

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

**Promotorhypermethylierung und Expression des DNA-
Reparaturgens *MGMT* in oligodendroglialen Tumoren**

Dissertation

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

vorgelegt von

Maria Thannhäuser

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan
Referent: Prof. Dr. Reifenberger
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Sabel

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden in der folgenden Originalarbeit veröffentlicht:

Möllemann M, Wolter M, Felsberg J, Collins VP, Reifenberger G (2005)
Frequent promoter hypermethylation and low expression
of the *MGMT* gene in oligodendroglial tumors.
Int J Cancer 113, 379-85.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
	1.1 Klinik und Neuropathologie der Oligodendrogliome und Oligoastrozytome	5
	1.1.1 Oligodendrogliome	5
	1.1.2 Oligoastrozytome	6
	1.2 Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung	7
	1.2.1 Inaktivierung von Tumorsuppressorgen durch Promotorhypermethylierung	8
	1.3 Das DNA-Reparaturenzym O ⁶ -Methylguanin-Methyltransferase	10
	1.4 Molekulargenetik der Oligodendrogliome und Oligoastrozytome	11
	1.5 Fragestellung und Zielsetzung der eigenen Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
	2.1 Material	14
	2.2 Methoden	16
	2.2.1 Natriumbisulfitbehandlung genomischer DNA	16
	2.2.2 Polymerase -Kettenreaktion (PCR)	17
	2.2.3 Methylierungsspezifische PCR (MSP)	17
	2.2.4 Sequenzierung der Natriumbisulfitbehandelten DNA	19
	2.2.5 Auswertung der Sequenzierungsergebnisse	21
	2.3 Real-Time Reverse-Transkription-PCR	21
	2.4 Immunhistochemische Untersuchungen	26
	2.5 LOH-Analysen auf 1p und 19q	27
	2.6 Statistische Auswertung	28
	2.7 Lösungen und Puffer	28

3	Ergebnisse	29
3.1	Methylierungsanalyse der <i>MGMT</i> Promotorregion mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP)	29
3.2	Methylierungsanalyse der <i>MGMT</i> Promotorregion mittels direkter Sequenzierung Natriumbisulfitbehandelter DNA	32
3.3	Untersuchung der <i>MGMT</i> mRNA-Expression mittels Real-Time Reverse-Transkription-PCR	35
3.4	Untersuchung der Mgmt Proteinexpression mittels Immunhistochemie	36
3.5	Korrelation der <i>MGMT</i> Promotorhypermethylierung mit klinischen und molekularen Parametern	38
4	Diskussion	40
4.1	<i>MGMT</i> Promotormethylierung in Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen	40
4.2	<i>MGMT</i> mRNA-Expression in oligodendroglialen Tumoren	42
4.3	Mgmt Proteinexpression in oligodendroglialen Tumoren	43
4.4	Korrelation zwischen <i>MGMT</i> Hypermethylierung und LOH auf 1p und 19q in oligodendroglialen Tumoren	44
4.5	Perspektiven	44
5	Zusammenfassung	45
6	Lebenslauf	46
7	Danksagung	47
8	Literaturverzeichnis	48

1 Einleitung

Krebserkrankungen zählen trotz aller medizinischen Fortschritte immer noch zu den häufigsten Todesursachen in unserem Kulturkreis und werden damit für die Betroffenen zu einer erschreckenden und ausweglosen Diagnose. Es ist verständlich, dass die wissenschaftliche Forschung in zahllosen Ansätzen, Richtungen und mit den verschiedensten Methoden versucht, Erkenntnisse über Ursprung, Ausprägung, Wachstum und Fortschreiten der diversen Krebsvarianten zu erlangen. Auch die vorliegende Arbeit reiht sich in diese Bestrebungen ein und möchte einen Beitrag zum Verständnis der Entstehung von Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen leisten und zugleich Mechanismen aufklären, die für das Ansprechen dieser speziellen Hirntumoren auf eine Chemotherapie mitverantwortlich sind.

1.1 Klinik und Neuropathologie der Oligodendrogliome und Mischgliome

1.1.1 Oligodendrogliome

Oligodendrogliome zählen zu den verhältnismäßig selten auftretenden intrakraniellen Tumoren (ca. 5%) des zentralen Nervensystems und machen etwa 10-15% aller Gliome aus (Reifenberger *et al.* 1999). Hauptsächlich in Frontal- und Temporallappen des Großhirns, seltener in Kleinhirn und Rückenmark lokalisiert, treten sie gehäuft zwischen dem 4. und 5. Lebensjahrzehnt auf. Klinisch machen sich diese Tumoren durch die Folgen der Raumforderung und der diffusen Infiltration des angrenzenden Hirngewebes bemerkbar. In der primären diagnostischen Bildgebung sind Verkalkungen in den Randzonen des Tumors charakteristisch sowie unscharfe Abgrenzungen zum umliegenden Hirngewebe. Makroskopisch erscheinen die Oligodendrogliome als solide, rosa-gräuliche Tumoren, die zur Zystenbildung neigen. Oligodendrogliome können auch nekrotische Areale aufweisen. In der histologischen Aufarbeitung lässt sich die Bestimmung des WHO (World Health Organisation)-Grades vornehmen. Der WHO-Grad II bezeichnet differenzierte

Oligodendrogliome mit mäßig zellreichem und diffus infiltrativem Bild sowie den charakteristischen Honigwabenzellen und Mikroverkalkungen. Der WHO-Grad III entspricht der anaplastischen Variante mit erhöhter Zelldichte, Kern- und Zellpolymorphien, Mitosen sowie Nekrosen. Die Therapie der Wahl besteht bei den WHO-Grad II Oligodendrogliomen in der operativen Resektion des Tumors. Bei anaplastischen Oligodendrogliomen folgt nach der Operation meist eine adjuvante Therapie mit Bestrahlung und/oder systemischer Chemotherapie, entweder nach dem PCV-Schema (Procarbazin, CCNU, Vincristin) oder neuerdings auch als Monotherapie mit der Substanz Temozolomid.

1.1.2 Oligoastrozytome

Oligoastrozytome machen ungefähr 5-10% aller Gliome aus und werden histologisch ebenfalls entweder in den WHO-Grad II (gut differenziert) oder den WHO-Grad III (anaplastisch) eingeteilt. Auch sie treten gehäuft im mittleren Erwachsenenalter auf. Therapie der Wahl ist die operative Entfernung des Tumors, im Fall der anaplastischen Variante kombiniert mit Bestrahlung und einer Chemotherapie.

Analog zu den anaplastischen Oligodendrogliomen zeigen auch anaplastische Oligoastrozytome eine erhöhte Zelldichte, Zell- und Kernpolymorphien und Mitosen. Pathologische Gefäßproliferate und Nekrosen können ebenfalls vorkommen. Die diffuse Infiltration des umgebenden Hirngewebes erlaubt in der Regel keine radikale Operation. Bei Patienten mit einem anaplastischen Oligoastrozytom (WHO-Grad III) geht man von einer Überlebenszeit von drei Jahren nach Diagnose aus, im Vergleich zu 6-8 Jahren bei Vorliegen eines differenzierten Oligoastrozytoms vom WHO-Grad II.

Mikroskopisch sind Oligoastrozytome Mischtumore aus astrozytär und oligodendrogliol differenzierten Tumorzellen. Man kann dabei zwei Formen unterscheiden: zum einen können die oligodendroglialen und astrozytären Anteile weitgehend getrennt nebeneinander liegen, zum anderen ist eine diffuse Durchmischung möglich.

1.2 Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung

An der Tumorentstehung sind im Wesentlichen zwei Mechanismen beteiligt, nämlich die Aktivierung von Proto-Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Die Abfolge des Auftretens und der zeitliche Abstand zwischen den Ereignissen ist variabel. Im Fall der Proto-Onkogene handelt es sich um dominante Gene, das heißt, eine Mutation an einem der beiden Allele genügt zur Ausprägung eines proliferationsstimulierenden Phänotyps. Als Beispiel sei das *KRAS*- Gen genannt, das bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen aktiviert wird und häufig Punktmutationen aufweist, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen. Besonders oft ist das Kodon 12 betroffen, was z. B. durch den Austausch von Glycin gegen Valin zur onkogenen Aktivierung des KRAS Proteins führt (Esteller und Herman, 2004). Tumorsuppressorgene verhalten sich dagegen häufig rezessiv, das heißt, beide Allele müssen einer Mutation unterliegen, um das Gen funktionell stillzulegen. Die Ereignisse können zeitlich unabhängig voneinander auftreten und verschiedener Art sein, zum Beispiel Punktmutation des einen und Deletion des anderen Allels. Fearon und Vogelstein (1990) zeigten, dass beim kolorektalen Karzinom die Progression von benigner Dysplasie bis hin zur malignen Entartung durch das Akkumulieren multipler Genveränderungen bedingt ist. Nach erfolgtem Initialereignis kennzeichnen die weitere Tumorprogression dann die Abschaltung der Apoptosemechanismen, gesteigerte Proliferation, sowie Invasion und Metastasierung in andere Gewebe.

Für die vollständige Inaktivierung eines Tumorsuppressorgenes bedarf es, wie oben schon erwähnt, eines sogenannten „*second hits*“, das heißt, wenn nur ein Allel mutiert vorliegt, bleibt dies häufig ohne Auswirkungen auf den Phänotyp. Erst die Schädigung des zweiten Allels, unabhängig und zeitversetzt, führt zur Tumorentstehung.

Die Mechanismen der DNA-Schädigung, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen, erstrecken sich von Punktmutationen bis hin zu Deletionen, Insertionen oder Translokationen. Auch ohne Veränderungen der Basenfolge der DNA können Tumorsuppressorgene inaktiviert werden, z. B. durch eine Promotorhypermethylierung, die zu einer Verminderung oder kompletten Unterbindung der Transkription führt.

1.2.1 Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Promotorhypermethylierung

Unter einer Promotorhypermethylierung versteht man eine epigenetische Veränderung, welche die Kontrollsequenz vor einem transkribierten Genabschnitt so verändert, dass eine Transkription verhindert wird und das Gen somit nicht mehr in RNA überschrieben wird. Methyliert werden dabei Cytosinreste in 5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'-Dinukleotiden, sogenannten CpGs (Abb.1).

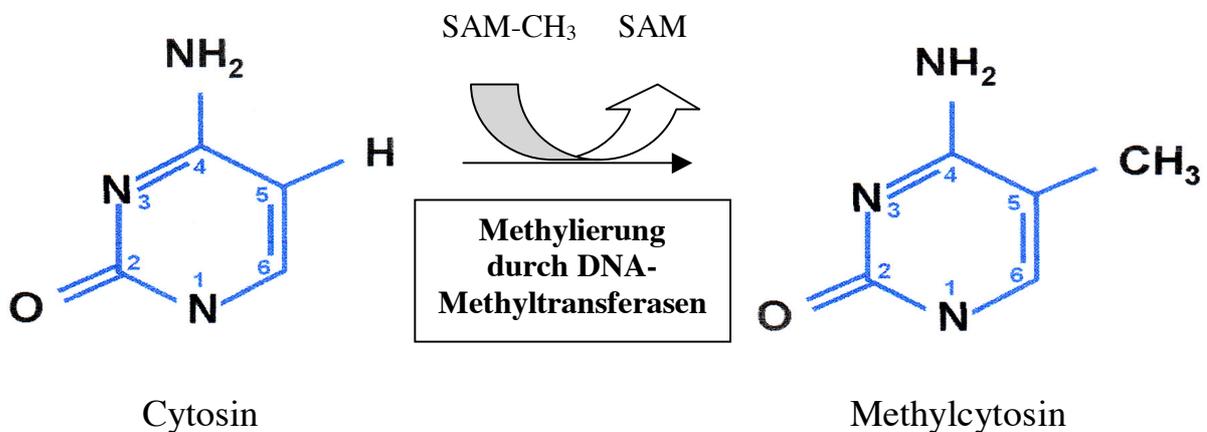


Abb. 1: Methylierung von Cytosin am Kohlenstoffatom 5 durch DNA-Methyltransferasen mit S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor.

Eine Häufung von CpGs in einem DNA-Abschnitt von einigen hundert bis tausend Basenpaaren bezeichnet man als CpG-Insel. In diesen meist im 5'-Bereich von Genen befindlichen Inseln finden sich normalerweise keine CpG-Methylierungen. Insgesamt treten CpGs in der DNA-Abfolge seltener als statistisch zu erwarten auf, da methyliertes Cytosin mit höherer Wahrscheinlichkeit als unmethyliertes Cytosin desaminiert und in Thymin umgewandelt wird. In den sogenannten CpG-Inseln erreicht der CpG-Anteil die statistisch zu erwartende Frequenz. In Tumorzellen findet sich häufig eine Veränderung des DNA-Methylierungsmusters, im Rahmen derer es zur Hypermethylierung von CpG-Inseln kommt, was dann zur Fehlregulation der Transkriptionsaktivität des entsprechenden Gens führen kann. Zum Beispiel finden sich aberrante Methylierungen des *RB*-Genpromotors in Retinoblastomen und Gliomen, was zum Verlust der Zellzykluskontrolle beiträgt. Eine

Hypermethylierung des *VHL* (von-Hippel-Lindau) Genpromotors findet sich z.B. in klarzelligem Nierenzellkarzinomen und verursacht eine verminderte Expression des *VHL* Tumorsuppressorgens. Eine Promotorhypermethylierung des *APC* (adenomätöse Polyposis coli)-Gens führt zu fehlerhafter Signaltransduktion besonders in Kolon-, aber auch in Ösophagus-, Magen- und Pankreaskarzinomen.

Die nachfolgende **Abbildung 2** zeigt schematisch Promotor und transkribierten Genabschnitt mit CpG Dinukleotiden, an denen Methylierung möglich ist. Im Normalzustand bei nicht methyliertem Promotor erfolgt die Ablesung des Gens (s. Abb. 2a), bei methyliertem Promotor, wie es zum Beispiel im Tumorgewebe vorkommt, unterbleibt diese (s. Abb. 2b). Auch im Normalzustand finden sich Methylierungen an CpGs, allerdings dann meist außerhalb von Promotorbereichen und in sogenannten repetitiven Sequenzen. Diese Regionen sind im Tumor dagegen oft hypomethyliert, was die Chromosomeninstabilität in Tumorzellen mit begründet.

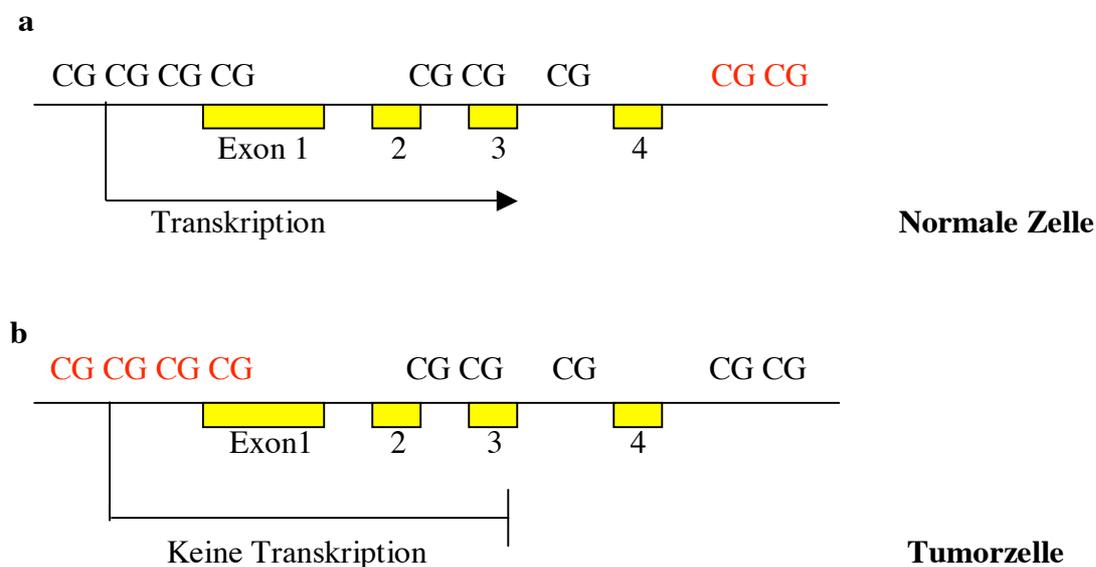


Abb. 2: Promotorhypermethylierung vermindert die DNA-Transkription.

CG: CpG Dinukleotid mit methyliertem Cytosin,
CG: CpG Dinukleotid mit nicht methyliertem Cytosin

1.3 Das DNA-Reparaturenzym O⁶-Methylguanin-Methyltransferase

Das in dieser Arbeit untersuchte *O⁶-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT)*-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 10 (10q26) lokalisiert und kodiert für ein Transferase-Enzym (relative Molekülmasse 18 kD), das fehlerhaft am O⁶-Atom alkyliertes Guanin durch Übertragung der Alkylgruppe auf eine moleküleigene Cysteinseitenkette restauriert. Da von dort aus keine Weitergabe der Gruppe mehr erfolgen kann, wird das Mgmt-Protein dadurch irreversibel inaktiviert. Das Ausmass der Reparaturfähigkeit ist also abhängig von der ständigen Neusynthese der Transferase. Am O⁶-Atom alkyliertes Guanin führt ohne Reparatur zur Vernetzung zwischen dem Guanin-Anhang und dem Cytosinrest des Gegenstranges und damit zur Verhinderung der Replikation. Alternativ kann es auch zu einer fehlerhaften Basenpaarung des Guanins mit Thymin statt Cytosin und damit zu einer Punktmutation kommen (Esteller *et al.*, 1999). Gerson (2004) betont nochmals die derzeit einzigartige Wirkweise der Transferase, nämlich nicht die veränderte Base- das alkylierte Guanin- sondern nur das Alkyl-Addukt von der DNA zu entfernen.

Die DNA-alkylierenden und potenziell kanzerogenen Alkyl-Gruppen stammen aus körpereigenen Stoffwechselfvorgängen oder von umwelt- und nahrungsbedingt auf den Organismus einwirkenden Stressoren. Aufgrund der ständigen Exposition ist ein effektiver und schneller Reparaturmechanismus unverzichtbar, um eine Tumorentstehung zu verhindern, die schon bei wenigen alkylierten Guaninen beginnen kann. Ein komplettes Absterben der jeweiligen Zelle wird dagegen erst bei ungefähr 5000 O⁶-Methylguaninen induziert (Gerson, 2004).

Funktionelle Störungen des Mgmt-Reparaturenzyms können somit zu einer erhöhten DNA-Mutationsrate und nachfolgend zur Tumorentstehung führen. Ein in dieser Arbeit untersuchter Mechanismus, der letztendlich zu einer verminderten Mgmt-Expression und -Funktion führt, ist die aberrante Promotorhypermethylierung des *MGMT*-Gens. Welche Regulationsmechanismen im einzelnen diese Hypermethylierung auslösen, ist noch nicht bekannt. Es kommt durch diesen Mechanismus (die Methylierung von Cytosinen im Bereich des Promotors und des ersten Exons) zur Unterbindung der Transkription des *MGMT*-Gens. Die Enzymsynthese stagniert mit der Folge, dass ein Mangel an Mgmt-Protein entsteht. Dieser führt dazu, dass mutagene Alkylanzien kanzerogene DNA-Schäden und Ablesestopps verursachen. Von großer klinischer Bedeutung ist die Tatsache, dass Mgmt auch für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich ist, die durch alkylierende Chemotherapeutika

hervorgerufen werden und so eine Resistenz gegen diese Medikamente verursachen kann. Im Gegensatz dazu führt ein Verlust von Mgmt durch Promotorhypermethylierung zu einer verbesserten Wirkung von alkylierenden Chemotherapeutika, wie z. B. die in der Gliombehandlung eingesetzten Nitrosoharnstoff-Derivate und das Temozolomid. Somit kann eine Hypermethylierung des *MGMT*-Gens zum einen Tumorentstehung fördern, zum anderen bei schon bestehendem Tumor aber auch die Wirksamkeit einer alkylierenden Chemotherapie verbessern (Gerson, 2004). Da letzteres Phänomen unmittelbare Auswirkung auf das Therapieansprechen und die Prognose von Tumorpatienten hat, erscheint es sinnvoll, die *MGMT*-Promotormethylierung und Exprimierung im Tumorgewebe vorab zu bestimmen, um die Chemotherapie dann gegebenenfalls individuell zu adaptieren. Esteller *et al.* (2000c) zeigten, dass der *MGMT* Status bei Patienten mit malignen Gliomen einen besseren Vorhersagewert für die Prognose unter Carmustin-Therapie hatte, als Tumorgrad, Karnofsky-Index oder das Patientenalter. Andererseits ist die Prognose der Patienten mit *MGMT* Hypermethylierung, also fehlender Reparaturtransferase, ohne alkylierende Therapie schlechter als ohne Hypermethylierung (Esteller und Herman, 2004). Eine Überexpression von Mgmt kann außerdem als Gen-Therapie genutzt werden, um Normalgewebe vor den Nebenwirkung einer Chemotherapie zu schützen (Gerson, 2004).

1.4 Molekulargenetik der Oligodendrogliome und Oligoastrozytome

Aus molekularbiologischen Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen ist bisher bekannt, dass Oligodendrogliome des WHO-Grades II in bis zu 80% der Fälle Allelverluste auf 1p und 19q aufweisen (Reifenberger und Louis, 2003). Außerdem treten häufig Promotorhypermethylierungen von *p14^{ARF}*, *CDKN2A* und/oder *CDKN2B* (Chr. 9p21) (Wolter *et al.*, 2001), sowie eine Überexpression des EGF-Rezeptors (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor), des Plättchenwachstumsfaktor α (PDGF α) und seines Rezeptors (PDGFRA) auf (Reifenberger und Louis, 2003). Bei der Progression zum anaplastischen Oligodendrogliom (WHO III) lassen sich vor allem Verluste auf den Chromosomenarmen 9p und 10q finden. Die Deletionen auf 9p führen zu einem Verlust der Zellzyklusregulatorgene *CDKN2A* (homozygote Deletion in bis zu einem Drittel der Fälle) und *CDKN2B*. In einem kleinen Teil der anaplastischen Oligodendrogliome finden sich *PTEN* Mutationen, welche mit einer

schlechten Prognose assoziiert sind (Sasaki *et al.*, 2001). *TP53* Mutationen sind dagegen in Oligodendrogliomen selten (Reifenberger und Louis, 2003).

Auch mehr als die Hälfte der Oligoastrozytome (50-70% der Fälle) weisen die Kombination von 1p und 19q Verlusten auf und zeigen dann häufig eine vorherrschend oligodendrogliale Differenzierung. Im Gegensatz dazu finden sich in bis zu 30% der Oligoastrozytome *TP53* Mutationen, wobei in diesen Fällen meist der astrozytäre Anteil überwiegt (Maintz *et al.*, 1997 ; Watanabe *et al.*, 2002).

Klinisch außerordentlich bedeutsam ist der Befund, dass Oligodendrogliome und Oligoastrozytome mit einem Allelverlust auf 1p und 19q eine außergewöhnlich gute Sensitivität für die Behandlung mit alkylierenden Chemotherapeutika aufweisen (Cairncross *et al.*, 1998, Felsberg *et al.*, 2004), was wiederum eine günstige Prognose mit oftmals langjährigen Rezidiv-freien Verläufen bedingt. Histologisch gleichartige Tumoren, die keine 1p und 19q-Verluste aufweisen, sprechen dagegen mehrheitlich nicht auf die Chemotherapie an, insbesondere dann, wenn zusätzlich homozygote *CDKN2A* Deletionen oder *PTEN* Mutationen vorliegen (Ino *et al.*, 2001).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der eigenen Arbeit

Zur Chemotherapie bei Tumorerkrankungen, besonders bei Hirntumoren, werden häufig alkylierende Substanzen wie Nitrosoharnstoff-Derivate (BCNU, CCNU, ACNU) oder die neue, oral anwendbare Substanz Temozolomid eingesetzt, die Schäden in der Tumor-DNA setzen und darüber zur Apoptose von Tumorzellen führen. Wird in der Tumorzelle allerdings das Mgmt-Protein in ausreichender Menge exprimiert, so werden die therapeutisch induzierten DNA-Schäden repariert und die Tumorzelle resistent gegenüber der Chemotherapie. Es sind folglich große Mengen an Chemotherapeutika mit entsprechend hoher Nebenwirkungsrate erforderlich, um die Reparaturkapazität des Enzyms zu überlasten und ein Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie zu erzielen. So liegt der klinische Aspekt dieser Arbeit darin, zu ermitteln, ob in oligodendroglialen Tumoren, die häufig Chemotherapie-sensibel sind, *MGMT* über eine Promotorhypermethylierung transkriptionell ausgeschaltet ist. Für die Patienten würde das bedeuten, dass möglicherweise anhand der Bestimmung des *MGMT*-Methylierungsstatus eine Vorhersage hinsichtlich der Wirksamkeit einer Behandlung mit alkylierenden Chemotherapeutika möglich ist.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu klären, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem *MGMT*-Methylierungsstatus und dem Vorhandensein von Allelverlusten auf 1p und 19q in oligodendroglialen Tumoren besteht, da bekannt ist, dass letztere Veränderung mit einem Ansprechen auf Chemotherapie und günstiger Prognose assoziiert ist. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit umfasst somit nicht nur Aspekte der molekularbiologischen Grundlagenforschung, sondern auch die Analyse einer möglichen klinischen Bedeutung epigenetischer Veränderungen des *MGMT*-Gens bei Patienten mit Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Arbeit untersuchte Tumorserie umfasste 52 oligodendrogliale Tumoren von 24 weiblichen und 28 männlichen Patienten im Alter von 4-72 Jahren (Tab. 1). Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag bei 47 Jahren. Von einer Patientin wurden Tumorproben unterschiedlicher Operationen untersucht (OA1 und AOA12). Im einzelnen handelte es sich bei den Tumoren um 9 Oligodendrogliome WHO-Grad II (OII), 23 anaplastische Oligodendrogliome WHO-Grad III (AOIII), 9 Oligoastrozytome WHO-Grad II (OAI) und 11 anaplastische Oligoastrozytome WHO-Grad III (AOAIII). Die Patienten wurden zwischen März 1989 und Dezember 1997 in der Neurochirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf oder der Abteilung für Neurochirurgie der Evangelischen und Johanniter-Krankenanstalten Duisburg-Nord/Oberhausen operiert. Ein Teil des Tumormaterials stammte zudem von Patienten, die im Karolinska Hospital, Stockholm oder im Sahlgrenska Hospital, Göteborg, Schweden operiert wurden. Insgesamt handelte es sich in 35 Fällen um Primärtumoren, in 11 Fällen um das erste Rezidiv, in vier Fällen um das zweite und in zwei Fällen um das dritte Rezidiv. Neun Patienten waren zuvor adjuvant bestrahlt und ein Patient adjuvant chemotherapiert worden (Tab.1).

Alle Tumoren wurden anhand der WHO-Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems (Kleihues und Cavenee, 2000) histopathologisch klassifiziert. Die zur DNA und RNA Extraktion verwandten Tumorproben wiesen lichtmikroskopisch alle einen Tumorzellgehalt von mindestens 80% auf. Für die eigenen Untersuchungen standen bereits DNA und RNA Proben zur Verfügung. Für die Bisulfitbehandlung und nachfolgende methylierungsspezifische PCR (MSP) bzw. Sequenzanalyse wurde genomische DNA eingesetzt. Für die Real-Time RT-PCR Untersuchungen war cDNA (copy-DNA), synthetisiert aus RNA, das Ausgangsmaterial.

Tab. 1: Klinische Daten der Patienten, von denen Tumorproben untersucht wurden.

Fallnummer	Diagnose ^a	Alter (Jahre)	Geschlecht ^b	Lokalisation	Anmerkungen ^c
O2	O II	31	w	parieto-occipital	1. Rezidiv; X
O5	O II	43	w	temporal	1. Rezidiv, X
O8	O II	24	m	frontal	PT
O14	O II	38	w	frontal	PT
O16	O II	36	m	frontal	PT
O17	O II	60	m	frontal	PT
O18	O II	46	m	frontal	PT
O19	O II	72	w	temporal	1. Rezidiv
O20	O II	53	w	frontal	PT
AO2	AO III	54	w	frontal	1. Rezidiv, X
AO4	AO III	52	w	frontal	PT
AO5	AO III	44	w	frontal	PT
AO6	AO III	62	m	frontal	PT
AO7	AO III	53	w	frontal	PT
AO8	AO III	29	m	frontal	PT
AO10	AO III	55	w	frontal	2. Rezidiv
AO11	AO III	32	m	parieto-occipital	PT
AO12	AO III	64	w	frontal	PT
AO18	AO III	57	m	fronto-parietal	PT
AO19	AO III	47	m	frontal	1. Rezidiv
AO20	AO III	57	w	frontal	PT
AO21	AO III	61	m	frontal	2. Rezidiv, X
AO22	AO III	64	w	frontal	PT
AO23	AO III	48	m	fronto-temporal	PT
AO24	AO III	57	w	temporo-parietal	1. Rezidiv, X
AO25	AO III	36	m	fronto-temporal	PT
AO26	AO III	61	w	frontal	PT
AO29	AO III	59	w	frontal	3. Rezidiv, X
AO34	AO III	50	w	fronto-temporal	PT
AO35	AO III	70	m	parietal	PT
AO36	AO III	34	w	fronto-temporal	2. Rezidiv, X
AO38	AO III	29	m	frontal	PT
OA1	OA II	41	m	frontal	1. Rezidiv
OA2	OA II	61	w	frontal	PT
OA3	OA II	46	m	temporal	PT
OA4	OA II	70	m	frontal	PT
OA5	OA II	4	m	temporal	PT
OA6	OA II	50	m	parietal	1. Rezidiv
OA7	OA II	33	m	frontal	PT
OA8	OA II	8	m	cerebellär	PT
OA10	OA II	70	w	frontal	PT
AOA1	AOA III	59	m	frontal	1. Rezidiv
AOA2	AOA III	50	w	frontal	PT
AOA3	AOA III	65	m	frontal	PT
AOA4	AOA III	50	w	frontal	PT
AOA5	AOA III	42	w	frontal	1. Rezidiv
AOA6	AOA III	32	m	parieto-occipital	PT
AOA7	AOA III	50	m	temporo-parietal	PT
AOA8	AOA III	5	w	cerebellär	PT
AOA12	AOA III	47	m	frontal	2. Rezidiv von OA1
AOA13	AOA III	56	m	temporo-parietal	1. Rezidiv, X
AOA18	AOA III	33	m	parieto-temporal	3. Rezidiv, Chemo, X

^a O II: Oligodendrogliom WHO-Grad II, AO III: anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III, OA II: Oligoastrozytom WHO-Grad II, AOA III: anaplastisches Oligoastrozytom WHO-Grad III; ^b w: weiblich, m: männlich; ^c PT: Primärtumor; X: Zustand nach Strahlentherapie, Chemo: Zustand nach Chemotherapie.

2.2 Methoden

2.2.1 Natriumbisulfitbehandlung genomischer DNA

Durch eine Behandlung von DNA mit Natriumbisulfit wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, während 5-Methyl-Cytosin unverändert bleibt (**Abb. 3**). Bei einer nachfolgenden PCR-Amplifikation und Sequenzierung dieser modifizierten DNA wird Uracil als Thymin gelesen. Dagegen wird methyliertes Cytosin als Cytosin erkannt und kann so von unmethyliertem Cytosin unterschieden werden.

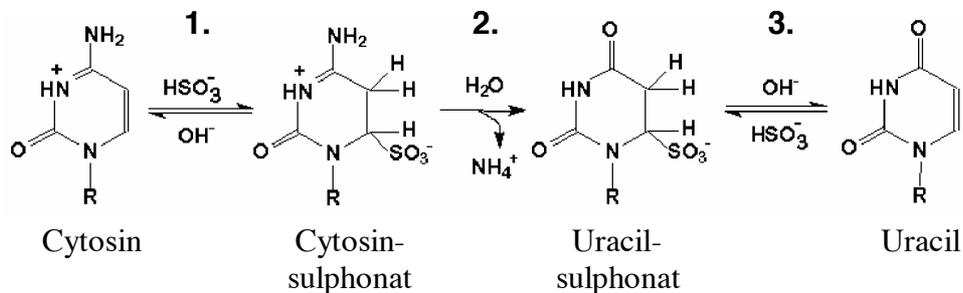


Abb. 3: Chemischer Verlauf der Bisulfit-induzierten hydrolytischen Desaminierung von Cytosin zu Uracil. Schritt 1: Sulphonierung; Schritt 2: Hydrolytische Desaminierung; Schritt 3: Alkali-Desulphonierung.

Ein Cytosin-Molekül kann über sein C5-Atom Addukte mit zahlreichen Substanzen, einschliesslich des Bisulfit-Ions, bilden. Die relativ langsame Reaktion mit Natriumbisulfit wird bei niedrigem pH-Wert (pH 5,0) katalysiert und ist Einzelstrang-spezifisch. In wässriger Lösung wird das Cytosin-Bisulfit-Addukt unter Abspaltung der NH_2 -Gruppe zum Uracil- SO_3^- -Derivat desaminiert und durch eine abschließende Alkali-Behandlung zu Uracil desulphoniert (**Abb. 3**).

Für die Natriumbisulfitbehandlung wurden je $10 \mu\text{l}$ genomische DNA ($100 \text{ ng}/\mu\text{l}$) mit $1,5 \mu\text{l}$ 10 N NaOH und $38,5 \mu\text{l}$ *Aqua dest.* bei 37°C in einem Heizblock 15 min zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von $30 \mu\text{l}$ 10 mM Hydrochinon (frisch angesetzt) und $520 \mu\text{l}$ 3 M Natriumbisulfit (frisch angesetzt). Das Gemisch wurde mit zwei Tropfen Mineralöl bedeckt in einem Hybridisierofen bei 55°C für 16 h inkubiert. Die anschließende Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem „*Wizard DNA*

Clean-Up System“ (Promega) gemäß Angaben des Herstellers. Im letzten Schritt wird die DNA aus den Aufreinigungssäulen in 50 μ l *Aqua dest.* eluiert und danach mit 1,5 μ l 10 N NaOH 15 min bei 37°C desulphoniert. Die modifizierte DNA wurde mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2 Vol. 99% (v/v) Ethanol bei -20°C für mindestens 30 min gefällt und anschließend die DNA für 30 min bei 14 000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 15 μ l *Aqua dest.* aufgenommen.

2.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) dient dazu, Nukleinsäureabschnitte *in vitro* zu vervielfältigen. Sie konnte sich seit ihrer Entdeckung im Jahr 1983 durch Kary Mullis als wichtiger Bestandteil vieler molekulargenetischer Untersuchungsmethoden etablieren. In einem ersten Schritt wird die Matrizen-DNA (oder cDNA) durch Erhitzen denaturiert. Anschließend erfolgt bei niedrigerer Temperatur (der „*Annealing*“-Temperatur) die Anlagerung eines ausgewählten Oligonukleotid-Paares an die denaturierte DNA. Die Sequenz dieser Oligonukleotide oder „*Primer*“ ist komplementär zu den 5' bzw. 3'-Bereichen des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Im letzten Schritt (Elongation) wird der neue DNA-Strang ausgehend von der freien 3'-OH-Gruppe des Oligonukleotids durch den Einbau von Desoxynukleotiden mit Hilfe der hitzeresistenten *Taq* DNA Polymerase synthetisiert.

2.2.3 Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Die methylierungsspezifische PCR ist eine schnelle und sehr sensitive Methode, um z. B. eine größere Tumorserie auf Methylierung eines oder mehrerer Gene hin zu untersuchen. Dabei werden die „*Primer*“ so ausgewählt, das sie entweder von methylierter oder unmethylierter natriumbisulfitbehandelter DNA amplifizieren. Die PCR-Produkte können dann auf Agarosegelen aufgetrennt und ausgewertet werden. Die MSP ist die momentan sensitivste Methode und kann einen Anteil von 0,1% methylierter DNA in einem DNA-Gemisch detektieren. Der Nachteil der Methode liegt in der fehlenden quantitativen Information und

darin, dass sich der Nachweis methylierter CpG Dinukleotide auf die beiden Bindungsstellen der „Primer“ beschränkt.

Für die MSP-Analyse der 5'-CpG-Insel im Promotorbereich des *MGMT*-Gens wurden folgende Komponenten auf Eis pipettiert:

1/15 der natriumbisulfitbehandelten DNA
2,5 μ l 10 x PCR-Puffer (Qiagen)
2,5 μ l 2 mM dNTP-Mix
1,5 μ l 10 pmol/ μ l Vorwärts-Primer
1,5 μ l 10 pmol/ μ l Rückwärts-Primer
2,0 μ l DMSO
1 u HotStar *Taq* DNA Polymerase (Qiagen)
ad 25 μ l H₂O *dest.*

Die entsprechenden Primersequenzen zur Amplifikation methylierter bzw. nicht-methylierter DNA finden sich in Tabelle 3. Die MSP-Reaktionen wurden unter folgenden PCR-Bedingungen in einem Thermocycler der Firma BIOMETRA durchgeführt:

1.	15 min	95°C	(Hitzeaktivierung der HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase)	
2.	30 s	95°C	} 45 Zyklen	
3.	30 s	56°C		
4.	1,5 min	72°C		
5.	10 min	72 °C		

Bis zur weiteren Verwendung wurden die PCR-Produkte bei 4°C gelagert.

Zur Auswertung der MSP-Analyse wurden jeweils 5 μ l der PCR-Produkte mit 5 μ l BFB-Ladepuffer (siehe 2.7) auf 2% Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer (siehe 2.7) mit Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml) als Fluoreszenzfarbstoff aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese konnten die Nukleinsäurebanden unter UV-Licht abgebildet werden. Als Größenstandard wurde ein 100 bp-DNA-Größenmarker (PeqLab) verwendet.

Das Vorhandensein eines klaren PCR-Produktes bei Verwendung methylierungsspezifischer Primer wurde mit einem „+“ bewertet, eine schwache Bande mit einem „(+“ und die Abwesenheit eines methylierungsspezifischen PCR-Produktes mit einem „-“. Als positive Kontrolle für die methylierungsspezifische PCR diente mit *SssI*-Methyltransferase behandelte DNA aus nicht-neoplastischem Hirngewebe. Natriumbisulfitbehandelte, nicht-methylierte Leukozyten-DNA und DNA aus nicht-neoplastischem Hirngewebe wurde als Negativkontrolle in der methylierungsspezifischen MSP eingesetzt.

2.2.4 Sequenzierung der natriumbisulfitbehandelten DNA

Die Methode der Wahl zur Untersuchung des Methylierungsmusters aller CpG Dinukleotide in einer bestimmten Genregion ist die direkte Sequenzierung natriumbisulfitbehandelter DNA. Zunächst wurde die zu untersuchende Sequenz mittels PCR aus der natriumbisulfitbehandelten DNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden dann über ein Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt. Ein Aliquot des aufgereinigten PCR-Produktes wird nach der *Dye-Terminator* Methode von Applied Biosystems sequenziert. Dabei findet eine lineare Vermehrung der eingesetzten Proben statt, die dann beendet wird, wenn das jeweilige fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotid (*Dye-Terminator*) eingebaut wird. Die vier verschiedenen Farbmoleküle emittieren nach Anregung durch einen Argonlaser Licht verschiedener Wellenlänge. Daher kann die zu sequenzierende DNA-Probe in einer Laufspur aufgetrennt werden. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf einem semiautomatischen Sequenziergerät (ABI 377, Applied Biosystems).

Die zu untersuchende *MGMT*-Promotorregion wurde zuerst nach folgendem Protokoll aus der bisulfitbehandelten DNA vervielfältigt:

In einem Gesamtvolumen von 25 μ l wurden 1 μ l natriumbisulfitbehandelte DNA, 1 x PCR Puffer (QIAGEN), 1u HotStar *Taq* DNA Polymerase (QIAGEN), 0.2 mM dNTP und 15 pmol je Primer pipettiert. Nach einer 15 minütigen Aktivierung der *Taq* DNA Polymerase bei 95°C wurden die Proben in einem Thermocycler der Firma BIOMETRA mit 45 Zyklen unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

30 s	95°C	Denaturierung
30 s	56°C	Annealing
90 s	72°C	Elongation

Abschließend erfolgt bei 72°C für 10 min das Auffüllen der begonnenen DNA-Doppelstränge. Die PCR-Produkte wurden mit 5 µl BFB-Ladepuffer versetzt und vollständig auf ein 1% (w/v) Agarosegel aufgetragen, unter UV-Licht mit Hilfe des interkalierten Ethidiumbromids visualisiert und ausgeschnitten. Die Agaroseblöckchen wurden in Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Aufreinigung bei 4°C gelagert. Die DNA wurde mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purifikation Kit* (ROCHE) nach dem Herstellerprotokoll aus der Agarose aufgereinigt und in 35 µl Elutionspuffer eluiert. Zur Abschätzung der Produktmenge wurden je 5 µl der aufgereinigten DNA und 4 µl BFB-Ladepuffer (siehe 2.7) auf einem Agarosegele aufgetrennt und je nach Bandenstärke 4-7,5 µl Produkt in die *Cycle*-Sequenzierreaktion eingesetzt.

Die *Cycle*-Sequenzierreaktion setzte sich folgendermaßen zusammen:

4 -7,5 µl	aufgereinigtes PCR-Produkt
0,5 µl	Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)
2,0 µl	Terminationsmix (Applied Biosystems)
ad 10,0 µl	H ₂ O <i>dest.</i>

Die lineare Amplifikation der Proben erfolgte in 25 Zyklen mit folgendem PCR-Programm:

10 s	96°C
5 s	55°C
4 min	60°C

Für die Aufreinigung der *Cycle*-Sequenzierprodukte wurden zunächst 1 µl 3 M Natriumacetat pH 4,6 und 25 µl 95% Ethanol in ein Reaktionsgefäß pipettiert und der Reaktionsansatz dazugegeben. Die Proben wurden kurz gemischt und dann für 30 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet zweimal mit je 200 µl 70% Ethanol gewaschen und bei 37°C in einem Heizblock getrocknet. Zum Auftrag auf das

Sequenziergel wurde das Pellet in 4 μ l Sequenzierungspuffer (siehe 2.7) gelöst, wovon 2 μ l auf das Polyacrylamidgel geladen wurden.

Das Sequenziergel wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

21 g	Harnstoff
8,4 ml	30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid, 29:1 vernetzt (BIORAD)
6 ml	10 x TBE (siehe 2.7)
20 ml	Aqua <i>dest.</i>

Nach vollständiger Lösung des Harnstoffs werden 15 μ l TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) sowie 350 μ l 10% Ammoniumpersulfat (APS) zugesetzt und die Gellösung zwischen die gereinigten Glasplatten gegossen. Nach der vollständigen Auspolymerisierung erfolgt der Sequenzlauf in einem halbautomatischen Sequenziergerät der Firma Applied Biosystems (ABI Prism 377). Die Auftrennung der Proben erfolgt in einer Laufzeit von acht Stunden bei 2500 Volt, 48 Watt und 51°C Geltemperatur.

2.2.5 Auswertung der Sequenzierung der natriumbisulfitbehandelten DNA

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden auf das Vorliegen von methylierten, also durch die Natriumbisulfitbehandlung nicht umgewandelten CpG Dinukleotiden an den entsprechenden Lokalisationen untersucht. Die Daten aller untersuchten Tumoren wurden in Tabelle 4 zusammengestellt.

2.3 Real-Time Reverse-Transkriptase (RT)-PCR

Die Real-Time RT-PCR ermöglicht die kontinuierliche quantitative Messung des gebildeten PCR-Produktes durch Bestimmung und Quantifizierung eines Fluoreszenzsignals, welches proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produktes in der Reaktion zunimmt. Im Gegensatz zur Endproduktbestimmung bei einer herkömmlichen PCR ermöglicht die Messung der Fluoreszenz in jedem Amplifizierungszyklus eine kontinuierliche Aufzeichnung

der PCR-Produktbildung. Eine quantitative Bestimmung der PCR-Produktmenge ist jedoch nur in der exponentiellen Phase der Reaktion sinnvoll, da hier die Zunahme an PCR-Produkt mit der in die Reaktion eingesetzten Matrizenmenge direkt korreliert. Je höher die ursprüngliche Kopienzahl der Matrize ist, desto schneller ist ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen. Ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz über einen Basiswert, der während der ersten 3-15 Zyklen (durch Voreinstellung) bestimmt wird, kennzeichnet die Entstehung von PCR-Produkt. Ein fester Schwellenwert (C_T), der oberhalb der Basisfluoreszenz liegt (**Abb. 4**), wird am Ende der Real-Time RT-PCR durch den Anwender festgesetzt. Dieser C_T -Wert ist definiert als die Zyklus-Zahl, bei der die Fluoreszenzemission den festen Schwellenwert überschreitet (**Abb. 4**).

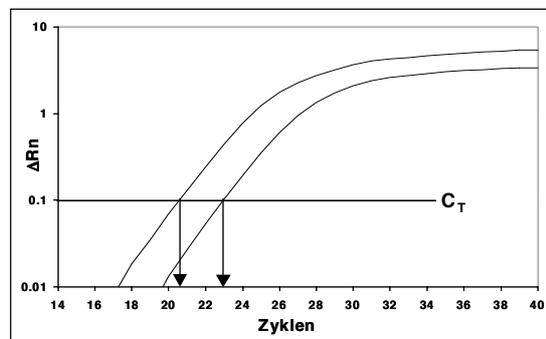


Abb. 4: Graphische Darstellung der Produktzunahme (Ordinate, ΔRn) gegen die Zyklenzahl (Abzisse). Dargestellt sind beispielhaft zwei Kurvenverläufe mit von links nach rechts abnehmender Kopienzahl der Matrize. Die linke Kurve schneidet den Schwellenwert (C_T) ungefähr beim 21. PCR-Zyklus, während die rechte Kurve beim 23. Zyklus den Schwellenwert überschreitet.

Mit Hilfe der Real-Time RT-PCR lässt sich die mRNA-Expression von Genen sehr sensitiv und reproduzierbar bestimmen, jedoch detektiert diese PCR-Methode nicht die Größe eines Amplikons. Dies macht die Erstellung einer Dissoziationskurve am Ende der PCR (**Abb. 5**) notwendig. Im Idealfall sollen die untersuchten Proben einen scharfen Peak bei der Schmelztemperatur des Amplikons ergeben. Dagegen dürfen in den entsprechenden Leerkontrollen (ohne Matrize) keine signifikanten Fluoreszenzsignale auftreten.

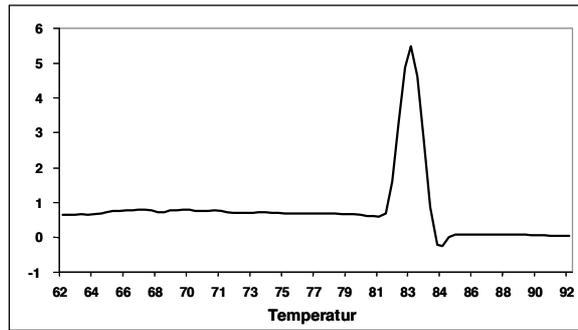


Abb. 5: Charakteristische Schmelzkurve eines reinen PCR-Produktes. Der scharfe Peak der Schmelzkurve bei dem Schmelzpunkt des Amplikons (hier: bei 83°C) weist ein sauberes PCR-Produkt aus.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit angewandten komparativen C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$) lässt sich die Expression von Genen relativ zur Expression eines Referenzgens quantifizieren. Dabei entfällt die Erstellung einer Eichkurve, um die Kopienzahl eines Gens exakt festzustellen. Als Referenzgene dienen solche Gene, die in allen Zellen und Geweben möglichst gleichstark exprimiert werden, wie die sogenannten „Haushaltsgene“, *GAPDH* (Glycerinaldehyd-Dehydrogenase) oder β -*Aktin*. Da die mRNA Expression dieser beiden Gene im Vergleich zur Expression des untersuchten Zielgens *MGMT* zu stark war, wurde *ARF1* (*ADP-Ribosylation factor 1*; NCBI GenBank Zugangsnummer M36340) als Referenzgen für die Expressionsanalysen ausgewählt. Die Normalisierung der ermittelten Zielgen-Expressionswerte gegen die Expression des Referenzgens für jede untersuchte Tumorprobe ($\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenz})$) soll Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Tumorproben, die durch unterschiedliche Matrizenmengen verursacht werden, ausschließen. In jedem Real-time RT-PCR Lauf dient eine bestimmte Matrize als Kontrollprobe, um die einzelnen Läufe untereinander vergleichen und um die ermittelten Expressionswerte der Tumorproben auf einen gemeinsamen Wert beziehen zukönnen. In dieser Arbeit wurden zwei nicht-neoplastische Hirngewebsproben als Kontrollen in jedem durchgeführten Real-time RT-PCR Lauf eingesetzt. Die ΔC_T -Werte der beiden Kontrollen wurde gemittelt und von den ΔC_T -Werten der Tumorproben subtrahiert ($\Delta\Delta C_T$ -Wert, **Tab. 2**). Eine erhöhte Expression in den Tumorproben im Vergleich zur nicht-neoplastische Hirngewebs-Kontrolle ergibt einen negativen $\Delta\Delta C_T$ -Wert und eine erniedrigte Expression hat einen positiven $\Delta\Delta C_T$ -Wert zur Folge. Um diese Werte in absolute Zahlen umzuwandeln, wird der $\Delta\Delta C_T$ -Wert invers zur Basis 2 potenziert, so dass die Hirngewebskontrolle einem Expressionslevel von 1 entspricht

und die *MGMT* mRNA-Expression in den Tumoren relativ zu diesem Wert angegeben werden kann (Tab. 2).

Tab. 2: Beispiel für eine Real-Time RT-PCR Auswertung.

Probe	C_T Zielgen	C_T Referenzgen	MW (C_T) Zielgen	MW (C_T) Referenzgen	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
Ko1	23.53	20.20	23.54	20.21	3.33		
	23.54	20.12					
	23.55	20.03					
Ko2	24.28	20.38	24.05	20.26	3.79		
	23.83	20.14					
	24.05	20.26					
			MW (ΔC_T)	3.56	0.00	1.00	
Tu1	18.32	19.25	18.32	19.35	-1.03	-4.59	24.08
	18.37	19.35					
	18.27	19.45					
Tu2	24.19	20.55	23.96	20.55	3.41	-0.15	1.10
	23.89	20.65					
	23.79	20.45					
Tu3	25.59	20.33	25.59	20.37	5.22	1.66	0.32
	25.78	20.37					
	25.40	20.41					

Ko, Kontrollgewebe; Tu, Tumorproben. Von den zu untersuchenden Tumorproben wird jeweils ein Dreifach RT-PCR Ansatz durchgeführt und von diesen Messwerten der Mittelwert (MW) bestimmt. Die Tumorprobe Tu1 zeigt eine deutliche Überexpression der Zielgen-mRNA im Vergleich zu der Kontrolle, während die Tumorprobe Tu3 eine deutlich erniedrigte Expression aufweist. In der Tumorprobe Tu2 ist die Expressionshöhe des Zielgens vergleichbar mit der im Kontrollgewebe. C_T , Fluoreszenzschwellenwert.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Real-Time RT-PCR Untersuchungen wurde das folgende Schema für die Herstellung eines einfachen Reaktionsansatzes verwendet:

	2,5	μl	10 x Reaktionspuffer
	1,75	μl	50 mM MgCl_2
	1,0	μl	5,0 mM dNTPs
	0,125	μl	Hot Gold Star <i>Taq</i> Polymerase
	0,75	μl	SYBR Green [®] Farbstoff (1/66000 verdünnt)
	1,5	μl	Vorwärts-Oligonukleotid (MGMT, 10 pmol/ μl)
	4,5	μl	Rückwärts-Oligonukleotid (MGMT, 10 pmol/ μl)
oder	1,5	μl	Vorwärts-Oligonukleotid (ARF1, 10 pmol/ μl)
	1,5	μl	Rückwärts-Oligonukleotid (ARF1, 10 pmol/ μl)
	5	μl	cDNA-Gebrauchslösung
	ad 25	μl	<i>Aqua dest.</i>

Die Real-Time RT-PCR wurde mit dem ABI Prism[®] 5700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Darmstadt) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt.

1. 50°C 2 min
2. 95°C 10 min (Aktivierung der *Hot Gold Star Taq* Polymerase)
3. 95°C 15 sec (Denaturierung des DNA-Doppelstranges)
4. 60°C 1 min (Anlagerung der Primer und DNA-Synthese)

Die Schritte 3 und 4 wurden 40 mal wiederholt.

Die erhaltenen Messdaten der einzelnen Tumor- und Kontrollproben wurden dann wie oben beschrieben ausgewertet.

Tab. 3: Zusammenstellung der verwendeten Primer.

MSP MGMT		
unmethyliert	sense	5'- TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT -3
	antisense	5'- AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA -3
methyliert	sense	5'- TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC -3
	antisense	5'- GCACTCTTCGAAAACGAAACG -3
Sequenzierung MGMT		
	sense	5'- ATGTTGGGATAGTTTGTGTTTTTAGA -3
	antisense	5'- CCACTCCACAATCACTACAAC -3
Real-Time-RT-PCR		
MGMT	sense	5'- TGCACAGCCTGGCTGAATG -3
	antisense	5'- GGTGAACGACTCTTGCTGGAAA -3
ARF 1	sense	5'- GACCACGATCCTCTACAAGC -3
	antisense	5'- TCCCACACAGTGAAGCTGATG -3
Nested-Primer zur Sequenzierung		
Primer 6	sense	5'- TAAATTAAGGTATAGAGTTTTAGG -3
Primer 8	antisense	5'- AAAAATTCTAAAACTTCCTAAAAC -3
Primer 10	antisense	5'- CTAAACAACACCTAAAAACACTTAA -3
Primer 11	antisense	5'- CCAATCCACAATCACTACAAC -3

sense: Vorwärts-Primer, antisense: Rückwärts-Primer

2.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Zum Nachweis des Mgmt-Proteins wurde eine immunhistochemische Färbung an Paraffinschnitten der jeweiligen Tumoren vorgenommen. Dazu wurden die Präparate zunächst entparaffiniert und rehydriert, sowie im Gewebe vorhandenes Biotin geblockt. Dann wurde der spezifische Antikörper gegen Mgmt (Klon MT3.1, Neomarker, Frumat, CA) auf die Schnitte gegeben. Die Bindung des Primärantikörpers wurde dann mit dem Dako CSA System gemäß dem Herstellerprotokoll nachgewiesen. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin und Eindeckelung wurden die Präparate dann im Lichtmikroskop untersucht.

Als Positivkontrolle wurde ein in der Real-Time RT-PCR stark *MGMT*-exprimierender Tumor mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten nicht mit dem Antikörper inkubierte Schnitte, die ansonsten der gleichen Behandlung unterzogen wurden wie alle übrigen Schnitte.

Die Tumorgewebsschnitte wurden zunächst in Xylol (2 x 15 min) entparaffiniert und dann über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Dann erfolgte die Biotin-Blockierung in

einzelnen Schritten mit den im CSA-System enthaltenen Lösungen nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären monoklonalen Maus-Antikörper gegen Mgmt 1 in einer Konzentration von 0.4 $\mu\text{g/ml}$ für 15 Minuten inkubiert. Der Negativkontrolle wurde statt des Antikörpers das im System enthaltene Negativ-Kontroll-Reagenz zugegeben. Danach wurde mit dem zweiten Antikörper ebenfalls 15 Minuten inkubiert, der Streptavidin-Biotin-Complex (frisch hergestellt) zugegeben und mit der Amplifikations-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Streptavidin-Peroxidase und im letzten Schritt die Inkubation mit der ebenfalls frisch angesetzten und dunkel gelagerten Diaminobenzidin-Substratlösung. Zwischen allen Schritten erfolgten jeweils gründliche Spülungen der Schnitte in TBST-Puffer (siehe 2.7). Alle Inkubationen erfolgten jeweils solange, wie im Herstellerprotokoll angegeben. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte einer konventionellen Hämatoxylin-Färbung unterzogen und nach Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe in DePex-Überschichtungsmedium eingedeckelt. Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte semiquantitativ am Lichtmikroskop anhand der folgenden Scala: -, keine positiven Tumorzellen; +, <10% positive Tumorzellen; ++, 10-50% positive Tumorzellen; +++, >50% positive Tumorzellen.

2.5 LOH-Analysen auf 1p und 19q

Zum Vergleich der *MGMT*-Promotormethylierung und Expression mit dem Allelstatus auf 1p und 19q wurden die LOH-Daten der untersuchten Tumoren verwendet, die bereits aus zwei Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bekannt waren (Reifenberger et al., 1994; Felsberg et al., 2004). Diese stammten aus RFLP- bzw. Mikrosatellitenanalysen, wobei jeweils 14 Loci auf 1p und 16 Loci auf 19q mittels RFLP-Analyse, bzw. 22-24 Loci auf 1p und 7 Loci auf 19q mittels Mikrosatellitenanalysen bestimmt worden waren.

2.6 Statistische Auswertung

Der Student's t-Test wurde zum Vergleich kontinuierlicher Variablen verwendet. Für die statistische Auswertung von Vierfeldertafeln wurde der Fisher-Test oder der X^2 -Test herangezogen. Alle ermittelten p-Werte sind 2-seitig und liegen in einem Vertrauensintervall von 95%.

2.7 Lösungen und Puffer

Aufgeführt sind die Rezepte der wichtigsten eingesetzten Lösungen und Puffer. Für weitere Einzelheiten wird auf das Laborhandbuch von Sambrook *et al.* (2001) verwiesen.

6 x BFB-Ladepuffer: 0.25 % Bromphenol-Blau
 0.25 % Xylencyanol FF
 30 % Glycerol in Aqua dest.

1 x TAE-Puffer: 40 mM Tris – Base
 20 mM NaOAc
 1 mM EDTA

1 x TBE-Puffer : 90 mM Tris – Base
 90 mM Borsäure
 2 mM EDTA

TBST-Puffer: 0.05 M Tris-HCl pH 7.6
 0.3 M NaCl
 0.1% Tween 20
 (DAKO TBST 10x Konzentrat in 1:10 Verdünnung eingesetzt)

Sequenzierungs-Puffer: 4 ml FA
 1 ml EDTA (25 mM, pH 8,0)
 250 mg Blue Dextran (50 mg/ml)

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Serie von 52 Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen sowohl auf das Vorliegen einer *MGMT* Promotormethylierung als auch auf die Expression des *MGMT* Transkriptes und Proteins hin untersucht. Die folgende Abbildung (**Abb. 6**) zeigt den Promotorbereich von *MGMT*, der mittels methylierungsspezifischer PCR (blaue Pfeile) und Sequenzierung natriumbisulfitbehandelter DNA (graue Pfeile) auf methylierte Cytosine in CpG-Dinukleotiden hin analysiert wurde.



Abb. 6: DNA-Sequenz des untersuchten Promotorbereiches von *MGMT*.

Graue Pfeile, Sequenzierungsprimer; *blaue Pfeile*, MSP-Primer; Dargestellt ist die genomische Region zwischen den Nukleotiden 46827 bis 47291 (GenBank „Accession“-Nr.: AL355531). Unterstrichen ist eine der Regionen im *MGMT*-Promotor, deren Methylierung nach Watts *et al.* (1997) mit einer transkriptionellen Inaktivierung assoziiert ist.

3.1 Methylierungsanalyse der *MGMT* Promotorregion mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP)

Bei Verwendung von methylierungsspezifischen Primern (**Abb. 6**, blaue Pfeile) ließ sich in insgesamt 40 (6 OII, 20 AOIII, 5 OAI, 9 AOAI) der 52 untersuchten Tumoren ein deutliches und in drei Tumoren (2 AOIII, 1 OII) ein schwaches PCR-Produkt amplifizieren (**Tab. 4; Abb. 7**). In allen übrigen Tumoren und in nicht-neoplastischem Hirngewebe ließ sich nur mit der Primerkombination, die nicht-methylierte DNA nachweist, ein PCR-Produkt erzielen. Auch die Tumoren mit methylierten CpG-Primerstellen wiesen zumindest noch schwache Produkte mit den Primern auf, die an nicht-methylierte DNA-Sequenzen binden

(Abb. 7). Dies ist dadurch zu erklären, dass immer eine geringe Kontamination des Tumorgewebes mit nicht-neoplastischen Zellen (Gefäße, lymphozytäre Infiltrate, reaktive Astrozyten) besteht. Zusätzlich kann natürlich auch eine partielle Methylierung nur eines Alleles oder nur einer Subpopulationen von Tumorzellen bestehen (Abb. 7; Abb. 8 a, b).

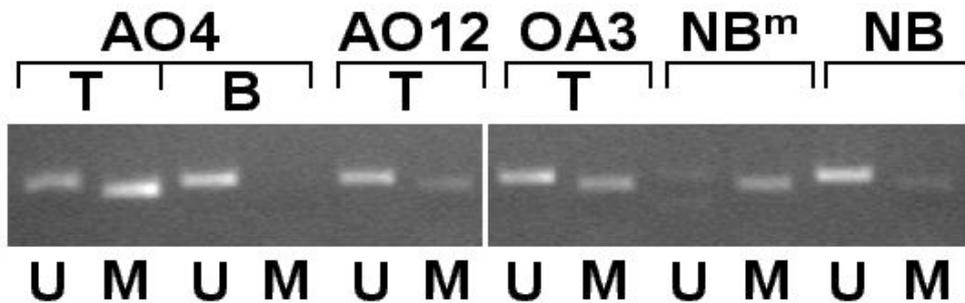


Abb. 7: Beispiel einer MSP-Analyse des *MGMT*-Promotors. Dargestellt sind Ethidiumbromid-gefärbte PCR-Produkte nach Auftrennung in einem Agarosegel. T, MSP-Produkte aus Natriumbisulfitbehandelter Tumor-DNA; B, MSP-Produkte aus natriumbisulfitbehandelter Blut-DNA; NB, nicht-neoplastisches Hirngewebe; NB^m, mit *SssI* Methyltransferase behandeltes nicht-neoplastisches Hirngewebe; M, PCR-Produkt bei Verwendung methylierungsspezifischer Primer; U, PCR-Produkt bei Verwendung von MSP-Primern für unmethylierte DNA. Man erkennt eine Methylierung des *MGMT*-Promotors in der Positiv-Kontrolle (NB^m) sowie in allen drei Tumoren (AO4, AO12, OA7). Blut-DNA (B) und nicht-neoplastisches Hirngewebe (NB) ergeben dagegen lediglich mit Primern gegen unmethylierte DNA ein Signal.

Tab. 4: Zusammenfassung der untersuchten Tumoren und Ergebnisse der molekulargenetischen und epigenetischen Analysen.

Tumor	Diagnose ^a	LOH ^b 1p	LOH ^b 19q	MGMT			
				MSP ^c	Bisulfit Sequenzierung ^d	mRNA Expression ^e	Protein Expression ^f
O 2	O II	+	+	+	84	0.8	-
O 5	O II	+	+	+	100	0.1	-
O 8	O II	-	-	-	44	n.a.	+++
O 14	O II	+	+	+	68	0.1	-
O 16	O II	+	+	-	64	0.6	++
O 17	O II	+	-	-	32	1.6	n.a.
O 18	O II	+	+	+	96	n.a.	-
O 19	O II	+	+	+	100	0.4	++
O 20	O II	+	+	+	92	n.a.	++
AO 2	AO III	+	+	+	92	0.6	-
AO 4	AO III	+	+	+	96	n.a.	-
AO 5	AO III	+	+	+	92	0.4	+
AO 6	AO III	+	+	+	96	n.a.	++
AO 7	AO III	+	+	+	92	n.a.	+
AO 8	AO III	-	+	+	76	0.1	n.a.
AO 10	AO III	-	+	+	72	1.2	n.a.
AO 11	AO III	-	-	-	0	12	+++
AO 12	AO III	-	-	(+)	88	1.2	-
AO 18	AO III	+	+	+	100	0.1	n.a.
AO 19	AO III	+	+	+	68	0.1	-
AO 20	AO III	+	-	+	100	n.a.	-
AO 21	AO III	+	+	+	96	0.4	-
AO 22	AO III	-	-	(+)	64	0.4	+
AO 23	AO III	+	+	+	64	0.2	n.a.
AO 24	AO III	-	-	+	100	0.1	-
AO 25	AO III	+	+	+	92	0.4	n.a.
AO 26	AO III	+	+	+	96	n.a.	+
AO 29	AO III	+	+	+	100	0.5	++
AO 34	AO III	+	-	+	88	0.3	-
AO 35	AO III	+	+	+	96	0.2	+
AO 36	AO III	+	+	+	88	0.4	-
AO 38	AO III	+	-	+	84	0.6	+
OA 1	OA II	+	+	(+)	96	0.6	++
OA 2	OA II	-	+	+	92	n.a.	-
OA 3	OA II	-	-	-	72	0.5	-
OA 4	OA II	-	-	+	72	0.8	-
OA 5	OA II	-	-	-	0	n.a.	n.a.
OA 6	OA II	-	-	+	96	0.3	++
OA 7	OA II	-	-	-	0	9.5	-
OA 8	OA II	-	-	+	92	n.a.	+
OA 10	OA II	-	-	+	64	1.1	+
AOA 1	AOA III	+	+	+	100	0.2	+
AOA 2	AOA III	+	+	+	96	n.a.	-
AOA 3	AOA III	-	+	+	64	1.8	n.a.
AOA 4	AOA III	-	-	-	96	0.4	n.a.
AOA 5	AOA III	-	-	+	80	0.8	-
AOA 6	AOA III	-	-	-	40	1.2	-
AOA 7	AOA III	+	-	+	84	0.2	-
AOA 8	AOA III	-	-	+	76	0.9	-
AOA 12	AOA III	+	+	+	96	n.a.	+
AOA 13	AOA III	-	-	+	80	0.3	+
AOA 18	AOA III	+	+	+	80	0.5	++

^a, OII, Oligodendrogliom WHO-Grad II; AOIII, anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III; OAI, Oligoastrozytom WHO-Grad II; AOAI, anaplastisches Oligoastrozytom WHO-Grad III. ^b, + = Verlust der Heterozygotie an einem oder mehreren Markern auf 1p bzw. 19q; - = kein Verlust der Heterozygotie auf 1p bzw. 19q. ^c, + = deutliches MSP-Produkt; (+) = schwaches MSP-Produkt; - = kein MSP-Produkt detektierbar. ^d, Prozent methylierter CpG-Stellen. ^e, mRNA Expressionlevel im Vergleich zur Expression in nicht-neoplastischem Hirngewebe. ^f, - = keine Mgmt-immunpositive Zellen; + = < 10% immunpositiver Zellen; ++ = 10-50% immunpositiver Zellen; +++ = > 50% immunpositiver Zellen; n.a. = nicht analysiert. Die LOH-Daten stammten aus den Publikationen von Reifenberger *et al.* (1994) und Felsberg *et al.* (2004).

3.2 Methylierungsanalyse der *MGMT* Promotorregion mittels direkter Sequenzierung natriumbisulfitbehandelter DNA

Die Methylierungsanalyse der *MGMT* Promotorregion mittels DNA-Sequenzierung zeigte eine Hypermethylierung (Methylierung von mehr als 50% der 25 untersuchten CpG-Dinukleotide) in 29/32 Oligodendrogliomen und in 17/20 Oligoastrozytomen (**Tab. 4; Abb. 8; Abb. 9**). Sieben Tumoren (2 OII, 4 AOIII, 1 AOA III) waren an allen untersuchten 25 CpGs methyliert. Diese Tumoren waren in der MSP-Analyse ebenfalls alle methylierungspositiv. Ein anaplastisches Oligodendrogliom (AO11) und zwei Oligoastrozytome (OA5, OA7) waren an keinem der 25 untersuchten CpGs methyliert und in der MSP-Analyse erwartungsgemäß negativ. Drei nicht-neoplastische Hirngewebskontrollen zeigten keine Methylierung von CpG-Dinukleotiden in dem untersuchten *MGMT* Promotorbereich.

Das Methylierungsmuster zeigte sich von Tumor zu Tumor sehr variabel. Dabei wiesen einige CpG-Stellen (CpGs 1, 2, 7-10, 14, 16, 18) eine höhere Methylierungsfrequenz auf als andere (**Abb. 9**). Die CpG-Dinukleotide 10 bis 24 kartieren in eine von drei bereits beschriebenen Regionen des *MGMT* Promotors, die eine besonders hohe Methylierungsfrequenz in Tumoren aufweisen (Watts *et al.* 1997). Die beiden MSP-Primerbindungsstellen liegen ebenfalls in diesem DNA-Bereich. Doch auch innerhalb dieser hypermethylierten Promotorregion waren besonders in den Primerbindungsstellen eine Reihe nur partiell methylierter Cytosine zu finden. So weisen drei Tumoren (O16, OA3, AOA3) zwar eine Methylierungsfrequenz von über 50% auf, aber aufgrund von nicht-methylierten oder nur partiell-methylierten Cytosinen innerhalb der Primerbindungsstellen war die MSP-Analyse in diesen Fällen negativ (**Tab. 4; Abb. 9**).

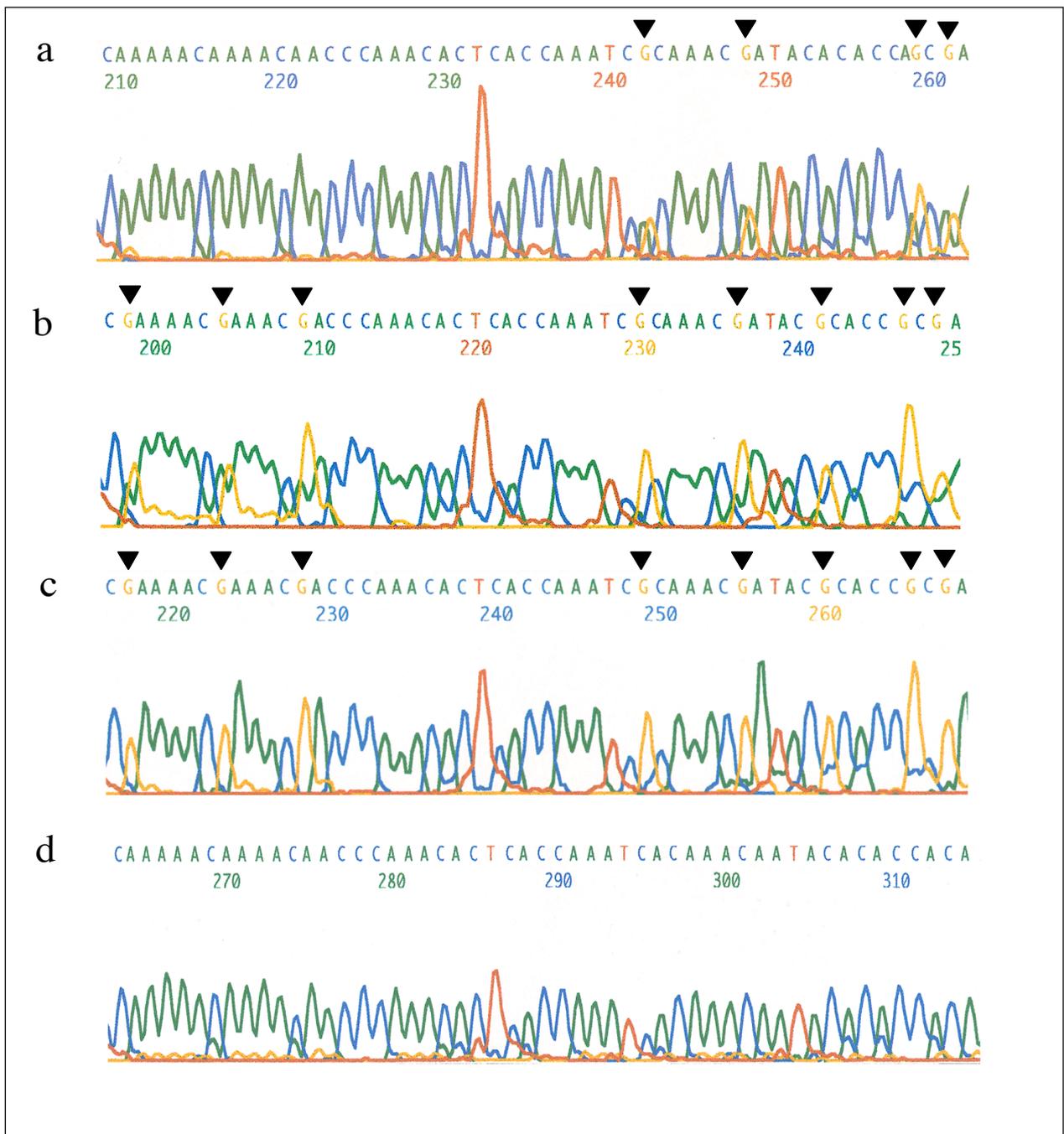


Abb. 8: Methylierungsmuster der *MGMT* Promotorregion in ausgewählten Tumoren.
 Dargestellt sind die Elektropherogramme im Bereich der 6.-13. CpG-Stelle nach Sequenzierung des Gegenstranges. a-b, Partielle Methylierungsmuster in den Tumoren OA3 und AO4. c, Der Tumor AOA1 zeigt vollständig methylierte CpGs in der abgebildeten Sequenz. d, Unmethylierte Promotorregion in nicht-neoplastischem Hirngewebe. Die Pfeilspitzen zeigen auf methylierte Cytosinreste in CpG-Dinukleotiden.

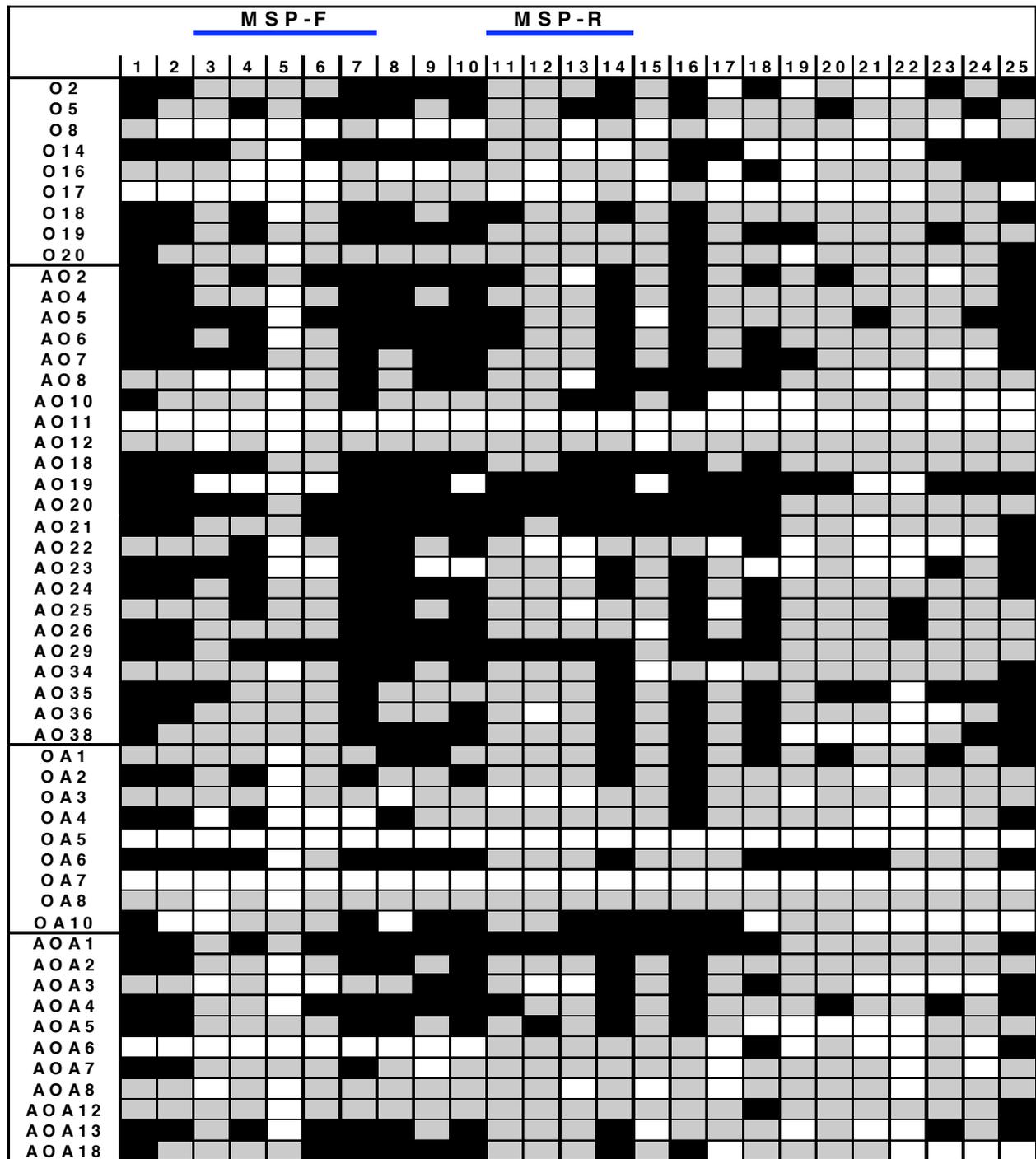


Abb. 9: Graphische Darstellung der mittels Natriumbisulfit-Sequenzierung bestimmten Methylierungsmuster in den 52 untersuchten oligodendroglialen Tumoren. *Abzisse*, Nummerierung der untersuchten CpG-Dinukleotide in der Region nt 46922-47124 („Accession“-Nr.: AL355531) des *MGMT* Promotors. *Ordinate*, Fall-Nr.; *weisses Rechteck*, nicht-methyliertes CpG; *graues Rechteck*, partiell methyliertes CpG; *schwarzes Rechteck*, vollständig methyliertes CpG; *MSP-F und MSP-R*, Bindungsstellen der für die MSP-Analyse verwendeten Primer.

3.3 Untersuchung der *MGMT* mRNA-Expression mittels Real-Time Reverse-Transkription-PCR

Die Mehrzahl der Tumoren mit nachgewiesener *MGMT* Promotorhypermethylierung (3/5 OII, 13/17 AOIII, 2/5 OAII, 5/8 AOAI) wiesen eine um 50% oder mehr verminderte Expression der *MGMT* mRNA relativ zu normalem Hirngewebe auf (Tab. 4; Abb. 10). Die höchsten *MGMT* Transkriptlevel fanden sich in zwei Tumoren ohne Methylierung (AO11, OA7), wohingegen nur 5 Tumoren (AO10, AO12, OA10, OAA3, OAA8) mit Hypermethylierung *MGMT* mRNA in einer vergleichbaren Stärke wie nicht-neoplastisches Hirngewebe exprimierten.

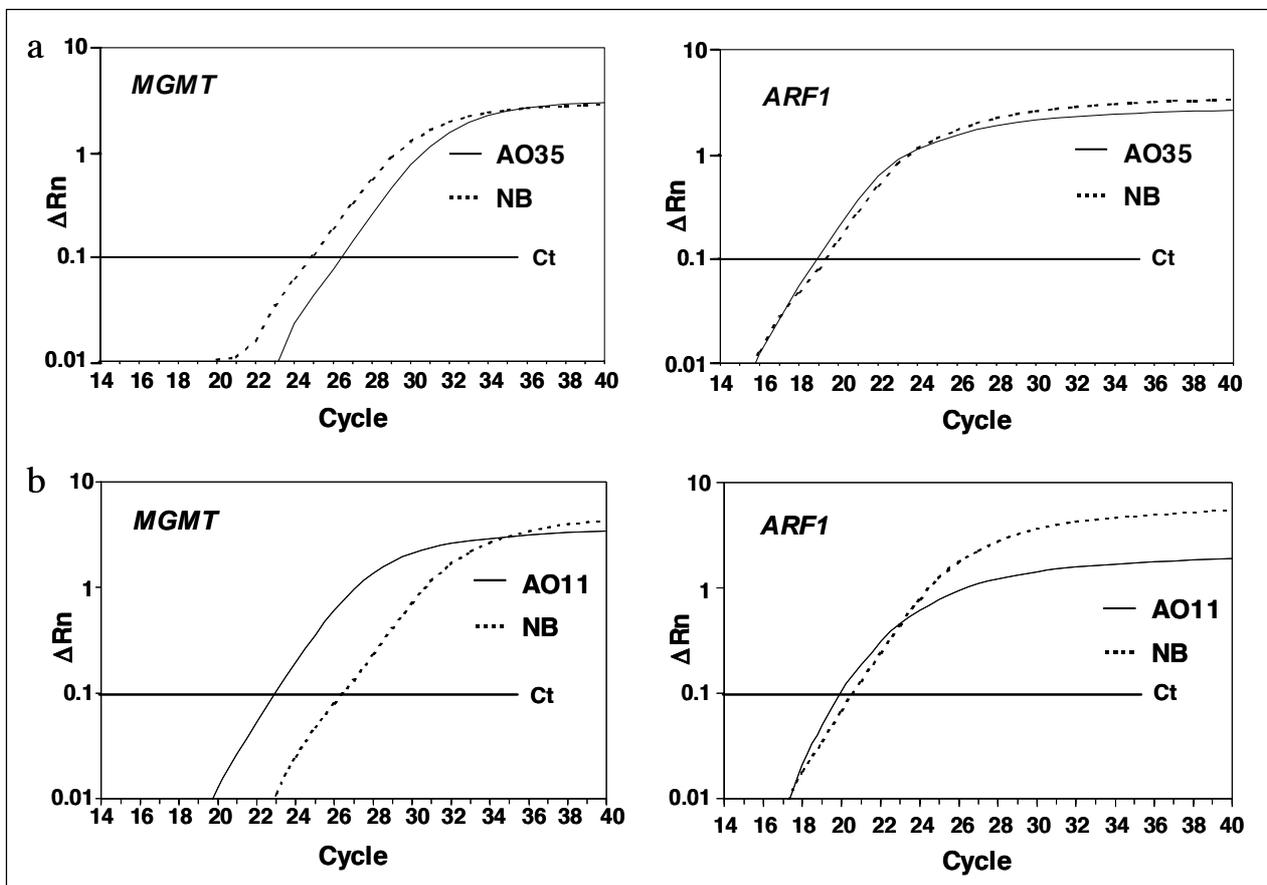


Abb. 10: Beispiele der Real-Time RT-PCR Analyse der *MGMT* mRNA Expression in zwei anaplastischen Oligodendrogliomen (AO35, AO11) im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe (NB). *Abzisse*, Nummer des PCR-Zyklus; *Ordinate*, Relative Menge an PCR-Produkt; a, reduzierte *MGMT* mRNA Expression in AO35. Während bei AO35 und NB die Kurven der Referenz mRNA (*ARF1*, rechte Abbildung) den Ct Schwellenwert bei nahezu gleichen Zyklenzahlen erreichen, ist die Kurve der *MGMT* mRNA bei AO35 im Vergleich NB (linke Abbildung) deutlich nach rechts verschoben. Das errechnete *MGMT* mRNA Niveau von AO35 lag bei 0,2 relativ zu NB. b, Hohe *MGMT* mRNA Expression in Tumor AO11. Die

MGMT mRNA Kurve von AO11 ist zur Linken verschoben verglichen mit NB (linke Abbildung), während die *ARF1* mRNA Kurven sowohl für AO11 als auch NB den Schwellenwert bei etwa gleicher Zyklenzahl passieren (rechte Abbildung). Das errechnete *MGMT* mRNA Niveau lag für AO11 bei 12 relativ zu NB. AO35 wies eine *MGMT* Promotorhypermethylierung und Allelverluste auf 1p und 19q auf. Im Gegensatz dazu zeigte AO11 weder eine *MGMT*-Promotorhypermethylierung noch 1p/19q-Verluste.

3.4 Untersuchung der Mgmt Protein-Expression mittels Immunhistochemie

Insgesamt wurden Schnittpräparate von 43 der 52 Tumoren immunhistochemisch auf Expression des Mgmt-Proteins hin untersucht. In den meisten der Tumoren (28/39; 72%) mit einer Methylierung von mehr als 50% der untersuchten CpG-Stellen ließen sich immunhistochemisch keine (20/28) oder nur eine kleine Fraktion (8/28) an Mgmt positiven Tumorzellen nachweisen (Tab 4; Abb. 11). Nur in zwei Tumoren (AO11, O8) wurde Mgmt in mehr als 50% der Tumorzellen exprimiert. Tumor AO11 hat keine methylierten CpGs in der *MGMT* Promotorregion, während O8 eine Methylierungsfrequenz von 44% aufweist. Zwei weitere Tumoren (OA7 und AOA6) ohne *MGMT*-Promotorhypermethylierung erwiesen sich trotzdem immunhistochemisch als negativ für Mgmt. Der als Positivkontrolle in allen Versuchsdurchgängen mitgeführte Tumor OA1 zeigte immer eine deutliche positive nukleäre Immunreaktion in einem Teil der Tumorzellen (<50%). Als Negativkontrolle diente der Tumor AOA7, in dem keine positiven Tumorzellen nachzuweisen waren. In den meisten Tumoren finden sich als interne Positivkontrolle Mgmt positive Gefäßendothelzellen (Abb. 11).

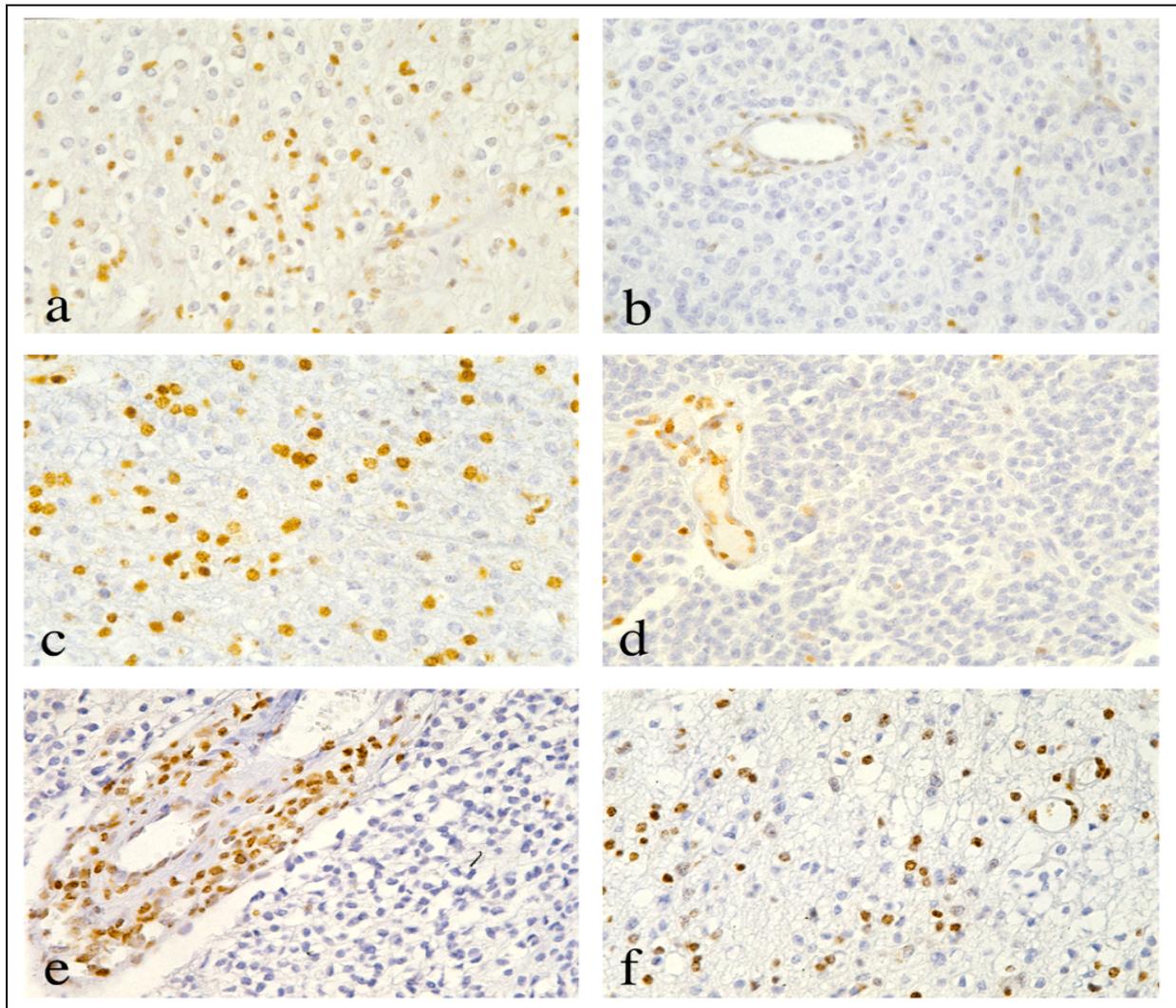


Abb. 11: Beispiele der immunhistochemischen Ergebnisse zur Expression von Mgmt; a-b, Oligodendrogliome WHO-Grad II. Man erkennt eine nukleäre Immunreaktivität der Tumorzellen in Tumor O8 (a), der keine *MGMT* Promotorhypermethylierung und keine Verluste auf 1p und 19q aufwies. Im Gegensatz dazu ist die Mgmt Expression in Tumor O14 (b) im Wesentlichen auf Gefäßwandzellen beschränkt. Dieser Tumor wies Allelverluste auf 1p und 19q sowie eine *MGMT* Promotorhypermethylierung auf. c-d, Anaplastische Oligodendrogliome WHO-Grad III. Der Tumor AO6 (c) enthielt fokale Abschnitte mit Mgmt positiven Tumorzellen, wohingegen der Tumor AO19 (d) vollständig negativ war, d. h. lediglich vaskuläre Zellen als interne Positivkontrolle markiert waren. Beide Tumoren zeigten molekularbiologisch Allelverluste auf 1p und 19q sowie Hypermethylierung des *MGMT* Promotors. e-f, Anaplastisches Oligoastrozytom WHO-Grad III (AOA12). Dieser *MGMT* hypermethylierte Tumor zeigte keine Mgmt Expression in zelldichten, soliden Tumoranteilen (e). In weniger zelldichten Abschnitten des Tumorrandbereiches fanden sich jedoch stellenweise einzelne positive Tumorzellen (f). Alle gezeigten immunhistochemischen Präparate wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

3.5 Korrelation der *MGMT* Promotorhypermethylierung mit klinischen und molekularen Parametern

Der statistische Vergleich der Ergebnisse zur *MGMT* Promotorhypermethylierung mit dem Allelstatus auf 1p und 19q bzw. der *MGMT* mRNA und Protein-Expression ergab einige interessante Korrelationen (**Tab. 5**). Eine *MGMT* Promotorhypermethylierung war insgesamt in Tumoren mit einem LOH 1p ($p < 0.05$, Fisher's Exakt Test), einem LOH 19q ($p < 0.01$, Fisher's Exakt Test) oder einem kombinierten LOH 1p/19q ($p < 0.01$, Fisher's Exakt Test) häufiger. Auch war der prozentuale Anteil methylierter CpG Dinukleotide im *MGMT*-Promotor in Tumoren mit Verlusten auf 1p und/oder 19q höher (jeweils $p < 0.01$, Student's t-Test). Tumoren mit einem LOH 1p wiesen signifikant reduzierte *MGMT* mRNA Transkriptionslevel auf verglichen mit Tumoren ohne LOH 1p ($p < 0.05$, Chi² Test). Eine separate Analyse der zwanzig Oligoastrozytome zeigte den signifikant höheren Anteil methylierter CpG Dinukleotide bei bestehendem LOH 1p/19q, während dies für die 32 Oligodendrogliome als Gruppe betrachtet so nicht nachzuweisen war ($p = 0.05$, Student's t-Test). Außerdem zeigte sich eine Korrelation zwischen *MGMT* Promotorhypermethylierung und dem Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt. Patienten, die älter als 40 Jahre waren, wiesen mehr methylierte CpG Dinukleotide auf als jüngere Patienten ($p < 0.05$, Student's t-Test). Im Gegensatz dazu war keine Korrelation nachzuweisen zwischen einem LOH 1p/19q und dem Alter zum OP-Zeitpunkt ($p = 0.29$, Student's t-Test).

Tab. 5: Korrelation der *MGMT* Promotorhypermethylierung mit *MGMT* mRNA Expression und Allverlusten auf 1p und 19q

	<i>MGMT</i> Promotor- methylierung (Prozent methylierter CpG-Reste)			<i>MGMT</i> -Promotor- methylierung (MSP Ergebnisse)		
	alle Fälle	OII+ AOIII	OAI+ AOAIII	alle Fälle	OII+ AOIII	OAI+ AOAIII
Chr. 1p LOH vs. RET	<i>0,0043</i>	0,1115	<i>0,0023</i>	<i>0,0268</i>	0,2005	0,2663
Chr. 19q LOH vs. RET	<i>0,0046</i>	0,1081	<i>0,0273</i>	0,0607	0,0572	1,0000
Chr. 1p/19q LOH vs. RET	<i>0,0041</i>	0,1724	<i>0,0045</i>	<i>0,0154</i>	0,0846	0,5193
mRNA Expression ≤ 0.5 vs. > 0.5	<i>0,0068</i>	0,0956	<i>0,0436</i>	<i>0,0025</i>	<i>0,0277</i>	0,5692
Alter bei OP ≥ 40 J vs. < 40 J	<i>0,0085</i>	0,0666	0,0793	<i>0,0118</i>	0,0572	0,1313

Angegeben sind die p-Werte nach Korrelation der entsprechenden Datengruppen mittels Student's t-Test, Fisher's Exakt-Test oder dem Chi²-Test. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen 2 Datengruppen sind hervorgehoben (**fett** und *kursiv*).

4 Diskussion

4.1 *MGMT* Promotormethylierung in Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Methylierungsstatus und die Expression des *MGMT*-Gens systematisch in oligodendroglialen Tumoren bestimmt. Mgmt dient zur Reparatur von DNA-Schäden, die durch Alkylierung des Guanins entstehen. Der Verlust der Mgmt Expression und Funktion resultiert in DNA-Mutationen, die letztendlich zur Tumorentstehung führen können. Andererseits kommt Mgmt bei schon bestehendem Tumor eine Bedeutung als Chemotherapieresistenzfaktor zu, d. h. eine starke Expression von Mgmt kann zur Resistenz von Tumorzellen gegen alkylierende Substanzen führen, wie sie auch in der Therapie maligner Gliome eingesetzt werden. Umgekehrt könnte ein Verlust der Mgmt Expression, z. B. als Folge einer *MGMT* Promotorhypermethylierung für das positive Ansprechen vieler oligodendroglialer Tumoren auf eine Chemotherapie mitverantwortlich sein.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 52 oligodendrogliale Tumoren der WHO-Grade II und III auf ihren *MGMT*-Methylierungsstatus hin untersucht. Unter diesen 52 Tumoren waren nur 3 Fälle, die an keinem der 25 sequenzierten CpG-Dinukleotide eine Methylierung aufwiesen und drei weitere Fälle, die eine Methylierung an weniger als 50% der 25 untersuchten CpG-Dinukleotide zeigten. Bei allen anderen Tumoren ließ sich eine Methylierung von mehr als 50% der untersuchten CpG-Dinukleotide nachweisen. Diese Tumoren wurden als hypermethyliert eingestuft. In bisherigen Studien erfolgte der Nachweis einer *MGMT*-Promotorhypermethylierung hauptsächlich mittels der MSP-Methode und nicht durch Sequenzierung der entsprechenden DNA-Abschnitte. Beispielsweise konnten Esteller *et al.* (2000c) mittels MSP zeigen, dass bei 19 von 47 (40%) Patienten mit malignen Gliomen, die neben Operation und Bestrahlung zusätzlich mit Carmustin behandelt wurden, ein methylierter *MGMT*-Promotor vorlag. Die Korrelation des *MGMT* Promotorstatus mit klinischen Daten ergab, dass 12 der 19 Patienten mit *MGMT*-hypermethylierten Tumoren mit Tumorregression, längerem Überleben und längerer Rezidivfreiheit auf die Chemotherapie reagierten. Im Gegensatz dazu sprach nur einer der 28 Patienten, deren Tumoren keine *MGMT*-Hypermethylierung aufwiesen, auf die Therapie an. Diese Befunde sprechen dafür,

dass mittels einer vergleichsweise einfachen, schnellen Methode wie der MSP eine prognostische Aussage über den Nutzen einer alkylierenden Chemotherapie bei Patienten mit malignen Gliomen gemacht werden kann.

Auch für die vorliegende Arbeit wurde die methylierungsspezifische PCR angewandt und insgesamt neunmal kein positives Methylierungssignal gefunden (zwei OII, ein AOIII, drei OAI, zwei AOAI). Alle sechs in der Sequenzanalyse als nicht hypermethyliert gefundenen Tumoren gehörten zu dieser Gruppe. Außerdem waren auch drei Gliome mit mehr als 60% methylierten CpG Dinukleotiden (O16, OA3, AOAI) in der MSP negativ. Bei diesen Tumoren lagen zwar insgesamt relativ viele Methylierungen vor, jedoch nicht an den MSP-Primerbindungsstellen, so dass die bestehende Hypermethylierung mittels MSP nicht detektierbar war. Insgesamt ist somit die Sensitivität der MSP-Methode etwas niedriger als die der Sequenzierung.

Molekularbiologische Arbeiten haben gezeigt, dass bei anaplastischen Oligodendrogliomen des WHO-Grades III im Vergleich zu Oligodendrogliomen des WHO-Grades II zusätzliche genetische Veränderungen vorlagen, darunter am häufigsten Verluste auf Chromosom 9 und 10. Für das hier analysierte *MGMT*-Gen ergaben sich keine Hinweise auf eine homozygote Deletion, da die Sequenz in allen Tumoren vorhanden war. Allerdings konnte in den anaplastischen Tumoren (WHO-Grad III) ein signifikant stärkerer Methylierungsgrad des *MGMT*-Promotors nachgewiesen werden. Die Immunhistochemie zeigte jedoch keine Unterschiede in der Proteinexpression zwischen anaplastischen und gut differenzierten oligodendroglialen Gliomen. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der Arbeit von Gerson (2002), in welcher eine gesteigerte Proteinaktivität in höhergradigen Gliomen gefunden wurde, was im Falle von Mgmt einem größeren Enzym-Angebot entspräche.

Ein interessanter Aspekt ist das Verteilungsmuster der Methylierung über die 25 analysierten CpGs. Wie beim Betrachten der Abbildung 9 auffällt, sind es die Positionen 1, 2, 7-10, 14, 16, 18, die in den meisten Oligodendrogliomen methyliert vorliegen. Die Klusterbildung könnte ein Ergebnis der Entstehung der Methylierung sein, wenn man die Theorie zugrunde legt, dass zunächst einzelne, bestimmte CpGs methyliert werden und von diesen dann eine Ausbreitung auf die angrenzenden Positionen stattfindet (Esteller *et al.*, 2002). Betrachtet man die Oligoastrozytome, zeigt sich ein insgesamt heterogeneres Verteilungsmuster der Methylierung. Auch weisen die Oligodendrogliome häufiger komplette Methylierungen auf als die Oligoastrozytome.

Weiter konnten wir eine gewisse Altersabhängigkeit des Methylierungsmaßes nachweisen. Patienten, die bei der Operation älter als 40 Jahre waren, wiesen signifikant mehr methylierte CpG-Dinukleotide im *MGMT*-Promotor auf als jüngere Patienten. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Gruppe von Silber *et al.* (1996), die Gehirngewebe von Patienten, die wegen eines primären Hirntumors operiert wurden, untersucht haben und einen mit dem Alter zunehmenden Gehalt an Mgmt gefunden haben.

Die bislang publizierten Daten zur *MGMT*-Methylierung in Oligodendrogliomen variieren zwischen 47 und 80% der untersuchten Tumoren. So konnten Dong *et al.* (2001) in 60% der untersuchten Tumoren einen methylierten *MGMT*-Promotor nachweisen und darüber hinaus die Ergebnisse positiv zum LOH 1p/19q korrelieren. Alonso *et al.* (2003) untersuchten mittels MSP insgesamt 41 Oligodendrogliome und fanden eine *MGMT*-Methylierung in 80% der Fälle. Die Gruppe um Watanabe (2002) untersuchte 19 Oligodendrogliome und fand in 47% eine *MGMT*-Methylierung. Die außerdem untersuchten 23 Astrozytome wiesen zu 48% eine *MGMT*-Methylierung auf, allerdings ohne Korrelation zu einem LOH 1p oder 19q, dafür aber in Assoziation mit einer *TP53* Mutation.

4.2 *MGMT* mRNA-Expression in oligodendroglialen Tumoren

Von den 52 Tumoren der Gesamtserie wurden sechs Oligodendrogliome, 18 anaplastische Oligodendrogliome, sechs Oligoastrozytome und neun anaplastische Oligoastrozytome mittels Real-Time RT-PCR auf die mRNA-Expression von *MGMT* hin untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation ($p = 0.0068$) zwischen der Anzahl methylierter CpG-Stellen im *MGMT*-Promotor und der relativen mRNA-Expression im Tumorgewebe. So weisen die beiden nicht methylierten Tumoren (AO11, OA7) im Vergleich zur Genexpression in nicht-neoplastischem Hirngewebe eine ungefähr zehnfach gesteigerte *MGMT*-Expression auf. Die sechs Tumore (O5, O19, AO18, AO24, AO29, AOA1), die an allen 25 untersuchten CpGs methyliert waren, zeigen ein deutlich erniedrigtes mRNA-Level verglichen mit dem des Kontrollgewebes.

Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die gefundenen epigenetischen Veränderungen im *MGMT*-Promotor zu einer verminderten mRNA Transkription führen. Esteller *et al.*, (2000c) beschrieben sogar den Ausfall der mRNA Expression bei aberranter *MGMT*-Hypermethylierung in diversen Tumorentitäten (Gliomen, Lymphomen u. a.).

4.3 Mgmt Proteinexpression in oligodendroglialen Tumoren

Es wurden 43 der 52 Oligodendrogliome und Oligoastrozytome immunhistochemisch auf Expression des Mgmt Proteins hin untersucht. Auffällig war zunächst, dass in den allermeisten Präparaten vaskuläre Endothelzellen und Lymphozyten Mgmt positiv waren und somit als endogene Kontrolle der Färbung dienten. Gerson (2002) beschreibt einen ähnlichen Befund und stellt dazu die Hypothese auf, dass das durch die Alkylierungsvorgänge veränderte Protein schneller als das ursprüngliche degradiert und somit in den Tumorzellen nicht mehr nachweisbar ist im Gegensatz zum aktiven Protein in Lymphozyten und Endothelzellen. Diese Hypothese setzt allerdings voraus, dass die Tumorzell-DNA stärker alkyliert ist als die DNA in Lymphozyten und Gefäßzellen. Ob dies in Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen tatsächlich der Fall ist, bleibt zu untersuchen. Keiner der Tumoren der eigenen Serie war zumindest vor der Operation chemotherapeutisch behandelt worden, abgesehen von einem einzigen anaplastischen Oligoastrozytom (AOA18). Ebenso beschreiben Gerson (2002) ein Nebeneinander von dichter und fehlender Markierung innerhalb eines Präparates, ähnlich wie es auch in der eigenen Serie gefunden wurde. Dabei scheint es keine spezifische Ausrichtung zu geben, sondern die stärker markierten Bereiche lagen sowohl am Rand als auch in der Mitte der Präparate.

Die wahrscheinlichste Interpretation der teilweise heterogenen Expression von Mgmt im Tumorgewebe dürfte die sein, dass eine intertumorale Heterogenität im Methylierungsgrad des *MGMT* Promotors vorliegt, d. h. dass innerhalb eines Tumors durchaus methylierte und unmethylierte Tumorzellen nebeneinander oder räumlich getrennt vorkommen können. Insgesamt sprechen die eigenen Ergebnisse dafür, dass in oligodendroglialen Tumoren in den meisten Fällen eine Mehrheit der Tumorzellen eine verminderte Mgmt Proteinexpression hat.

Die hier diskutierten Ergebnisse beziehen sich alle auf die in dieser Arbeit untersuchten Oligodendrogliome und Oligoastrozytome. Betrachtet man oligodendrogliale Tumoren im Vergleich mit Astrozytomen, so finden sich in der Literatur mehrere Studien, die übereinstimmend eine in Astrozytomen deutlich höhere Mgmt Expressionsrate beschreiben (bis zu 2-4 fach höher, Silber *et al.*, 1998). Daraus kann letztlich das schlechtere Ansprechen astrozytärer Tumoren auf alkylierende Therapeutika resultieren. So zeigten Nutt *et al.* (2000), dass Oligodendrozyten von Ratten wesentlich sensibler auf BCNU reagierten als Astrozyten. Diese Astrozyten konnten aber durch medikamentöse Mgmt Ausschaltung ebenso chemosensibel gemacht werden.

4.4 Korrelation zwischen *MGMT*-Hypermethylierung und LOH auf 1p/19q in oligodendroglialen Tumoren

Die eigenen Daten zeigten eine signifikante Korrelation zwischen LOH 1p/19q und dem Grad der *MGMT* Promoterhypermethylierung in oligodendroglialen Tumoren. In Tumoren mit LOH auf 1p, LOH auf 19q und kombinierten Allelverlusten auf 1p und 19q ließen sich signifikant mehr methylierte CpGs in der untersuchten *MGMT*-Promotorregion nachweisen als in den Tumoren ohne diese Allelverluste. Die eigenen Ergebnisse bestätigen somit die Daten von Dong *et al.* (2001). Auffällig ist auch, dass alle drei nicht methylierten Tumoren kein LOH auf den genannten Chromosomenarmen aufweisen. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Allelverluste auf 1p und/oder 19q möglicherweise Kontrollgene der DNA-Methylierung beeinflussen, die zu einer Veränderung der Promotormethylierungsmusters verschiedener Gene führen. Auch Watanabe *et al.* (2002) konnte für die Oligodendrogliome mit Methylierung in 74% der Fälle LOH 1p, in 74% LOH 19q und in 68% die Kombination LOH 1p und 19q nachweisen. Für die Gruppe der Oligoastrozytome konnten sie keinen Zusammenhang zwischen *MGMT*-Methylierung und LOH 1p/19q finden.

4.5 Perspektiven

Die Daten dieser und der zitierten Arbeiten zeigen eine Korrelation zwischen dem in chemosensitiven oligodendroglialen Tumoren oft beobachteten LOH 1p/19q und einer *MGMT*-Promoterhypermethylierung, was nahe legt, dass der Ausfall der O⁶-Methylguanin-Methyltransferase die Chemosensitivität entscheidend mitbedingt. Somit könnte in Zukunft ein im Patientengewebe (z. B. bei diagnostischen Biopsien gewonnen) bestimmter *MGMT* Status Aufschluss geben über den prospektiven Nutzen einer Chemotherapie und die Prognose hinsichtlich der Behandlungsmöglichkeiten des Tumors. Derzeit fehlen zum Beweis dieser Hypothese aber noch die entsprechenden klinischen Daten aus kontrollierten Studien zum Verlauf der Erkrankung und dem Ansprechen auf die Therapie bei vorliegender *MGMT*-Promoterhypermethylierung. Diese Daten sind in zukünftigen prospektiven Studien zu erbringen. Ebenso bleibt der mögliche funktionelle Zusammenhang zwischen LOH 1p/19q und *MGMT*-Promoterhypermethylierung aufzuklären. Dabei wird es besonders darum gehen, die Gene zu identifizieren, die durch die Verluste auf 1p und 19q betroffen sind und deren Effekt auf die Tumorsuppression zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Oligodendrogliale Tumoren sind primäre Tumoren des Gehirns, die vornehmlich bei Erwachsenen im Bereich der Großhirnhemisphären auftreten und insgesamt etwa 10-15% aller Gliome ausmachen. Im Vergleich zu den astrozytären Gliomen zeichnen sich oligodendrogliale Tumoren durch ein besseres Ansprechen auf eine Chemotherapie mit DNA-alkylierenden Substanzen sowie eine günstigere Prognose aus. Die Gründe für diese Unterschiede zwischen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren sind noch weitgehend unbekannt. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen bestimmten genetischen Veränderungen in den Tumorzellen, insbesondere dem Vorkommen von Allelverlusten auf den Chromosomenarmen 1p und 19q, und dem Ansprechen auf eine Chemotherapie besteht. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob möglicherweise einer Promotorhypermethylierung und dadurch bedingten verminderten Transkription des DNA-Reparaturgens *MGMT* eine Bedeutung in Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen zukommt. Das Mgmt Protein ist in der Lage, die von alkylierenden Chemotherapeutika verursachten DNA-Schäden zu reparieren und dadurch eine Chemotherapieresistenz hervorzurufen. Insgesamt wurden in der eigenen Arbeit 52 Oligodendrogliome und Oligoastrozytome der WHO-Grade II und III auf *MGMT* Promotorhypermethylierung sowie auf mRNA- und Proteinexpression hin untersucht. Die Methylierungsanalysen wurden mit zwei verschiedenen Methoden, der methylierungsspezifischen PCR (MSP) und der direkten Sequenzierung von Natriumbisulfitbehandelter DNA, durchgeführt. Mit letzterem Verfahren wurde der Methylierungszustand an insgesamt 25 CpG-Dinukleotiden im *MGMT* Promotor bestimmt. Um die Auswirkungen der gefundenen epigenetischen Veränderungen auf mRNA- und Proteinebene zu untersuchen, wurden Expressionsanalysen mittels Real-Time Reverser Transkription-PCR sowie Immunhistochemie durchgeführt. Die so erhobenen Befunde zur *MGMT*-Promotormethylierung und Expression wurden mittels statistischer Testverfahren miteinander sowie mit dem Allelstatus auf 1p und 19q verglichen. Die Analyse des *MGMT* Promotors mittels Sequenzierung von Natriumbisulfitbehandelter DNA ergab in 46 der 52 untersuchten oligodendroglialen Tumoren eine Methylierung von mehr als 50% der 25 untersuchten CpG-Dinukleotide in der *MGMT*-Promotorregion. In der MSP-Analyse zeigten 43 von 52 Tumoren eine *MGMT*-Promotorhypermethylierung. Die Expressionsanalysen ergaben in den Tumoren mit *MGMT*-Promotormethylierung im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe deutlich niedrigere *MGMT* mRNA Level, was dafür spricht, dass die Promotorhypermethylierung tatsächlich zu einer verminderten Transkription des *MGMT*-Gens führt. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten in der überwiegenden Mehrheit der Tumoren ebenfalls nur niedrige Expressionswerte, wobei insbesondere die Tumoren mit Promotorhypermethylierung keine oder nur sehr wenige Mgmt-positive Tumorzellen aufwiesen. Die statistischen Analysen erbrachten eine signifikante Korrelation zwischen der Häufigkeit und dem Ausmaß der *MGMT*-Promotorhypermethylierung mit dem Vorhandensein von Allelverlusten auf 1p und 19q.

Zusammenfassend sprechen die eigenen Ergebnisse somit dafür, dass oligodendrogliale Tumoren sehr häufig durch eine Promotorhypermethylierung und verminderte Expression des DNA-Reparaturgens *MGMT* charakterisiert sind. Diese Veränderungen könnten zumindest mitverantwortlich dafür sein, dass oligodendrogliale Tumoren, insbesondere wenn sie Allelverluste auf 1p und 19q aufweisen, in der Regel gut auf eine Chemotherapie mit alkylierenden Substanzen ansprechen. Ob dem Nachweis einer *MGMT*-Promotormethylierung eine klinische Bedeutung als Marker für chemosensitive Oligodendrogliome und Oligoastrozytome zukommt, muss in weiteren klinischen Studien geklärt werden. Ebenso bedarf es weiterer Forschungsarbeit, um die dem beobachteten Zusammenhang zwischen 1p/19q Allelverlusten und *MGMT*-Promotorhypermethylierung zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzuklären.

6 Lebenslauf

Name: Maria Thannhäuser geb. Möllemann
Geboren: 15. Juli 1978 in Düsseldorf

Wohnhaft: Minuitstr. 15
46485 Wesel

Konfession: röm.-kath.

Schullaufbahn:

1984-88: Gemeinschaftsgrundschule Sonsbeck
1988-97: Städt. Stiftsgymnasium Xanten

06/1997: Abitur, allg. Hochschulreife

Studium:

1997-2003: Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2002-2003: Praktisches Jahr am Lukaskrankenhaus Neuss

09/1999: Ärztliche Vorprüfung
09/2000: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2002: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2003: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10/2000-
10/2002: Experimenteller Teil der Promotionsarbeit zum Thema
„Promotorhypermethylierung und Expression des
DNA-Reparaturgens *MGMT* in oligodendroglialen Tumoren“ am
Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Doktorvater: Prof. Dr. G. Reifenberger)

Ärztliche Tätigkeit:

02-09/2004: Ärztin im Praktikum
am Forschungsinstitut für die Prävention von Allergien und Asthma im
Kindesalter am Marien-Hospital Wesel, Chefarzt Prof. Dr. D. Berdel
ab 10/2004: Assistenzärztin
am Forschungsinstitut für die Prävention von Allergien und Asthma im
Kindesalter am Marien-Hospital Wesel, Chefarzt Prof. Dr. D. Berdel

7 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Guido Reifenberger, der mir diese Arbeit angeboten und anvertraut hat und sie stets mit großer Sachkenntnis und wertvollen Anregungen begleitet hat. Auch meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Marietta Wolter sei Dank gesagt, die mir die Arbeit im Labor nahe und beigebracht hat. Sie stand mit Rat und Tat zur Seite und hat diese Arbeit mit vorangebracht, nicht zuletzt durch wiederholtes, geduldiges Korrekturlesen und ihre vielen wichtigen Verbesserungsanregungen.

Allen Kollegen im Labor ein großes Dankeschön für viele Tipps zur Arbeit und unzählige gute Gespräche. Auch diese Begegnungen machen die Zeit im Labor zu einem unverwechselbaren Abschnitt meines Lebens.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer wieder ermutigt haben zur Arbeit an diesem Projekt und den Moment der Fertigstellung ähnlich ungeduldig erwartet haben wie ich.

Last but not least meinen Freunden, die alle jeweils auf ihre Weise diese Arbeit begleitet haben und besonders auch meinem Mann Dirk ein Danke von ganzem Herzen für viel Ermutigung, Schulterklopfen und Rückenwind.

8 Literaturverzeichnis

Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, Arjona D, Lomas J, de Campos JM, Isla A, Sarasa JL, Rey JA (2003) Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 144 (2), 134-42

Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72, 141-196

Baylin SB, Herman JG (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis. *TIG Vol* 16, Nr.4, 168-174

Bearzatto A, Szadkowski M, Macpherson P, Jiricny J, Karran P (2000) Epigenetic regulation of the *MGMT* and *hMSH6* DNA repair genes in cells resistant to methylating agents. *Cancer Res* 60, 3262-3270

Becker K, Gregel C, Fricke C, Komitowski D, Dosch J, Kaina B (2003) DNA repair protein MGMT protects against N-methyl-N-nitrosoureas-induced conversion of benign into malignant tumors. *Carcinogenesis Vol.* 24, Nr. 3, 541-546

Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Gen Vol.* 9, Nr. 16, 2395-2402

Bestor TH, (2003) Unanswered questions about the role of promoter methylation in carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 987, 22-27

Bortolotto S, Chiado-Piat L, Cavalla P, Chio A, Mauro A, Schiffer D (2000) CDKN2A/p16 inactivation in the prognosis of oligodendrogliomas. *Int J Cancer Vol.* 88, 554-557

Brabender J, Usadel H, Metzger R, Schneider PM, Park J, Salonga D, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lord RV, Takebe N, Schneider Sm Holscher Ah, Danenberg KD, Danenberg PV (2003) Quantitative O6-methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome. *Clin Cancer Res Vol.* 9, Nr. 1, 223-227

Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ramsay DA, Louis DN (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Nat Cancer Inst Vol.* 90, Nr. 19, 1473-1479

Christmann M, Pick M, Lage H, Schadendorf D, Kaina B (2001) Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. *Int J Cancer* 92, 123-129

Debinski W, Gibo D, Mintz A (2003) Epigenetics in high-grade astrocytomas. *Ann N Y Acad Sci* 983, 232-242

Dong S-M, Pang J C-S, Poon W-S, Hu J, To K-F, Chang AR, Ng H-K (2001) Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* Vol. 60, Nr. 8, 808-816

Dong S, Pang JC-S, Hu J, Zhou L-F, Ng H-K (2002) Transcriptional inactivation of TP73 expression in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* Vol. 98, 370-375

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG (1999) Inactivation of DNA repair gene *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase* by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 59(4), 793-797

Esteller M (2000a) Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 36, 2294-2300

Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JPI, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG (2000b) Inactivation of the DNA repair gene *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase* by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 60, 2368-2371

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG (2000c) Inactivation of the DNA-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *NEJM*, Vol. 343, Nr. 19, 1350-1354

Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21, 5427-5440

Esteller M, Gaidano G, Goodman SN, Zagonel V, Capello D, Botto B, Rossi D, Gloghini A, Vitolo U, Carbone A, Baylin SB, Herman JG (2002) Hypermethylation of the DNA repair gene *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase* and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Nat Cancer Inst* Vol. 94, Nr. 1, 26-32

Esteller M, Herman JG (2004) Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of *O⁶-methylguanine DNA methyltransferase* in human cancer. *Oncogene* 23,1-8

Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767

Felsberg J, Erkwah A, Sabel MC, Kirsch L, Fimmers R, Blaschke B, Schlegel U, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G (2004) Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation on 1p/19q status with survival. *Brain Pathol* 14, 121-30

Gerson SL (2002) Clinical relevance of *MGMT* in the treatment of cancer. *J Clin Oncol*, Vol 20, Nr. 9, 2388-2399

Gerson SL (2004) *MGMT*: Its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 4, Apr 2004, 296-307

- Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Lomas J, Arjona D, Campos JM de, Vaquero J, Isla A, Lassaletta L, Gutierrez M, Sarasa JL, Rey JA (2003) CpG island methylation in sporadic and neurofibromatosis type 2-associated schwannomas. *Clin Cancer Res* Vol. 9, 5601-5606
- Hayashi H, Yazawa T, Okudela K, Nagai JJ, Ito T, Kanisawa M, Kitamura H (2002) Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human lung adenocarcinoma related to high-grade histology and worse prognosis among smokers. *Jap J Cancer Res* Vol. 93, Nr. 2, 184-189
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 93, 9821-9826
- Holland EC (2001) Gliomagenesis: Genetic alterations and mouse models. *Nature Rev Genetics* Vol 2, 120-129
- Iacopetta B(2003) Aberrant DNA methylation: have we entered the era of more than one type of colorectal cancer? *Am J Pathol* Vol. 162, Nr. 4, 1043-1045
- Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC et al. (2001) Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma : Implications for patient management at diagnosis. *Clin Cancer Res* 7, 839-45
- Kleihues P, Louis DN, Schneithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61,215-25
- Komine C, Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Yokoyama T, Fukushima T (2003) Promoter hypermethylation of the DNA repair gene *O6-methylguanine-DNA methyltransferase* is an independent predictor of shortened progression free survival in patients with low-grade diffuse astrocytomas. *Brain Pathol* 13, 176-184
- Laird PW (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Rev Cancer* 3, 253-265
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 94, 2545-2550
- Maintz D, Fiedler K, Koopmann J et al. (1997) Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 10, 1098-1104
- Margison GP, Santibanez-Koref MF (2002) O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: role in carcinogenesis and chemotherapy. *BioEssays* 24, 255-266
- Lin X, Tascilar M, Lee W-H, Vles WJ, Lee BH, Veeraswamy R, Asgari K, Frejje D, Rees Bv, Gage WR, Bova GS, Isaacs WB, Brooks JD, DeWeese TL, De Marzo AM, Nelson WG (2001) *GSTP1* CpG island hypermethylation is responsible for the absence of *GSTP1* expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol* Vol. 159, Nr. 5, 1815-1826

- Lusher ME, Lindsey JC, Latif F, Pearson ADJ, Ellison DW, Clifford SC (2002) Biallelic epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in medulloblastoma development. *Cancer Res* 62, 5906-5911
- Mattern J, Koomägi R, Volm M (1998) Smoking-related increase of O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in human lung carcinomas. Oxford University Press, 1247-1250
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Medicine* Vol. 1, Nr. 7, 686-692
- Millar DS, Paul CL, Molloy PL, Clark SJ (2000) A distinct sequence (ATAAA) separates methylated and unmethylated domains at the 5'-end of the *GSTP1* CpG Island. *J Biol Chem* Vol. 275, Nr. 32, 24893-24899
- Mukai T, Sekiguchi M (2002) Gene silencing in phenomena related to DNA repair. *Oncogene* 21, 9033-9042
- Nagasaka T, Sharp GB, Notohara K, Kambara T, Sasamoto H, Isozaki H, MacPhee DG, Jass JR, Tanaka N, Matsubara N (2003) Hypermethylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter may predict nonrecurrence after chemotherapy in colorectal cancer cases. *Clin Cancer Res* Vol. 9, 5306-5312
- Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, Zhao W, Higashimoto K, Satoh Y, Matsukura S, Kudo S, Kitajima Y, Harada H, Furukawa K, Matsuzahi H, Emi M, Nakabeppu Y, Miyazaki K, Sekiguchi M, Mukai T (2003) Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene*, 1-10
- Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001) 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* Vol. 22, Nr. 10, 1715-1719
- Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001) p14^{ARF} deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* 11, 159-168
- Nutt CL, Noble M, Chambers AF, Cairncross JG (2000) Differential expression of drug resistance genes and chemosensitivity in glial cell lineages correlate with differential response of oligodendrogliomas and astrocytomas to chemosensitivity. *Cancer Res* 60, 4812-4818
- Park TJ, Han SU, Cho YK, Paik WK, Kim YB, Lim IK (2001) Methylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene is associated significantly with K-ras mutation, lymph node invasion, tumor staging, and disease free survival in patients with gastric carcinoma. *Cancer* Vol. 92, Nr. 11, 2760-2768
- Pulling LC, Divine KK, Klinge DM, Gilliland FD, Kang T, Schwartz AG, Bocklage TJ, Belinsky SA (2003) Promoter hypermethylation of the *O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase* gene: more common in lung adenocarcinomas from never-smokers than smokers and associated with tumor progression. *Cancer Res* 63, 4842-4848

Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP (1994) Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic losses on chromosome arms 19q und 1p. *Am J Pathol* 145, 1175-1190

Reifenberger G, Kramm C, Bilzer T, Kiwitt JCW (1999) *Handbuch der molekularen Medizin, Band 2, Erkrankungen des Zentralnervensystems*, D. Ganten/K. Ruckpaul (Hrsg.), Springer Verlag, 450-509

Reifenberger G, Louis DN (2003) Oligodendroglioma: Toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol* Vol. 62, Nr. 2, 111-126

Rood BR, Zhang H, Weitmann DM, Cogen PH (2002) Hypermethylation of *HIC-1* and 17p allelic loss in medulloblastoma. *Cancer Res* 62, 3794-3797

Rosas SLB, Koch W, Carvalho MdGdC, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D (2001) Promoter hypermethylation patterns of *p16*, *O6-methylguanine-DNA methyltransferase* and *Death-associated protein kinase* in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 61, 939-942

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning, A laboratory manual*. Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sasaki H, Zlatescu MC, Betensky RA, Ino Y, Cairncross JG, Louis DN (2001) PTEN is a target of chromosome 10q loss in anaplastic oligodendrogliomas and PTEN alterations are associated with poor prognosis. *Am J Pathol* 159, 359-67

Silber JR, Blank A, Bobola MS, Mueller BA, Kolstoe DD, Ojemanns GA, Berger MS (1996) Lack of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in histologically normal brain adjacent to primary human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 93, 6941-6946

Silber JR, Bobola MS, Ghatan S, Blank A, Kolstoe DD, Berger MS (1998) *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics. *Cancer Res* 58, 1068-73

Silber JR, Blank A, Bobola MS, Ghatan S, Kolstoe DD, Berger MS (1999) O6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient phenotype in human gliomas: Frequency and time to tumor progression after alkylating agent-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* Vol. 5, 807-814

Smiraglia DI, Rush LJ, Fruhwald MC et al. (2001) Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet* 10: 1413-419

Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW (2001) Inactivation of the apoptosis effector *Apaf-1* in malignant melanoma. *Nature* Vol. 409, 207-211

- Spugnardi M, Tommasi S, Dammann R, Pfeifer GP, Hoon DSB (2003) Epigenetic inactivation of *RAS association domain family protein 1 (RASSF1A)* in malignant cutaneous melanoma. *Cancer Res* 63, 1639-1643
- Tanaka S, Kobayashi I, Utsuki S, Oka H, Fum K, Watanabe T, Nagashima T, Hori T (2003) O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression in gliomas by means of Real-Time quantitative RT-PCR and clinical response to nitrosoureas. *Int J Cancer* 103, 67-72
- Watanabe T, Nakamura M, Kros JM, Burkhard C, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2002) Phenotype versus genotype correlation in oligodendrogliomas and low-grade diffuse astrocytomas. *Acta Neuropathol* 103, 267-275
- Watts GS, Pieper RO, Costello JF, Peng Y-M, Dalton WS, Putscher BW (1997) Methylation of discrete regions of the *O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)* CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol* Vol.17, Nr. 9, 5612-5619
- Whitehall VL, Walsh MD, Young J, Leggett BA, Jass JR (2001) Methylation of *O⁶-methylguanine DNA methyltransferase* characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res* Vol. 61, Nr. 3, 827-830
- Wolter M, Reifenberger J, Blaschke B, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP, Reifenberger G (2001) Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16^{INK4a}), p14^{ARF}, and CDKN2B (MTS 2, p15^{INK4b}) tumor suppressor genes. *J Neuropathol Exp Neurol* Vol. 60, Nr. 12, 1170-1180
- Yamada H, Vijayachandra K, Penner C, Glick A (2001) Increased sensitivity of transforming growth factor (TGF) β 1 null cells to alkylating agents reveals a novel link between TGF β signaling and O6-methylguanine methyltransferase promoter hypermethylation. *J Biol Chem* Vol. 276, Nr. 22, 19052-19058
- Zhang YJ, Chen Y, Ahsan H, Lunn RM, Lee PH, Chen CJ, Santella RM (2003) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to aflatoxin B1-DNA adducts and p53 mutation in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* Vol 103, Nr. 4, 440-444