	+	+	+																					84,31
AO III	AO24	-	-	+	+																					72,55
AO III	AO25	+	+	+	+																					78,43
AO III	AO26	+	+	+	+																					74,51
AO III	AO29	+	+	+	+																					84,31
AO III	AO32	+	+	+	+																					70,57
AO III	AO35	+	+	+	+																					94,12
AO III	AO36	+	+	+	+																					88,23
AO III	AO37	+	+	+	+																					84,31
AO III	AO38	+	-	+	+																					76,47
AO III	AO39	+	+	+	+																					66,67
AO III	AO40	+	+	+	+																					80,39
AO III	AO63	+	+	+	+																					90,2
AO III	AO84	+	+	+	+																					92,16
AOA III	AOA7	+	-	+	+																					72,55
AOA III	AOA12	+	+	+	+																					78,43
AOA III	AOA13	-	-	+	+																					78,43
AOA III	AOA14	+	+	+	+																					78,43
AOA III	AOA18	+	+	+	+																					74,51
AOA III	AOA44	-	-	+	-																					88,24
AOA III	AOA77	+	+	+	+																					74,51
NB	NB1			-	n.a.	n.a.																				11,76
NB	NB2			+	n.a.																					27,45
NB	NB3			+	n.a.	n.a.																				25,49
NB	NB4			+	n.a.	n.a.																				94,12
NB	NB5			-	n.a.	n.a.																				3,92
NB	NB6			+	n.a.	n.a.																				43,14
NB MB				+	n.a.	n.a.																				92,16



Tab. 7: Methylierungsmuster der 5'-CpG-Inselle von *CGI69* in 38 Gliomen, sechs Normalhirngewebebeobachtungen und einer Methylase-behandelten Positivkontrolle (MB NB). Der Methylierungsstatus wurde mittels Natriumbisulfit-Sequenzierung an 17 CpG-Stellen, wie unter 2.2.5 beschrieben, erhoben. Neben den prozentualen Methylierungswerten sind zusätzlich die Ergebnisse der COBRA, die relative mRNA-Expression sowie der LOH-Status auf 1p (+ = Allelverlust, - = kein Allelverlust) angegeben.

3.2.2 Kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse (COBRA)

Die Serie aus oligodendroglialen Tumoren wurde für die *CGI69*-Methylierungsanalysen ebenfalls um astrozytär differenzierte Tumoren erweitert und so insgesamt 87 Tumoren mittels COBRA untersucht. In 73 Tumoren (84%) wurde eine Methylierung der 5'-CpG-Insel von *CGI69* festgestellt (10/11 O II, 4/4 OA II, 24/25 AO III, 9/11 AOA III, 5/8 A II, 8/9 AA III, 8/9 sGB IV und 5/10 pGB IV). Mit dieser Methode wurden zwei Normalgehirnproben untersucht, sie waren nicht methyliert. Exemplarisch sind in Abb. 19 ausgewählte Ergebnisse der COBRA dargestellt.

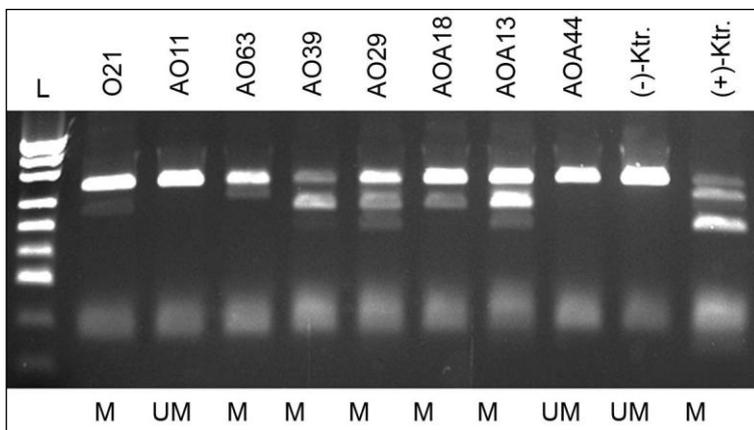


Abb. 19: Ausgewählte Ergebnisse der COBRA Analyse für *CGI69*. Man erkennt bei den methylierten Tumoren bis zu drei Fragmente, entsprechend der unterschiedlich starken Promotormethylierung und dem konsekutiven Restriktionsenzymverdau. Die unmethylierten Proben weisen dagegen nur ein ungeschnittenes PCR-Fragment auf. L, Längenstandard; M, methylierte 5'-CpG-Insel mit geschnittenen PCR-Fragmenten; UM, unmethylierte 5'-CpG-Insel mit ungeschnittenen PCR-Fragmenten.; (-)-Ktr., ungeschnittene Negativ-Kontrolle; (+)-Ktr., vollständig geschnittene, Sssl-behandelte Positiv-Kontrolle.

Die COBRA-Ergebnisse zeigten, dass Tumoren mit oligodendroglialer Komponente signifikant häufiger methyliert waren (47/51, 92%) als astrozytäre Tumoren (26/36, 72%, Exakter Test nach Fisher: $p = 0,018$). Tumoren mit oligodendroglialer Komponente der WHO-Grade II und III zeigten dabei eine ähnliche Häufigkeit der Methylierung (O II und OA II: 14/15, 93%, AO III und AOA III: 33/36, 92%).

Die A II (5/8, 63%) zeigten im Vergleich zu den malignen Varianten seltener eine Methylierung von *CGI69* (AA III: 8/9, 89% und sGB IV: 8/9, 89%), wohingegen die pGB IV mit Abstand (5/10, 50%) am seltensten eine Methylierung der 5'-CpG-Insel dieses Gens aufwiesen (s. Abb. 20).

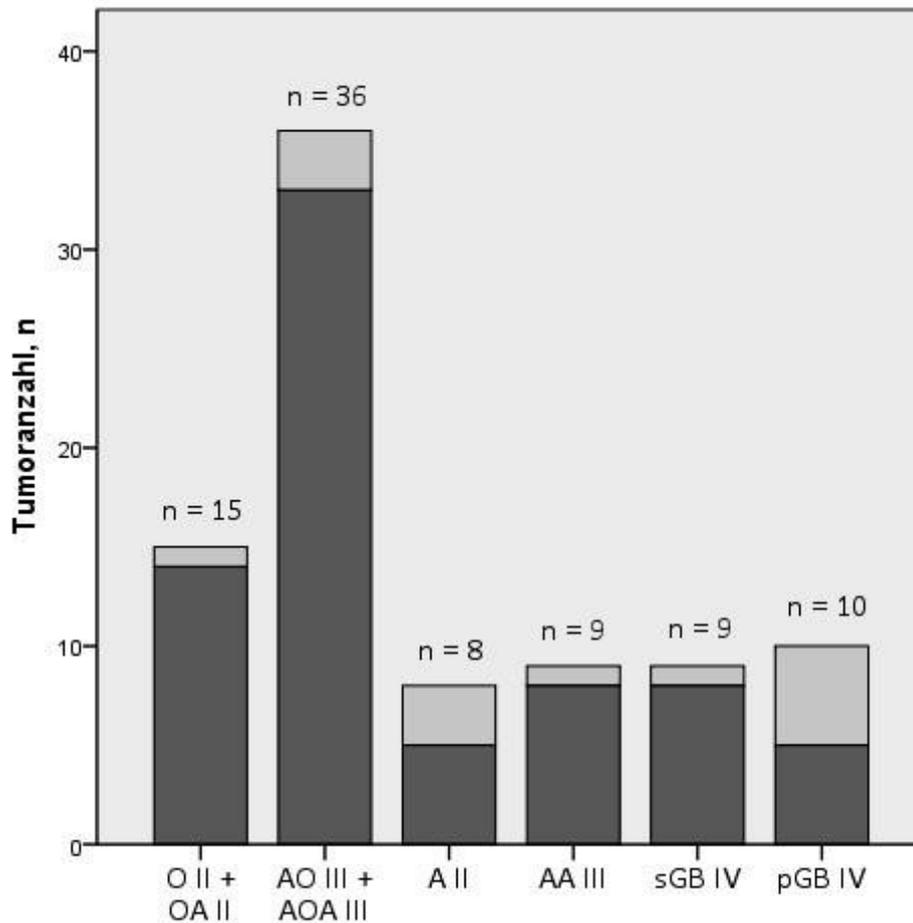


Abb. 20: Anzahl an *CGI69*-methylierten und -unmethylierten Tumoren in den verschiedenen Tumorgruppen basierend auf den mittels COBRA erzielten Ergebnissen. Dunkel dargestellt sind die Tumoren mit 5'-CpG-Methylierung. Die Gesamtzahl der in den einzelnen Gruppen untersuchten Patientenproben ist oberhalb der jeweiligen Balken angegeben.

Im Kollektiv der AO III und AOA III waren alle Tumoren mit kombiniertem Allelverlust auf 1p und 19q methyliert (20/20 Tumoren). Tumoren ohne 1p/19q-Verluste waren vereinzelt nicht methyliert (3/15 Tumoren, 20% nicht methyliert; Exakter Test nach Fisher: $p = 0,070$).

3.2.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung und der COBRA

Insgesamt 38 Proben oligodendroglialer Tumoren (sechs O II, drei OA III, 22 AO III, sieben AOA III) wurden durch beide Verfahren, die Natriumbisulfit-Sequenzierung und die COBRA, analysiert und zeigten weitgehend konkordante Ergebnisse. In 35 Proben wurden in der COBRA und in der Natriumbisulfit-Sequenzierung eine *CGI69*-Methylierung nachgewiesen, drei Proben waren in der COBRA nicht methyliert, in der Sequenzierung jedoch methyliert.

3.2.4 Funktionelle Bedeutung der *CGI69*-Promotormethylierung: Expressionsanalysen der Gliomzelllinien

Für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Methylierung des *CGI69*-Promotors wurden die Expressionsniveaus von *CGI69* in den Gliomzelllinien A178, U373MG, A172, U87MG und LN428 vor und nach der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Aza-2'-Deoxycytidin durch die Real-Time RT-PCR analysiert. In den Zelllinien A178, U373MG, A172 und LN428 fand sich ein Expressionsanstieg nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung (s. Abb. 21).

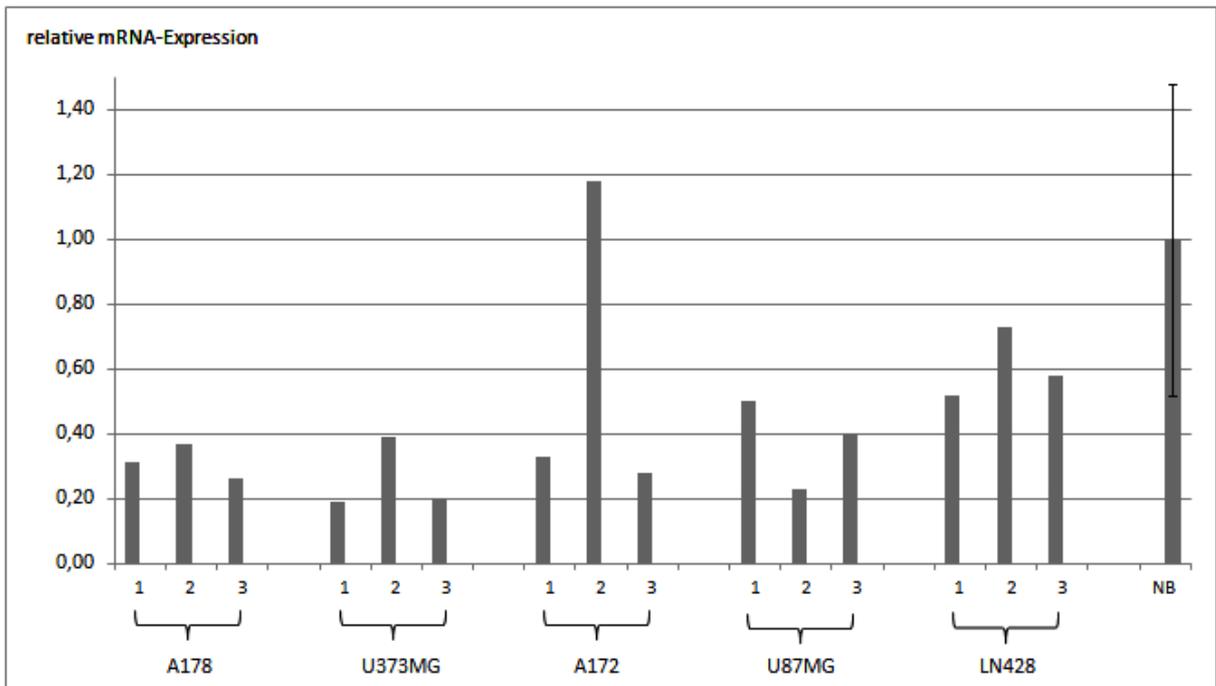


Abb. 21: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expressionsanalyse von *CGI69* in den Gliomzelllinien A178, U373MG, A172, U87MG, LN428 vor und nach der Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin sowie Normalgehirngewebe (dargestellt ist der Mittelwert aus acht Gewebeprobe, Standardabweichung 0,48). Die Zelllinien wurden entweder unter Standardbedingungen (1) oder unter zwei unterschiedlichen Bedingungen (2) oder (3), kultiviert.

Für *CGI69* wurde die 5'-CpG-Insel in der Gliomzelllinie A172 auf ihren Methylierungsstatus mittels COBRA untersucht. Sie war methyliert.

3.2.5 mRNA-Expressionsanalyse

Für *CGI69* wurde die Real-time RT-PCR für insgesamt 80 Gliome durchgeführt. Die Serie bestand aus neun O II, zwei OA II, 25 AO III, elf AOA III, acht A II, sieben AA III, neun sGB IV und neun pGB IV. Als Kontrollgewebe wurden acht nicht neoplastisch veränderte Gehirnproben verwendet (s. 2.1.1) und deren Expressionswerte gemittelt (s. Abb. 22).

Die gemittelte relative Expression von *CGI69* in den Normalgehirnproben lag bei 0,26 (relativ zum Human Universal RNA-Standard). In drei Gliomen (4%) wurde eine auf 50% verminderte *CGI69*-Expression relativ zum Normalgewebe gefunden. Darunter fanden sich ein AO III, ein

AOA III und ein pGB IV. Eine um mehr als den Faktor 2 gesteigerte Expression relativ zum Normalhirngewebe wurde in 43 Tumorproben (54%) festgestellt, darunter 4/9 O II (44%), 1/2 OA II (50%), 17/25 AO III (68%), 6/11 AOA III (55%), 3/8 A II (38%), 5/7 AA III (57%), 4/9 sGB IV (44%) und 3/9 pGB IV (33%).

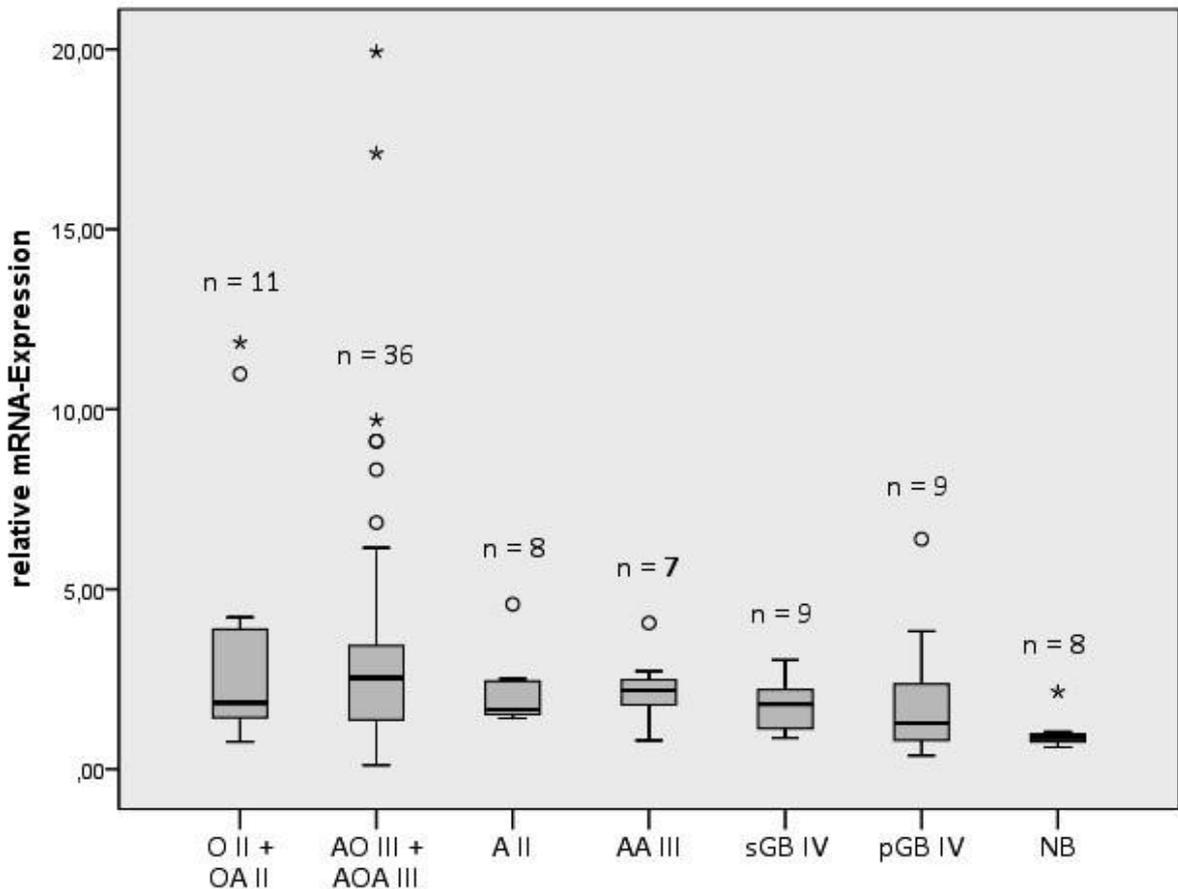


Abb. 22: Boxplot der *CG169* mRNA-Expression in den verschiedenen Tumorgruppen und in nicht-neoplastischem Hirngewebe (NB) relativ zum verwendeten Human Universal RNA-Standard.

Die Expressionswerte in den Tumoren mit oligodendroglialer Komponente waren tendenziell höher (n = 47, Mittelwert 3,91, Median 2,47) als die der astrozytären Tumoren (n = 33, Mittelwert 2,05, Median 1,76, Mann-Whitney-U-Test: p = 0,054). Der Vergleich der Gruppe mit (n = 20) und ohne kombinierten LOH1p/19q (n = 15) innerhalb des Kollektivs der AO III und AOA III zeigte keinen Expressionsunterschied (Mann-Whitney-U-Test: p = 0,908).

3.2.6 Korrelation der Ergebnisse der Methylierungsanalyse und der mRNA-Expression

Tab. 7 zeigt die Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung und der COBRA im Zusammenhang mit dem LOH 1p/19q-Status und dem Expressionsniveau. In der Tumorserie fanden sich in der COBRA zwölf unmethylierte und 65 methylierte Tumoren, für die die relative mRNA-Expression ermittelt werden konnte. Methylierte und unmethylierte Tumoren zeigten keinen wesentlichen Expressionsunterschied (Mittelwert 3,29 versus 2,34, Median 2,21 versus 1,56, Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,214$) (s. Abb. 23).

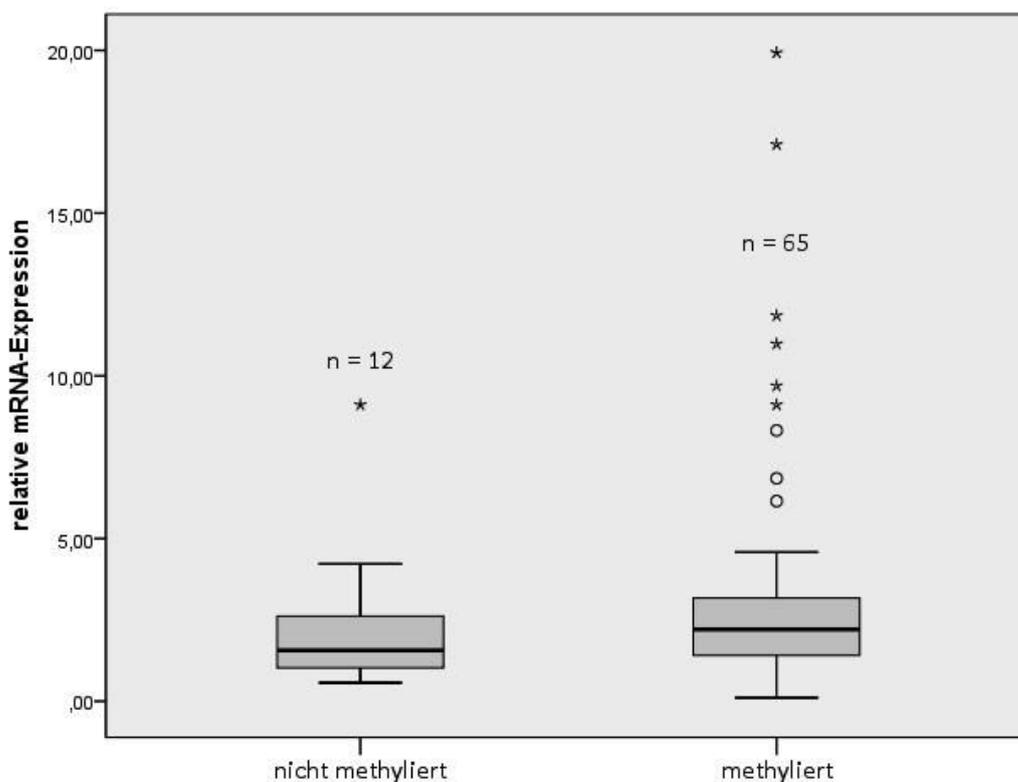


Abb. 23: Relative *CGI69* mRNA-Expression in nicht-methylierten und methylierten Tumoren. Die mRNA-Ergebnisse wurden mittels Real-time RT-PCR bestimmt, die Methylierungsergebnisse wurden mittels COBRA ermittelt (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,214$).

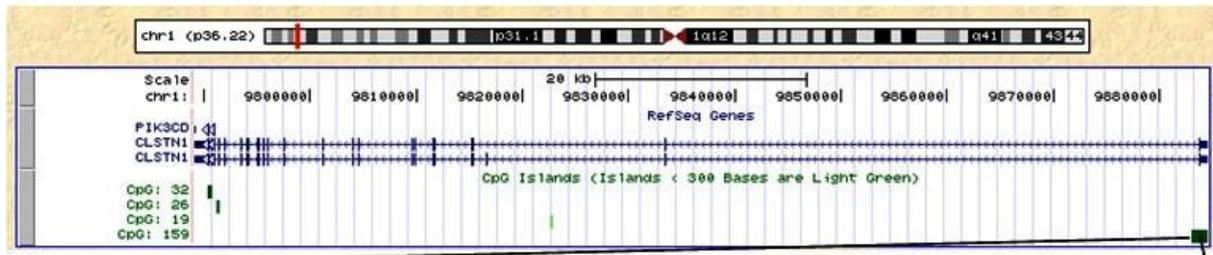
3.2.7 Überprüfung der prognostischen Bedeutung der Promotormethylierung und mRNA-Expression

Die prognostische Bedeutung der *CGI69*-Expression und der *CGI69*-Promotormethylierung wurde für die Gruppe der Patienten mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren (AO III und AOA III) untersucht. Die Gruppe der Tumoren mit einer um den Faktor >2 im Vergleich zum Normalhirngewebe gesteigerten Expression umfasste 22 Tumoren, in zehn Tumoren fand sich eine Expression von <2 in Relation zum Normalhirngewebe. Patienten mit Tumoren der Gruppe mit höherer *CGI69*-Expression überlebten durchschnittlich 2093 Tage (Median: 1730 Tage) nach Diagnosestellung, Patienten, deren mit Tumoren eine niedrigere *CGI69*-Expression aufwiesen 2946 Tage (Median: 3390 Tage, Log Rang: $p = 0,422$).

Im gesamten untersuchten Tumorkollektiv fand sich nur ein Tumor mit einer im Vergleich zum Normalhirngewebe auf unter 50% verminderten *CGI69*-Expression. Da die Tumoren von 33 der 36 Patienten mit AO III oder AOA III einen positiven *CGI69*-Promotormethylierungsstatus aufwiesen, war eine aussagekräftige Gruppenbildung für eine Kaplan-Maier-Analyse hinsichtlich der Überlebenszeitkorrelation nicht möglich.

3.3 Ergebnisse der molekularen Analysen des Calsyntenin 1 (*CLSTN1*)-Gens

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 24) zeigt zur Übersicht ein Piktogramm des *CLSTN1*-Gens und dessen Lokalisation auf Chromosom 1. Darunter ist der untersuchte, Natriumbisulfit-modifizierte Sequenzabschnitt mit den verwendeten Primern und den jeweiligen Schnittstellen der Restriktionsenzyme und den untersuchten CpG-Positionen dargestellt.



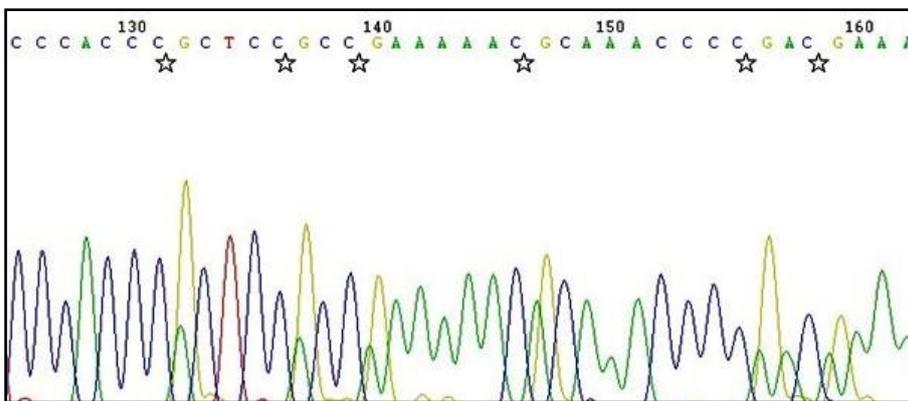
agagggggaggggttttttgtttttttatattCGgatttCGtatttttaagaattagtagtCG
tattatgttattgagaaagagCGCGtatattagtCGtttttgaaggtataaatagattttttta
gtgaatttaggatagatttttCGggggtaggttCGgggCGggagtCGgtgtgggtagtgttCGC
GgtttttaattgtttatttagCGCGtttCGttgatttCGtttttggatttttttCGtgattttt
tttaaatattttatggggagaCGaggattTCGAggttttgggggCGaCGCGatttgtTCG agt
gataagggttttgggtCGtattgttCGtCGgggtttgCGttttCGgCGgagCGggtgggaagga
tgagtttCGgggtggagaaggaggagCGggtttCGggtatCGtttattCGgttttaggagttCG
ggagCGCGCGtagggaCGCGgagttgaggtttttatttgCGgttagggaaagggatatagtttt
CGggttttttCGgtCGttCGgaatttatttaggCGCGtttCGCGgCGCGCGttttaggCGgg
gtCGaCGggttCGgaggCGCGCGttCGttgtCGggttCGtCGCGCGCGttttttCGtttttttt
ttCGttttttCGggttCGCGCGtttttagggttCGtCGCGCGCGCGttCGCGtCGtttttatt
ttCGttttttCGtCGttattCGttttCGgtCGggtattttCGtCGgattCGagagagagCGtCG
tCGttatttttagttgttgtCGttgttttagtaagaCGttgtttgaggCGgggagggCGtCGCGt
tttgagCGCGCGgtttagCGttaCGgCGgCGgCGgCGgttttttttggattttCGgagtttt
tCGCGtCGCGgagtagtttagtttaggttttagagtttCGagagtttCGagagtttCGttCGgCG
tttCGCGCGttttttgtCGttttCGtttCGggttggCGATGttgCGtCGtttCGtttCGCGttg

Abb. 24: Piktogramm von Chromosom 1 mit Darstellung des *CLSTN1*-Gens und den assoziierten CpG-Inseln (<http://genome.ucsc.edu;assembly> Feb.2009 (GRCh37/hg19)). Darunter Ausschnitt der untersuchten Promotorsequenz des *CLSTN1*-Gens nach Natriumbisulfit-Behandlung. Die CG-Dinukleotide sind als methyliert, also nicht konvertiert dargestellt. Alle CpGs sind unterstrichen dargestellt. Die Sequenzabschnitte mit grüner bzw. roter Schrift bezeichnen die Primer für die Natriumbisulfit-Sequenzierung (Fragmentgröße: 200 bp) mit 19 CpG-Positionen. Die grün bzw. rot hinterlegten Sequenzabschnitte bezeichnen die Primer für die COBRA (Fragmentgröße: 395 bp). Die gelb hinterlegten Sequenzabschnitte bezeichnen die Schnittstellen für *Bsh1236I*, die orange hinterlegten Sequenzabschnitte bezeichnen die Schnittstellen für *TaqI*. Das türkis hinterlegte ATG kennzeichnet den Transkriptionsstart von *CLSTN1*. Nach einem vollständigen Verdau ergeben sich folgende Fragmentgrößen: *Bsh1236I*: 66, 24, 94, 153, 10, 46 bp (Fragmentgröße näherungsweise, bedingt durch das CpG-Repeat CGCGCG und den daraus resultierenden unterschiedlichen Schnittmöglichkeiten), *TaqI*: 164, 29, 202 bp.

3.3.1 Natriumbisulfit-Sequenzierung

Die Natriumbisulfit-Sequenzierung der 5'-CpG-reichen Region von *CLSTN1* wurde für 38 Tumoren, sechs Normalgehirnproben und eine Methylase-behandelte Normalgehirnprobe als Positivkontrolle durchgeführt. Unter den Tumorproben waren sechs O II (5/6 methyliert), drei OA II (3/3 methyliert), 22 AO III (18/22 methyliert) und sieben AOA III (6/7 methyliert). Die Positivkontrolle war methyliert (s. exemplarisch Abb. 25 und Tab. 8).

a)



b)

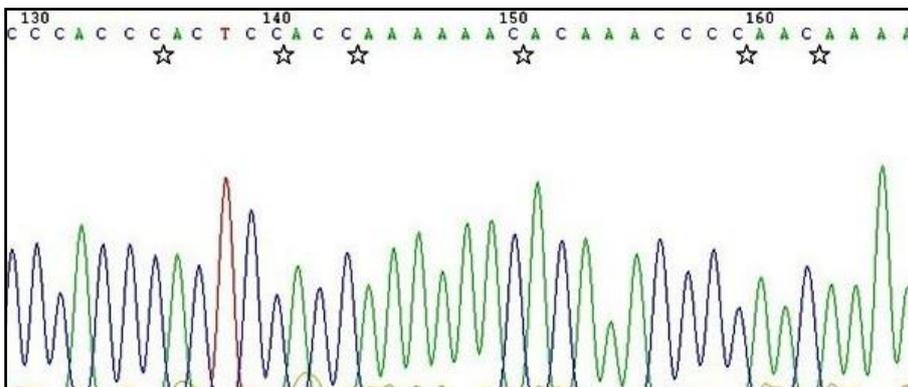


Abb. 25: Ausschnitte aus den Ergebnissen der Natriumbisulfit-Sequenzierung der 5'-CpG-reichen Region von *CLSTN1* eines methylierten AO III, (AO22) (a) und einer Normalgehirnprobe (b). Die CpG-Dinukleotide sind mit einem Stern markiert. In der Tumorprobe (a) sind die CpG-Dinukleotide methyliert, in der Normalgehirnkontrolle (b) dagegen nicht. Die Sequenzierung des reversen DNA-Strangs ist abgebildet.

Die Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung und der COBRA sind gemeinsam mit den Daten der Expressionsanalyse und dem LOH 1p/19q-Status in Tab. 8 angegeben.

Diag	Case PC	LOH 1p	LOH 19q	Meth.	Expr.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	Meth. %
O II	O23	+	+	+																					59,65
O II	O14	+	+	+																					61,4
O II	O15	+	+	+																					61,4
O II	O17	+	-	-																					14,04
O II	O18	+	+	+																					66,67
O II	O21	+	+	+																					56,14
OA II	OA2	-	+	+																					64,91
OA II	OA6	-	-	+																					54,39
OA II	OA1	+	+	+																					66,67
AO III	AO8	-	+	+																					52,63
AO III	AO11	-	-	-																					7,02
AO III	A17	-	-	+	n.a.																				33,33
AO III	AO18	+	+	+																					52,63
AO III	AO19	+	+	+																					71,93
AO III	AO24	-	-	+																					22,81
AO III	AO22	-	-	+																					35,09
AO III	AO20	+	-	-																					3,51
AO III	AO21	+	+	+																					56,14
AO III	AO25	+	+	-																					17,54
AO III	AO23	+	+	+																					66,67
AO III	AO26	+	+	+																					68,42
AO III	AO29	+	+	+	n.a.																				66,67
AO III	AO32	+	+	+	n.a.																				56,14
AO III	AO40	+	+	+																					64,91
AO III	AO35	+	+	+																					70,18
AO III	AO36	+	+	-																					3,51
AO III	AO37	+	+	+																					56,14
AO III	AO38	+	-	+																					63,16
AO III	AO39	+	+	+																					63,16
AO III	AO63	+	+	+																					59,65
AO III	AO84	+	+	+																					63,16
AOA III	AOA7	+	-	+																					33,33
AOA III	AOA12	+	+	+																					29,82
AOA III	AOA13	-	-	+																					59,65
AOA III	AOA14	+	+	+																					68,42
AOA III	AOA18	+	+	+																					70,18
AOA III	AOA44	-	-	-																					15,79
AOA III	AOA77	+	+	+																					68,42
NB	NB1				n.a.																				3,51
NB	NB2																								5,26
NB	NB3				n.a.																				5,26
NB	NB4				n.a.																				45,61
NB	NB5				n.a.																				7,02
NB	NB6				n.a.																				17,54
NB MB					+																				75,44

Tab. 8: Methylierungsmuster der 5'-CpG-Insel von *CLSTN1* in 38 Gliomen, sechs Normalhirngewebebeobachten und einer Methylase-behandelten Positivkontrolle (NB NB). Der Methylierungsstatus wurde mittels Natriumbisulfit-Sequenzierung an 19 CpG-Stellen wie unter 2.2.5 beschrieben erhoben. Neben den prozentualen Methylierungswerten sind zusätzlich die Ergebnisse der COBRA, die relative mRNA-Expression sowie der LOH-Status auf 1p und 19q (+ = Allelverlust, - = kein Allelverlust) angegeben.

3.3.2 Kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse (COBRA)

Die COBRA wurde für *CLSTN1* ebenfalls an der erweiterten Tumorserie von 87 oligodendroglialen und astrozytären Tumoren durchgeführt. Die Tumoren teilten sich folgendermaßen auf die verschiedenen Entitäten auf: elf O II, vier OA II, 25 AO III, elf AOA III, acht A II, neun AA III, neun sGB IV und zehn pGB IV. 64 Tumoren (74%) zeigten eine Methylierung des *CLSTN1*-Promotors (8/11 O II, 4/4 OA II, 20/25 AO III, 9/11 AOA III, 6/8 A II, 6/9 AA III, 7/9 sGB IV und 4/10 pGB IV) (s. Abb. 27). Abb. 26 zeigt exemplarisch Ergebnisse der COBRA.

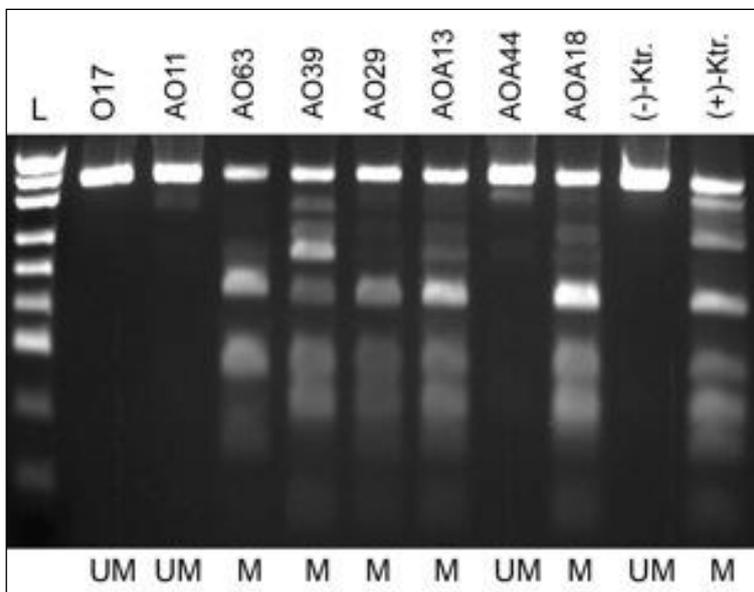


Abb. 26: Ausgewählte Ergebnisse der COBRA Analyse für *CLSTN1*. Methylierte DNA wurde entsprechend der unterschiedlich starken Promotormethylierung in bis zu sechs Fragmente geschnitten. Die unmethylierten Proben weisen dagegen nur ein ungeschnittenes PCR-Fragment auf. L, Längenstandard; M, methylierter Promotor mit geschnittenen PCR-Fragmenten; UM, unmethylierter Promotor mit ungeschnittenen PCR-Fragmenten.; (-)-Ktr., ungeschnittene Negativ-Kontrolle; (+)-Ktr., vollständig geschnittene, Sssl-behandelte Positiv-Kontrolle.

Tumoren mit oligodendroglialer Komponente (41/51, 80%) waren häufiger methyliert als astrozytäre Tumoren (23/36, 64%), wobei der Unterschied in der Häufigkeit statistisch nicht signifikant war (Exakter Test nach Fisher: $p = 0,138$). Die wenigsten methylierten Tumoren fanden sich unter den pGB IV (4/10, 40%). A II (6/8, 75%), AA III 6/9 (67%) und sGB IV (7/9, 78%) verhielten sich ähnlich. Auch zwischen den oligodendroglialen Tumoren

unterschiedlicher WHO-Grade bestand kein Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit der *CLSTN1*-Promotormethylierung (O II und OA II: 12/15, 80%; AO III und AOA III: 29/36, 81%).

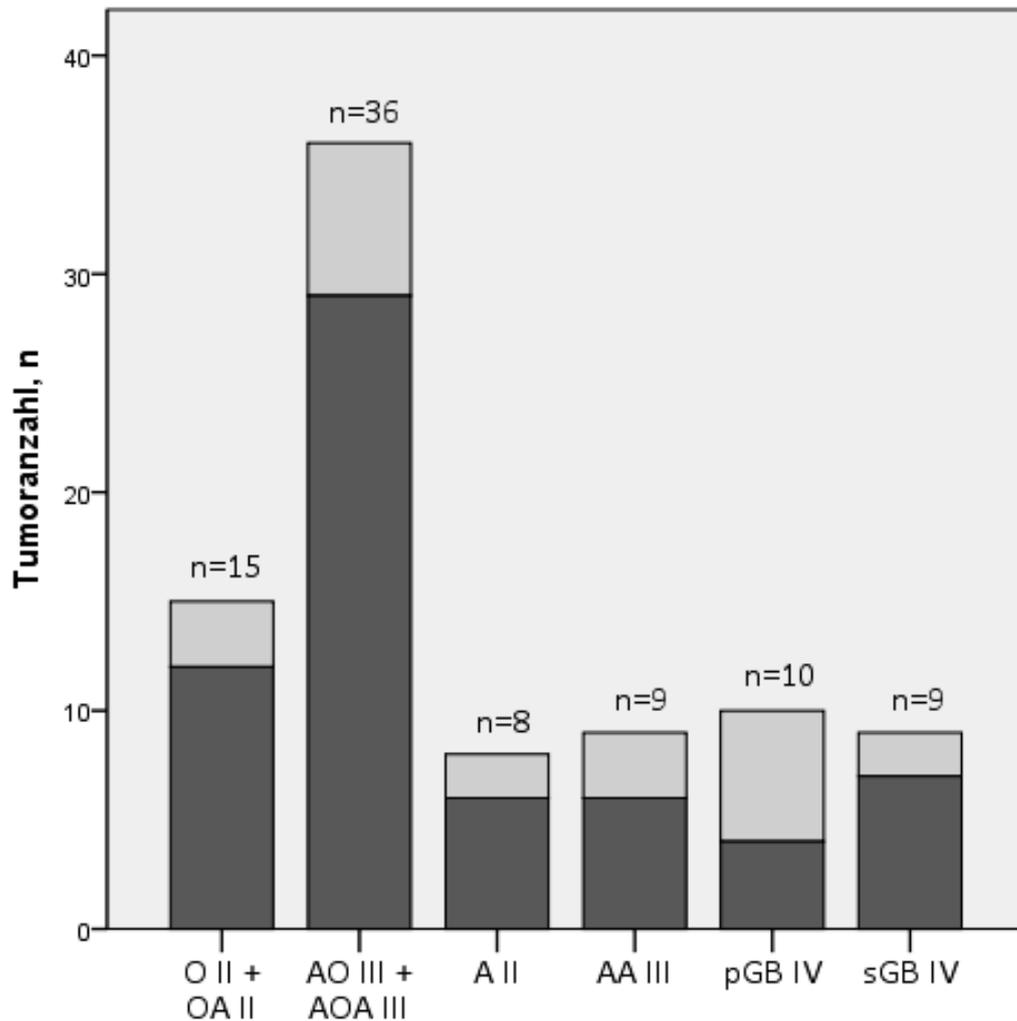


Abb. 27: Anzahl der *CLSTN1*-methylierten und unmethylierten Tumoren in den unterschiedlichen Diagnosegruppen. Dunkel dargestellt sind die Tumoren mit *CLSTN1*-Promotormethylierung. Die Gesamtzahl der in den einzelnen Gruppen untersuchten Patientenproben ist oberhalb der jeweiligen Balken angegeben.

AO III und AOA III mit kombiniertem Allelverlust auf 1p und 19q waren signifikant häufiger methyliert (19/20 (95%)) als Tumoren ohne LOH 1p/19q (9/15 (60%)) (Exakter Test nach Fisher: $p = 0,027$) (s. Abb. 28).

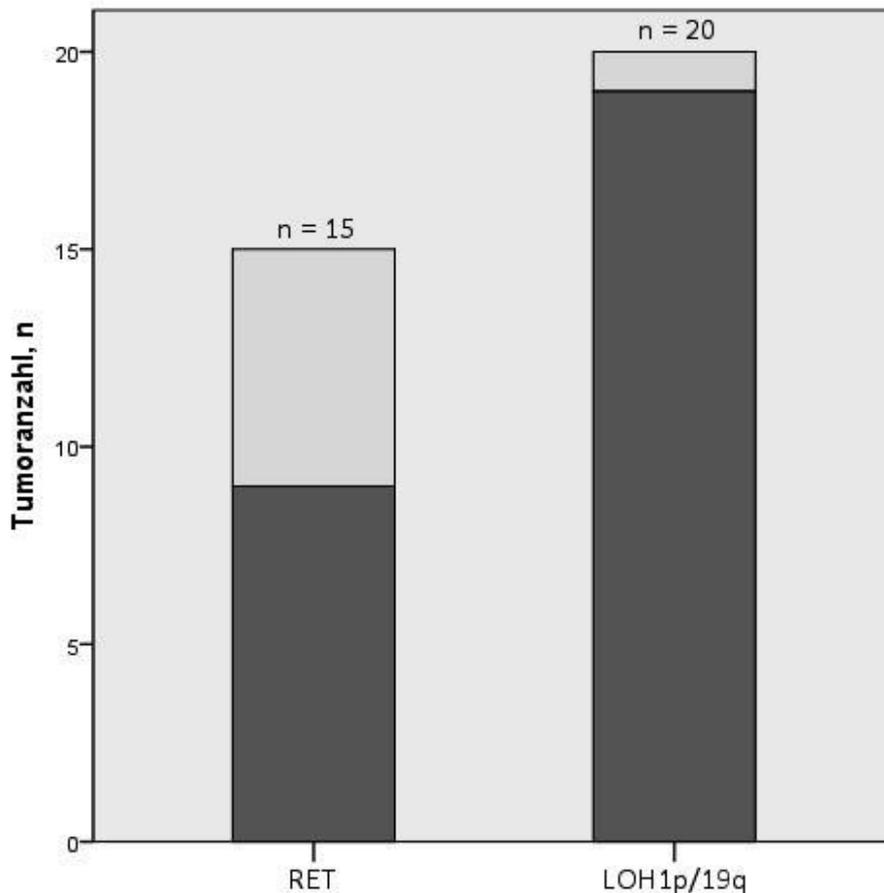


Abb. 28: Darstellung der Ergebnisse der COBRA für *CLSTN1* in AO III und AOA III, aufgeteilt nach Tumoren mit und ohne LOH 1p/19q. Exakter Test nach Fisher: $p = 0,027$. Dunkel dargestellt ist die Anzahl der Tumoren mit *CLSTN1*-Promotormethylierung. Die Gesamtzahl der in den beiden Gruppen untersuchten Patientenproben ist oberhalb der jeweiligen Balken angegeben.

3.3.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung und der COBRA

Insgesamt 38 Tumorproben wurden mittels beider Methoden auf *CLSTN1*-Promotormethylierung hin analysiert (sechs O II, drei OA II, 22 AO III und sieben AOA III). Beide Methoden zeigten zumeist konkordante Ergebnisse, allerdings waren sechs Tumoren in der Sequenzierung methyliert und in der COBRA unmethyliert, sowie *vice versa* fünf Proben in der Sequenzierung methyliert und der COBRA unmethyliert.

3.3.4 *CLSTN1*-Expressionsanalysen in Gliomzelllinien mit und ohne 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung

Bei *CLSTN1* stieg die Expression in den Zelllinien A172, U87MG und LN428 nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung an (s. Abb. 29). Im Vergleich zum Mittelwert der Normalgehirnproben (relative Expression 7,88 im Vergleich zum Universal Human RNA-Standard) war die Expression in den Zelllinien niedrig. Die Zelllinie A172 zeigte in der COBRA keine Methylierung der untersuchten *CLSTN1*-Promotorregion.

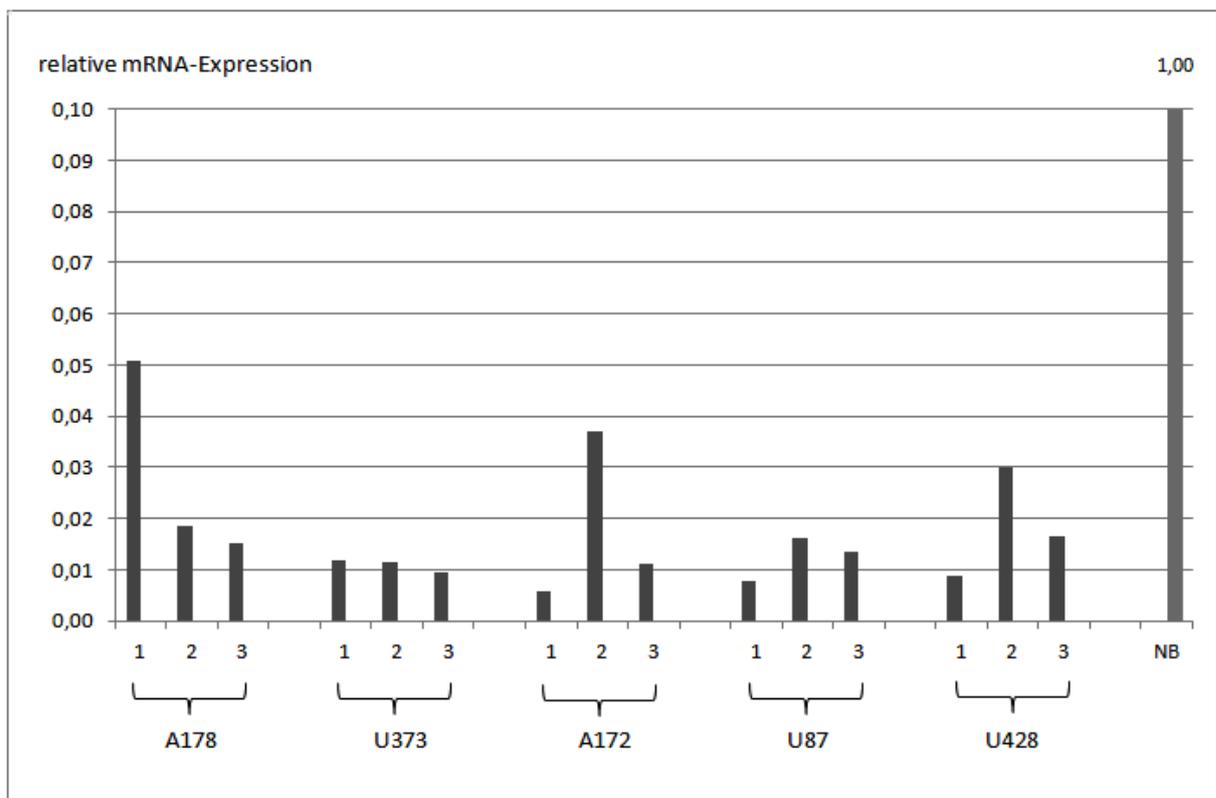


Abb. 29: Darstellung der Ergebnisse der Expressionsanalyse von *CLSTN1* in den Gliomzelllinien A178, U373MG, A172, U87MG, U428 vor und nach der Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin sowie in Normalgehirngewebe (dargestellt ist der Mittelwert aus sechs Gewebeprobe, Standardabweichung 0,18). Die Expressionsdaten basieren auf Ergebnissen der Real-time Reverse Transkriptase-PCR mit *ARF1* als Referenzgen. Die Zelllinien wurden entweder unter Standardbedingungen (1), oder unter zwei unterschiedlichen Behandlungsbedingungen, d.h. 0,5 μ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin (2) oder 1,0 μ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin (3), kultiviert.

3.3.5 mRNA-Expressionsanalyse

Eine *CLSTN1*-Expressionsanalyse wurde für insgesamt 85 Gliome durchgeführt. Darunter waren zehn O II, vier OA II, 23 AO III, elf AOA III, acht A II, neun AA III, neun sGB IV und elf pGB IV. Sechs nicht pathologisch veränderte Gehirnproben wurden als Kontrollgewebe verwendet (s. 2.1.1). Als Referenzgen wurde *ARF1* (s. 2.1.3 und 2.2.8) verwendet.

Der Mittelwert der relativen *CLSTN1*-Expression im Normalhirngewebe im Vergleich zu Universal Human RNA-Standard lag bei 7,88. Für die Tumorserie wurden die Expressionswerte in Relation zu diesem Mittelwert gesetzt. 63 Tumoren (74%) zeigten eine relativ zum Normalhirngewebe verminderte *CLSTN1*-Expression ($<0,5$). Darunter waren 5/10 O II (50%), 2/4 OA II (50%), 8/8 A II (100%), 17/23 AO III (74%), 6/11 AOA III (55%), 8/9 AA III (89%), 6/9 sGB IV (67%) und 11/11 pGB IV (100%). Acht Gliome zeigten eine gesteigerte relative Expression (>1 , 9%: 1/10 O II (10%), 1/4 OA II (25%), 4/23 AO III (17%) und 2/11 AOA III (18%)). Eine Überexpression ($>2,0$) zeigte ein AO III mit isoliertem Verlust auf 19q (relative Expression 2,53) (s. Abb. 30).

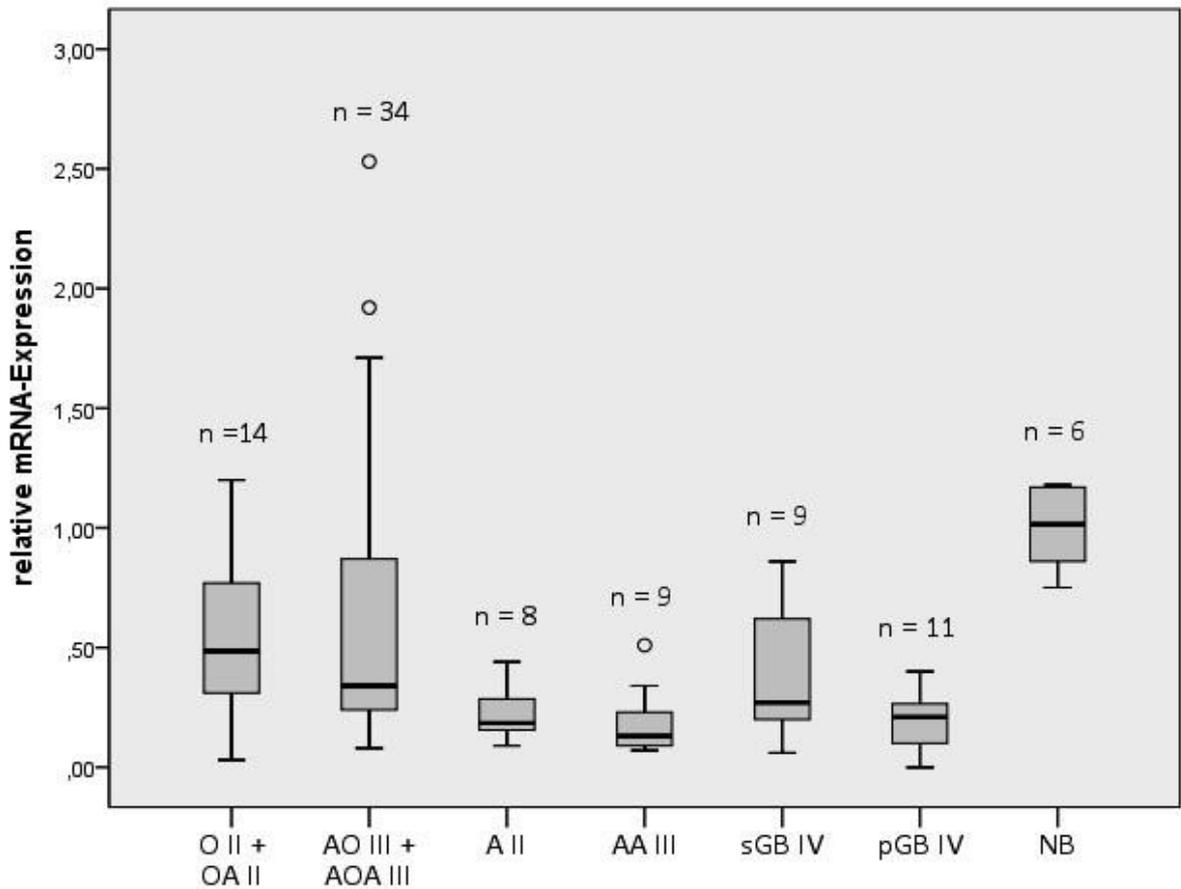


Abb. 30: Boxplot der relativen *CLSTN1*-mRNA-Expression in den verschiedenen Diagnosegruppen. Die Tumoranahl in den einzelnen Diagnosegruppen ist jeweils über den Balken angegeben.

Die Serie umfasste 37 astrozytäre Gliome und 48 Gliome mit oligodendroglialer Komponente. Oligodendrogliale Tumoren wiesen eine tendenziell etwas höhere relative mRNA-Expression im Vergleich zu astrozytären Tumoren auf (Mittelwert 0,247 versus 0,585, Mann-Whitney-U-Test: $p = 0.746$) (s. Abb. 31).

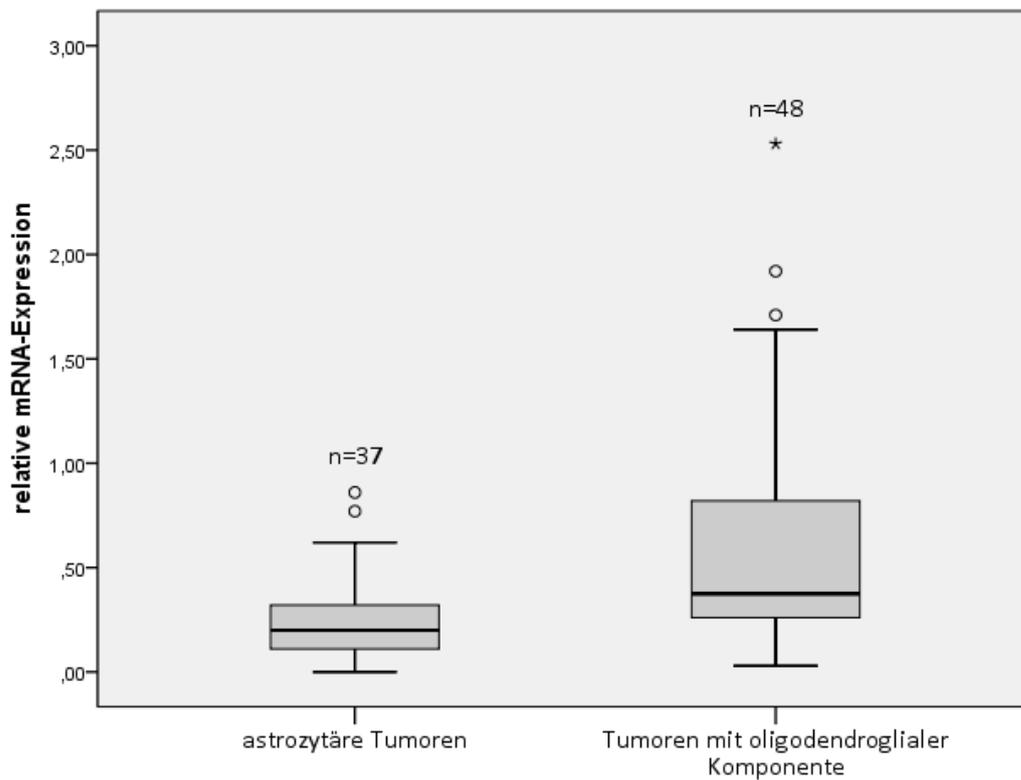


Abb. 31: Boxplot für die relative *CLSTN1*-Expression in astrozytäre Tumoren (n = 37) und Gliomen mit oligodendroglialer Komponente (n = 48) (Mann-Whitney-U-Test p = 0,746).

Die Expressionswerte für oligodendrogliale Tumoren mit und ohne LOH 1p/19q wurden vergleichend für das Kollektiv von AO III und AOA III analysiert (LOH 1p/19q, n = 19, kein LOH 1p/19q, n = 14). Die Expressionswerte zeigten keine signifikante Korrelation zum LOH 1p/19q-Status (Mann-Whitney-U-Test: p = 0,548). Im selben Tumorkollektiv wurden die *CLSTN1*-Expressionswerte für den einzelnen Allelverlust von 1p gesondert untersucht. Für Tumoren mit LOH 1p lag der Mittelwert bei 0,544, für Tumoren ohne LOH 1p lag der Mittelwert bei 0,693 (Mann-Whitney-U-Test: p = 0,428).

3.3.6 Korrelation der Ergebnisse der Methylierungsanalyse und der mRNA-Expression

Die Ergebnisse der Natriumbisulfit-Sequenzierung, der LOH 1p/19q-Status und die Ergebnisse der *CLSTN1*-Expressionsanalyse sind in Tab. 8 ersichtlich. Es gab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der relativen Expression zwischen *CLSTN1*-methylierten (n = 60, Mittelwert 0,448, Median 0,325) und -unmethylierten Tumoren (n = 22, Mittelwert 0,321, Median 0,235, Mann-Whitney U-Test: p = 0,051) (s. Abb. 32).

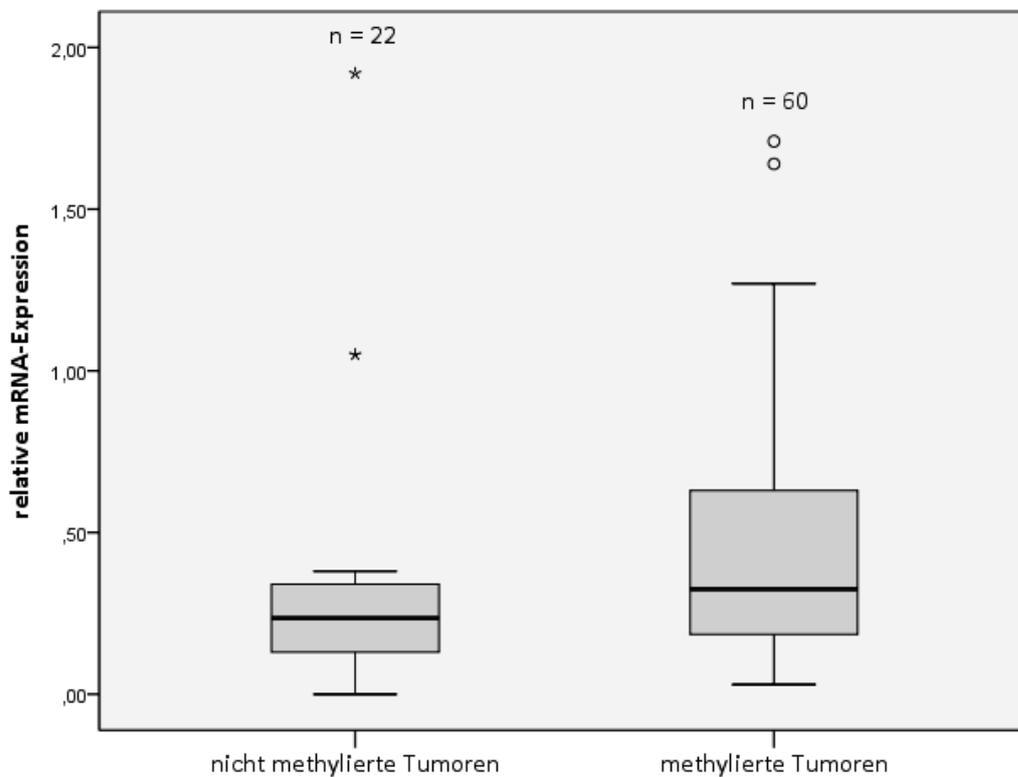


Abb. 32: Boxplot für die relative *CLSTN1*-Expression der *CLSTN1*-methylierten (n = 60) und *CLSTN1*-unmethylierten Gliome (n = 22, Mann-Whitney-U-Test: p = 0,051).

3.3.7 Überprüfung der prognostischen Bedeutung der *CLSTN1*-Promotormethylierung und mRNA-Expression in Gliomen

Die prognostische Bedeutung der relativen *CLSTN1*-Expression und der *CLSTN1*-Promotormethylierung im Kollektiv der Patienten mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren (AO III und AOA III) war nur sehr eingeschränkt beurteilbar, da die Tumoren mehrheitlich keine Promotormethylierung und eine herabgesetzte relative Expression aufweisen und somit eine aussagekräftige Gruppenbildung für eine Kaplan-Maier-Analyse nicht möglich war. Die Gruppe der Tumoren mit einer relativen Expression $>0,5$ umfasste elf Tumoren, 23 Tumoren zeigten eine relative Expression $<0,5$. Die Patienten der beiden Gruppen überlebten nahezu gleich lang (Mittelwerte: 1877 versus 1630 Tage, Mediane: 1414 versus 1632 Tage). Patienten, deren Tumoren einen unmethylierten *CLSTN1*-Promotor ($n = 6$) aufwiesen, zeigten ein tendenziell kürzeres Überleben als solche mit *CLSTN1*-Promotormethylierten Tumoren ($n = 27$) (Mittelwerte: 911 Tage versus 2206 Tage, Mediane: 492 Tage versus 1730 Tage).

4 Diskussion

4.1 Promotormethylierung und Genrepression

Eine aberrante Genfunktion und veränderte Genexpressionsmuster sind charakteristisch für Tumorzellen. Mutationen in Genen können zu spezifischen Vorteilen einer Zelle führen, für die in einer Zellpopulation selektiert wird. Dieses Prinzip lässt sich auch auf epigenetische Veränderungen übertragen. Veränderungen in der Genexpression, die durch epigenetische Veränderungen zustande kommen, können u.a. zu unkontrolliertem Wachstum und dadurch zu Tumorentstehung führen [26]. Die Hypermethylierung von CpG-reichen Promotoren stellt ein häufiges Charakteristikum menschlicher Neoplasien dar und kann zu einem *Gen-Silencing* auf transkriptioneller Ebene führen [121]. Änderungen der Methylierungsmuster von Promotoren können aber auch während des Alterns vorkommen [26]. Die mögliche Reversibilität von epigenetischen Veränderungen durch pharmakologische Beeinflussung macht die Epigenetik zu einem wissenschaftlich hoch interessanten Gebiet, auch für die Behandlung von bösartigen Tumorerkrankungen. So wurde das Medikament 5-Azacytidin, ein spezifischer Hemmer der DNA-Methylierung, bereits zugelassen [122].

Tumorentitäten scheinen jeweils bestimmte Methylierungsmuster aufzuweisen [123, 124]. In einer beträchtlichen Anzahl von Oligodendrogliomen wurden mehrere hypermethylierte Gene gefunden [125]. In letzter Zeit wurden in mehreren Tumorentitäten Gengruppen entdeckt, die konsistent hohe Methylierungsniveaus aufweisen. Der Terminus *CpG island methylator phenotype* (CIMP) beschreibt dieses Auftreten von tumorspezifischen globalen Veränderungen der DNA-Methylierung, die zur Hypermethylierung zahlreicher Gene in den Tumorzellen führt. In früheren Arbeiten wurde ein CIMP für Kolonkarzinome entdeckt, ein ähnliches Auftreten von Ansammlungen methylierter Promotoren wurde unter anderem auch in Gliomen beobachtet [67, 126]. Noushmehr *et al.* haben dieses Phänomen erneut für Gliome in den Focus gerückt, u.a. mit Identifizierung einer prognostisch besonders günstigen Tumorgruppe, worauf aber noch später eingegangen wird [67].

In dieser Arbeit wurden die Gene *ADM*, *CGI69* und *CLSTN1* auf Promotormethylierung und veränderte Genexpression und deren Korrelation zueinander, sowie auf ihre klinische, d.h.

prognostische Bedeutung in Patienten mit Gliomen hin untersucht. Dabei wurden hinsichtlich der Promotormethylierung zwei unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Promotormethylierungsstatus verwendet. Zunächst wurde die Direktsequenzierung von Natriumbisulfit-behandelter DNA angewandt, um mögliche *Hot-Spot*-Regionen zu identifizieren. Zusätzlich wurde an einer erweiterten Tumorserie die COBRA-Methode verwendet. Diese ermöglichte die Bestimmung der Promotormethylierung an einer größeren Anzahl von Tumoren und ist weniger zeit- und kostenaufwendig. Für die hier untersuchten drei Gene fanden sich weitgehend konkordante Ergebnisse für die beiden Methoden. Einzelne Diskrepanzen bzgl. des Methylierungsstatus sind durch die methodischen Unterschiede und die unterschiedlichen untersuchten Sequenzabschnitte zu begründen.

4.2 Adrenomedullin (ADM)

ADM (11p15.4) ist ein pluripotentes regulatorisches Peptid [127]. Es wurde 1993 durch Kitamura *et al.* aus einem Phäochromozytom isoliert und als Peptid identifiziert, das die Adenylylcyclase stimuliert und *in vivo* als Vasodilatator wirkt [128]. Es wird in endokrinen Geweben, Leber, Thymus, Milz, Binde- und Stützgeweben und im zentralen Nervensystem exprimiert [127, 129]. Dem Peptid werden verschiedene Funktionen zugeschrieben: Beeinflussung der kardiovaskulären Spannung, Bronchoelastizität, Hormonfreisetzung, der renalen Ausscheidung, Apoptose, Angiogenese, Zellwachstum und Immunantwort im Sinne einer Makrophagen-inhibierenden Wirkung und einer Hemmung der Komplementkaskade. Diese Funktionen sind notwendig für Prozesse, die durch prominentes Zellwachstum charakterisiert sind, so wie Embryogenese, Wundheilung und Karzinogenese [127].

ADM konnte in weiten Teilen des zentralen Nervensystems durch immunhistochemische Techniken lokalisiert werden, so auch in manchen Gefäßendothelzellen und perivaskulären Gliazellen. Seine Expression ist in kortikalen Neuronen und Endothelzellen erhöht [129].

Martinez *et al.* stellten hohe ADM-Expressionslevel im Epithel von Luftwegen, Krebszelllinien und Tumoren aus dieser Region fest [130]. In vielen epithelialen Tumoren besteht ein vermindertes Sauerstoffangebot. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu sehen, dass das Peptid ADM und mehrere seiner Rezeptoren bei einem ischämischen Insult vermehrt

exprimiert werden. Eine Reihe neuraler und epithelialer Tumoren exprimieren große Mengen an ADM, im Serum wurden mit dem Auftreten einer malignen Erkrankung erhöhte Spiegel gemessen und diese erhöhten Spiegel schienen mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet zu sein [127].

Zu epigenetischen Veränderungen von *ADM* finden sich derzeit noch keine Untersuchungen. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde festgestellt, dass in oligodendroglialen Tumoren die *ADM*-Promotorregion signifikant häufiger methyliert war als in astrozytären Tumoren (Exakter Test nach Fisher: $p = 0,019$). Methylierte Tumoren exprimierten *ADM* tendenziell geringer als nicht methylierte Tumoren (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,162$). Diese Beobachtung könnte im Zusammenhang mit der in niedriggradigen Tumoren geringeren *ADM*-Expression im Sinne einer Repression durch Methylierung stehen. Jedoch waren die Normalgehirnproben ebenfalls unmethyliert, gleichzeitig zeigten sie aber eine sehr niedrige *ADM*-Expression, sodass auch alternative Regulationsmechanismen zu diskutieren sind, auf die noch später eingegangen wird.

Um den möglichen funktionellen Effekt einer demethylierenden Behandlung auf die Genexpression zu untersuchen, wurde die *ADM*-Expression in den Zelllinien A178, U373MG, A172, U87MG und LN428 vor und nach der Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-Deoxycytidin ermittelt. Drei der fünf Zelllinien, A178, U373MG und A172, zeigten einen Expressionsanstieg, wie er auch in einer Studie von Ouafik *et al.* nachgewiesen werden konnte [131]. Mit Ausnahme der Zelllinie LN428 exprimierten aber alle Zelllinien *ADM* um ein Vielfaches höher als die Zellen des Normalgehirngewebes, in dem in eigenen Untersuchungen praktisch keine *ADM*-Expression nachweisbar war. Ouafik *et al.* berichteten ebenfalls über erhöhte Level an *ADM*-mRNA in menschlichen Glioblastomzelllinien. Die Zelllinien setzten zudem immunreaktives ADM ins Kulturmedium frei [131]. Die *ADM*-Promotoren in den unbehandelten Zelllinien erwiesen sich zudem in den Methylierungsanalysen als unmethyliert, was zu einer fehlenden *ADM*-Methylierung in den meisten primären Glioblastomen passt. Trotzdem kam es durch die Behandlung mit dem demethylierenden Agens zu einer Expressionszunahme, so dass hier zusätzliche, indirekte Regulationsmechanismen angenommen werden müssen und die transkriptionelle Regulation von *ADM* in Glioblastomzellen offenbar nicht über eine differentielle Methylierung des *ADM*-Promotors erklärbar ist. Es wäre z.B. möglich, dass nicht die

Demethylierung des *ADM*-Promotors selbst verantwortlich für den expressionssteigernden Effekt ist, sondern möglicherweise ein vorgeschalteter, ehemals methylierter Transkriptionsfaktor, der dann an den *ADM*-Promotor bindet und zu einem Expressionsanstieg führt. Dies lässt sich in den hier durchgeführten Experimenten nicht weiter differenzieren.

ADM wird in mehreren Tumorentitäten, zum Beispiel klarzelligem Nierentumoren und in Krebszellen von Lunge, Kolon, Brust, Ovar, Prostata, Knorpel und Knochenmark hoch exprimiert. Seine Wirkung wird über seine Rezeptoren *Calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein 2 und 3* (CLR/RAMP2 und CLR/RAMP3) vermittelt. *In vitro* stimuliert *ADM* über diese Rezeptoren Zellproliferation, -migration und -invasion [132, 133]. Mit dem Auftreten einer malignen Erkrankung wurden erhöhte Serum-*ADM*-Spiegel nachgewiesen, diese waren mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet. Ouafik *et al.* korrelierten Tumortyp und -grad mit der *ADM*-Expression [131]. Sie fanden hohe Expressionslevel in allen untersuchten GB IV, niedrige Expressionslevel in AA III und kaum detektierbare Level in A II und O II. Sie zeigten auch, dass den Zellkulturen zugefügtes *ADM* eine stimulierende Wirkung auf das *in vitro*-Wachstum von Glioblastomzellen hat. *ADM* könnte also für Glioblastomzellen einen Wachstumsfaktor darstellen [131]. Boudouresque *et al.* untersuchten ebenfalls durch Real-time RT-PCR die Expression von *ADM* in Gliomen unterschiedlicher Grade und bestätigten die hohen Expressionslevel in GB IV, die niedrigeren Level in AA III und die kaum nachweisbaren Expressionsniveaus in niedriggradigen Astrozytomen und Oligodendrogliomen [134]. Auch in den eigenen Untersuchungen wurde eine erhöhte *ADM*-Expression in glialen Tumoren im Vergleich zum Normalhirngewebe, welches *ADM* kaum exprimiert, beobachtet. Die *ADM*-Expression der Gruppe der astrozytären Tumoren war signifikant höher als die der Tumoren mit oligodendroglialer Komponente (Mann-Whitney U-Test: $p = 0,001$). Wie auch in den Studien von Ouafik *et al.* [131] und Boudouresque *et al.* [134] beschrieben, bestand hier ein Zusammenhang von Tumorgrad und *ADM*-Expression innerhalb der Gruppe astrozytärer Tumoren. Die relative Expression stieg von den A II über die AA III zu den pGB IV an. Auffällig ist, dass während der Progression der astrozytären Tumoren die Expression zunächst von A II zu AA III anstieg, sie jedoch bei sGB IV wieder absank. Dies kann möglicherweise auf eine stärkere interindividuelle Schwankungsbreite innerhalb der hier untersuchten, relativ kleinen

Kollektive zurückzuführen sein. Insgesamt weisen die Ergebnisse auf eine progressionsassoziierte Veränderung hin.

Die Expressionszunahme von *ADM* im Rahmen des untersuchten Tumorkollektivs kann über seine oben beschriebene Funktion als sog. Onkogen erklärt werden. Auch die weitgehend fehlende Expression in den Normalgehirnproben deckt sich mit den Ergebnissen vorheriger Studien. Weitere onkogene Eigenschaften von *ADM* lassen sich aus einer Arbeit von Cuttitta *et al.* ableiten [127]. Hier konnte gezeigt werden, dass *ADM* bei Hypoxie hochreguliert wird, ein Zustand, der wichtig sein kann für Tumorwachstum, da eine hohe Expression von *ADM* der Tumorzelle einen Überlebensvorteil durch die Verbesserung ihrer nutritiven Versorgung verschaffen könnte [127]. Ji und Xue wiesen auf eine zytoprotektive Funktion von *ADM* im zentralen Nervensystem während ischämischer Zustände hin [135]. Wahrscheinlich wirkt *ADM* an zerebralen Blutgefäßen perfusionsregulierend [136]. Zudem wird *ADM* eine immunsuppressive Wirkung zugesprochen, zum Beispiel soll *ADM* Makrophagen hemmen und einen negativ regulatorischen Effekt auf die Komplement-Kaskade haben. Dies könnte folglich die Tumorzelle in die Lage versetzen, der Immunosurveillance zu entkommen [127].

Letztlich bleibt auffällig, dass es grundsätzlich einen Unterschied im Methylierungsstatus des in den eigenen Untersuchungen analysierten 5'-CpG-reichen Abschnittes von *ADM* zwischen Normalgehirn- und Tumorgewebe gibt, was einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen *ADM*-Promotormethylierung und Malignität geben könnte. Aufgrund der eigenen Untersuchungen scheint jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression von *ADM* in humanen Gliomen zu bestehen. Wie weiter oben bereits diskutiert, können somit auch andere Mechanismen für eine aberrante Regulation der *ADM*-Expression in Gliomen verantwortlich sein. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass die begrenzte Fallzahl der hier untersuchten Tumoren die fehlende Signifikanz der Expressionsunterschiede mitbedingt. An diesem Punkt wären weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv notwendig.

In den Vorarbeiten war *ADM* als hypermethyliert in Tumoren mit kombiniertem Allelverlust auf 1p und 19q aufgefallen. Es wurde bereits in zahlreichen Studien festgestellt, dass das Vorliegen eines kombinierten LOH 1p/19q in oligodendroglialen Tumoren mit einer besseren Prognose assoziiert ist [39]. Wie oben erwähnt, waren hohe *ADM*-mRNA-Spiegel in

vorangegangenen Studien mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet [127]. Dies lässt sich mit der hier gefundenen niedrigeren *ADM*-Expression in Tumoren mit LOH 1p/19q vereinbaren. Weiterhin zeichnete sich eine leicht längere Überlebenszeit für Tumoren mit niedriger Expression innerhalb des eigenen Patientenkollektivs mit AO III und AOA III ab. Die Überlebenszeit der Patienten mit positivem *ADM*-Methylierungsstatus war hingegen signifikant länger als bei negativem (Log Rang-Test: $p = 0,005$). Während die erhöhte *ADM*-Expression also entgegen den Beobachtungen von Cuttitta *et al.* [127] in dem hier untersuchten Gliomkollektiv keine deutliche prognostische Bedeutung zu haben scheint, scheint die *ADM*-Promotormethylierung mit einer signifikant längeren Überlebenszeit von Patienten mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren assoziiert zu sein.

4.3 Solute Carrier Family 25 Member 39 (CGI69)

CGI69 (Alias: SLC25A39, 17q21.31) ist ein bislang noch wenig charakterisiertes Gen, zu dem es in der gegenwärtigen Literatur kaum Untersuchungen gibt. Kürzlich entdeckten Nilsson *et al.* [137] *CGI69* als essentiellen Faktor in der Hämbiosynthese. Es stellt einen möglichen mitochondrialen Transporter dar. Ein *Knockdown* in Zebrafischen führte in dieser Studie zu einer schweren Anämie. Ein *Gen-Silencing* in murinen Erythroleukämiezellen störte die Eiseninkorporation in Protoporphyrin IX. Säugetier-orthologe Hefen mit deletiertem *CGI69* zeigten einen Eisenhomöostasedefekt [137].

CGI69 gehörte in den Vorarbeiten zu den in Tumoren mit kombiniertem LOH 1p/19q als hypermethyliert ermittelten Genen. In der Natriumbisulfit-Sequenzierung wurden 38 oligodendrogliale Tumoren untersucht, in allen war eine Promotormethylierung vorhanden. In der erweiterten Serie, die mittels COBRA untersucht wurde, waren 73 von 87 Tumoren (84%) methyliert. Insgesamt fällt der sehr hohe Methylierungsanteil von *CGI69* in Gliomen auf. Im Kollektiv der AO III und AOA III zeigten, wie nach den Ergebnissen der Vorarbeiten zu erwarten war, Tumoren mit kombiniertem Allelverlust auf 1p und 19q tendenziell häufiger eine methylierte Promotorregion als Tumoren ohne diese Allelverluste (Exakter Test nach Fisher: $p = 0,070$). Bezüglich der Methylierungsanalyse fiel außerdem auf, dass Tumoren mit oligodendroglialer Komponente häufiger methyliert waren als astrozytäre Tumoren (Exakter Test nach Fisher: $p = 0,018$).

Durch die demethylierende Behandlung von Gliomzellen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin stieg die *CGI69*-Expression in vier von fünf Zelllinien (A178, U373MG, A172 und LN428) an, wobei für die Zelllinie A172 eine Methylierung des *CGI69*-Promotors nachgewiesen werden konnte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Methylierung einen supprimierenden Einfluss auf die relative Expression haben könnte, wobei eine signifikante Korrelation zwischen Methylierung und Expression in der hier untersuchten Tumorserie nicht nachgewiesen werden konnte. Bezüglich des WHO-Grads und dem LOH 1p/19q-Status ergaben sich keine *CGI69*-Expressionsunterschiede im Subkollektiv der oligodendroglialen Tumoren.

Innerhalb des Kollektivs von AO III und AOA III waren fast alle Tumoren methyliert (33/36 Tumoren, 92%). Deshalb waren ein Vergleich der Expression sowie eine Korrelation zur Überlebenszeit der Patienten für diese beiden Gruppen nicht aussagekräftig. Allerdings scheint die *CGI69*-Promotormethylierung einen positiven Effekt auf die Prognose zu haben. Die Gruppe der nicht methylierten Tumoren ist jedoch mit nur drei von 36 Tumoren zu klein, um eine solche Aussage machen zu können. Hier wären Untersuchungen an einem vergrößerten Patientenkollektiv notwendig.

Aufgrund der eigenen Untersuchungen konnten für *CGI69* gewisse Anhaltspunkte generiert werden, die zu einem Tumorsuppressorgen passen würden. So gab es in den Zelllinienexperimenten Hinweise darauf, dass sich die Expression durch eine Behandlung mit einem demethylierenden Agens erhöhen lässt. Allerdings fand sich kein Zusammenhang zwischen Promotormethylierung und Expression im untersuchten Tumorkollektiv. Die fehlende Korrelation zwischen Methylierung und Expression könnte an den bereits oben diskutierten alternativen Regulationsmechanismen, aber auch an dem relativ kleinen Tumorkollektiv liegen. Zudem besteht das Problem der von Fall zu Fall unterschiedlichen Kontamination des Tumorgewebes mit normalen Zellen, wie Mikrogliazellen, Lymphozyten, reaktive Astrozyten oder Gefäßzellen. Insofern bleibt die Bedeutung hinsichtlich der Gliompathogenese offen. Hier müssten sich Untersuchungen an einem vergrößerten Kollektiv bzw. funktionelle Untersuchungen *in vitro* anschließen.

4.4 Calsyntenin (CLSTN1)

CLSTN1 oder Calsyntenin ist ein Transmembranprotein, welches sich in der postsynaptischen Membran von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen befindet. Es besitzt unter anderem zwei Cadherin-Domänen, denen eine Zelladhäsionsaktivität zugesprochen wird. *CLSTN1* ist auch unter dem Synonym *Non-classical cadherin XB31 alpha1* bekannt und liegt innerhalb einer umschriebenen Kandidatenregion für Oligodendrogliome auf 1p36.22 [138]. Die gestörte Funktion von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen spielt eine Rolle in der Fähigkeit von Tumorzellen zur Gewebsinvasion und Metastasierung. CLSTN1 bindet u.a. Calcium mit seiner zytoplasmatischen Domäne [139]. Konecna *et al.* zeigten, dass Calsyntenin-1 direkt mit der leichten Kette von Kinesin-1 (KLC1) interagiert und damit eine Rolle im axonalen Transport spielt [140].

Fransson *et al.* untersuchten Neuroblastome verschiedener Grade mit 1p-Deletion und solche mit intaktem 1p bezüglich der *CLSTN1*-Expression. Sie konnten signifikant niedrigere *CLSTN1*-Expressionslevel in Tumoren mit LOH 1p zeigen, es wurden allerdings keine kompletten Expressionsverluste gefunden [141]. Ebenso berichtete eine Studie von Janoueix-Lerosey *et al.*, dass Neuroblastome mit 1p-Verlust eine verminderte *CLSTN1*-Expression aufweisen [142]. Es wurden bereits epigenetische Untersuchungen bezüglich des Methylierungsstatus von *CLSTN1* in Prostatakarzinomen von Kwabi-Addo *et al.* durchgeführt, die eine signifikant höhere Methylierung in Tumorzellen im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe ergaben [143, 144].

Auch in den eigenen Untersuchungen waren die *CLSTN1*-Promotoren der Tumoren in 74% der Fälle methyliert. In den Vorarbeiten war *CLSTN1* als stärker methyliert in Tumoren mit LOH 1p/19q aufgefallen. In dem hier untersuchten Kollektiv der AO III und AOA III ließ sich diese Beobachtung bestätigen (Exakter Test nach Fisher: $p = 0,027$). Im Vergleich der oligodendroglialen mit den astrozytären Tumoren zeigte sich in der COBRA eine tendenziell stärkere Methylierung in den oligodendroglialen Tumoren (Exakter Test nach Fisher: $p = 0,138$). Um eine mögliche funktionelle Bedeutung der Methylierung zu untersuchen, wurden in den Gliomzelllinien A178, U373MG, A172, U87MG und LN428 die Expressionsniveaus vor und nach der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von 5-Aza-2'-Deoxycytidin gemessen. Die Zelllinien A172, U87MG und LN428 zeigten einen Expressionsanstieg nach der Behandlung. Dies ist ein Hinweis auf eine methylierungsbedingte Hemmung der *CLSTN1*-

Expression in den unbehandelten Zellen. Insgesamt war die relative Expression in den unbehandelten Zelllinien um ein Vielfaches geringer als in den Normalhirngewebebeobachtungen, was auf eine Tumorsuppressoren-Eigenschaft von *CLSTN1* hindeutet. Ähnlich verhielt es sich mit den Proben der Tumorserie. 74% der Tumoren zeigten eine verminderte Expression im Vergleich zum Normalhirngewebe.

Bei der Korrelation von *CLSTN1*-Promotormethylierungsstatus mit der mRNA-Expression gab es keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney U-Test: $p = 0,051$). Dies ist in Befund, der wiederum gegen den klassischen Pathomechanismus einer verminderten Expression durch Promotormethylierung spricht und an alternative Regulationsmechanismen denken lässt.

Zwischen dem LOH1p/19q-Status und der *CLSTN1*-Expression bestand im untersuchten Kollektiv der AO III und AOA III kein Zusammenhang (Mann-Whitney U-Test: $p = 0,548$). Da Fransson *et al.* für Neuroblastome verschiedener Grade mit 1p-Deletion und solche mit intaktem 1p signifikante Unterschiede in der *CLSTN1*-Expression zeigen konnten [141] und Janoueix-Lerosey *et al.* ebenfalls eine verminderte *CLSTN1*-Expression in Neuroblastomen mit 1p-Verlust vorfanden [142], wurde in der eigenen Arbeit dieser einzelne Allelverlust im Kollektiv der AO III und AOA III noch einmal gesondert betrachtet. Zu beachten ist jedoch, dass im Vergleich zu den Untersuchungen bezüglich des kombinierten Allelverlusts von 1p und 19q nur drei Tumoren zu den Berechnungen hinzukamen. Tendenziell war die Expression bei Tumoren mit LOH 1p höher, ohne dass hier jedoch ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,428$). Die Ergebnisse der genannten Studien konnten also für Gliome in der eigenen Serie nicht bestätigt werden.

Bezüglich der prognostischen Bedeutung ergaben sich für *CLSTN1*-Expression und -Promotormethylierung keine signifikanten Beziehungen zum Gesamtüberleben von Patienten mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren, jedoch war das auf Methylierung hin untersuchte Patientenkollektiv letztlich zu klein, um mögliche Unterschiede mit Signifikanz abbilden zu können.

4.5 Schlussfolgerung

Die in Vorarbeiten zu dieser Promotionsarbeit gefundene aberrante Promotormethylierung der drei Kandidatengene *ADM*, *CGI69* und *CLSTN1* konnte erfolgreich validiert werden. In dieser Arbeit wurde erstmals die Bedeutung der Promotormethylierung von *ADM* in Gliomen untersucht. Das *ADM*-Gen zeigt in glialen Tumoren eine verstärkte Promotormethylierung im Vergleich zum Normalhirngewebe. Zusätzlich findet sich eine deutlich häufigere Promotormethylierung in oligodendroglialen Tumoren im Vergleich zu astrozytären Tumoren. Besonders interessant ist, dass anaplastische oligodendrogliale Tumoren eine signifikant günstigere Prognose aufwiesen, wenn der *ADM*-Promotor methyliert war. Ein signifikanter Zusammenhang der *ADM*-Promotormethylierung mit der mRNA-Expression ließ sich jedoch nicht nachweisen. Die hier nachgewiesene im Vergleich zu normalem Hirngewebe erhöhte mRNA-Expression im Tumorgewebe und die Daten der Literatur weisen insgesamt eher auf onkogene Eigenschaften von *ADM* hin.

Auch für *CGI69* wurde in dieser Arbeit erstmals eine häufige Promotormethylierung an einer größeren Serie von Gliomen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass oligodendrogliale Tumoren und insbesondere diejenigen mit kombinierten Allelverlusten auf 1p und 19q häufiger eine *CGI69*-Promotormethylierung aufweisen als oligodendrogliale Tumoren ohne diese Verluste bzw. astrozytäre Tumoren. In den Zelllinienexperimenten ließ sich durch die demethylierende Behandlung eine Zunahme der Expression nachweisen, was für eine epigenetische Regulation von *CGI69* spricht. Die Methylierung des *CGI69*-Promotors scheint zudem tendenziell einen positiven Einfluss auf die Prognose zu haben, wobei dieser Zusammenhang in der eigenen relativ kleinen Patientenkohorte statistisch nicht signifikant war. Eine signifikante Assoziation mit der mRNA-Expression war auch für *CGI69* nicht nachweisbar, was auf alternative Regulationsmechanismen hinweist, wie bereits ausführlich diskutiert.

Wie schon für *ADM* und *CGI69* konnte für *CLSTN1* die in den Vorarbeiten in Tumoren mit LOH 1p/19q verstärkte Promotormethylierung bestätigt werden. Auch hier ließ sich die *CLSTN1*-Expression in Zelllinien durch demethylierende Behandlung steigern. Zudem fand sich eine deutlich erhöhte Expression in Tumorzellen im Vergleich zum Normalhirngewebe, sowohl in den Zelllinien als auch in primären Gliomen. Methylierte Tumoren zeigten jedoch niedrigere Expressionsraten als unmethylierte. *CLSTN1* zeigte also

ebenfalls kein klassisches Tumorsuppressorgen-Verhalten, auch wenn einige Ergebnisse auf eine Funktion als Tumorsuppressorgen hinweisen.

Für die untersuchten Gene müssen also alternative Regulationsmechanismen in Betracht gezogen werden. Es konnte bereits vor längerem gezeigt werden, dass ein großer Teil der Oligodendrogliome eine gleichzeitige Hypermethylierung von mehreren Genen aufweist [26]. Deshalb könnte ein genereller Defekt in der Regulierung der DNA-Methylierung zugrunde liegen [46]. Eckhardt *et al.* führten ein DNA-Methylierungs-Profilung der Chromosomen 6, 20 und 22 durch. 17% der 873 analysierten Gene waren differenziell methyliert und nur etwa ein Drittel dieser Gene zeigte eine inverse Korrelation zwischen Methylierung und Transkriptlevel [145]. Ein Befund, der auch die in dieser Arbeit fehlende signifikante Korrelation zwischen Promotormethylierung und mRNA-Expression unterstützt.

Alle drei Gene zeigten in oligodendroglialen Tumoren eine höhere Methylierungsrate als in astrozytären Tumoren. Dies passt zu den Ergebnissen, die kürzlich anhand von Promotormethylierungsprofilen an einer Serie von 272 Glioblastomen beschrieben wurden [67]. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Subpopulation von Tumoren eine größere Anzahl methylierter Loci aufweist, die als *Glioma-CpG island methylator phenotype* (G-CIMP) bezeichnet wurden. Die G-CIMP positiven Glioblastome besitzen epigenetische und expressionsregulatorische Unterschiede, die eher mit den Profilen niedriggradiger Gliome mit besserer Prognose übereinstimmen als mit höhergradigen Gliomen. Die Tumorgruppe entspricht der zuvor definierten Gruppe mit einer proneuralen Signatur [146], die darüber hinaus auch in fast allen Fällen eine Mutation des *IDH1*-Gens aufweist. Eine mögliche Erklärung für die gute Prognose dieser Tumoren könnte auch darin bestehen, dass diejenigen Gene, die Tumoren mit einer sogenannten mesenchymalen Signatur charakterisieren, die eine hohe Aggressivität aufweisen, epigenetisch herunterreguliert sind. Die Beobachtung, die schon von Eckhardt *et al.* gemacht wurde, dass lediglich 17% der methylierten Gene auch einen Expressionsverlust zeigten [145], kann wie oben bereits diskutiert mehrere Gründe haben, die für die hier untersuchten drei Kandidaten in zukünftigen Arbeiten weitergehend abgeklärt werden müssten.

Literaturverzeichnis

1. Bettegowda, C., N. Agrawal, Y. Jiao, M. Sausen, L.D. Wood, R.H. Hruban, F.J. Rodriguez, D.P. Cahill, R. McLendon, G. Riggins, V.E. Velculescu, S.M. Oba-Shinjo, S.K. Marie, B. Vogelstein, D. Bigner, H. Yan, N. Papadopoulos, and K.W. Kinzler, *Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma*. *Science*, 2011. 333(6048): p. 1453-5.
2. Yip, S., Y.S. Butterfield, O. Morozova, S. Chittaranjan, M.D. Blough, J. An, I. Birol, C. Chesnelong, R. Chiu, E. Chuah, R. Corbett, R. Docking, M. Firme, M. Hirst, S. Jackman, A. Karsan, H. Li, D.N. Louis, A. Maslova, R. Moore, A. Moradian, K.L. Mungall, M. Perizzolo, J. Qian, G. Roldan, E.E. Smith, J. Tamura-Wells, N. Thiessen, R. Varhol, S. Weiss, W. Wu, S. Young, Y. Zhao, A.J. Mungall, S.J. Jones, G.B. Morin, J.A. Chan, J.G. Cairncross, and M.A. Marra, *Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers*. *J Pathol*, 2012. 226(1): p. 7-16.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. 100(1): p. 57-70.
4. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer, Chapter 5: Growth Factors, Receptors and Cancer*, pp.119-158. 2007, New York, NY Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
5. Slamon, D.J., G.M. Clark, S.G. Wong, W.J. Levin, A. Ullrich, and W.L. McGuire, *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. *Science*, 1987. 235(4785): p. 177-82.
6. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer, Chapter 4: Cellular Oncogenes*, pp.91-117. 2007, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
7. Foley, K.P. and R.N. Eisenman, *Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mxi1 tell us about the MYC/MAX/MAD network*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1423(3): p. M37-47.
8. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer, Chapter 10: Eternal Life: Cell Immortalization and Tumorigenesis*, pp. 357-398. 2007, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
9. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer, Chapter 13: Dialogue Replaces Monologue: Heterotypic Interactions and the Biology of Angiogenesis*, pp. 527-586. 2007, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
10. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer, Chapter 14: Moving Out: Invasion and Metastasis*, pp. 587. 2007, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
11. Christofori, G. and H. Semb, *The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene*. *Trends Biochem Sci*, 1999. 24(2): p. 73-6.
12. De Wever, O., P. Pauwels, B. De Craene, M. Sabbah, S. Emami, G. Redeuilh, C. Gespach, M. Bracke, and G. Berx, *Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front*. *Histochem Cell Biol*, 2008. 130(3): p. 481-494.
13. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer, Chapter 15: Crowd Control: Tumor Immunology and Immunotherapy*, pp. 655-724. 2007, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
14. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer, Chapter 3: Tumor Viruses*, pp.57-90. 2007, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.

15. Campbell, N.A., Reece, J. B., *The Organization and Control of Eukaryotic Genomes*, pp. 354-374, in *Biology*. 2002, Benjamin Cummings: San Francisco.
16. Petrides, P.E., *Tumorgewebe in Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage, pp. 1142, ed. G. Löffler, Petrides, P.E. 2006, Heidelberg [u.a.]: Springer 1267.
17. Campbell, N.A., Reece, J. B. , *Microbial Models: The Genetics of Viruses and Bacteria*, pp. 328-353, in *Biology*. 2002, Benjamin Cummings: San Francisco.
18. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer, Chapter 7: Tumor Suppressor Genes*, pp.209-254. 2007, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
19. Sabado Alvarez, C., *Molecular biology of retinoblastoma*. Clin Transl Oncol, 2008. 10(7): p. 389-94.
20. Goodrich, D.W. and W.H. Lee, *The molecular genetics of retinoblastoma*. Cancer Surv, 1990. 9(3): p. 529-54.
21. Rodenhiser, D. and M. Mann, *Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications*. Cmaj, 2006. 174(3): p. 341-8.
22. Robertson, K.D., *DNA methylation, methyltransferases, and cancer*. Oncogene, 2001. 20(24): p. 3139-55.
23. Szyf, M., *DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy*. Biochemistry (Mosc), 2005. 70(5): p. 533-49.
24. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer, Chapter 12: Maintenance of Genomic Integrity and the Development of Cancer*, pp. 463-526. 2007, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
25. Takai, D. and P.A. Jones, *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(6): p. 3740-5.
26. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. 3(6): p. 415-28.
27. Baylin, S.B. and J.E. Ohm, *Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? Nat Rev Cancer*, 2006. 6(2): p. 107-16.
28. Mollemann, M., M. Wolter, J. Felsberg, V.P. Collins, and G. Reifenberger, *Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors*. Int J Cancer, 2005. 113(3): p. 379-85.
29. Boulwood, J. and J.S. Wainscoat, *Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies*. Br J Haematol, 2007. 138(1): p. 3-11.
30. Liu, Y., J.C. Pang, S. Dong, B. Mao, W.S. Poon, and H.K. Ng, *Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas*. Hum Pathol, 2005. 36(4): p. 416-25.
31. Inda, M.M. and J.S. Castresana, *RASSF1A promoter is highly methylated in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. Neuropathology, 2007. 27(4): p. 341-6.
32. Abbosh, P.H., M. Wang, J.N. Eble, A. Lopez-Beltran, G.T. Maclennan, R. Montironi, S. Zheng, C.X. Pan, H. Zhou, and L. Cheng, *Hypermethylation of tumor-suppressor gene CpG islands in small-cell carcinoma of the urinary bladder*. Mod Pathol, 2008. 21(3): p. 355-62.
33. Michalowski, M.B., F. de Fraipont, D. Plantaz, S. Michelland, V. Combaret, and M.C. Favrot, *Methylation of tumor-suppressor genes in neuroblastoma: The RASSF1A gene is almost always methylated in primary tumors*. Pediatr Blood Cancer, 2008. 50(1): p. 29-32.
34. Wolter, M., J. Reifenberger, B. Blaschke, K. Ichimura, E.E. Schmidt, V.P. Collins, and G. Reifenberger, *Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of*

- the CDKN2A (MTS1, p16INK4a), p14ARF, and CDKN2B (MTS2, p15INK4b) tumor suppressor genes.* J Neuropathol Exp Neurol, 2001. 60(12): p. 1170-80.
35. Godfraind, C., E. Rousseau, M.M. Ruchoux, F. Scaravilli, and M. Vikkula, *Tumour necrosis and microvascular proliferation are associated with 9p deletion and CDKN2A alterations in 1p/19q-deleted oligodendrogliomas.* Neuropathol Appl Neurobiol, 2003. 29(5): p. 462-71.
 36. Dong, S., J.C. Pang, J. Hu, L.F. Zhou, and H.K. Ng, *Transcriptional inactivation of TP73 expression in oligodendroglial tumors.* Int J Cancer, 2002. 98(3): p. 370-5.
 37. Alonso, M.E., M.J. Bello, P. Gonzalez-Gomez, D. Arjona, J. Lomas, J.M. de Campos, A. Isla, J.L. Sarasa, and J.A. Rey, *Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas.* Cancer Genet Cytogenet, 2003. 144(2): p. 134-42.
 38. Hegi, M.E., A.C. Diserens, T. Gorlia, M.F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, and R. Stupp, *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.* N Engl J Med, 2005. 352(10): p. 997-1003.
 39. Reifenberger, G., Kros, J.M., Louis, D.N., Collins, V.P., *Oligodendroglioma in WHO Classification of Tumours of the Nervous System.* 2007, Lyon: WHO OMS International Agency for Research on Cancer (IARC)
 40. Reifenberger, G., Kros, J.M., Louis, D.N., Collins, V.P., *Anaplastic Oligodendroglioma in WHO Classification of Tumours of the Nervous System.* 2007, Lyon: WHO OMS International Agency for Research on Cancer (IARC).
 41. CBTRUS (Central Brain Tumor Registry Of The United States), *Statistical Report: Brain Tumors in the United States, 2000–2004.* 2008, The Central Brain Tumor Registry of the United States.
 42. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas.* Acta Neuropathol, 2005. 109(1): p. 93-108.
 43. Del Valle, L., S. Enam, C. Lara, C. Ortiz-Hidalgo, C.D. Katsetos, and K. Khalili, *Detection of JC polyomavirus DNA sequences and cellular localization of T-antigen and agnoprotein in oligodendrogliomas.* Clin Cancer Res, 2002. 8(11): p. 3332-40.
 44. Okamoto, Y., P.L. Di Patre, C. Burkhard, S. Horstmann, B. Jourde, M. Fahey, D. Schuler, N.M. Probst-Hensch, M.G. Yasargil, Y. Yonekawa, U.M. Lutolf, P. Kleihues, and H. Ohgaki, *Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas.* Acta Neuropathol, 2004. 108(1): p. 49-56.
 45. Jeuken, J.W., A. von Deimling, and P. Wesseling, *Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors.* J Neurooncol, 2004. 70(2): p. 161-81.
 46. Reifenberger, G. and D.N. Louis, *Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology.* J Neuropathol Exp Neurol, 2003. 62(2): p. 111-26.
 47. Jenkins, R.B., H. Blair, K.V. Ballman, C. Giannini, R.M. Arusell, M. Law, H. Flynn, S. Passe, S. Felten, P.D. Brown, E.G. Shaw, and J.C. Buckner, *A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma.* Cancer Res, 2006. 66(20): p. 9852-61.
 48. Watanabe, T., H. Yokoo, M. Yokoo, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, *Concurrent inactivation of RB1 and TP53 pathways in anaplastic oligodendrogliomas.* J Neuropathol Exp Neurol, 2001. 60(12): p. 1181-9.
 49. Ruas, M. and G. Peters, *The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives.* Biochim Biophys Acta, 1998. 1378(2): p. F115-77.

50. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, 1999. 13(12): p. 1501-12.
51. Husemann, K., M. Wolter, R. Buschges, J. Bostrom, M. Sabel, and G. Reifenberger, *Identification of two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 and rare mutation of the CDKN2C gene from 1p32 in oligodendroglial tumors*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. 58(10): p. 1041-50.
52. Pohl, U., J.G. Cairncross, and D.N. Louis, *Homozygous deletions of the CDKN2C/p18INK4C gene on the short arm of chromosome 1 in anaplastic oligodendrogliomas*. Brain Pathol, 1999. 9(4): p. 639-43.
53. McDonald, J.M., V. Dunmire, E. Taylor, R. Sawaya, J. Bruner, G.N. Fuller, K. Aldape, and W. Zhang, *Attenuated expression of DFFB is a hallmark of oligodendrogliomas with 1p-allelic loss*. Mol Cancer, 2005. 4: p. 35.
54. McDonald, J.M., S. Dunlap, D. Cogdell, V. Dunmire, Q. Wei, A. Starzinski-Powitz, R. Sawaya, J. Bruner, G.N. Fuller, K. Aldape, and W. Zhang, *The SHREW1 gene, frequently deleted in oligodendrogliomas, functions to inhibit cell adhesion and migration*. Cancer Biol Ther, 2006. 5(3): p. 300-4.
55. Maier, D., D. Comparone, E. Taylor, Z. Zhang, O. Gratzl, E.G. Van Meir, R.J. Scott, and A. Merlo, *New deletion in low-grade oligodendroglioma at the glioblastoma suppressor locus on chromosome 10q25-26*. Oncogene, 1997. 15(8): p. 997-1000.
56. Trost, D., M. Ehrler, R. Fimmers, J. Felsberg, M.C. Sabel, L. Kirsch, J. Schramm, O.D. Wiestler, G. Reifenberger, and R.G. Weber, *Identification of genomic aberrations associated with shorter overall survival in patients with oligodendroglial tumors*. Int J Cancer, 2007. 120(11): p. 2368-76.
57. Yan, H., D.W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B.A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G.J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K.W. Kinzler, V.E. Velculescu, B. Vogelstein, and D.D. Bigner, *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. 360(8): p. 765-73.
58. Balss, J., J. Meyer, W. Mueller, A. Korshunov, C. Hartmann, and A. von Deimling, *Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors*. Acta Neuropathol, 2008. 116(6): p. 597-602.
59. Fu, Y., R. Huang, J. Du, R. Yang, N. An, and A. Liang, *Glioma-derived mutations in IDH: from mechanism to potential therapy*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. 397(2): p. 127-30.
60. Parsons, D.W., S. Jones, X. Zhang, J.C. Lin, R.J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I.M. Siu, G.L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B.A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D.A. Busam, H. Tekleab, L.A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D.R. Smith, R.L. Strausberg, S.K. Marie, S.M. Shinjo, H. Yan, G.J. Riggins, D.D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, and K.W. Kinzler, *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science, 2008. 321(5897): p. 1807-12.
61. Wick, W., C. Hartmann, C. Engel, M. Stoffels, J. Felsberg, F. Stockhammer, M.C. Sabel, S. Koeppen, R. Ketter, R. Meyermann, M. Rapp, C. Meisner, R.D. Kortmann, T. Pietsch, O.D. Wiestler, U. Ernemann, M. Bamberg, G. Reifenberger, A. von Deimling, and M. Weller, *NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide*. J Clin Oncol, 2009. 27(35): p. 5874-80.
62. Sanson, M., Y. Marie, S. Paris, A. Idbaih, J. Laffaire, F. Ducray, S. El Hallani, B. Boisselier, K. Mokhtari, K. Hoang-Xuan, and J.Y. Delattre, *Isocitrate dehydrogenase 1*

- codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas.* J Clin Oncol, 2009. 27(25): p. 4150-4.
63. Hartmann, C., B. Hentschel, W. Wick, D. Capper, J. Felsberg, M. Simon, M. Westphal, G. Schackert, R. Meyermann, T. Pietsch, G. Reifenberger, M. Weller, M. Loeffler, and A. von Deimling, *Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas.* Acta Neuropathol, 2010. 120(6): p. 707-18.
 64. Tews, B., P. Roerig, C. Hartmann, M. Hahn, J. Felsberg, B. Blaschke, M. Sabel, A. Kunitz, G. Toedt, K. Neben, A. Benner, A. Deimling, G. Reifenberger, and P. Lichter, *Hypermethylation and transcriptional downregulation of the CITED4 gene at 1p34.2 in oligodendroglial tumours with allelic losses on 1p and 19q.* Oncogene, 2007. 26(34): p. 5010-6.
 65. Kunitz, A., M. Wolter, J. van den Boom, J. Felsberg, B. Tews, M. Hahn, A. Benner, M. Sabel, P. Lichter, G. Reifenberger, A. von Deimling, and C. Hartmann, *DNA hypermethylation and aberrant expression of the EMP3 gene at 19q13.3 in Human Gliomas.* Brain Pathol, 2007. 17(4): p. 363-70.
 66. Hong, C., A.W. Bollen, and J.F. Costello, *The contribution of genetic and epigenetic mechanisms to gene silencing in oligodendrogliomas.* Cancer Res, 2003. 63(22): p. 7600-5.
 67. Noushmehr, H., D.J. Weisenberger, K. Diefes, H.S. Phillips, K. Pujara, B.P. Berman, F. Pan, C.E. Pelloski, E.P. Sulman, K.P. Bhat, R.G. Verhaak, K.A. Hoadley, D.N. Hayes, C.M. Perou, H.K. Schmidt, L. Ding, R.K. Wilson, D. Van Den Berg, H. Shen, H. Bengtsson, P. Neuvial, L.M. Cope, J. Buckley, J.G. Herman, S.B. Baylin, P.W. Laird, and K. Aldape, *Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma.* Cancer Cell, 2010. 17(5): p. 510-22.
 68. Turcan, S., D. Rohle, A. Goenka, L.A. Walsh, F. Fang, E. Yilmaz, C. Campos, A.W. Fabius, C. Lu, P.S. Ward, C.B. Thompson, A. Kaufman, O. Guryanova, R. Levine, A. Heguy, A. Viale, L.G. Morris, J.T. Huse, I.K. Mellinghoff, and T.A. Chan, *IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype.* Nature, 2012. 483(7390): p. 479-83.
 69. Lu, C., P.S. Ward, G.S. Kapoor, D. Rohle, S. Turcan, O. Abdel-Wahab, C.R. Edwards, R. Khanin, M.E. Figueroa, A. Melnick, K.E. Wellen, D.M. O'Rourke, S.L. Berger, T.A. Chan, R.L. Levine, I.K. Mellinghoff, and C.B. Thompson, *IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation.* Nature, 2012. 483(7390): p. 474-8.
 70. Riemenschneider, M.J., J.W. Jeuken, P. Wesseling, and G. Reifenberger, *Molecular diagnostics of gliomas: state of the art.* Acta Neuropathol, 2010. 120(5): p. 567-84.
 71. Peiffer, J., Schröder, J.M., Paulus, *Neuropathologie - Morphologische Diagnostik der Krankheiten des Nervensystems und der Skelettmuskulatur.* 3. ed. 2002, Berlin Heidelberg New York: Springer. 723.
 72. Louis, D.N., H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, B.W. Scheithauer, and P. Kleihues, *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.* Acta Neuropathol, 2007. 114(2): p. 97-109.
 73. von Deimling, A., Burger P.C., Nakazato, Y., Ohgaki, H., Kleihues, P., *Diffuse Astrocytoma in WHO Classification of Tumours of the Nervous System.* 2007, Lyon WHO OMS International Agency for Research on Cancer (IARC).

74. Kleihues, P., Burger, P.C., Rosenblum, M.K., Paulus, W., Scheithauer, B.W., *Anaplastic Astrocytoma in WHO Classification of Tumours of the Nervous System*. 2007, Lyon: WHO OMS International Agency for Research on Cancer (IARC).
75. Kleihues, P., Burger, P.C., Aldape, K.D., Brat, D.J., Biernat, W., Bigner; D.D., Nakazato, Y., Plate, K.H., Giangaspero, F., von Deimling, A., Ohgaki, H., Cavenee, W.K., *Glioblastoma in World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 2007, Lyon: WHO OMS International Agency for Research on Cancer (IARC)
76. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. 170(5): p. 1445-53.
77. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. 64(6): p. 479-89.
78. Hainaut, P., *The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival*. Curr Opin Oncol, 1995. 7(1): p. 76-82.
79. Watanabe, T., Y. Katayama, A. Yoshino, K. Yachi, T. Ohta, A. Ogino, C. Komine, and T. Fukushima, *Aberrant hypermethylation of p14ARF and O6-methylguanine-DNA methyltransferase genes in astrocytoma progression*. Brain Pathol, 2007. 17(1): p. 5-10.
80. Nakamura, M., T. Watanabe, U. Klangby, C. Asker, K. Wiman, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, *p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas*. Brain Pathol, 2001. 11(2): p. 159-68.
81. Ranza, E., A. Facchetti, P. Morbini, E. Benericetti, and R. Nano, *Exogenous platelet-derived growth factor (PDGF) induces human astrocytoma cell line proliferation*. Anticancer Res, 2007. 27(4B): p. 2161-6.
82. Nishizaki, T., S. Ozaki, K. Harada, H. Ito, H. Arai, T. Beppu, and K. Sasaki, *Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization*. Genes Chromosomes Cancer, 1998. 21(4): p. 340-6.
83. Arslantas, A., S. Artan, U. Oner, M.H. Muslumanoglu, M. Ozdemir, R. Durmaz, D. Arslantas, M. Vural, E. Cosan, and M.A. Atasoy, *Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas*. Pathol Oncol Res, 2007. 13(1): p. 39-46.
84. Wiltshire, R.N., J.E. Herndon, 2nd, A. Lloyd, H.S. Friedman, D.D. Bigner, S.H. Bigner, and R.E. McLendon, *Comparative genomic hybridization analysis of astrocytomas: prognostic and diagnostic implications*. J Mol Diagn, 2004. 6(3): p. 166-79.
85. Backlund, L.M., B.R. Nilsson, L. Liu, K. Ichimura, and V.P. Collins, *Mutations in Rb1 pathway-related genes are associated with poor prognosis in anaplastic astrocytomas*. Br J Cancer, 2005. 93(1): p. 124-30.
86. Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N.M. Probst-Hensch, P.C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M.G. Yasargil, U.M. Lutolf, and P. Kleihues, *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. 64(19): p. 6892-9.
87. Von Hoff, D.D., B. Forseth, C.N. Clare, K.L. Hansen, and D. VanDevanter, *Double minutes arise from circular extrachromosomal DNA intermediates which integrate into chromosomal sites in human HL-60 leukemia cells*. J Clin Invest, 1990. 85(6): p. 1887-95.
88. Nicholas, M.K., R.V. Lukas, N.F. Jafri, L. Faoro, and R. Salgia, *Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas*. Clin Cancer Res, 2006. 12(24): p. 7261-70.

89. Gil-Benso, R., C. Lopez-Gines, R. Benito, J.A. Lopez-Guerrero, R.C. Callaghan, A. Pellin, P. Roldan, and M. Cerda-Nicolas, *Concurrent EGFR amplification and TP-53 mutation in glioblastomas*. Clin Neuropathol, 2007. 26(5): p. 224-31.
90. Viana-Pereira, M., J.M. Lopes, S. Little, F. Milanezi, D. Basto, F. Pardal, C. Jones, and R.M. Reis, *Analysis of EGFR overexpression, EGFR gene amplification and the EGFRvIII mutation in Portuguese high-grade gliomas*. Anticancer Res, 2008. 28(2A): p. 913-20.
91. Dahia, P.L., *PTEN, a unique tumor suppressor gene*. Endocr Relat Cancer, 2000. 7(2): p. 115-29.
92. Nakamura, M., Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, *Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas*. Lab Invest, 2001. 81(1): p. 77-82.
93. Network, T.C.G.A.T.R., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. 455(7216): p. 1061-8.
94. Rasheed, B.K., R.E. McLendon, H.S. Friedman, A.H. Friedman, H.E. Fuchs, D.D. Bigner, and S.H. Bigner, *Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25*. Oncogene, 1995. 10(11): p. 2243-6.
95. Ichimura, K., E.E. Schmidt, A. Miyakawa, H.M. Goike, and V.P. Collins, *Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades*. Genes Chromosomes Cancer, 1998. 22(1): p. 9-15.
96. Fujisawa, H., R.M. Reis, M. Nakamura, S. Colella, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, *Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas*. Lab Invest, 2000. 80(1): p. 65-72.
97. Nakamura, M., E. Ishida, K. Shimada, M. Kishi, H. Nakase, T. Sakaki, and N. Konishi, *Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas*. Lab Invest, 2005. 85(2): p. 165-75.
98. Nakamura, M., F. Yang, H. Fujisawa, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, *Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. 59(6): p. 539-43.
99. Gonzalez-Gomez, P., M.J. Bello, D. Arjona, J. Lomas, M.E. Alonso, J.M. De Campos, J. Vaquero, A. Isla, M. Gutierrez, and J.A. Rey, *Promoter hypermethylation of multiple genes in astrocytic gliomas*. Int J Oncol, 2003. 22(3): p. 601-8.
100. Nakamura, M., T. Watanabe, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, *Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene*. Carcinogenesis, 2001. 22(10): p. 1715-9.
101. von Deimling, A., Reifenberger, G., Kros, J.M., Louis, D.N., Collins, V.P., *Oligoastrocytoma in WHO Classification of Tumours of the Nervous System*. 2007, Lyon: WHO OMS International Agency for Research on Cancer (IARC)
102. von Deimling, A., Reifenberger, G., Kros, J.M., Louis, D.N., Collins, V.P., *Anaplastic Oligoastrocytoma in WHO Classification of Tumours of the Nervous System*. 2007, Lyon: WHO OMS International Agency for Research on Cancer (IARC).
103. Rencic, A., J. Gordon, J. Otte, M. Curtis, A. Kovatich, P. Zoltick, K. Khalili, and D. Andrews, *Detection of JC virus DNA sequence and expression of the viral oncoprotein, tumor antigen, in brain of immunocompetent patient with oligoastrocytoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(14): p. 7352-7.
104. Kraus, J.A., J. Koopmann, P. Kaskel, D. Maintz, S. Brandner, J. Schramm, D.N. Louis, O.D. Wiestler, and A. von Deimling, *Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q*

- suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma.* J Neuropathol Exp Neurol, 1995. 54(1): p. 91-5.
105. Qu, M., T. Olofsson, S. Sigurdardottir, C. You, H. Kalimo, M. Nister, A. Smits, and Z.P. Ren, *Genetically distinct astrocytic and oligodendroglial components in oligoastrocytomas.* Acta Neuropathol, 2007. 113(2): p. 129-36.
 106. Olson, J.D., E. Riedel, and L.M. DeAngelis, *Long-term outcome of low-grade oligodendroglioma and mixed glioma.* Neurology, 2000. 54(7): p. 1442-8.
 107. Lebrun, C., D. Fontaine, A. Ramaioli, F. Vandebos, S. Chanalet, M. Lonjon, J.F. Michiels, V. Bourg, P. Paquis, M. Chatel, and M. Frenay, *Long-term outcome of oligodendrogliomas.* Neurology, 2004. 62(10): p. 1783-7.
 108. Weller, M., *Gliome in Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.* 2008, Deutsche Gesellschaft für Neurologie.
 109. Cairncross, J.G., K. Ueki, M.C. Zlatescu, D.K. Lisle, D.M. Finkelstein, R.R. Hammond, J.S. Silver, P.C. Stark, D.R. Macdonald, Y. Ino, D.A. Ramsay, and D.N. Louis, *Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas.* J Natl Cancer Inst, 1998. 90(19): p. 1473-9.
 110. Everhard, S., G. Kaloshi, E. Criniere, A. Benouaich-Amiel, J. Lejeune, Y. Marie, M. Sanson, M. Kujas, K. Mokhtari, K. Hoang-Xuan, J.Y. Delattre, and J. Thillet, *MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas.* Ann Neurol, 2006. 60(6): p. 740-3.
 111. Weller, M., R. Stupp, G. Reifenberger, A.A. Brandes, M.J. van den Bent, W. Wick, and M.E. Hegi, *MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?* Nat Rev Neurol, 2010. 6(1): p. 39-51.
 112. Tabatabai, G. and R. Stupp, *[Angiogenesis inhibition in neurooncology. A very promising therapy strategy for malignant glioma].* Nervenarzt, 2010. 81(8): p. 936-9.
 113. van den Bent, M.J., H.J. Dubbink, M. Sanson, C.R. van der Lee-Haarloo, M. Hegi, J.W. Jeuken, A. Ibdaih, A.A. Brandes, M.J. Taphoorn, M. Frenay, D. Lacombe, T. Gorlia, W.N. Dinjens, and J.M. Kros, *MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951.* J Clin Oncol, 2009. 27(35): p. 5881-6.
 114. Masuhr, K.F., Neumann, M., *Neurologie.* 6 ed. Duale Reihe, ed. MLP. 2007, Stuttgart: Thieme. 597.
 115. McMurry, J., *Biomolecules: Lipids and Nucleic Acids in Fundamentals of Organic Chemistry Fifth Edition, pp. 507-539,* ed. J. Holcroft. 2003, Pacific Grove,CA,USA: Angus McDonald.
 116. Sanger, F. and A.R. Coulson, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.* J Mol Biol, 1975. 94(3): p. 441-8.
 117. Campbell, N.A., Reece, J.B., *DNA Technology and Genomics, pp. 375-401,* in *Biology.* 2002, Benjamin Cummings: San Francisco.
 118. Xiong, Z. and P.W. Laird, *COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay.* Nucleic Acids Res, 1997. 25(12): p. 2532-4.
 119. Christman, J.K., *5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy.* Oncogene, 2002. 21(35): p. 5483-95.
 120. Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams, *Real time quantitative PCR.* Genome Res, 1996. 6(10): p. 986-94.
 121. Esteller, M., *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future.* Oncogene, 2002. 21(35): p. 5427-40.

122. Issa, J.P., *CpG island methylator phenotype in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(12): p. 988-93.
123. Costello, J.F., M.C. Fruhwald, D.J. Smiraglia, L.J. Rush, G.P. Robertson, X. Gao, F.A. Wright, J.D. Feramisco, P. Peltomaki, J.C. Lang, D.E. Schuller, L. Yu, C.D. Bloomfield, M.A. Caligiuri, A. Yates, R. Nishikawa, H. Su Huang, N.J. Petrelli, X. Zhang, M.S. O'Dorisio, W.A. Held, W.K. Cavenee, and C. Plass, *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. Nat Genet, 2000. 24(2): p. 132-8.
124. Esteller, M., P.G. Corn, S.B. Baylin, and J.G. Herman, *A gene hypermethylation profile of human cancer*. Cancer Res, 2001. 61(8): p. 3225-9.
125. Dong, S.M., J.C. Pang, W.S. Poon, J. Hu, K.F. To, A.R. Chang, and H.K. Ng, *Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. 60(8): p. 808-16.
126. Li, Q., A. Jedlicka, N. Ahuja, M.C. Gibbons, S.B. Baylin, P.C. Burger, and J.P. Issa, *Concordant methylation of the ER and N33 genes in glioblastoma multiforme*. Oncogene, 1998. 16(24): p. 3197-202.
127. Cuttitta, F., R. Pio, M. Garayoa, E. Zudaire, M. Julian, T.H. Elsasser, L.M. Montuenga, and A. Martinez, *Adrenomedullin functions as an important tumor survival factor in human carcinogenesis*. Microsc Res Tech, 2002. 57(2): p. 110-9.
128. Kitamura, K., K. Kangawa, M. Kawamoto, Y. Ichiki, S. Nakamura, H. Matsuo, and T. Eto, *Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. 192(2): p. 553-60.
129. Serrano, J., D. Alonso, A.P. Fernandez, J.M. Encinas, J.C. Lopez, S. Castro-Blanco, P. Fernandez-Vizarra, A. Richart, M. Santacana, L.O. Uttenthal, M.L. Bentura, R. Martinez-Murillo, A. Martinez, F. Cuttitta, and J. Rodrigo, *Adrenomedullin in the central nervous system*. Microsc Res Tech, 2002. 57(2): p. 76-90.
130. Martinez, A., M.J. Miller, E.J. Unsworth, J.M. Siegfried, and F. Cuttitta, *Expression of adrenomedullin in normal human lung and in pulmonary tumors*. Endocrinology, 1995. 136(9): p. 4099-105.
131. Ouafik, L., S. Sauze, F. Boudouresque, O. Chinot, C. Delfino, F. Fina, V. Vuaroqueaux, C. Dussert, J. Palmari, H. Dufour, F. Grisoli, P. Casellas, N. Brunner, and P.M. Martin, *Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines in vitro and suppresses tumor xenograft growth in vivo*. Am J Pathol, 2002. 160(4): p. 1279-92.
132. Deville, J.L., C. Bartoli, C. Berenguer, S. Fernandez-Sauze, I. Kaafarani, C. Delfino, F. Fina, S. Salas, X. Muracciole, J. Mancini, E. Lechevallier, P.M. Martin, D. Figarella-Branger, L. Ouafik, and L. Daniel, *Expression and role of adrenomedullin in renal tumors and value of its mRNA levels as prognostic factor in clear-cell renal carcinoma*. Int J Cancer, 2009. 125(10): p. 2307-15.
133. Miller, M.J., A. Martinez, E.J. Unsworth, C.J. Thiele, T.W. Moody, T. Elsasser, and F. Cuttitta, *Adrenomedullin expression in human tumor cell lines. Its potential role as an autocrine growth factor*. J Biol Chem, 1996. 271(38): p. 23345-51.
134. Boudouresque, F., Y. Berthois, P.M. Martin, D. Figarella-Branger, O. Chinot, and L. Ouafik, *[Role of adrenomedullin in glioblastomas growth]*. Bull Cancer, 2005. 92(4): p. 317-26.
135. Wang, S.M. and W.L. Yang, *Circulating hormone adrenomedullin and its binding protein protect neural cells from hypoxia-induced apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1790(5): p. 361-7.
136. Kastin, A.J., V. Akerstrom, L. Hackler, and W. Pan, *Adrenomedullin and the blood-brain barrier*. Horm Metab Res, 2001. 33(1): p. 19-25.

137. Nilsson, R., I.J. Schultz, E.L. Pierce, K.A. Soltis, A. Naranuntarat, D.M. Ward, J.M. Baughman, P.N. Paradkar, P.D. Kingsley, V.C. Culotta, J. Kaplan, J. Palis, B.H. Paw, and V.K. Mootha, *Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis*. *Cell Metab*, 2009. 10(2): p. 119-30.
138. Felsberg, J., A. Erkwow, M.C. Sabel, L. Kirsch, R. Fimmers, B. Blaschke, U. Schlegel, J. Schramm, O.D. Wiestler, and G. Reifenberger, *Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival*. *Brain Pathol*, 2004. 14(2): p. 121-30.
139. Vogt, L., S.P. Schrimpf, V. Meskenaite, R. Frischknecht, J. Kinter, D.P. Leone, U. Ziegler, and P. Sonderegger, *Calsyntenin-1, a proteolytically processed postsynaptic membrane protein with a cytoplasmic calcium-binding domain*. *Mol Cell Neurosci*, 2001. 17(1): p. 151-66.
140. Konecna, A., R. Frischknecht, J. Kinter, A. Ludwig, M. Steuble, V. Meskenaite, M. Indermuhle, M. Engel, C. Cen, J.M. Mateos, P. Streit, and P. Sonderegger, *Calsyntenin-1 docks vesicular cargo to kinesin-1*. *Mol Biol Cell*, 2006. 17(8): p. 3651-63.
141. Fransson, S., T. Martinsson, and K. Ejeskar, *Neuroblastoma tumors with favorable and unfavorable outcomes: Significant differences in mRNA expression of genes mapped at 1p36.2*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007. 46(1): p. 45-52.
142. Janoueix-Lerosey, I., E. Novikov, M. Monteiro, N. Gruel, G. Schleiermacher, B. Loriol, C. Nguyen, and O. Delattre, *Gene expression profiling of 1p35-36 genes in neuroblastoma*. *Oncogene*, 2004. 23(35): p. 5912-22.
143. Chung, W., B. Kwabi-Addo, M. Ittmann, J. Jelinek, L. Shen, Y. Yu, and J.P. Issa, *Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling*. *PLoS One*, 2008. 3(4): p. e2079.
144. Kwabi-Addo, B., W. Chung, L. Shen, M. Ittmann, T. Wheeler, J. Jelinek, and J.P. Issa, *Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues*. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(13): p. 3796-802.
145. Eckhardt, F., J. Lewin, R. Cortese, V.K. Rakyan, J. Attwood, M. Burger, J. Burton, T.V. Cox, R. Davies, T.A. Down, C. Haefliger, R. Horton, K. Howe, D.K. Jackson, J. Kunde, C. Koenig, J. Liddle, D. Niblett, T. Otto, R. Pettett, S. Seemann, C. Thompson, T. West, J. Rogers, A. Olek, K. Berlin, and S. Beck, *DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22*. *Nat Genet*, 2006. 38(12): p. 1378-85.
146. Network, C.G.A.R., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. *Nature*, 2008. 455(7216): p. 1061-8.

Danksagung

Ich danke herzlich Herrn Professor Reifenberger dafür, dass ich meine Promotionsarbeit am Institut für Neuropathologie erstellen durfte und für seine Betreuung während der Fertigstellung der Schrift.

Ein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Jörg Felsberg für seine stete Hilfsbereitschaft und seine wirklich außergewöhnliche Unterstützung. Auch danke ich Frau Dr. Marietta Wolter, die mich während der Laborarbeit betreute und mir mit Tipps und Ratschlägen zur Seite stand.

Zudem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für die gute Arbeitsatmosphäre und Ihre Hilfsbereitschaft.

Außerdem danke ich Johann und meiner Familie für ihre Unterstützung und die Ermutigungen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

15.05.2013, Laura Hofmann