

Identifikation epigenetisch regulierter Gene in Gliomen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christian René Alexander Regenbrecht

aus

Oberhausen

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: PD Dr. Bodo Lange
2. Referent: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 20.10.2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Meiner Familie

Danksagungen

Ich danke allen Mitgliedern des Instituts für Neuropathologie für die gute Zusammenarbeit während der letzten Jahre. Mein besonderer Dank gilt vor allem Herrn Prof. OD Wiestler für seine Unterstützung. Vieles wäre ohne ihn nicht möglich gewesen.

Herrn PD Dr. Bodo Lange danke ich für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit sowie meiner freundlichen Aufnahme in seine Arbeitsgruppe nach der Promotion.

Bei Herrn Prof. Kolanus bedanke ich mich herzlich für die freundliche Übernahme der Betreuung seitens der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät.

Herrn Dr. Andreas Waha danke ich für die hervorragende Betreuung der Arbeit im Labor und seine ständige Bereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Frau Dr. Anke Waha danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr und gute Ratschläge für mich hatte. Herrn Dr. Jörg Felsberg sei gedankt, dass er alle meine Hybridisierungen mit guten Tipps und viel Geduld begleitet hat. Frau Denise Ehrentraut, Frau Juliane Köhler und Frau Ulrike Milde danke ich für die hervorragende technische Assistenz und möchte mich gleichzeitig für mein Chaos entschuldigen, das sie bisweilen ertragen mussten.

Bei Frau PD Dr. Kindler-Röhrborn bedanke ich mich herzlich für angeregte Diskussionen, Aufmunterung und Trost. Herrn Dr. Bernd Kölsch gebührt mein Dank vor allem für die vielen praktischen Ratschläge und interessanten Sichtweisen die er mir vermittelt hat.

Herrn Ulrich Klatt danke ich für Fotos und Gestaltungstipps bei der Erstellung von Postern und der vorliegenden Arbeit.

Bei Frau Maria del Carmen Quintela González bedanke ich mich für das hervorragende Lektorat.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Freunden, die mich während meiner Promotion und hoffentlich darüber hinaus begleiten: Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen, die immer den richtigen Ton gefunden. Herrn Dr. Dirk Lichtermann für seine offenen Worte und Herrn Martin Schneider, der immer dann zur Stelle war, wenn der Rechner versagte.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich dafür, dass sie immer an mich geglaubt, mich unterstützt und mir den Rücken freigehalten haben. Vor allem dann, wenn es mal nicht so gut gelaufen ist.

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

@	bei
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
5-Aza	5-aza-2'-deoxycytidine
A. bidest	doppelt destilliertes Wasser
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>Bst</i> U	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>
cDNA	copy DNA
CEG	Cancer epigenetics group
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
cRT-PCR	kompetitive RT-PCR
C-Terminus	Carboxyterminus
Cy3	Cyanin-3
Cy5	Cyanin-5
DABCO	1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-Oktan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-deoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
fwd	forward (vorwärts)
GBM	Glioblastom
HCl	Wasserstoffchlorid
<i>Hpa</i> II	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus parainfluenzae</i>
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
M	Molar
max.	maximal
Mbp	Megabasenpaare
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	New England Biolabs, Firma
N-Terminus	Aminoternus
o.B.	ohne Befund
p.a.	per analysis (analysenrein)
PA	Pilocytisches Astrozytom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potentia hydrogenii

PIP5K	Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	Revers
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SAM	S-adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelsträngige DNA
Sssl	Methylase aus <i>Spiroplasma sp. Stamm MQ1</i>
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
Taq	DNA Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBST	Tris buffered saline Tween-Puffer
TEMED	N'-N'-N'-N'- Di-(dimethylamino)ethan
Tx-100	Triton X-100
U	Unit
UV	Ultraviolett
vol	Volumen
wt	Gewicht
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
1 Einleitung	5
1.1 Maligne Tumore	5
1.2 Hirntumore	8
1.2.1 Klassifikation der Hirntumore nach WHO.....	8
1.2.2 Molekularbiologie astrozytärer Tumore.....	9
1.2.3 Glioblastome	11
1.3 DNA-Methylierung.....	14
1.3.1 DNA-Methylierung im Genom	14
1.3.2 Die zelluläre Methylierungsmaschinerie.....	17
1.3.3 Funktionen der DNA-Methylierung.....	18
1.3.3.1 Schutz des Genoms und strukturelle Integrität	18
1.3.3.2 Transkriptionelle Repression	19
1.3.4 Tumorepigenetik	21
1.3.5 Methylierungshemmende Substanzen.....	22
1.3.5.1 5-Azacytidin und Derivate	23
1.3.5.2 RG-108	24
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	25
2 Material & Methoden.....	26
2.1 Material	26
2.1.1 Chemikalien	26
2.1.2 Stammlösungen	26
2.1.3 Restriktionsendonukleasen.....	27
2.1.4 Zellkulturmedien	27
2.1.5 Kommerzielle Reagenzien-Sätze (Kits)	27
2.1.6 Nukleinsäuren.....	28
2.1.6.1 Vektoren	28
2.1.6.2 Primer	28
2.1.7 Größenstandards	30
2.1.8 Bakterienstämme	30
2.1.9 Zelllinien.....	30
2.1.10 Untersuchungskollektive	31

2.1.11	Geräte.....	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	33
2.2.1.1	Isolierung von DNA aus Gefrierschnitten	33
2.2.1.2	DNA-Isolierung aus gefrorenem Blut	34
2.2.1.3	Fällung von DNA.....	34
2.2.1.4	Isolierung von RNA mittels TRIZOL	35
2.2.1.5	Isolierung von RNA mittels RNeasy	35
2.2.1.6	Fällung von RNA.....	35
2.2.2	Aufreinigung von Nukleinsäuren	36
2.2.2.1	Aufreinigung von PCR Produkten	36
2.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.2.4	Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren.....	37
2.2.4.1	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	37
2.2.4.2	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
2.2.6	Größenfraktionierung von Nukleinsäuren	39
2.2.6.1	Agarose-Gelelektrophorese doppelsträngiger DNA.....	39
2.2.7	Methoden der Bakterienkultur.....	40
2.2.7.1	Herstellung chemisch-transformationskompetenter Bakterien.....	40
2.2.8	<i>In vitro</i> Modifikation von DNA.....	41
2.2.8.1	SssI-Behandlung zur <i>in vitro</i> Methylierung genomischer DNA.....	41
2.2.9	Zellkultur	41
2.2.9.1	Präparation von primärem humanem Tumorgewebe für die Zellkultur ..	41
2.2.9.2	Auftauen und Einfrieren von Zelllinien	42
2.2.9.3	Passagieren von adhärent wachsenden Zelllinien.....	42
2.2.9.4	Behandlung einer primären humanen Glioblastomzelllinie mit RG-108 .	43
2.2.9.5	Zellkultur mit 5-Aza-2'-deoxycytidin	43
2.2.9.6	Transwell-Migrationsassay	43
2.2.10	Immunzytochemische Charakterisierung von primären Glioblastomzellen	44
2.2.11	Differential Methylation Hybridisation (DMH)	45
2.2.11.1	Herstellung der Sonden	45
2.2.11.2	CGI-Library	50

2.2.11.3	Herstellung der Slides (Spotting)	50
2.2.11.4	Auswertung	54
2.2.12	Methylierungs-Target-Array	54
2.2.12.1	Herstellung der Membran	55
2.2.12.2	Herstellung genspezifischer Sonden	55
2.2.12.3	Kontrollfärbung der Sonden mit NBT/BCIP	56
2.2.12.4	Berechnung der Hybridisierstemperatur für die Sonde	57
2.2.12.5	MTA Prähybridisierung	57
2.2.12.6	MTA Hybridisierung	57
2.2.12.7	Auswertung	58
2.2.13	Bisulfit Modifizierung genomischer DNA	58
2.2.14	DNA-Sequenzierung	59
2.2.14.1	Bisulfitsequenzierung	61
2.3	Kompetitive RT-PCR zum quantitativen Nachweis der Genexpression .	61
2.3.1	Herstellung exogener Kompetitor-RNA-Moleküle	62
2.3.2	cRT-PCR	62
3	Ergebnisse	64
3.1	Kultivierung humaner Gliomzellen aus primären Glioblastomen.....	64
3.2	Differentielle Methylierungsanalyse von Astrozytomen WHO Grad II und normalem Gehirngewebe mittels DMH	70
3.3	Auswirkungen demethylierender Substanzen auf die Methylierung von Gliomzellen	79
3.4	Migrationuntersuchung an kultivierten Gliomzellen.....	84
3.5	Herstellung eines Methylierungs-Target-Arrays für primäre Glioblastome	86
3.5.1	Herstellung der Array-Membran.....	86
3.5.2	Sondenauswahl	91
3.5.3	Auswertung der hybridisierten Sonden	92
3.6	Methylierungsabhängige Transkriptionsregulation in niedriggradigen Astrozytomen und Gliomzelllinien	97
3.6.1	cRT-PCR von <i>ROCK-1</i> in niedriggradigen Astrozytomen	100
3.6.2	Re-Expression von <i>Rock1</i> nach Behandlung mit 5-Aza2-deoxycytidin.103	
3.6.3	cRT-PCR von FOLH1 in niedriggradigen Astrozytomen	104
3.6.4	cRT-PCR von <i>Osr2</i> in niedriggradigen Astrozytomen.....	106

3.6.5	cRT-PCR von <i>PI3K</i> in niedriggradigen Astrozytomen.....	110
4	Diskussion	113
4.1	Differentielle Methylierungshybridisierung (DMH).....	114
4.2	Methylierungs- Target-Array (MTA)	115
4.3	Hypermethylierung als Inaktivierungsmechanismus von Genen.....	117
4.4	Hypermethylierung von Genen in anaplastischen Astrozytomen WHO Grad II.....	117
4.4.1	Rock1.....	118
4.4.1.1	Korrelation der Hypermethylierung von <i>Rock1</i> mit reduzierter Expression und re-Expression nach Behandlung mit 5-Azacytidin.....	119
4.4.1.2	Funktionelle Bedeutung: Migration-Assay.....	120
4.4.2	PI3K-P101	121
4.4.2.1	Korrelation von Hypermethylierung mit reduzierter Expression von <i>PI3K-P101</i>	122
4.4.3	Osr2.....	123
4.4.3.1	Korrelation von Hypermethylierung mit reduzierter Expression von <i>Osr2</i>	123
4.4.4	FOLH1	123
4.4.4.1	Korrelation von Hypermethylierung mit reduzierter Expression von <i>FOLH1</i>	125
4.4.4.2	Mögliche Ursachen für aberrante Transkriptionsregulation.....	126
4.5	Hypermethylierte Bereiche bilden „hot-spot“-Regionen für Mutationen.127	
4.5.1	Veränderung der Methylierung im Verlauf der Tumorprogression	128
4.6	Weitere Identifizierte Gene und ihre Bedeutung in der Tumorentwicklung	129
4.7	Klinische Bedeutung der Methylierung in der Tumordiagnostik und Therapie.....	130
4.7.1	Vergleich der Spezifität von RG-108 und 5-Azacytidin bei der Demethylierung von Genen	130
4.8	Ausblick	131
5	Zusammenfassung	133
6	Literaturverzeichnis.....	135
7	Anhang	145
7.1	Lebenslauf	145

1 Einleitung

1.1 *Maligne Tumore*

Die Entstehung von Tumoren ist mit der Aktivierung von Onkogenen („gain-of-function“) und der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen („loss-of-function“) (s. Abb. 1-1) assoziiert. Beide Arten von Krebsgenen wurden durch ihre Veränderungen in menschlichen und tierischen Zellen sowie durch ihre Auswirkungen auf unterschiedliche Phänotypen von Krebszellen identifiziert [Bishop et Weinberg, 1996]. Lange Zeit galten dabei strukturelle Veränderungen genomischer DNA, wie z.B. Punktmutationen, Deletionen, Genamplifikationen und Allelverluste als die wesentlichen Faktoren, die zur Ausbildung von Tumorerkrankungen führen. Neuere Beobachtungen deuten allerdings darauf hin, dass epigenetische Veränderungen von Tumor-relevanten Genen mindestens ebenso weit verbreitet sind. So weisen ca. 50% aller Gene für familiäre Tumorerkrankungen epigenetische Veränderungen in den entsprechenden sporadischen Tumoren auf [Balmain et al., 2003].

Unabhängig vom Aktivierungsmechanismus geht man heute davon aus, dass Zellen mindestens 6 Eigenschaften erwerben müssen, um maligne zu entarten. Normale Zellen benötigen Wachstumssignale bevor sie aus dem teilungsinaktiven Zustand (G_0 -Phase) in die Mitose übergehen. Diese Signale erreichen die Zelle unter anderem über Transmembranrezeptoren, die in der Lage sind, unterschiedliche Signalmoleküle zu binden, darunter diffusionsfähige Wachstumsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix und Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle. Um die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen zu erreichen, sind drei grundlegende Mechanismen vorstellbar: 1) Normalerweise werden die meisten mitogenen Wachstumsfaktoren von einem Zelltyp produziert, um die Proliferation eines anderen Zelltyps anzuregen. Es handelt sich somit um ein heterotypisches Signal. Viele Krebszellen sind jedoch in der Lage, die von ihnen benötigten Signale selbst zu synthetisieren, und es kommt zu einer autokrinen Stimulation der Zellproliferation [Fedi et al., 1997]. 2) Die Membranrezeptoren, die das Wachstumssignal in die Zelle weiterleiten, werden selbst zum Ziel einer Deregulation. In vielen Krebsarten werden Wachstumssignal-Rezeptoren, die als Tyrosinkinase aktiv sind, stark überexprimiert. Diese Überexpression kann dann zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber einer Signalkonzentration führen, die normalerweise nicht zu einer

Proliferation führen würde [Fedi et al., 1997]. Zum Beispiel ist der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-R/*erbB*) in Magen-, Hirn-, und Brusttumoren überexprimiert, oder der Her2/neu-Rezeptor ausschließlich in Magen- und Mammakarzinomen [Slamon et al., 1987; Yarden and Ullrich, 1988]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine stark erhöhte Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren sogar zu einem stimulusunabhängigen Signal führen kann [DiFiore et al., 1987]. 3) Die komplexesten Mechanismen der erworbenen Autonomie von Wachstumssignalen stellen die Veränderungen intrazellulärer Komponenten der Signalweiterleitung und -Verarbeitung dar. Dabei kommt der SOS-Ras-Raf-MAPK Kaskade eine wesentliche Bedeutung zu. Etwa 25% aller humanen Tumore weisen Ras Proteine auf, die strukturell so verändert sind, dass sie auch ohne Stimulus ihrer Aktivatoren mitogene Signale an die Zelle senden [Medema and Bos, 1993].

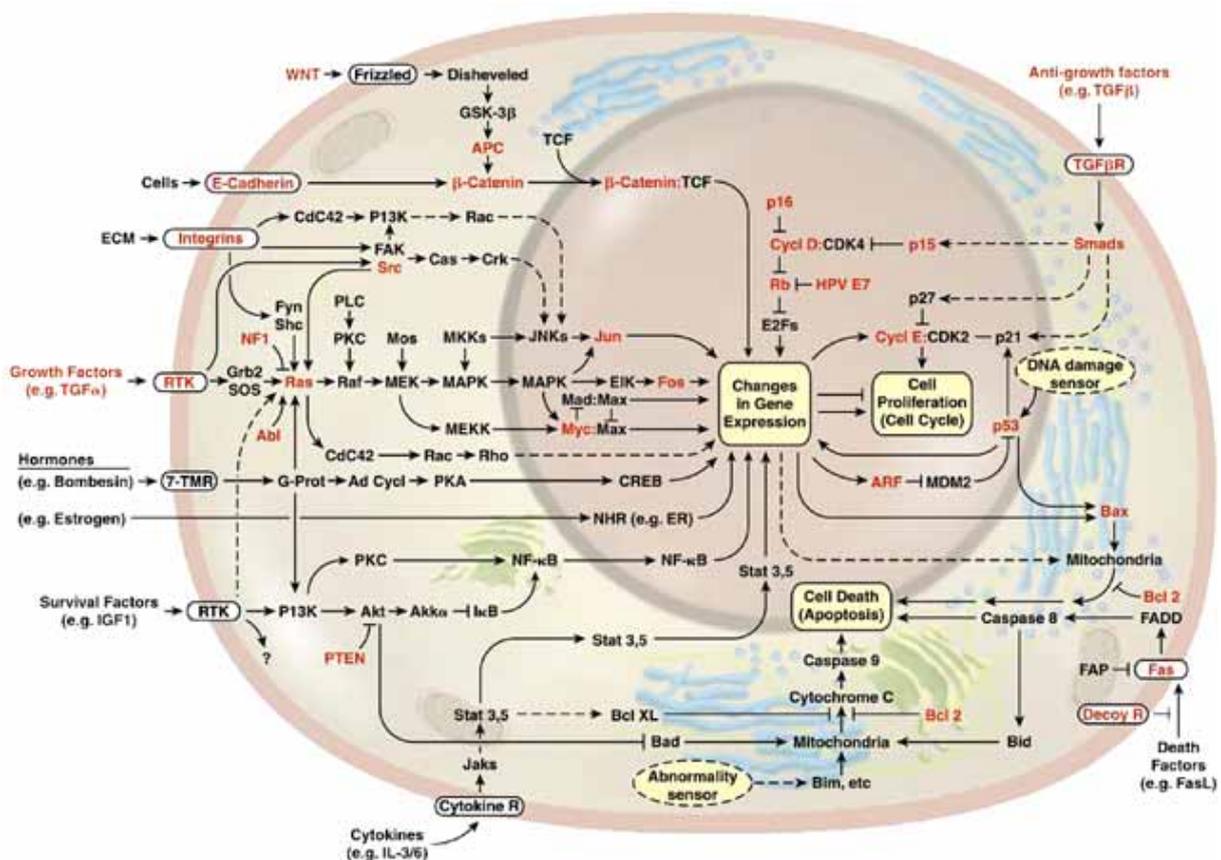


Abb. 1-1: Die Tumorentstehung hat viele verschiedene Ursachen. Dargestellt sind die wichtigsten grundlegenden Mechanismen und Signalwege, die zur Tumorentstehung führen. Zu den Mechanismen gehören die gewonnene Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Wachstumsinhibitoren, die Fähigkeit, Neoangiogenese zu initiieren sowie die Vermeidung des Apoptose-Programms und die daraus resultierende Fähigkeit zur unbegrenzten Teilung.

[Verändert nach Weinberg et al., 1999]

Die Proliferation von Zellen im Gewebeverband wird nicht nur von positiven, d.h. wachstumsfördernden Signalen bestimmt, sondern auch durch eine Anzahl antiproliferativer Signale, die für die Aufrechterhaltung der Gewebshomeostase verantwortlich sind. Diese Signale setzen sich aus zwei Arten von Molekülen zusammen: den löslichen Wachstumsinhibitoren und den in der extrazellulären Matrix benachbarter Zellen verankerten Inhibitoren. Ebenso wie bei den wachstumsfördernden Inhibitoren gelangt das Signal über Transmembranrezeptoren und deren Signalkaskaden in die Zielzelle. Wachstumshemmende Substanzen können dabei die Zielzelle entweder aus dem aktiven proliferativen Zustand in die G₀-Phase zwingen, um dann gegebenenfalls später nochmals proliferativ aktiv zu werden oder aber die Zelle wird durch antiproliferative Signale zu einer postmitotischen Differenzierung angeregt, die eine weitere Zellteilung permanent verhindert. Die Verarbeitung antiproliferativer Signale ist eng an die Zellzykluskontrolle geknüpft, vor allem mit den Komponenten, die den Eintritt in die G₁-Phase überwachen, denn an diesem Punkt des Zellzyklus entscheidet die Zelle basierend auf den Signalen, die sie von Ihrer Umgebung erhält, ob sie proliferiert, in die G₀-Phase eintritt oder sich postmitotisch differenziert. Auf molekularer Ebene wurde gezeigt, dass alle bislang bekannten antiproliferativen Signale durch das Retinoblastoma-Protein pRB- bzw. p107 und p130 verarbeitet werden. Im unphosphorylierten Zustand blockieren diese Proteine die Zellproliferation durch Regulation von E2F-Transkriptionsfaktoren und TGFβ, die ihrerseits die Transkription vieler Gene, die zum Eintritt in die S-Phase nötig sind kontrollieren [Weinberg, 1995]. TGFβ suprimiert die Expression der *c-myc* Gene, von denen bekannt ist, dass sie die G₁-Zellzyklus Maschinerie kontrollieren [Moses et al., 1990]. TGFβ fördert die Synthese von p15^{INK4B}, p21 und p27, also den Proteinen die die Bildung der Cyclin – CDK Komplexe, die für die Phosphorylierung von pRb verantwortlich sind, hemmen [Hannon and Beach, 1994; Datto et al., 1997].

Da alle Zellen während des Zellzyklus der strengen Kontrolle der Zellzyklusmaschinerie unterstehen und Zellen, die dieses Programm nicht einwandfrei durchlaufen, in die Apoptose gezwungen werden, ist die Vermeidung des Apoptoseprogramms eine grundlegende Eigenschaft von Tumorzellen. Eine weitere bedeutende Eigenschaft maligner Tumorzellen ist ihre unbegrenzte Replikationsfähigkeit. Alle Säugetierzellen besitzen darüber hinaus ein intrinsisches, vom Zellverband unabhängiges Programm, das ihr Zellteilungspotential reguliert und

die Zellen nach einer bestimmten Anzahl von Teilungen in den Teilungsstillstand, die Seneszenz führt. Dieses Programm scheint völlig unabhängig von den bekannten Zell-Zell-Signalwegen zu funktionieren.

Die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch das Blutgefäßsystem ist für Zellfunktion und Überleben der Zelle von entscheidender Bedeutung. Um mit zunehmender Tumorgröße eine ausreichende Versorgung der Tumorzellen mit allen benötigten Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten, müssen sie in der Lage sein, eine Neoangiogenese zu induzieren [Bouck et al., 1996; Hanahan und Folkman, 1996; Folkman, 1997]. Bei einigen Tumorarten verlassen einzelne Zellen den Primärtumor und wandern in das umliegende Gewebe ein. Auf diese Weise kann es passieren, dass sich auch in weit entfernten Geweben Sekundärtumore, so genannte Metastasen bilden. Diese Metastasen verursachen dabei 90% der Todesfälle bei Krebspatienten [Sporn, 1996]. Die Identifizierung hierfür verantwortlicher Gene ist also für die Entwicklung zukünftiger Krebstherapien von großer Bedeutung.

1.2 Hirntumore

1.2.1 Klassifikation der Hirntumore nach WHO

Die Einteilung der Hirntumore erfolgt nach der Klassifikation von Kleihues et. al. Eine Tumorprogression geht immer mit einer Erhöhung des Grades bei der Beurteilung des Tumors einher. Als Maßstab für die Beurteilung gelten histologische, morphologische, biochemische und genetische Eigenschaften des Tumors. Mit zunehmendem Grad der Malignität des Tumors verschlechtert sich die Prognose für den Patienten. Eine Übersicht über die verschiedenen Hirntumore und ihre WHO-Klassifikation gibt Tabelle 1-1.

Bezeichnung des Tumors	WHO-Grad des Tumors
Pilozytisches Astrozytom (PA)	Grad I
Oligoastrozytom (OA)	Grad II
Fibrilläres Astrozytom	Grad II
Protoplasmatisches Astrozytom	Grad II
Gemistozytisches Astrozytom	Grad II
Oligodendrogliom	Grad II
Ependymom	Grad II
Anaplastisches Astrozytom (AA)	Grad III
Anaplastisches Ependymom	Grad III
Anaplastisches Oligoastrozytom	Grad III
Anaplastisches Oligodendrogliom	Grad III
Gliosarkom	Grad IV
Medulloblastom	Grad IV
Glioblastoma multiforme (GBM)	Grad IV

Tab. 1-1: Um eine einheitliche Diagnose und Beurteilung der Tumoreigenschaften zu ermöglichen, werden die Tumore nach der WHO-Klassifikation bewertet und in Malignitätsgrade (WHO Grad I-IV) eingeteilt.

[nach Kleihues et al., 2000]

1.2.2 Molekularbiologie astrozytärer Tumore

Bei der Entstehung astrozytärer Tumore sind verschiedene Signalwege betroffen. Wegen ihrer Fähigkeit, normales Gehirngewebe zu infiltrieren bedingen Astrozytome WHO Grad II eine schlechte Prognose und zeigen häufig eine Tendenz zu maligner Progression zum Astrozytom WHO Grad III oder zum Glioblastom WHO Grad IV. Bei der Entstehung niedriggradiger Astrozytome kommt es ausgehend vom Normalgewebe zu einem genomischen Zugewinn auf dem langen Arm von Chromosom 7. Die häufigsten genetischen Alterationen in Astrozytomen WHO Grad II betreffen das Tumorsupressorgen *TP53* (>65%) auf Chromosom 17p13.1 sowie umschriebene Verluste der chromosomalen Regionen 22q und 13q. Ebenfalls häufig zu beobachten ist die Überexpression verschiedener Wachstumsfaktoren, wie dem platelet derived growth factor (PDGFA) bzw. dessen Rezeptoren (z.B. PDGFA-R). In

anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III treten zusätzliche Allelverluste in weiteren chromosomalen Regionen auf. So kommt es neben Allelverlusten der Regionen 9p und 11p häufig zu einem Verlust der Heterozygotie (LOH) auf dem langen Arm von Chromosom 19. Häufig kommt es bei Patienten mit einem anaplastischen Astrozytom WHO Grad III zu einer Hypermethylierung bzw. einer homozygoten Deletion des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors 2A (CDKN2A). Zu den typischen molekularen Befunden gehören Mutationen in der Phosphatase *PTEN*, ein Expressionsverlust von *DCC* (deleted in colon cancer) und eine Genamplifikation des *PDGFA-R*. Schließlich kommt es auch auf Chromosom 10 zu Allelverlusten. Auch bei der Progression zum GBM (WHO Grad IV) können weitere Hypermethylierungen, so zum Beispiel des *RB1*-Gens, beobachtet werden (Abb. 1-2).

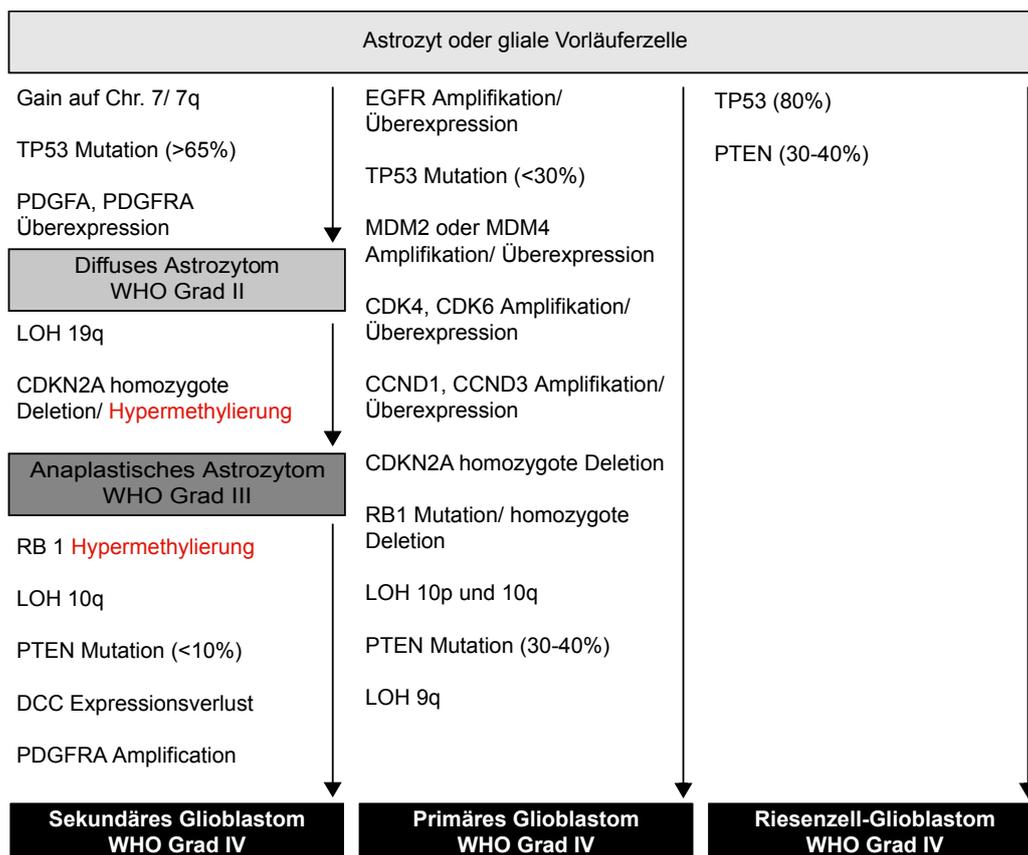


Abb. 1-2: Übersicht über die unterschiedlichen biochemischen und genetischen Veränderung bei astrozytischen Tumoren. Die Abbildung zeigt die typischen Veränderungen bei der Progression von niedriggradigen Astrozytomen hin zum sekundären Glioblastom. Daneben gezeigt sind die bekannten strukturell-genetischen Veränderungen, die zu primären Glioblastomen bzw. Riesenzellglioblastomen führen.

[verändert nach Reifenberger et al., 2004]

1.2.3 Glioblastome

Die am häufigsten auftretenden Hirntumore beim Menschen sind Glioblastome (GBMs). Sie machen etwa 12-15% aller intrakraniellen Neoplasien, sowie 50-60% aller astrozytären Tumore aus. Pro Jahr sind das etwa 2-3 neue Fälle pro 100.000 Einwohner. Glioblastome bestehen aus kaum differenzierten neoplastischen Astrozyten. Histopathologisch stellen sie sich als sehr polymorphe Zellen dar. Aber nicht nur die Zellen als solche sehen uneinheitlich aus, auch die Zellkerne sind in hohem Maße pleiomorph. Glioblastome sind typische Tumoren des Erwachsenenalters und treten bevorzugt in der cerebralen Hemisphäre auf. Sie können sich entweder sekundär durch eine Progression aus diffusen Astrozytomen WHO Grad II oder anaplastischen Astrozytomen entwickeln, oder, was häufiger der Fall ist, sie können primär *de novo* entstehen, ohne dass ihnen ein weniger maligner Tumor vorangegangen ist. Entsteht ein Glioblastom *de novo*, d.h. ohne dass vorher eine Tumorphase stattgefunden hat, sind die Mutationen nur teilweise die gleichen, die man auch bei der Tumorphase beobachten kann. So konnte bisher noch keine relevante epigenetische Veränderung beobachtet werden, die direkt zu einem primären Glioblastom führen würde (Abb. 1-2). Der klinische Verlauf bei der Progression von einem niedriggradigen Tumor ist normalerweise recht kurz (<3 Monate in mehr als 50% der Fälle) und wird meist durch epileptische Anfälle mit unspezifischen neurologischen Symptomen, wie Kopfschmerzen, Persönlichkeitsstörungen und einem steigenden intrakraniellen Druck begleitet. Glioblastome sind diffus infiltrierende Tumore und daher nicht klar vom umgebenden Gewebe abgrenzbar (Abb. 1-3).

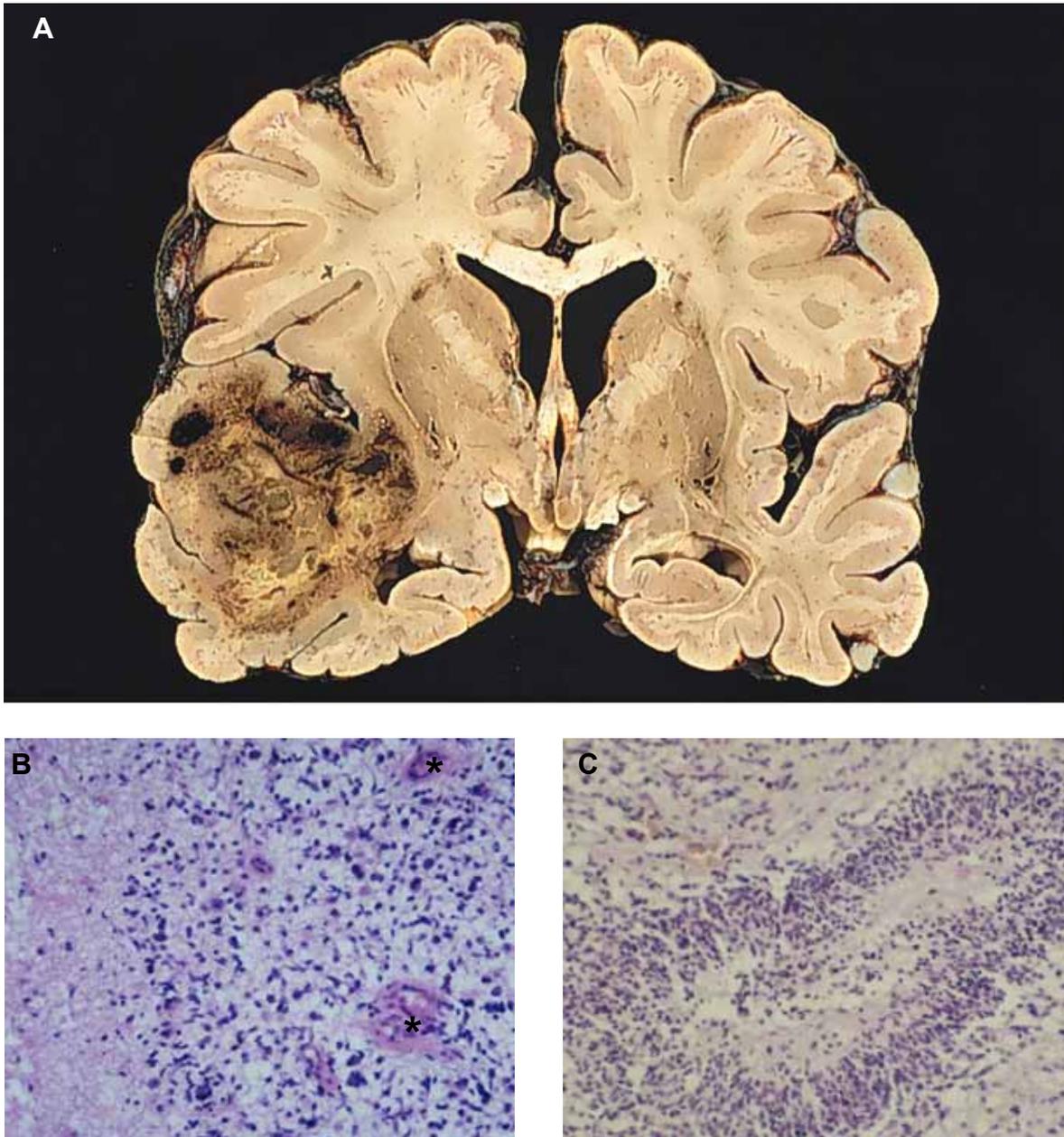


Abb. 1-3: (A): Makroskopische Aufnahme des Querschnitts durch das Gehirn eines Patienten, der an einem Glioblastom in der linken Hemisphäre erkrankt war. Die Aufnahme zeigt, dass der Tumor nicht klar gegen das umgebende Gewebe abgrenzbar ist, sondern diffus in das umgebende Gewebe infiltriert. Auf Grund der starken Raumforderung des Tumors kommt es zu Einblutungen (dunkelrot) sowie zu Nekrosen mit sich zersetzendem Myelin (gelb). Unten: (B) H&E-Färbung eines Gewebedünnschnitts durch ein Glioblastom. Auffällig ist die hohe Zelldichte und die pleiomorphen Kerne (dunkelblau). Der zellarme Anteil am linken Bildrand stellt eine der typischen Nekrosen dar, die mit Glioblastomen einhergehen. (*) markiert die ebenfalls typischen Gefäßproliferate. (C) zeigt zwei weitere typische mikroskopische Eigenschaften von Glioblastomen, die Pseudopalisadenbildung und das wegen seiner Form als Serpentina-Nekrose bezeichnete abgestorbene Gewebe.

Trotz eines wachsenden Verständnisses für die genetischen Veränderungen in diesen Tumoren ist eine Prognose über den klinischen Ausgang der Erkrankung immer noch nahezu unmöglich; die Überlebenschance für Glioblastompatienten liegt bei etwa 9 Monaten, ohne dass eine Heilungschance besteht. Heute werden verschiedene diagnostische Marker zur Charakterisierung von Glioblastomen eingesetzt. Zu den ersten in astrozytären Hirntumoren identifizierten Mutationen gehören Mutationen von *TP53* [Nigro et al., 1989] in etwa 25-30% der Fälle [Louis, 1994; Ohgaki, 1995]. *TP53* bildet mit dem Protein *MDM2* Komplexe [Zauberman, 1995], daher stellt auch eine Amplifikation bzw. Überexpression von *MDM2* einen geeigneten Mechanismus für die Zelle dar, der *TP53*-regulierten Kontrolle des Zellzyklus zu entkommen. Auch *CDKN2A*, einem weiteren Bindungspartner von *MDM2* und Inhibitor von Cyklin-CDK Komplexen kommt eine Bedeutung als diagnostischer Marker für Glioblastome zu [Tao et al., 1999]. In mehr als 30% der Patienten mit einem Glioblastom [Louis DN, Gusella JF, 1995; Ohgaki et al., 1995] ist das Gen das für den EGF-Rezeptor kodiert, amplifiziert und der Rezeptor überexprimiert [Libermann et al.; 1985, Ekstrand et al., 1992; Wong et al., 1992]. Typischerweise ist die Amplifikation des *EGFR*-Gens in Glioblastomen von Verlusten in der chromosomalen Region von Chromosom 10 begleitet [von Deimling et al., 1992; Lang et al., 1994].

Neben der Bedeutung für die Klassifikation der Tumore kommt den diagnostischen Markern in zunehmendem Umfang auch eine Relevanz für die Beurteilung der klinischen Prognose zu. Klinische Studien belegen, dass eine Überexpression des *EGFR*-Gens oftmals mit einer schlechteren Prognose einhergeht [Eppenberger & Müller, 1994; Hiesiger et al., 1993; Hurtt et al., 1992; Torp et al. 1992]. Eine erhöhte Expression von *PTEN/MMAC1* hingegen korreliert mit einer besseren klinischen Prognose [Sano et al., 1999]. Allerdings spielen neben dem genetischen Profil des Tumors bei der Prognose auch die histopathologischen Veränderungen des Gewebes eine wichtige Rolle. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass unabhängig von den molekularen Eigenschaften das Vorhandensein und die Ausdehnung von Nekrosen in Glioblastomen mit einer schlechten Prognose einhergeht [Barker et al., 1996; Burger & Green, 1987; Nelson et al., 1983; Pierallini et al., 1998].

1.3 DNA-Methylierung

1.3.1 DNA-Methylierung im Genom

Das Genom ist ein hochdynamisches System, das aus transkriptionell aktiven und inaktiven Bereichen besteht. Nicht nur im Verlauf der zunehmenden Differenzierung spielt dabei die Dynamik eine Rolle, auch die Fähigkeit, die Transkription adäquat den Umweltbedürfnissen der Zelle anzupassen, steht im Vordergrund. Eine fehlgeleitete Expressionskontrolle kann zu Erkrankungen führen, die sich zum Beispiel in neuralen Entwicklungsstörungen oder der malignen Entartung von Zellen manifestieren.

Einerseits muss die Zelle das Genom möglichst kompakt im Nukleus unterbringen, andererseits muss sie aber in der Lage sein, die Transkription ihrer Entwicklung und äußeren Stimuli entsprechend zu regulieren. Damit diese beiden Anforderungen erfüllt werden, muss einerseits ein optimales Maß an Kompaktierung gegeben sein. Andererseits müssen transkriptionell aktive Bereiche des Genoms gut für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich sein. Diese Dynamik wird durch den unterschiedlichen Verpackungsgrad des transkriptionskompetenten Euchromatins im Vergleich zum repressiven Heterochromatin vermittelt. Die Dynamik der DNA-Kompaktierung ist abhängig von einer ganzen Reihe epigenetischer Mechanismen, die die DNA-Verpackung steuern. Dazu zählt neben Phosphorylierung, Methylierung und Acetylierung von Histonen auch die Methylierung der DNA selbst. Während der Embryonalentwicklung (s. Abb. 1-4) spielen sich eine Reihe wichtiger Methylierungsschritte ab. An Maus ES-Zellen und Blastozysten konnte man feststellen, dass sich die ersten Zellteilungen ohne erkennbare Methylierung der DNA vollziehen [Reik et al., 2001].

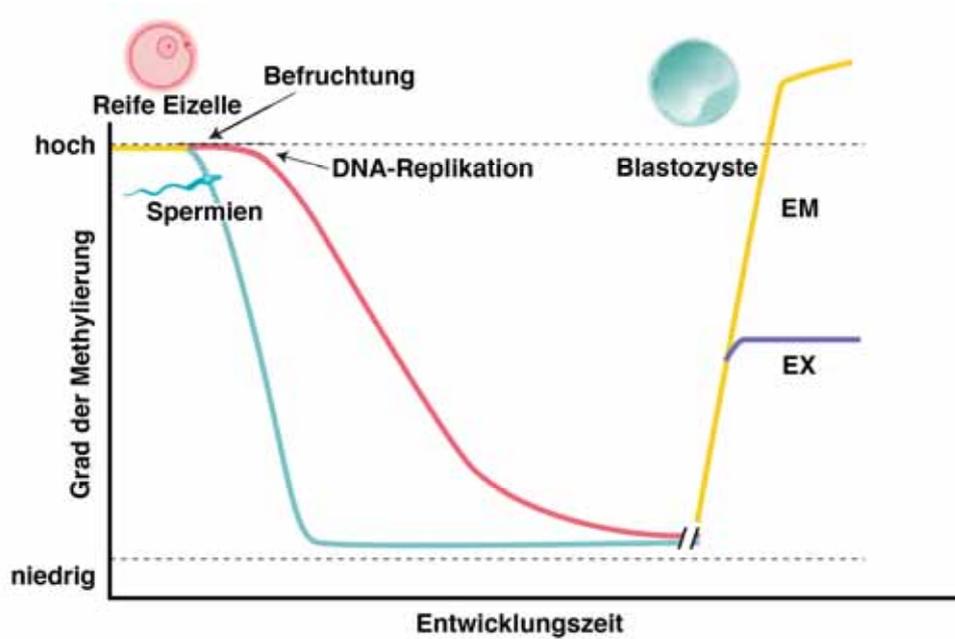


Abb 1-4: Reprogrammierung der Methylierung bei preimplantierten Embryonen. Das paternale Genom (blau) wird sofort nach der Befruchtung aktiv demethyliert. Das maternale Genom (rot) wird passiv durch DNA-Replikation demethyliert. Beide Anteile werden um den Zeitpunkt der Einnistung remethyliert. Dabei entsteht ein unterschiedliches Ausmaß an Methylierung zwischen embryonalen (EM) und extraembryonalen (EX) Entwicklungslinien. Weder werden methylierte „inprinted“ Gene und repetitive Elemente während der Entwicklung demethyliert noch unmethylierte „inprinted“ Gene mit einer Methylierung versehen.

Sobald es aber zu Differenzierung der Zellen kommt, wird die Methylierung bzw. Demethylierung bestimmter DNA Bereiche für die Zelle überlebensnotwendig [Jones et al., 1980; Razin et al., 1980; Yisraeli et al., 1986]. Die DNA-Methylierung ist offenbar mitverantwortlich für eine Partitionierung des Genoms und die Infrastruktur des Chromatins in aktive und inaktive Bereiche. Durch die festgelegten Methylierungsmuster kann die Transkriptionsmaschinerie nur noch eine begrenzte Anzahl von Genen, die wichtig für das Zellüberleben und die Zelldifferenzierung sind, transkribieren.

In Säugetierzellen findet DNA-Methylierung ausschließlich an Position 5 des Cytosins eines CpG-Dinukleotids statt (Abb. 1-5), wobei etwa 70% aller CpGs methyliert sind. Aber weder die Verteilung von 5-Methylcytosin noch die räumliche Verteilung der CpG-Dinukleotide ist zufällig. Im Allgemeinen ist die Sequenzfolge Cytosin – Phosphat – Guanin im Genom im Vergleich zur statistischen Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens stark unterrepräsentiert. In einigen Bereichen des Genoms ist dagegen eine starke Anhäufung der CpG-Dinukleotide anzutreffen, diese Bereiche werden

daher CpG-Inseln genannt. Obwohl die CpG-Inseln nur etwa 1% des Genoms ausmachen, enthalten sie etwa 15% des gesamten CpG-Gehalts des Genoms. Über 50% der dort lokalisierten CpG-Dinukleotide sind dabei unmethyliert. Es gibt im menschlichen Genom etwa 30.000 solcher CpG-Inseln, die meisten davon befinden sich im Promotorbereich oder dem ersten Exon von Haushaltsgenen. Diese CpGs sind normalerweise nicht methyliert. Eine Ausnahme bilden die CpG-Inseln des inaktivierten X-Chromosoms und die repetitiven Elemente bei Frauen. Ferner zeichnen sich unmethylierte CpG-Inseln durch eine gut zugängliche Chromatinstruktur aus. Diese offene Chromatinstruktur wird vor allem dadurch bedingt, dass der Linker an Histon H1 fehlt und man in den Nukleosomen vermehrt acetylierte Histone H3 und H4 vorfindet. Die CpG-Verarmung im Genom beschränkt sich auf Organismen mit einem hohen Anteil an methylierter DNA. Dieses Phänomen lässt sich mit der im Vergleich zum Cytosin erhöhten Anfälligkeit des 5-Methylcytosins gegenüber spontaner Deaminierung erklären, wobei Thymin entsteht. Dieser Vorgang entspricht eine Punktmutation und kann nicht effektiv durch DNA-Reparaturenzyme erkannt werden. Bei der Deaminierung von Cytosin entsteht Uracil, das im DNA-Strang gut erkannt und sehr effektiv durch die Uracil-DNA-Glycosylase abgebaut wird. Da aber Thymin eine natürlich vorkommende DNA-Base ist, wird die Deaminierung von 5-Methylcytosin nur selten als Fehler erkannt [Krokan HE et al., 2002] und es findet eine Transition von CpG nach TpG statt.

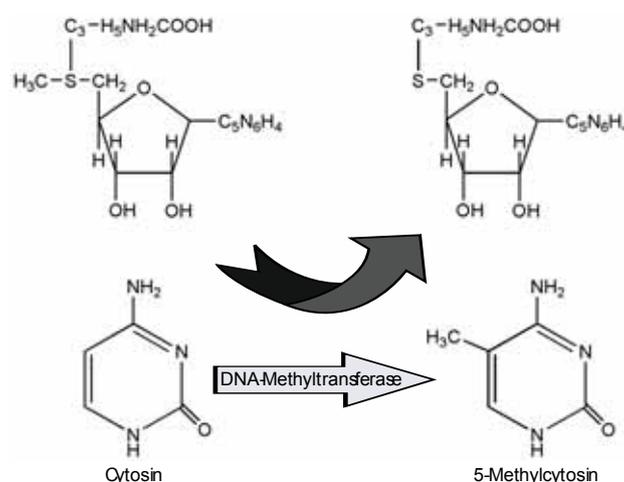


Abb 1-5: Synthese von 5-Methylcytosin in der Zelle. Durch die DNA-Methyltransferase wird eine Methylgruppe vom S-Adenosylmethionin (SAM) auf ein Cytosin übertragen, und es entstehen 5-Methylcytosin und S-Adenosylhomocystein (SAH) [verändert nach Atwood et al.]

1.3.2 Die zelluläre Methylierungsmaschinerie

Mindestens drei unabhängige DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B scheinen für die Etablierung und Aufrechterhaltung der genomischen Methylierungsmuster in komplexer Weise verantwortlich zu sein. DNMT1 war die erste DNA Methyltransferase, die beschrieben wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass DNMT1 eine etwa 10-40 fach erhöhte Affinität zu hemimethylierter DNA hat [Predhan et al., 1999]. In normalen somatischen Zellen ist DNMT1 die am stärksten exprimierte Methyltransferase [Robertson et al., 1999]. DNMT1 kolokalisiert intrazellulär mit den Replikationsfoci [Rountree et al., 2000] und interagiert mit dem proliferativen Zellkern-Antigen (PCNA) [Eads et al., 1999; De Marzo et al., 1999; Araujo et al., 2001]. Auf Grund dieser Eigenschaften wird angenommen, dass DNMT1 für das Übertragen der Methylierungsmuster auf den Tochterstrang nach der Replikation verantwortlich ist [Vertino et al., 2002]. DNMT1 wird daher oftmals auch als „Erhaltungs“-Methyltransferase bezeichnet. Auch während der Embryogenese spielt DNMT1 eine bedeutende Rolle, ebenso wie für das Imprinting und die X-Chromosom-Inaktivierung [Robertson et al., 1999; Hermann et al., 2004]. Es gibt Hinweise, dass DNMT1 jedoch auch Aufgaben und konservierte Funktionen jenseits der DNA-Methylierung übernimmt, da man in *D. melanogaster* ein DNMT1-artiges Protein identifizieren konnte, ohne dass DNA-Methylierung in *Drosophila* nachgewiesen wurden. Neuere Forschungsergebnisse zeigen allerdings, dass Methylierung in *Drosophila* tatsächlich stattfindet [Lyko, 2001].

Neben DNMT1 gibt es noch die DNMT3-Familie, die in Maus und Mensch gut charakterisiert und sowohl im Pflanzen- wie im Tierreich hoch konserviert ist. DNMT3(A/B) wird zur genomweiten *de novo*-Methylierung während der Embryogenese sowie für die Methylierung endogener retriviraler Sequenzen im Genom benötigt. *Dnmt3a-knockout*-Mäuse sind neonatal lethal. *Dnmt3b-knockout*-Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben schon am 9,5 Tag der Embryonalentwicklung mit zahlreichen entwicklungsbiologischen Defekten. Etwa zu der Zeit zeigen sich bei *Dnmt1-knockout*-Tieren erste Wachstumsdefekte. Diese Befunde zusammen mit der Erkenntnis, dass die Mitglieder der DNMT3-Familie keine Präferenz zu hemimethylierter DNA zeigen führte zu ihrer Bezeichnung als „*De novo*“-Methyltransferasen. Allerdings zeigen neuere Versuche, dass eine solche strenge Aufgabenteilung in *de novo* bzw. Erhaltungsmethyltransferasen die Situation

in vivo nur unzureichend abbildet. Es scheint viel wahrscheinlicher, dass alle drei Methyltransferasen beide Eigenschaften besitzen und auf Grund der Interaktion mit anderen nukleären Proteinen und DNA-Bindungsfaktoren spezifisch für die Methylierung bestimmter DNA-Regionen verantwortlich sind. Diese These wird vor allem durch neuere Studien unterstützt. In aufgereinigten DNMT1-Komplexen wurde das Rb-Genprodukt, E2F1 und die Histondeacetylase 1 (HDAC1) gefunden [Robertson KD et al., 2000]. In Yeast 2-Hybrid-Versuchen konnte gezeigt werden, dass DNMT1 einen Komplex mit HDAC2 und den Korepressoren DMAP1 und TSG 101 bilden kann [Margot JB et al., 2003; Muromoto R et al., 2004; Liu Z & Fisher RA, 2004].

1.3.3 Funktionen der DNA-Methylierung

1.3.3.1 Schutz des Genoms und strukturelle Integrität

Die meisten CpG-Dinukleotide befinden sich in ansonsten relativ CpG-armen genomischen Bereichen und sind hypermethyliert (Abb.1-6). Bei näheren Untersuchungen dieser CpG-Sequenzen hat man festgestellt, dass sie sich meistens in parasitischen DNA-Elementen, den Retrotransposons befinden. Etwa 40% des menschlichen Genoms besteht aus Retrotransposons, die sich aus endogenen Retroviren, L1-Elementen und ALU-Sequenzen zusammensetzen können und einen hohen Gehalt an CG-Dinukleotiden aufweisen. DNA-Methylierung könnte ursprünglich als Schutzmechanismus gegen die Ausbreitung dieser Transposons entstanden sein. Durch ihre Fähigkeit, die Rekombination von nicht allelen DNA-Fragmenten zu fördern, stellen parasitische DNA-Elemente eine große Bedrohung für die strukturelle Integrität des Genoms dar, da es so gehäuft zu chromosomalen Rearrangements oder Translokationen kommen würde. Viele Retrotransposons haben starke Promotoren, die, sollten sie in eine transkriptionsaktive Einheit inseriert werden, zu einem internen Initiationskomplex führen. Bei Einfügungen in Sinnrichtung würde das zu einem abgeschnittenen Transkript führen, bei einer Einfügung in Gegensinnrichtung könnte das Insert die Genexpression verhindern indem es wie eine antisense-RNA funktioniert [Yoder et al., 1997]. Für die Expression von Genen, für die Retrotransposons kodieren, wie z.B. die Reversen Transkriptasen

wurde gezeigt, dass eine Methylierung der Retrotransposon-Promotoren zu einem Transkriptions-silencing führt [Kochanek et al., 1995].

1.3.3.2 Transkriptionelle Repression

Seit etwa 25 Jahren ist ein Zusammenhang zwischen CpG-Methylierung und transkriptioneller Inaktivierung bei Wirbeltieren bekannt, jedoch konnte erst 1992 das „Methyl-CpG bindende Protein 2“ (MECP2), ein transkriptioneller Repressor, der selektiv methylierte DNA erkennt, charakterisiert werden [Lewis et al., 1992; Meehan et al., 1992]. MECP2 kann in zwei strukturelle Domänen unterteilt werden: Die Methyl-CpG bindende Domäne (MBD), die symmetrisch methylierte CpG-Dinukleotide an Kontaktstellen der großen Furche der DNA erkennt [Chandler et al., 1999], sowie eine transkriptionsreprimierende Domäne (TRD), die mit verschiedenen anderen regulatorischen Proteinen interagiert [Nan et al., 1998; Razin, 1998; Ng et al., 2000]. Die Eigenschaften von MECP2 und der Mechanismus die der DNA-Methylierung zugrunde liegen, konnten vor allem durch Studien an Patienten mit Rett-Syndrom aufgeklärt werden [Willard & Hendrich, 1999; Amir et al., 1999; Gura, 1999; Lam et al., 2000]. MECP2 reprimiert selektiv die Transkription von methylierter DNA in Abwesenheit einer geordneten Chromatinstruktur. Darüber hinaus wurde *in vitro* gezeigt, dass die TRD von MECP2 an Teile der normalen Transkriptionsmaschinerie bindet und so den Zusammenbau eines funktionellen Transkriptionskomplexes hemmt. Für viele Komponenten des Transkriptionskomplexes ist der freie Zugang zur DNA durch ihre Assoziation mit den Histonen nicht möglich. Methyl-CpG bindende Proteine dienen als Bindungskomplex für weitere Enzyme, wie der Histondeacetylase [Jones et al., 1998; Nan et al., 1998; Wade et al., 1999; Ng et al., 1999]. Die Rekrutierung der Histondeacetylase erfolgt dabei jedoch indirekt über die Assoziation mit Sin3A und führt zu einer starken Kompaktierung der DNA um die Histonkomplexe [Tse et al., 1998]. Zwei weitere wichtige Verbindungen zwischen DNA-Methylierung und der Chromatinstruktur zeigen sich bei der Beobachtung, dass auch DNMT1-Fusionsproteine mit einer minimalen Interaktionsdomäne (CXXC) mit Histondeacetylasen interagieren und die Transkription reprimieren [Robertson et al., 2000; Roundtree et al., 2000; Fuks et al., 2000]. Der zweite wichtige Hinweis auf die Verbindung zwischen DNA-Methylierung und Chromatinstruktur kommt von Patienten die am ATR-X Syndrom (α -

Thalassaemia, mental retardation, X-linked) leiden, einer Erkrankung, bei der Mutationen in einem putativen ATP-abhängigen Chromatin-remodelling Faktor der SNF2-Familie zu abnormen Methylierungsmustern in repetitiven Elementen (sowohl Hyper-, als auch Hypomethylierungen) führen [Gibbons et al., 2000].

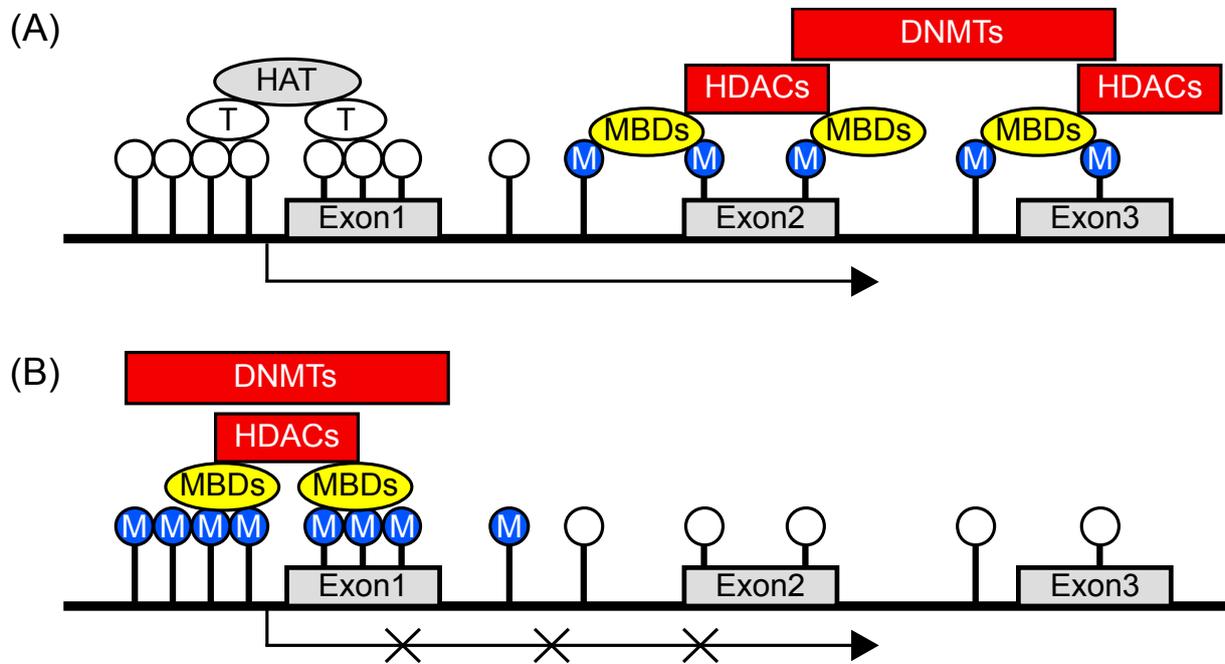


Abb 1-6: (A) Der Promotorbereich von Genen in normalen Zellen ist nicht methyliert. Die Acetylierung der Histone und die dadurch verursachte Auflockerung der Chromatinstruktur erfolgt durch Histonacetyltransferasen (HATs) unter Beteiligung von Transkriptionsfaktoren (T). Die Cytosin-Basen der CpG-Inseln sind nicht methyliert (weiße Kreise). Das Gen kann transkribiert werden. (B) zeigt die Situation eines hypermethylierten Genpromotors in einer Tumorzelle. Diese *de novo*-Methylierung erfolgt durch die Aktivierung der Methyltransferasen. Proteine mit Methylgruppen-bindenden Domänen (MDBs) und Histondeacetylase (HDACs) verursachen eine Deacetylierung und schließlich eine Chromatinkondensation. Die Transkription des Gens kann auf diese Weise blockiert werden. Zusätzlich kommt es in Tumorzellen neben der Hypermethylierung in den Promotoren auch zur Hypomethylierung von CG-Dinukleotiden außerhalb von CpG-Inseln, z.B. der repetitiven Elemente, was zu einer genomischen Instabilität führt.

[geändert nach Arnold et al.]

1.3.4 Tumorepigenetik

Die Krebsforschung konzentrierte sich lange Zeit auf die Suche nach Mutationen, Deletionen, Rearrangements und Genamplifikationen, die als strukturelle genetische Veränderungen vielen Tumorerkrankungen zugrunde liegen. Epigenetische Veränderungen in Tumoren umfassen sowohl Hypomethylierungen als auch Hypermethylierungen. Interessanterweise wurden zuerst Hypomethylierungen als eine mögliche Ursache für Krebs, z.B. Hypomethylierung des *Mage*-Gens in Melanomen, Cyclin D2 und Maspin bei Magenkarzinomen sowie Ca9 in Nierentumoren identifiziert [DeSmet et al., 1996; Cho et al., 2003; Adorjan et al., 2002]. Eine Hypermethylierung spielt bei der Tumorentwicklung und Progression vor allem durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen eine wichtige Rolle [Greger et al., 1989; Sakai et al., 1991; Gonzalez-Zulueta et al., 1995; Herman et al., 1994]. Die Bedeutung der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Hypermethylierung der Promotoren wird sehr klar, wenn man sie im Sinne von Knudson's „Two-Hit Model“ betrachtet. In dem Modell wird postuliert, dass es bei Tumorsuppressorgenen zweier genetischer Ereignisse („hits“) bedarf, um eine normale Zelle in eine Tumorzelle zu verwandeln, und dass bei familiären Tumorerkrankungen ein solches Ereignis als Mutation vererbt ist. Zur Tumorentstehung ist zusätzlich ein weiteres Ereignis, z.B. ein umfangreicher Allelverlust erforderlich, der die zweite Genkopie des Tumorsuppressorgens umfasst. Ein Phänotypen ist also erst dann zu beobachten, wenn beide Allele eines Tumorsuppressorgens inaktiviert wurden [Knudson et al., 1971].

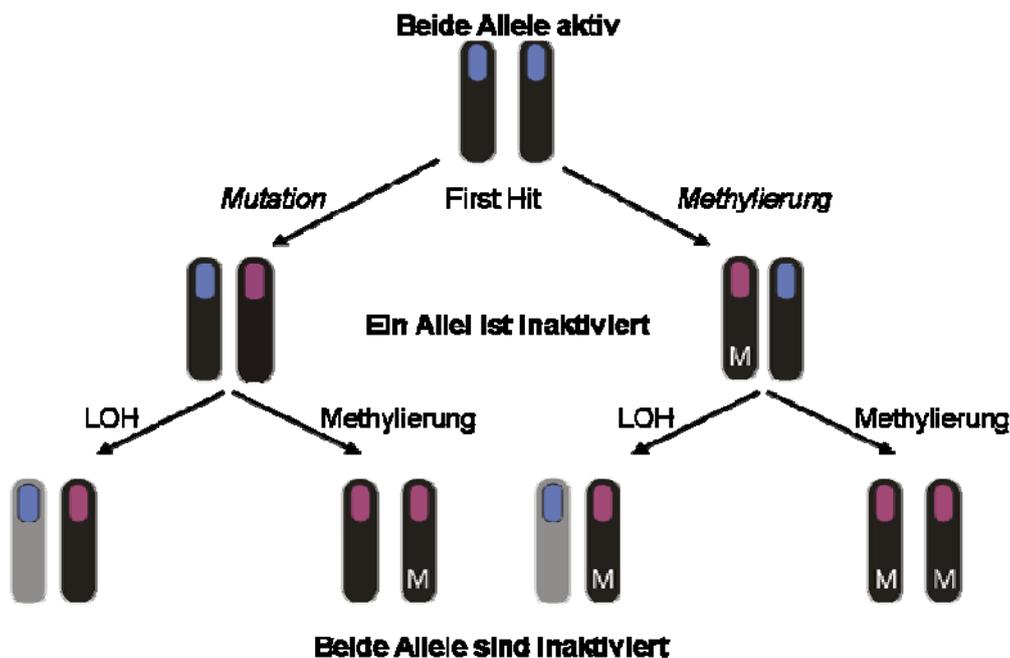


Abb. 1-7: Knudson's „2-hit Modell“ der Tumorenstentstehung. Die Hypothese besagt, dass bei familiären (hereditären) Tumoren durch eine frühere Keimbahnmutation ein Allel eines autosomalen Tumorsuppressorgens bereits inaktiviert vorliegt (first hit), und dass das Auftreten der Tumoren dann aus der Inaktivierung des zweiten Allels durch eine weitere, somatische Mutation resultiert (second hit). Bei sporadischen Tumoren müssen nach diesem Modell beide Allele in einer einzelnen Zelle durch somatische Mutation inaktiviert werden, ohne vorausgehende Keimbahnmutation. Aus diesem Modell ergibt sich das scheinbare Paradox, dass die Vererbung der Prädisposition zum Tumor dominant ist, während der eigentliche Mechanismus der Tumorentwicklung auf zellulärer Ebene rezessiv ist. Als Mechanismus zur Inaktivierung des Gens kommt dabei neben strukturell genetischen Ereignissen auch epigenetische Inaktivierung durch Hypermethylierung in Betracht.

1.3.5 Methylierungshemmende Substanzen

Neben Substanzen, die direkt auf den Mechanismus der Methylierung wirken, um epigenetisch inaktivierte Gene zu reaktivieren, können auch Inhibitoren der Histondeacetylasen eine Reaktivierung epigenetisch inaktiverter Gene ermöglichen. HDAC-Inhibitoren lassen sich grob in mehrere Gruppen einteilen: (i) Hydroxaminsäuren wie Trichostatin A [Tsuji et al., 1976; Yoshida et al., 1990], Oxamflatin [Kim et al., 1991], Suberoylanilide Hydroxaminsäure (SAHA) [Richon et al., 1998]. (ii) Zyklische Peptide mit Epoxyketonen, wie Trapoxin A und Trapoxin B [Kijama et al., 1993], Cyl-1 und Cyl-2 [Hirota et al., 1974], HC-Toxin [Kawai et al., 1983], WF-3161 [Umehara et al., 1983], Chlamydocin [Closse et al., 1974]. (iii)

Zyklische Peptide ohne Ketone, wie Depsipeptid [Nakajima et al., 1998], Apicidin [Darkin-Ratray et al., 1996]. (iv) Benzamide, wie MS-275 [Saito et al., 1999]. (v) Kurzkettige und aromatische Fettsäuren, wie Natriumbutyrat [Newmark et al., 1994], Phenylnatriumbutyrat [Warrell et al., 1998] und (vi) gemischte Wirkstoffe, wie Depudecin [Kwon et al., 1998].

1.3.5.1 5-Azacytidin und Derivate

Ursprünglich wurden 5-Azacytidin und dessen Deoxyderivat, das 5-Aza-2'-deoxycytidin (Decitabine) als potentielle Chemotherapeutika synthetisiert [Cihak, 1974]. Erst später konnte eine demethylierende Wirkung beobachtet werden [Jones & Taylor, 1980]. Die demethylierende Wirkung von 5-Azacytidin beruht darauf, dass die modifizierte Base durch die DNA Polymerase in die DNA einer sich teilenden Zelle eingebaut wird und dadurch die 5' Position durch die Azagruppe belegt wird. Es kommt zu einer kovalenten Bindung von DNMT1 an die DNA, die nicht mehr aufgehoben werden kann. So wird die Bindung der Methyltransferasen an die DNA sterisch verhindert. Als Konsequenz wird das Methylierungsmuster der DNA-Vorlage nicht auf den Tochterstrang übertragen. Allerdings birgt der Einsatz von 5-Azacytidin auch einige Komplikationen. So ist die Substanz im wässrigen Milieu instabil und muss daher stets frisch gelöst werden, um die Aktivität zu erhalten. Vor allem beim Einsatz in hohen Dosen kommt noch ein weiterer unerwünschter Effekt hinzu, denn mit zunehmender 5-Azacytidin Konzentration im Blut wirkt die Substanz myelosuppressiv, d.h. die Produktion von Blutplättchen, Leukozyten und Erythrozyten wird unterdrückt. Neben dieser rein substanzbedingten Nebenwirkung gibt es noch eine systemisch bedingte Nebenwirkung, denn 5-Azacytidin und seine Analoge unterscheiden nicht zwischen methylierten Promotorsequenzen und ersten Exonen aktiver Gene, sondern sie binden auch an die physiologisch methylierten repetitiven Sequenzen und führen so zu einer unbeabsichtigten genomischen Instabilität, sowohl bei Tumor- wie auch bei normalen Zellen.

1.3.5.2 RG-108

RG-108 ist ein kleines hydrophobes Molekül, das von Dr. F. Lyko am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) als Inhibitor der DNA-Methylierung synthetisiert wurde. Das Molekül wird im Gegensatz zu 5-Azacytidin nicht in die DNA eingebaut, sondern bindet kompetitiv an die Bindungsstelle der Methyltransferase DNMT1 und verhindert so eine Methylierung. Auf Grund der Bindungseigenschaften von RG-108 werden nur Gene, die als Einzelkopie vorliegen, demethyliert. Repetitive Sequenzen bleiben methyliert. Diese beiden Eigenschaften sind der große Vorteil der Substanz; sie führt nicht zu einer genomweiten Hypomethylierung und der damit verbundenen genomischen Instabilität.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung *de novo* methylierter Gene in Gliomen. Ein besonderes Interesse galt dabei der Untersuchung niedriggradiger Astrozytome, über deren molekulare Pathogenese nur wenige Informationen verfügbar sind. Während in fortgeschrittenen hochmalignen Gliomen umfangreiche strukturelle Veränderungen beschrieben sind, gehen wir von der Hypothese aus, dass in frühen Tumorstadien epigenetische Alterationen eine besondere Rolle spielen.

Zur Identifizierung epigenetisch regulierter Gene sollte ein Microarray-basiertes Verfahren (DMH...) eingesetzt werden. Der Methylierungszustand identifizierter Gene sollte im Anschluss durch detaillierte Bisulfit-Sequenzierung an primären Tumorgeweben und abgeleiteten Zelllinien überprüft und mit der Transkription der entsprechenden Gene korreliert werden.

Für ausgewählte Gene mit tumorbiologisch relevanten Funktionen sollte überprüft werden, ob in abgeleiteten Zelllinien die epigenetische Inaktivierung durch eine Behandlung mit demethylierenden Agenzien wieder aufgehoben werden kann. Darüber hinaus sollte in dieser Arbeit ein Microarray-basiertes Verfahren (MTA) zum effizienten und sensitiven Nachweis von *de novo*-Methylierung an einem großen Tumorkollektiv etabliert werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden – soweit nicht anders vermerkt – von den Firmen Biorad, Difco, Fluka, ICN, Invitrogen, Merck, Roche, Roth, Serva und Sigma in Analysequalität (p.a.) bezogen. Enzyme sowie Nukleotide stammten von Amersham, Clontech, Invitrogen, MBI Fermentas, MWG, NEB, Promega, Roche und Stratagene.

2.1.2 Stammlösungen

Waschpuffer	6,5mM NaCl 2 ml NonIDet P40 Ad 2l H ₂ O bidest.
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA Ad 1l H ₂ O bidest.
10x TBE-Puffer	810 g TRIS-Base 412,5 g Borsäure 300 ml 0,5 M EDTA; pH=8 Ad 7,5 l H ₂ O bidest.
50x TAE-Puffer	242 g TRIS-Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA; pH=8 Ad 1 l H ₂ O bidest.
TE-Puffer	10mM Tris-HCl; pH=8 1mM EDTA Ad 1l H ₂ O bidest.

2.1.3 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz	Firma
<i>MseI</i>	5'...T [▼] TAA...3' 3'...AAT [▲] T...5'	NEB
<i>HpaII</i>	5'...CC _(meth) [▼] GG...3' 3'...GG [▲] C _(meth) C...5'	NEB
<i>BstXI</i>	5'...CG [▼] CG...3' 3'...GC [▲] GC...5'	NEB

2.1.4 Zellkulturmedien

Medium	Firma
Quantum 263	PAA
Trypsin-EDTA	PAA
FCS Gold	PAA
DMEM	Gibco

2.1.5 Kommerzielle Reagenzien-Sätze (Kits)

Kit-Bezeichnung	Firma
CSPD	Roche
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
NBT/BCIP	Roche
pGEM-T Klonierungs Kit	PROMEGA
PROMEGA Wizard Kit	Promega
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Random Prime Kit	Invitrogen
RNeasy RNA Purification Kit	QIAGEN
SuperScriptII RT-Kit	PROMEGA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

2.1.6 Nukleinsäuren

2.1.6.1 Vektoren

Vektor	Quelle
TOPO	Invitrogen
pGEM	PROMEGA

2.1.6.2 Primer

2.1.6.2.1 Primer für Methylierungs-Target-Arrays

Chfr-1-MTA_fwd	5' AGT GCA GTG GCA CAG TCT TG 3'
Chfr-1-MTA_rev	5' GTT GCA GTG AGC CAA GAT CA 3'
Hand-1_MTA-fwd	5' ACA CTC CCT CTA CCA CAC CG 3'
Hand-1_MTA-rev	5' ACC TCG AGA CAC CAG CAT TC 3'
VHL_MTA-fwd	5' GCA CAA TCT CAG CTC ACT GC 3'
VHL_MTA-rev	5' AAG GCC CTA CTA TGT ACC ACC 3'
BRCA1_MTA-fwd	5' TTT ATG GCA AAC TCA GGT AG 3'
BRCA1-MTA-rev	5' TAA TTT ATC TGT AAT TCC CG 3'
Birc3_MTA-fwd1	5' TAA AAG ACA GCG TGA GAC TC 3'
Birc3_MTA-rev1	5' ACC TGG AAC CTA TCT AGA GC 3'
Birc3_MTA-fwd2	5' TAC GTG TAA AGT GTA TGG 3'
Birc3_MTA-rev2	5' TTA ACC GTG GCA TAT CTT 3'
OSR2_MTA-f1	5' TTG GAA GAA ATT TCT CCT GG 3'
OSR2_MTA-rev1	5' AGT TTT GTA CAT ACT TTT GG 3'
TP53TG3_MTA-fwd1	5' CAA GCT TGG TAA ACG AAG CC 3'
TP53TG3_MTA-rev1	5' CAC TGC GCA TGT CTG AAA AGG 3'

2.1.6.2.2 Primer für Bisulfit-behandelte DNA

FOLH1-bs-fwd	5' AGT GAG ATT GAG AGA GAT TTT ATT T 3'
FOLH1-bs-rev	5' TTC CCA ACT ACC CTC CTC C 3'
Osr2-bs-fwd	5' GAA GTA AAT AGA GTG GAT TAT TAG T 3'
Osr2-bs-rev	5' GCG TCC CTC CCC AAA CTA CCC CAA A 3'
PI3K-bs-fwd	5' AGT GAG AGA GAA GGA AGT AGT T 3'
PI3K-bs-rev	5' ACC CCA CAT CCT CTC TAA ATC A 3'
Rock1-bs-fw	5' AAT GGG AGA GTG AGG TTG TTT 3'
Rock1-bs-rev	5' AAA CCT CAA AAT CAC CAA ATA 3'

2.1.6.2.3 Primer für die kompetitive RT-PCR (cRT-PCR)

FOLH1-mut	5' TCA GTG TTC AAA GCT CCT CGA ACA ACA GCT GCT CCA CTC 3'
FOLH1-rt-fw	5' AGA TGC ACA TCC ACT CTA CC 3'
FOLH1-rt-rev	5' TCA GTG TTC CAA AGC TCC TC 3'
FOLH1-rt-r-fam	5' [6-FAM] TCA GTG TTC CAA AGC TCC TC 3'
FOLH1-T7	5' GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGA GAT GCA CAT CCA CTC TAC C 3'
Osr2-rt-fw	5' GTG GAC TCA ATG ACC TTT CC 3'
Osr2-rt-rev	5' GCG TCC CTC CCC AAA CTA CCC CAA A 3'
Osr2-rt-r-fam	5' [6-FAM] GCG TCC CTC CCC AAA CTA CCC CAA A 3'
Rock1 -rt-rev	5' GAG ATT GCT TCA GAT CAA CG 3'
Rock1-rt-fw	5' TGA AGA GGC AAA GTC TGT GG 3'
Rock1-rt-r-fam	5' [6-FAM] GAG ATT GCT TCA GAT CAA C 3'
Rock1-T7	5' GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGT GAA GAG GCA AAG TCT GTG G 3'
Rock-mut	5' GAG ATT GCT TCA GAT CAA CGA CAC TGT TTC TCA ATC TGA A 3'

2.1.6.2.4 Adaptoren für DMH und MTA

H12	5' TAA TCC CTC GGA 3'
H24	5' AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAT 3'

2.1.6.2.5 Klonier- und Sequenzierprimer

pGEM fwd	5' TTG GGT AAC GCC AGG GT 3'
pGEM rev	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'
Seq fwd	5' CGG CCG CCT GCA GGT CGA CCTTAA 3'
Seq rev	5' AAC GCG TTG GGA GCT CTC CCT TAA 3'

2.1.7 Größenstandards

Standard	Fragmentgrößen in Basen
100 bp DNA ladder (NEB)	2.072; 1.500; 600; 500; 400; 300; 200; 100
1kb DNA ladder (NEB)	10.002; 8.001; 6.001; 3.001; 2.000; 1.500; 1.000; 500
pUC19 (MBI Fermentas)	501/489; 404; 331; 242; 190; 147; 111/110; 67

2.1.8 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp
DH 5 α (Invitrogen)	F ⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻
TOP10 (Invitrogen)	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Δ 80lacZ Δ M15 Φ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG

2.1.9 Zelllinien

Humane Gliomzelllinien	LN229	DMEM + 10%FCS
	T98G	DMEM + 10%FCS
	U87MG	DMEM + 10%FCS
	A1207	DMEM + 10%FCS
	CEG001	Quantum 263
	LNZ308	DMEM + 10%FCS
Zelllinien	HaCaT	DMEM
	HeLa	DMEM

2.1.10 Untersuchungskollektive

Tumorbank DNA-Nummer	Diagnose
TB 2973	GBM WHO Grad IV
TB 3494	GBM WHO Grad IV
TB 3498	GBM WHO Grad IV
TB 3552	GBM WHO Grad IV
TB 4287	GBM WHO Grad IV
TB 4288	GBM WHO Grad IV
TB 4294	GBM WHO Grad IV
TB 4401	GBM WHO Grad IV
TB 4410	GBM WHO Grad IV
TB 4421	GBM WHO Grad IV
TB 4462	GBM WHO Grad IV
TB 4469	GBM WHO Grad IV
TB 4486	GBM WHO Grad IV
TB 4491	GBM WHO Grad IV
TB 4496	GBM WHO Grad IV
TB 4499	GBM WHO Grad IV
TB 4505	GBM WHO Grad IV
TB 4508	GBM WHO Grad IV
TB 4510	GBM WHO Grad IV
TB 4540	GVBM WHO Grad IV
TB 4581	GBVM WHO Grad IV
TB 4582	GBMV WHO Grad IV
TB 4612	GBM WHO Grad IV
TB 4614	GBM WHO Grad IV
TB 4630	GBM WHO Grad IV
TB 4661	GBM WHO Grad IV
TB 4662	GBM WHO Grad IV
TB 4664	GBM WHO Grad IV
TB 4673	GBM WHO Grad IV
TB 4678	GBM WHO Grad IV
TB 4710	GBM WHO Grad IV
TB 4713	GBM WHO Grad IV

2.1.11 Geräte

Gerät	Typ	Firma
Analysewaage	MC1 Analytic Ac 120 S	Sartorius
Deckgläser	24 x 60 mm	Marienfeld
Deionisierungsanlage	Milli Q UF Plus	Millipore
DNA-Sequenzierer	Abi Prism 377	Perkin-Elmer
Gelelektrophorese-Kammer	Wide Mini Sub Cell	Biorad
Heizblock	Dri-Block DB3A	Techne
Heizrührer	Temr	Ikamag Rct
Hybridisierofen	OV 5	Biometra
Kryostat	HM 560	Microm
Kühlaggregat f. Zellkultur	Cryo Freezing Container	Nalgene
Kühlzentrifuge	1 K15	Sigma
Membran-Vakuumpumpe	SC 110	Speed Vac
Microarray Spotter	Q-Array	Genetix
Mikroskop	TMS	Nikon
Multiblot Replikator	96-Pin Replicator	V&P Scientific
Netzgerät	Desatronic 500/500	Sarstedt-Gruppe
Netzgerät	Sesatronic 500/500	Desaga
PCR-Maschine	Gene Amp 9600 Thermocycler	PerkinElmer
PCR-Maschine	Primus 96 plus	MWG AG Biotech
PCR-Maschine	T1 Thermocycler	Biometra
PCR-Maschine	Uno Thermoblock	Biometra
pH-Meter	PH-Meter CG 840	Schott
Phosphoimager	Fla-2.000	Fuji
Photometer	Bio 500	Eppendorf
Photometer	GeneQuant II	Pharmacia
Photometer	Nanaodrop ND1000	PEQ-Lab
Pipetten	Biomed	Langenfeld
Pipetten	P10, P20, P100. P1.000	Gilson
Schüttelinkubator	3033	GFL
Schüttelmischer	Vortex Genie 2	Bender
Stickstofftank	Apollo Biosafe	Messer-Greisheim
Transwells	6.5mm/8.0µm	Corning
Ultra pure Water System	Elix	Millipore
UV-Dokumentation	Gel Doc 1000	Bio Rad
UV-Lampe	Mighty Bright UVTM	Serva
Vakuumbzentrifuge	SpeedVAC SC110	Thermo Lifesciences

Waage	BA 200	Sartorius
Wasserbad	1083	GFL
Wasserbad	MGW RC6	Lauda
Wasserbad	Thermomix UB	Braun
Zellkulturbank	antair BSK	Bioflow
Zentrifuge	Biofuge 13	Heraeus
Zentrifuge	Centrifuge 5415C	Eppendorf
Zentrifuge	Megafuge 3.0 RS	Heraeus Instruments

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung von DNA aus Gefrierschnitten

Gefrorenes Tumorgewebe wird im Kryostaten (Microm) im Semidünnschnittverfahren in 25 µm dicke Schnitte geraspelt. Für die DNA-Isolierung aus dem gefrorenen Gewebe wird das Gewebe von jeweils 30 Schnitten mit 10ml DNA-Extraktionspuffer sowie 100µl RNase A für 1 Stunde im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden 50µl Proteinase K (20mg/ml) zugegeben und über Nacht inkubiert. Anschließend wird zu jeder Probe das gleiche Volumen Phenolchloroform gegeben und für 10 Minuten auf dem Überkopfschüttler durchgemengt. Daran schließt sich eine 15 minütige Zentrifugation bei 3.500 RPM an. Die obere (wässrige) Phase mit der gelösten DNA wird mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und mit der gleichen Menge Phenolchloroform versetzt und für 10 Minuten geschüttelt sowie zentrifugiert. Nachdem die obere Phase abermals abgenommen wurde, wird das gleiche Volumen Chloroform dazu gegeben. Wieder wird die DNA bei gleichen Bedingungen geschüttelt und zentrifugiert. Das Procedere wird noch einmal wiederholt. Nun wird die obere Phase in ein steriles Falcon-Tube überführt. Zu der DNA werden 0,2 Volumen Ammoniumacetat (2M, pH4,0) und 2 Volumina EtOH abs. gegeben. Es folgt eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 3500 RPM. Der Überstand wird vorsichtig abgeschüttelt und das Pellet mit 2 ml 70% EtOH gewaschen. Nach dem das EtOH abpipettiert wurde, wird die DNA lufttrocknen gelassen und dann in 100-200 µl TE-Puffer gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgt bei 4°C.

2.2.1.2 DNA-Isolierung aus gefrorenem Blut

Als Ausgangsmaterial dienen 10 ml gefrorenes Blut, die nach dem Auftauen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben werden. Zu dem Blut werden 10 ml 0,1% NonIDet in 0,9% NaCl gegeben und kurz geschüttelt. Anschließend wird das Blut für ca. 20 min auf Eis inkubiert und für 15 Minuten bei 3500 RPM zentrifugiert. Der Überstand wird nach der Zentrifugation verworfen; das Pellet wird mit weiteren 30 ml 0,1% NonIDet/NaCl gewaschen und im Überkopfschüttler für 10 Minuten geschüttelt. Der Überstand wird vorsichtig abgeschüttelt, und anschließend lässt man den restlichen Inhalt des Röhrchens auf ein Tuch abtropfen. Das Pellet wird in 5 ml SE-Puffer und 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) gelöst. 250 µl 20% SDS werden hinzugegeben und über Nacht bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation werden 3 ml 6 M NaCl-Lösung hinzugefügt und anschließend nochmals für 15 min bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Nach der anschließenden 15 minütigen Zentrifugation bei 3500 RPM wird der Überstand abgenommen und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und mit 24 ml eiskaltem EtOH geschwenkt. Daran schließt sich ein weiterer Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 3500 RPM an. Der Überstand wird vorsichtig abgeschüttelt und mit 2 ml 70% EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen wird die DNA in 200 bis 400 µl TE-Puffer gelöst. Die Lagerung erfolgt dann bei 4°C.

2.2.1.3 Fällung von DNA

DNA wird durch Zugabe von 2,5 Volumen EtOH abs. und 1/10 Volumen Ammoniumacetat (2M, pH 4,0) gefällt und anschließend für 15 Minuten bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstands wird das DNA-Pellet luftgetrocknet und in TE-Puffer resuspendiert. Die anschließende Lagerung der gelösten DNA erfolgt zur kurzfristigen Lagerung bei 4°C; längerfristig bei -20°C.

2.2.1.4 Isolierung von RNA mittels TRIZOL

Die Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus humanem Gewebe erfolgt durch Zugabe von 800 µl TRIZOL (Invitrogen) pro 10 mg Gewebe. Das Gewebe wird durch Auf- und Abpipettieren mit TRIZOL homogenisiert und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wird das gleiche Volumen Chloroform zugegeben und für etwa 30 Sekunden kräftig geschüttelt. Unlösliche Bestandteile werden anschließend durch eine 10 min Zentrifugation sedimentiert. Nach der Zentrifugation befindet sich die RNA in der oberen, wässrigen Phase und wird vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und erneut mit Chloroform gewaschen. Die gelöste RNA wird nun mit 0,5 V Isopropanol präzipitiert und für 10 min bei 12.000 g abzentrifugiert. Die RNA wird in 70% EtOH gewaschen und anschließend in 30 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

2.2.1.5 Isolierung von RNA mittels RNeasy

Außer der RNA-Isolierung mittels TRIZOL wird das RNeasy-Mini-Kit (QIAGEN) verwendet, um die gesamt-RNA aus Zellen, die in Zellkultur gehalten werden, zu isolieren. Auch hier findet das vorgegebene Protokoll des Herstellers Anwendung. Nach Entfernen des Mediums werden die adhären-wachsenden Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert und homogenisiert. Nach Zugabe von 70% EtOH wird die RNA auf die RNeasy-Säulen gegeben und mittels der Puffer RW1 und RPE (im Kit enthalten) gewaschen und in einem Volumen von 30-40 µl DEPC-H₂O eluiert. Die Lagerung der RNA erfolgt bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

2.2.1.6 Fällung von RNA

Die Fällung der RNA erfolgt durch Zugabe von 2,5 Volumen EtOH abs. und 1/10 Volumen DEPC-behandeltem Ammoniumacetat (2M, pH 4,0). Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 12.000g bei 4°C wird der Überstand abgenommen und verworfen, das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und bei gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstands wird das Pellet

lufgetrocknet und in DEPC-H₂O resuspendiert. Die Lagerung der RNA erfolgt wiederum bei -80°C.

2.2.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Aufreinigung von PCR Produkten

Um PCR-Produkte für die Sequenzierung aufzureinigen, wird das High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) entsprechend dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Die PCR-Produkte werden in einem Volumen von 100µl aufgenommen, mit 500 µl Bindepuffer für die Aufreinigung vorbereitet und auf die High Pure Säulen gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit dem Waschpuffer des Kits und anschließender Zentrifugation wird die gereinigte DNA in ca. 50 µl H₂O bidest eluiert und kann nun bei -20°C gelagert werden.

2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Aufgrund der aromatischen Ringsysteme ihrer Basen haben Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Im Gegensatz dazu liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen wegen ihrer aromatischen Aminosäurereste

bei 280 nm. Der Quotient $\frac{OD_{260nm}}{OD_{280nm}}$ stellt somit ein Reinheitsmaß für

Nukleinsäurelösungen dar. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Konzentration einer Lösung direkt proportional zum dekadischen Logarithmus der Extinktion (0-1) und entspricht bei 260 nm und einem Strahlengang von 1 cm einer optischen Dichte von 1 (OD1) von:

- 50 ng/µl (dsDNA)
- 40 ng/µl (ssDNA/ RNA)
- 33 ng/µl (Oligonukleotide)

DNA- bzw. RNA-Proben werden zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung 1:70 bzw. 1:35 in H₂O bidest verdünnt und anschließend photometrisch (GeneQuant II) vermessen.

2.2.4 Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren

2.2.4.1 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Typ II Restriktionsendonukleasen erkennen palindromische Sequenzen doppelsträngiger DNA und schneiden diese innerhalb einer für das jeweilige Enzym spezifischen Erkennungssequenz (zu den verwendeten Restriktionsendonukleasen s. 2.1.3). Soweit nicht anders angegeben, werden pro µg DNA je 2 Enzymeinheiten (Units) Restriktionsendonuklease verwendet. Je nach Endvolumen wird ein enzyspezifischer 10x Reaktionspuffer eingesetzt und das Reaktionsvolumen mit H₂O bidest eingestellt. Der Verdau erfolgt dann bei optimaler Temperatur für mindestens 2 Stunden.

2.2.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation werden freie DNA-Enden miteinander verbunden. Dazu müssen die zu verbindenden Enden miteinander kompatibel sein. D.h. beide Enden müssen Überhänge, so genannte klebrige Enden (sticky ends), aufweisen oder es dürfen an beiden Enden keine Überhänge existieren. Bei der Klonierung von PCR-Fragmenten in einen Vektor wird die Ligation in der Regel in einem Molekülverhältnis von 3:1 durchgeführt. Soweit nicht anders aufgeführt wird die Ligation in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Pro Ligationsansatz wird 1 µl T4-DNA Ligase (5 U/µl, Fermentas) sowie 1 µl 10x-Ligationspuffer (Fermentas) eingesetzt, das Gesamtvolumen wird durch entsprechende Verdünnung des aufgereinigten PCR-Produkts mit H₂O bidest auf 10 µl eingestellt. Ein optimales Ligationsergebnis wird erzielt, wenn die Inkubation bei 4°C über Nacht erfolgt. Um die Reaktion zu beschleunigen kann auch eine 4 stündige Inkubation bei RT erfolgen.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) [Mullis, 1986] ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung ausgesuchter DNA-Sequenzen. Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei einzelsträngigen Oligonukleotidsequenzen (Primern), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Voraussetzung für eine erfolgreiche PCR ist also eine Information über die Nukleotidsequenzen, die den zu amplifizierenden Bereich beiderseits flankieren. Die Primer werden im Überschuss unter Hybridisierungsbedingungen (soweit nicht anders angegeben, erfolgt das Primerannealing bei 52 – 62°C) zu der DNA-Vorlage gegeben. Die DNA-Polymerase heftet Nukleotide an die 3'-OH-Enden der Primer und synthetisiert so komplementäre DNA-Sequenzen. Die Reaktionszeit und Temperatur sind dabei von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und dessen CG-Anteil abhängig. Um die optimale Temperatur zu bestimmen, kann man den Schmelzpunkt (T_M) des Primer-Matrizen-Hybrids nach folgender Faustformel berechnen: $T_M = [4^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl}(\text{C}+\text{G}))] + [2^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl}(\text{A}+\text{T}))]$. Die optimale Reaktionstemperatur liegt etwa 5°C unter dem berechneten Schmelzpunkt. Nach der Synthese werden die Doppelstränge bei 94°C denaturiert, und ein neuer Zyklus aus Denaturierung – Hybridisierung – DNA-Synthese beginnt. Der Einsatz thermostabiler DNA-Polymerasen, wie z.B. der *Taq*-Polymerase, erlaubt eine stabile Synthese über viele Zyklen, ohne dass das Enzym selbst durch die Denaturierungsschritte angegriffen würde.

Zusammensetzung für einen 1-fachen PCR-Ansatz:

c[MgCl₂]	1,0	1,5	2,0	2,5
dNTPs [100 µM]	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
10xPCR-Puffer	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
MgCl₂ [50 mM]	0,4 µl	0,6 µl	0,8 µl	1 µl
fwd-Primer [10 µM]	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
rev-Primer [10 µM]	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Taq-Polymerase [10U/µl]	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl
Template	je 1 µl DNA [10-25ng/µl]			

PCR-Grundprogramm:

1	Denaturierung	initial	5 min	
2	Denaturierung	zyklisch	30 s	
3	Hybridisierung	zyklisch	40 s	Schritt 2-4: 30 Zyklen
4	Synthese	zyklisch	40 s	
5	Synthese	final	10 min	

Die für jedes Primerpaar benutzten spezifischen PCR-Bedingungen wie MgCl₂-Konzentration und Reaktionszeiten und Temperaturen sind an den entsprechenden Stellen vermerkt.

2.2.6 Größenfraktionierung von Nukleinsäuren

Aufgrund ihrer negativen Phosphatgruppen wandern Nukleinsäuren im elektrischen Feld. Daher kann man sowohl DNA als auch RNA mittels gelelektrophoretischer Verfahren der Größe nach auftrennen.

2.2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese doppelsträngiger DNA

Um PCR-Produkte sowie durch Restriktionsenzyme verdaute DNA elektrophoretisch aufzutrennen, werden 1- bis 2-%ige Agarose-Gele hergestellt. Dazu wird Agarose eingewogen und in 1x TAE-Puffer (s. 2.1.2 „Stammlösungen“) bzw. 0,5x TBE-Puffer (s.2.1.2 „Stammlösungen“) gelöst und im Mikrowellenofen aufgeköcht. Sobald das Gel auf etwa 45°C abgekühlt ist, werden 10 µl Ethidiumbromid (1µg/µl) pro 100 ml Agarosegel zugegeben. Die aufzutrennende DNA wird 1:5 mit Agarosegel-Ladepuffer verdünnt und zusammen mit einem geeigneten DNA-Längenstandard (s. hierzu Abschnitt 2.1.7) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei maximal 200 V für mindestens 10 Minuten durchgeführt bevor die aufgetrennten Fragmente mit Hilfe eines UV-Transilluminators dokumentiert werden.

10x Agarosegel-Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau
	0,25% Xylencyanol
	15% Ficoll Typ 400
	Ad 50 ml H ₂ O bidest

2.2.7 Methoden der Bakterienkultur

2.2.7.1 Herstellung chemisch-transformationskompetenter Bakterien

Die Aufnahme von Fremd-DNA durch Bakterien bezeichnet man als Transformation. Dabei lagert sich die DNA an die Bakterienmembran an, und bei einem Temperaturschock von 42°C öffnen sich die Poren der Membran. Der anschließende Kältestress bei 4°C schließt die Poren wieder. Die Effizienz freie DNA aus dem Medium aufzunehmen kann jedoch bei *E.coli* Bakterien durch die Behandlung mit Rubidiumchlorid, Manganchlorid und Calciumchlorid bei niedriger Temperatur um ein Vielfaches gesteigert werden. Um die Bakterien kompetent zu machen, werden 0,5 µl Bakteriensuspension in 25 ml LB-Medium für 6 - 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 2, 4, bzw. 10 ml der inkubierten Bakteriensuspension in je 250 ml LB-Medium suspendiert und über Nacht im Bakterienschüttler inkubiert. Nachdem die Bakterien hochgeschüttelt wurden, wird die Bakterienkonzentration im Photometer bei 600 nm gemessen. Als Leerwert dient dabei frisches LB-Medium. Damit sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase, in der sie hochkompetent für die Aufnahme von Fremd-DNA sind, befinden, sollte die gemessene OD bei 0,55 liegen. Man arbeitet nur mit dem Ansatz weiter, der die entsprechende OD hat, die anderen Ansätze werden autoklaviert. Nun werden die Bakterien in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation werden die Bakterien für 10 min bei 3.500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird abgeschüttet, und das restliche LB-Medium lässt man auf einem Tuch abtropfen. Die Bakterien werden nun mit etwas INOUE-Puffer gewaschen, resuspendiert und auf 2 Falcon-Röhrchen verteilt. Zu beiden Röhrchen werden je 40 ml INOUE-Puffer gegeben und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird auf Eis gestellt. Die Pellets werden in 10 ml INOUE-Puffer resuspendiert und mit je 7,5 ml DMSO für das Auftauen und Einfrieren vorbereitet. Die aliquotierten Bakteriensuspensionen werden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

LB-Medium

20g LB-Trockenpulver
Ad 1 l H₂O bidest

INOUE-Puffer

55 mM MnCl₂ • 4H₂O
 14 mM CaCl₂ • 2H₂O
 250 mM KCl
 20 ml 0,5 M Pipes, pH=6,7
 Ad 1l H₂O bidest

2.2.8 *In vitro* Modifikation von DNA**2.2.8.1 Sssl-Behandlung zur *in vitro* Methylierung genomischer DNA**

5µg genomische DNA werden mit S-Adenylmethionin (SAM; NEB) und Sssl (NEB) über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

	Volumen [µl]
DNA [1-5 ng]	50
NEB2-Puffer	10
Sssl [4U/µl]	10
SAM [32 mM]	3
H₂O bidest	27

2.2.9 Zellkultur

Für die Methylierungsanalysen werden sowohl Glioblastom-Zelllinien als auch Primärkulturen verwendet. Die Primärkulturen werden in Quantum 263 Tumormedium (PAA) und die Zelllinien in DMEM+10% FCS (Gibco) in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

2.2.9.1 Präparation von primärem humanen Tumorgewebe für die Zellkultur

Ein frisches Stück Glioblastom-Tumorgewebe (Schnellschnittpräparat) eines Patienten mit Verdacht auf ein Glioblastom wird unter sterilen Bedingungen auf einer Petrischale mit zwei Skalpelln möglichst klein gehexelt und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Tumorstücke werden 2 Mal für eine Minute in sterilem PBS gewaschen und bei 1.000 g für 2 Minuten sedimentiert. Nachdem das PBS abgenommen wurde, gibt man Trypsin-ETDA zu den Tumorstückchen und inkubiert

sie über Nacht bei 4°C. Die Inkubation bei gleichzeitig geringer Proteaseaktivität mit Trypsin-EDTA führt zu einer hohen Durchdringung des Gewebes und einem hohen Maß an Dissoziation. Dieses Verfahren ist aufgrund der vergleichsweise großen Diffusionsstrecken für das Gewebe schonender als eine kurze Trypsin-Inkubation bei 37°C. Nach der Inkubation wird das Trypsin abgenommen, und die Zellen werden 2 Mal in PBS gewaschen und bei 1.000 g für 5 Minuten sedimentiert. Wenn die Zellen gewaschen sind, werden sie in Medium (Quantum 263; PAA) aufgenommen und in Zellkulturflaschen kultiviert. An den nächsten 2 Tagen sollte täglich eine Kontrolle der Zellen sowie ein Medienwechsel erfolgen.

2.2.9.2 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Zum Auftauen werden die bei -80°C gelagerten Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in 10 ml frischem Medium (37°C) resuspendiert. Die Zellen werden drei Mal für jeweils 5 min bei 1.000 g zentrifugiert und anschließend in frischem Medium gewaschen. Nach dem Waschen werden die Zellen in Zellkulturflaschen (Corning) ausgesät. Zum Einfrieren müssen die Zellen vereinzelt werden (s. 2.2.9.3). Die Zellen werden mit einer sterilen Pipette abgenommen und in ein steriles Röhrchen (je nach Volumen der Zellkulturflasche 15 bzw. 50 ml Falcon-Röhrchen) überführt. Die Sedimentierung erfolgt für 10 min bei 1.000 g. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen. Anschließend werden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen (Nalgene) abgefüllt. Die Zellen werden über Nacht in einem Kühlaggregat für Einfrieröhrchen (Nalgene) bei -80°C herabgekühlt, bevor sie dann endgültig bei -80°C gelagert werden.

2.2.9.3 Passagieren von adhärent wachsenden Zelllinien

Um die kultivierten Zellen zu passagieren wird das Zellkulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen zwei Mal mit sterilem PBS gewaschen. Durch Zugabe von 2-3 ml 1x-Trypsin-EDTA (PAA) werden die Zellen für etwa 5 min bei 37°C inkubiert, um adhärent wachsende Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Die Aktivität des Trypsins wird nach Sichtkontrolle mit dem Zellkulturmikroskop (Leica) durch Zugabe von ca. 8 ml Medium gestoppt. Die abgelösten Zellhaufen

werden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und durch kurze Zentrifugation bei 1.000 g sedimentiert und in entsprechendem Volumen frischen Mediums erneut ausgesät.

2.2.9.4 Behandlung einer primären humanen Glioblastomzelllinie mit RG-108

Da der DNMT1-Inhibitor RG-108 nur schwer wasserlöslich ist, wird er in entsprechender Menge DMSO vorgelöst, bevor die Konzentration mit Wasser auf 1 mM eingestellt wird. Das so gelöste RG-108 wird aliquotiert und kann bei -20°C gelagert werden. Wegen der Instabilität von RG-108 muss bei der Kultivierung von Zellen mit RG-108 im Medium ein täglicher Mediumwechsel und frische Zugabe von RG-108 erfolgen. Die Endkonzentration von RG-108 im Medium beträgt 25 µM.

2.2.9.5 Zellkultur mit 5-Aza-2'-deoxycytidin

Die optimale Wirkstoffkonzentration von 5-Azacytidin ist vom Zelltyp abhängig, daher werden die Zellen in Medien mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacytidin inkubiert. Da 5-Azacytidin relativ instabil ist, erfolgt täglich ein Mediumwechsel unter Zugabe frisch aufgetauten 5-Azacytidins.

2.2.9.6 Transwell-Migrationsassay

Gliomzellen werden bis zu einer Dichte von ca. 50% Konfluenz kultiviert. Am Tag vor Beginn des Versuchs wird einmal das Medium gewechselt. Die Zellen werden trypsinisiert (vgl. 2.2.9.3) und eine definierte Menge von Zellen in 300 µl Medium resuspendiert und in die obere Kammer der Transwells (Corning) gegeben. Die Zellen sollten auf der Membran zu 80-90% konfluent sein. Zur Titration der Zellzahl werden 96-well Platten benutzt. Die Konfluenz kann hierbei lichtmikroskopisch kontrolliert werden. In die untere Kammer werden 0,5-1ml Medium geben, so dass die Membran deutlich unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche liegt. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C und 5% CO₂ für ca. 48 Stunden. Die Transwells werden für ca. 20 min bei 37°C in eine neue 12-Loch-Platten-Vertiefung mit Trypsin-EDTA

transferiert. Migrierte Zellen sollten sich nun von der Membran ablösen und im Trypsin schwimmen. Das Trypsin wird mitsamt der Zellen aspiriert, in normalem Medium verdünnt und in einer neuen Zellkulturflasche inkubiert.

Um die nicht-migrierten Zellen vom Transwell zu lösen, wird nun Trypsin in die obere Kammer der Transwells geben, und nach einer 20 minütigen inkubation abgenommen und in frischem Medium ausgesät. Um die migrierten Zellen nochmals auf die Migrationsfähigkeit zu selektionieren, wurde der Versuch mit den migrierten Zellen wiederholt werden.

2.2.10 Immunzytochemische Charakterisierung von primären Glioblastomzellen

Neben den Proteinen, die alle Zellen exprimieren, gibt es auch Zellart-typische Proteine die exprimiert werden bzw. nicht exprimiert werden. Mit Hilfe dieser Proteine ist es möglich, den entwicklungsbiologischen Ursprung einer Zelle zu bestimmen. Nicht nur normale Zellen kann man auf diese Weise charakterisieren, auch Tumoren exprimieren bestimmte Proteine, die einen eindeutigen Rückschluss auf die Diagnose zulassen. Um sicherzustellen, ob es sich bei den aus Tumormaterial gewonnenen Zellen wirklich um Tumorzellen eines Glioblastoms handelt, werden die Zellen mit den entsprechenden zytochemischen Markern identifiziert. Dazu werden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert und anschließend mit 4% PFA fixiert. Die fixierten Zellen werden zunächst für 5 min in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen bei der Antikörpermarkierung zu vermeiden, werden die Zellen für 15 min in 5% Eselserum in PBS inkubiert. Die Immunmarkierung mit dem spezifischen ersten Antikörper findet über Nacht bei 4°C statt. Nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper werden die Zellen 3x 5 min mit PBS gewaschen und mit einem 1:500 in PBS verdünnten biotinylierten Antikörper gegen den ersten Antikörper für 1 h bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Ungebundener sekundär-Antikörper wird durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 min entfernt. Der biotinylierte sekundär-Antikörper wird mit TexasRed (FITC) in 10 mM HEPES gekoppelt.

2.2.11 Differential Methylation Hybridisation (DMH)

Die differentielle Methylierungshybridisierung (DMH) [Huang et al., 1999] ist eine geeignete Methode, um Veränderungen bei der Methylierung in unterschiedlichen Geweben, also zum Beispiel Methylierungsunterschiede zwischen Normalgewebe und niedriggradigem Tumor oder zwischen niedriggradigem Tumor und einer Progression, zu untersuchen. Dazu wird die DNA aus pilozytischen Astrozytomen WHO Grad II sowie ein DNA-Mix aus weißer Substanz als Kontrolle einmal mit einer 4 Basen Restriktionsendonuklease (*MseI*; TTAA), die keine CG-Erkennungssequenz hat, geschnitten. An diese DNA-Fragmente werden nun Adaptoren ligiert. Die erfolgreiche Ligation wird mit Hilfe einer adaptorspezifischen PCR kontrolliert. Anschließend werden die ligierten Fragmente mit methylierungsspezifischen Enzymen geschnitten. Diese Enzyme können die DNA nur dann schneiden, wenn das entsprechende Cytosin an der Erkennungssequenz nicht methyliert ist. Um die Ligationsprodukte anzureichern, wird eine PCR mit adaptorspezifischen Primern durchgeführt. Hierbei werden ausschließlich diese Fragmente amplifiziert, die aufgrund einer Methylierung vor einem Restriktionsverdau geschützt waren. Die so verdauten und amplifizierten DNAs werden nun mit 2 unterschiedlichen Cyanin-Farbstoffen markiert und zusammen auf einem Glasobjektträger mit den gespotteten DNAs aus der CpG-Insel-Bibliothek hybridisiert. Zur Auswertung wird der Chip eingescannt und die Farbsignale und Intensitäten werden am Computer ausgewertet. Je nach Färbung der DNAs kann man zwischen *de novo* methyliert, nicht methyliert und gleicher Methylierungszustand unterscheiden (s. Abb. 2-2). Die einzelnen Schritte der Sondenherstellung für die DMH werden im folgenden beschrieben.

2.2.11.1 Herstellung der Sonden

2.2.11.1.1 *MseI*-Verdau

Die Konzentration genomischer DNA wird photometrisch bestimmt. Für den Versuch werden je 2µg DNA aus Tumor und korrespondierendem Normalgewebe in 52,5µl H₂O bidest gelöst und über Nacht bei 37°C mit 75 U *MseI*-verdaut.

	Volumen [μ l]
2 μ g DNA	52,5
10x NEBuffer 2	7,5
10x BSA	7,5
Msel [10U/ μ l]	7,5
Endvolumen (μ l)	75,0

2.2.11.1.2 Vakuumaufreinigung

Die Aufreinigung der Proben wird mit Hilfe einer 96-Loch Vakuumaufreinigungsplatte (Millipore) durchgeführt. Pro Well der Platte werden 200 μ l H₂O bidest vorgelegt und bei einem Vakuum von 8mm Hg für 10 min laufen gelassen. Nach der Aktivierung der Membran wird die DNA auf die Membran geladen und erneut für 10 min ein Vakuum von 8mm Hg angelegt. Die restlichen Salze werden mit 100 μ l Aqua für 5min bei 8mmHg von der Membran gewaschen. Die Proben werden durch Zugabe von 2x 25 μ l H₂O bidest und mehrmaliges auf-/abpipettieren in ein 1,5ml Tube aufgenommen. Zur Kontrolle werden nun je 3 μ l der 50 μ l DNA auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Proben werden mittels einer SpeedVac (Thermo Lifesciences) eingedampft.

2.2.11.1.3 Adapterannealing

Pro Probe werden je 3,5 μ l des unverdünnten H24 mit H12-Primerstock zusammenpipettiert und im Wasserbad (1l im Becherglas) von 65°C auf 30°C bei RT heruntergekühlt. Zum optimalen Annealing der Primer erfolgt ein Abkühlen bei 4°C für ca. 30 min auf 20°C.

2.2.11.1.4 Adapterligation

Die aufgereinigten, Msel-verdauten Tumor- und Kontroll-DNAs werden in 13,5 μ l H₂O bidest gelöst und nach Zugabe der Adaptoren sowie des Reaktionsmixes für 16h bei 14°C inkubiert.

2.2.11.1.9 Cy3/ Cy5-dCTP-labeling

Die Proben werden mit 20µl 2,5x Random primers (Invitrogen) versetzt, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend werden 5µl 10x dNTP-Mix sowie 160U Klenow Fragment (Invitrogen) zugegeben. Zur Kontroll-DNA werden nun 2,5µl Cy3-dCTP, zur Tumor-DNA 2,5 µl Cy5-dCTP gegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 37°C im Dunkeln für 16 h inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wird die Reaktion mit 5 µl EDTA (0,5 M; pH 8,0) gestoppt. Zur weiteren Aufreinigung wird der pH-Wert der Lösung mit 450 µl TE-Puffer (pH 7,4) eingestellt.

2.2.11.1.10 Aufreinigung mit Mikrocon-Säulen

Um die Cy3 bzw. Cy5 markierte DNA von Primern und Salzen aus der Labeling-Reaktion zu reinigen, wird die DNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Millipore) auf die Mikrocon-Säulen pipettiert und für 10 Minuten bei 8.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und es werden 450 µl Gibco-H₂O auf die Säule aufgetragen und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nun werden die Säulen umgedreht in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und für 5 Minuten bei 8000 g abzentrifugiert. Die Säule kann nun verworfen werden und der Durchfluss wird mit Gibco-H₂O auf ein Volumen von 100 µl angeglichen.

2.2.11.1.11 Photometrische Quantifizierung der Labeling-Reaktion

Um abschätzen zu können, wie gut der Farbstoff in die DNA inkorporiert wurde, wird die Absorption der markierten DNA am Photometer (Bio-Tek Instruments) gemessen. Für den Farbstoff Cy3 liegt das Absorptionsmaximum wie für das Tetramethylrhodamin bei 550 nm. Das Absorptionsmaximum für Cy5 liegt weit im roten Wellenlängenbereich des Spektrums bei 650nm. Daher eignet sich Cy5 sehr gut als Zweitfarbstoff für Mehrfarbanalysen, denn aufgrund der großen Differenz bei der Wellenlänge kommt es nicht zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Signalintensitäten.

2.2.11.2 CGI-Library

Als Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten CpG-Insel Microarrays wird die kommerziell verfügbare CpG-Insel Bibliothek des „UK HGMP Resource Centre“ verwendet.

2.2.11.3 Herstellung der Slides (Spotting)

Der Microarray-Spotter (QArray Mini, Genetix) ist ein computergesteuerter Roboter, der in der Lage ist, sehr geringe Volumina aus einem Reservoir auf die Oberfläche des Chips zu transferieren. Der Roboter verfügt über die Möglichkeit, einen Carrier (die Spotter-Nadel) in der X-, Y- und Z-Achse zu bewegen, so dass jede Position innerhalb des Instruments angesteuert werden kann. Eine wichtige Voraussetzung für die gleichmäßige Herstellung von Chips ist die Fähigkeit, Spotter-Nadeln von der Mikrotiterplatte in einer flüssigen Bewegung (direct fly) zu führen. Aufgrund des Einsatzes von so genannten Micro-Stepper-Motoren liegt die Präzision, mit der die Spots aufgetragen werden, unterhalb von 10 µm. Um die Makromoleküle auf dem Chip zu deponieren, werden diese durch das mechanische Microspotting [Brown& Shalon, 1998] auf den Chip aufgebracht. Diese Methode beruht im Prinzip darauf, dass Makromoleküle mittels kapillarer Kräfte von einer Lösung auf die Chipoberfläche übertragen werden. Dieses wird durch das Eintauchen der Spotter-Nadel in die Moleküllösung erreicht, wobei die aufgenommene Flüssigkeit durch den mechanischen Kontakt mit dem Chip übertragen wird. Als Spotter-Nadeln (Pins) werden stahlnagelartige, so genannte Solid-Pins benutzt. Ohne entsprechende Tracking-Software wäre es nicht möglich, die Spots auf dem Chip zu identifizieren. Jede einzelne Spotter-Nadel erstellt ein für sie spezifisches Raster, das als Grid bezeichnet wird. Die Entfernung der Grids voneinander ist abhängig von der Distanz der Nadeln zueinander. Einzelne Grids, die gespottet werden, werden auf dem Chip zu Super-Grids zusammengefasst (s. Abb. 2-1).

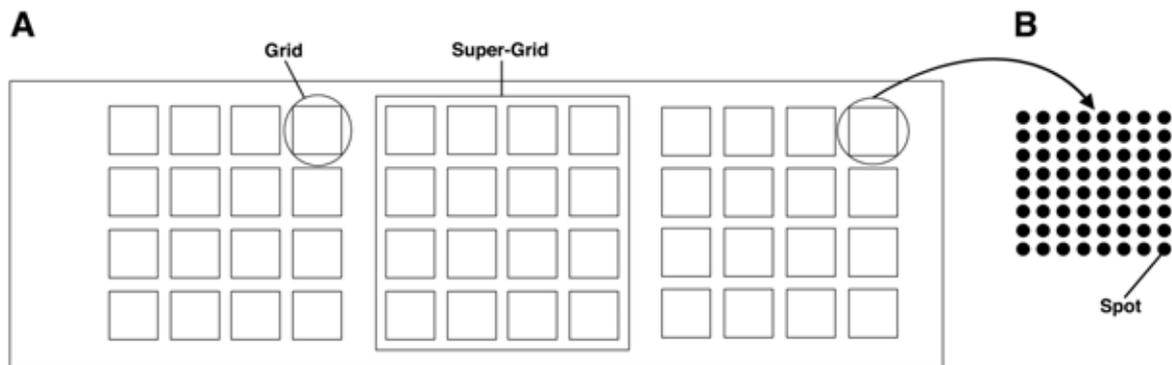


Abb. 2-1: Die schematische Darstellung (A) des Chips zeigt drei größere Super-Grid-Bereiche. Jeder Super-Grid besteht aus 16 kleineren Grids, die ihrerseits aus jeweils 64 Spots (B) bestehen. Per Definition ist ein Grid das Spot-Muster, welches durch einen einzelnen Pin gespottet wird. Allerdings kann jeder Grid individuelle Spots also verschiedene Makromoleküle repräsentieren.

Nach dem Spotting werden die Objektträger für ca. 5 Minuten im Vakuum getrocknet. Die trockenen Objektträger werden mit der gespotteten Seite nach unten für ca. 10 Sekunden über dem Dampf eines kochenden Wasserbades gehalten und anschließend für 30 Sekunden mit der gespotteten Seite nach oben auf eine auf 95°C vorgeheizte Heizplatte gelegt. Um die Spots auf dem Objektträger zu fixieren, werden die Objektträger im UV-Ofen bei 3000µJoules x 100 inkubiert. Nun ist eine lichtgeschützte Lagerung für max. 6 Monate möglich.

Nach der Herstellung der Microarrays und der erfolgreichen Hybridisierung, müssen die Ergebnisse vom Chip zur Auswertung in den Computer eingelesen werden. Dazu werden die Chips einzeln eingescannt. Im Scanner (Axon GenePix Pro) wird der Chip mit Hilfe eines Lasers abgetastet. Die Auflösung wird dabei nicht von einem nachgeschalteten Detektor, wie bei Imager-Systemen, sondern rein von der Abtastrate des Lasers bestimmt. Mit Hilfe entsprechender Filter wird das Laserlicht auf die Exzitationswellenlänge eingeschränkt. Nach dem Scanvorgang stehen die Rohdaten zur Verfügung und müssen mit Hilfe entsprechender Auswertungssoftware analysiert werden. Zur Auswertung wird eine Maske (GenePix Pro 5.1) über die Signale des Arrays gelegt. Diese Maske erlaubt neben der Einschränkung der auszuwertenden Fläche des Signals eine Normalisierung der Signalintensitäten anhand vorher identifizierter repetitiver Sequenzen, die immer zu einem gelben Signal führen. Durch die Normalisierung sind verschiedene Microarrays miteinander

vergleichbar. Der Vergleich verschiedener Arrays wird mit der Statistiksoftware Acuity für PC ausgeführt. Der Ablauf des DMH ist in Abbildung 2-2 dargestellt.

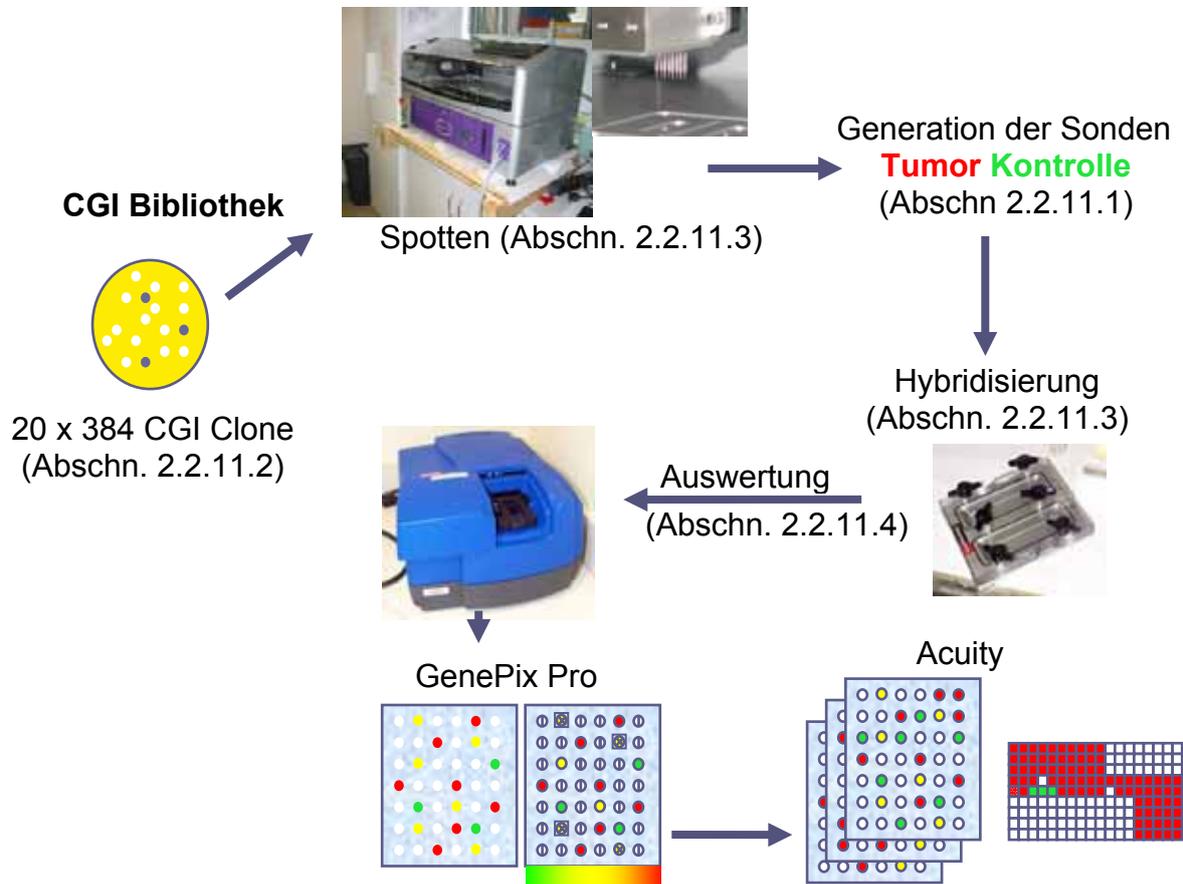


Abb 2-2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Arrayanalyse. Die CG-haltigen Sequenzen aus der CGI-Bibliothek werden mittels eines mechanischen Spotting-Roboters auf Glasobjektträger übertragen. Die auf ihre differentielle Methylierung hin zu untersuchenden DNAs werden mit Cy3 bzw. Cy5 farbmarkiert und auf Chips hybridisiert. Die hybridisierten Chips werden eingescannt und mit GenePix Pro und Acuity am Computer ausgewertet.

2.2.11.3.1 Prähybridisierung der Microarrays

Die Waschlösungen 1, 2 und 3 aus dem Universal Microarray Validation Kit (Corning) werden gemäß den Anleitungen des Herstellers hergestellt und können bis zu 4 Wochen gelagert werden. Die Pre-Soak-Lösung und die Pre-Hybridisierungslösung werden bei 42°C für 30 min im Wasserbad erwärmt. Eine Tablette Borohydrid Pre-Soak wird in 100 ml vorgewärmter Pre-Soak-Lösung gelöst. Der gespottete Objektträger wird nun für 20 min bei 42°C in der Hybridisierungskammer in dieser Lösung inkubiert. Nach der Inkubation muss der Objektträger 3 Mal für je 30 s in frischer Waschlösung 2 bei Raumtemperatur inkubiert werden. Um den Objektträger auf die anschließende Hybridisierung optimal vorzubereiten, wird er für eine weitere Minute bei RT in Waschlösung 2 gewaschen, bevor er 3x für jeweils 30 s in Waschlösung 3 entsalzt wird. Unmittelbar nach dem Waschen muss der Chip bei 500 RPM in der Zentrifuge für 5 Minuten getrocknet werden, damit später keine Schlieren zu sehen sind. Der getrocknete Chip kann nun durch einen Prescan auf eventuelle Salzurückstände kontrolliert werden. Sollte der Chip einen zu starken Hintergrund aufweisen, kann er bei gleichen Bedingungen erneut in Wasch-Lösung 3 gewaschen und anschließend mit H₂O bidest gespült werden.

2.2.11.3.2 Hybridisierung

Bei der Hybridisierung werden die fluoreszenzmarkierten Tumor- und Kontrollproben auf den Array hybridisiert. Da die Cy-Farbstoffe stark lichtempfindlich sind, ist es wichtig, alle Schritte möglichst im Dunkeln durchzuführen. Für die Hybridisierung wird ein Deckglas (24 x 60 mm, Marienfeld) mit H₂O bidest gewaschen und vorsichtig mit Druckluft getrocknet. Je ein Cy3-/ Cy5-markiertes Sondenpaar aus Tumor und Kontrollgewebe wird in insgesamt 50 µl Universal-Hybridisierungslösung (Corning) gelöst und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und auf das hintere Ende des Objektträgers pipettiert. Damit die Lösung während der Hybridisierung nicht eintrocknet, wird der Objektträger luftblasenfrei mit einem Deckgläschen bedeckt. Damit die Chips nicht austrocknen, werden an jedes Ende der Inkubationskammer (Genemachine) je 20 µl Universal-Hybridisierungslösung

gegeben, bevor sie handfest verschlossen werden. Für die 16 stündige Inkubation im Wasser bei 42°C wird die Hybridisierungskammer lichtdicht in Alufolie eingeschlagen.

2.2.11.3.3 Waschen

Damit bei der Auswertung die unspezifische Hintergrundfluoreszenz minimiert wird, werden die Arrays nach der Hybridisierung gewaschen. Dazu wird die Waschlösung 1 auf 42°C vorgewärmt. In einer Glasküvette mit Waschlösung 1 lässt man vorsichtig das Deckglas vom Objektträger gleiten, bevor der Objektträger dann für 5 Minuten in frischer Waschlösung 1 gewaschen wird. Anschließend wird der Objektträger bei RT sequentiell in Waschlösung 2 für 10 Minuten bzw. Waschlösung 3 für 2 Minuten gewaschen. Um die verbliebenen Salze vom Objektträger zu spülen, wird dieser mit H₂O bidest gewaschen und sofort für 5 Minuten bei 500 RPM trocken zentrifugiert.

2.2.11.4 Auswertung

Die getrockneten Chips werden im Genepix4000B-Scanner eingescannt und mit Hilfe der Software ausgewertet.

2.2.12 Methylierungs-Target-Array

Beim Methylierungs-Target-Array (MTA) handelt es sich um eine Methode, um den Methylierungszustand eines Gens in vielen Tumoren gleichzeitig testen zu können. Vom Prinzip her entspricht die MTA-Analyse einem Tissue-Array. Die Targets, also die zu untersuchenden DNAs, werden mit *MseI* geschnitten (vgl. 2.2.11.3.1). An die so verdauten DNA-Fragmente werden kurze Oligonukleotidsequenzen als Linker ligiert. Nach der Ligation wird die DNA mit methylierungssensitiven Enzymen (vgl. 2.2.11.3.4 und 2.2.11.3.6) sequentiell verdaut und mit den Linkern als Primer in einer PCR amplifiziert (vgl. 2.2.11.3.8). DNA-Fragmente mit methylierten Erkennungsstellen für die methylierungssensitiven Verdauung werden nicht verdaut und durch die PCR amplifiziert, da sie an ihren Enden die Linker-

Oligonukleotidsequenz besitzen. Unmethylierte und teilweise methylierte Fragmente tragen nur noch maximal eine Linkersequenz und können nicht amplifiziert werden.

2.2.12.1 Herstellung der Membran

Die grundlegende Strategie der Probenvorbereitung bei DMH und MTA ist gleich. Man möchte die Menge der methylierten DNA-Fragmente aus dem Hintergrund der gesamt-DNA herausamplifizieren um sie zu untersuchen. Daher erfolgt die Herstellung der DNA-Templates, die auf die Membran gespottet werden, analog zu den Schritten 2.2.11.2.3 bis 2.2.11.3.11 für die Sondenherstellung für die DMH-Analyse. Bevor die DNA auf die Membran gespottet werden kann, muss das vorbereitete PCR-Produkt mit dem gleichen Volumen NaOH (0,6 M) denaturiert werden. Die fertigen DNA-Templates werden mit einem 96-pin Multireplikatorstempel auf eine N+Hybond-Nylonmembran gespottet. Dazu wird der Replikatorstempel in Alkohol abgeflammt und anschließend in das PCR-Produkt getaucht. An den Stempelspitzen befindet sich nun eine geringe Menge des PCR-Produkts, das durch leichtes Aufdrücken des Stempels auf die Membran übertragen wird. Alle PCR-Produkte werden mindestens als Duplikate auf die Membran übertragen und anschließend für 4 min in Neutralisierungspuffer (0,6M TRIS pH 7,5) gewaschen und für 2 min in H₂O bidest gespült. Wenn die Membran getrocknet ist, werden die Produkte im UV-Ofen auf der Membran fixiert.

2.2.12.2 Herstellung genspezifischer Sonden

Als Sonden werden genspezifische PCR Fragmente aus den Promotorbereichen von *Rock1*, *BRCA1*, *MFAP*, *Chfr-1* und *TP53G3* der zu untersuchenden Gene verwendet. Die Fragmente haben eine optimale Länge von ca. 250 bp und weisen einen vergleichsweise hohen CG-Gehalt von etwa 50% auf. Pro Sonde wird 1 µg aufgereinigtes PCR-Produkt in 20 µl H₂O bidest verdünnt. Aus dem Random-Prime Kit (Invitrogen) werden je 4µl dATP, dGTP, dCTP sowie 15 µl Random Prime Puffer gegeben. Statt des dUTPs aus dem Random-Prime Kit werden 4 µl digUTP (Roche) in die Reaktion eingesetzt. Zur DNA und den Nukleotiden wird 1 µl Kleenow-Fragment pipettiert und für 20 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe

von 5 µl LiCl₂ und 125 µl EtOH p.A. gestoppt und für 30 min bei -80°C inkubiert. Um die DNA zu sedimentieren, wird der Ansatz bei 13.000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wird die DNA mit 100 µl 70% EtOH gewaschen und bei gleichen Bedingungen erneut sedimentiert. Nachdem das Pellet luftgetrocknet wurde, wird es in 50 µl H₂O bidest gelöst.

3 µl des Ansatzes werden abgenommen und für eine Kontrollfärbung aufbewahrt.

2.2.12.3 Kontrollfärbung der Sonden mit NBT/BCIP

Von den 3 µl asservierter Sonde aus 2.2.13.2 wird eine sequentielle Verdünnungsreihe nach folgendem Schema erstellt:

Tube	DNA [µl]	Von Tube #	Verdünnungs-puffer	Verdünnungs-faktor	Endkonzentration
1	1				1 ng/µl
2	2	D1	198	1:100	10 pg/µl
3	15	D2	35	1:330	3 pg/µl
4	5	D2	45	1:1000	1 pg/µl
5	5	D3	45	1:3.300	0,3 pg/µl
6	5	D4	45	1:10.000	0,1 pg/µl
7	5	D5	45	1:33000	0,03 pg/µl
8	5	D6	45	1:100000	0,01 pg/µg

Je 1 µl aus jedem Reaktionsgefäß wird auf eine Nylonmembran gespottet und im UV-Ofen quervernetzt. Nachdem die DNA auf der Membran fixiert wurde, wird die Membran für 1 min in Buffer 1 + 0,3% Tween 20 geschwenkt und anschließend für 30 min mit Buffer 2 im Hybridisierofen bei RT geblockt. Kurz vor Gebrauch wird der Ant-DIG-Antikörper 1:10.000 in Buffer 2 verdünnt. Die Membran kann nun für weitere 30 min mit dem Antikörper bei RT inkubiert werden. Nach der Inkubation wird die Membran für 2x 15 min in Buffer 1 + 0,3% Tween und anschließend für 2 min in Buffer 3 gewaschen. Nun kann die Membran für 10 bis 60 min in NBT/BCIP (Roche) in Buffer 3 im Dunkeln entwickelt werden. Nach entsprechender Inkubation wird die Reaktion mit Buffer 1 gestoppt. Die DIG-Inkorporierung war erfolgreich wenn mindestens die Verdünnung 6 noch ein Signal zeigt.

2.2.12.4 Berechnung der Hybridisiertemperatur für die Sonde

Die optimale Hybridisiertemperatur für die einzelnen Sonden berechnet sich nach:

$$T_{hyb} = (81,5 + (16,6 * \text{Log}10(Na^+) + (0,41 * (GC\% * 100 / bp_{Sonde}))) - 600 / bp_{Sonde}) - 15^\circ C$$

2.2.12.5 MTA Prähybridisierung

ExpressHyp (Clontech) wird im Wasserbad erwärmt, bis alle Kristalle gelöst sind. Pro Sonde werden 10 ml ExpressHyb in einem 15 ml Falcon abgefüllt. Zur späteren Blockierung unspezifischer Bindungen wird zur Hybridisierlösung 50 µg humane Cot-1 DNA gegeben und bei 95°C denaturiert. Die Membranen werden nun mit der vorbereiteten Blocking-Lösung für 30 min bei 68°C prähybridisiert.

2.2.12.6 MTA Hybridisierung

Die entsprechende Menge Sonde wird zu 10 ml ExpressHyb-Lösung gegeben und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei der errechneten Hybridisierungstemperatur. Benutzte Sonden können bei -20°C gelagert und bis zu 5x wieder verwendet werden. Nach der Hybridisierung werden die Membranen mit Waschpuffer 1 für 40 min bei RT gewaschen. Während der Inkubation wird die Lösung 3x gewechselt. Nach dem ersten Waschschrift schließt sich ein Waschschrift mit höherer Stringenz mit Waschpuffer 2 für 40 min bei 68°C an. Anschließend wird die Membran für 1 min in Buffer 1 + 0,3% Tween 20 inkubiert und für 1 h mit Buffer 2 im Hybridisierofen blockiert. Kurz vor Gebrauch wird der Anti-DIG-Antikörper 1:10.000 in Buffer 2 verdünnt und mit der Membran für 30 min bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem Antikörper wird gefolgt von zwei 15 minütigen Waschschriften in Buffer 1 + 0,3% Tween 20 bei RT sowie zur Vorbereitung der Entwicklung für 2 min in Buffer 3. Die Entwicklung der Membran erfolgt für 5 min in 15 ml CSPD-Lösung, die 1:100 in Buffer 3 verdünnt wird. Die so inkubierte Membran wird im Lumi-Imager (Kodak) eingescannt.

Waschpuffer 1	200 ml 2x SSC 0,1% SDS Ad 2l mit H ₂ O bidest
Waschpuffer 2	100 ml 2x SSC 0,1% SDS Ad 2l mit H ₂ O bidest
5x Buffer 1	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl Ad 2l mit H ₂ O bidest
Buffer 2 (Blockinglösung)	1 ml 10%-ige Blocking Reagenz Ad 10 ml mit Buffer 1
Buffer 3	100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ In Buffer 2

2.2.12.7 Auswertung

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der AIDA-Software (Raytest) V5.0 für PC.

2.2.13 Bisulfit-Modifizierung genomischer DNA

Grundlage der Methode ist die Eigenschaft des Bisulfits, Cytosinreste hydrolytisch zu desaminieren, während 5-Methyl-Cytosin unverändert bleibt [Hayatsu et al., 1970; Wang et al., 1980]. Bei der anschließenden PCR werden alle Uracil-Moleküle als Thymin gelesen, während die 5-Methylcytosine weiterhin als Cytosin erkannt werden. Für die Bisulfit Modifizierung wird 1µg DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 50 µl HPLC-H₂O gelöst und für 10 min mit 5,5 µl frischer NaOH (2 M) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden 30 µl frische Hydrochinonlösung (10 mM) und 520 µl frische Natrium-Bisulfitlösung (3 M) zugegeben. Der Reaktionsansatz wird gut gemischt und für 16 h bei 50°C unter Öl inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Proben unter dem Öl abpipettiert und in ein sauberes 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung der Proben erfolgt mit dem Wizard Cleanup Kit (Promega) dem Herstellerprotokoll entsprechend. Das Cleanup Resin wird bei 37°C vorgewärmt um Kristalle zu lösen, muss aber vor Gebrauch auf RT abkühlen. Die modifizierte DNA wird mit 900 µl Cleanup Resin versetzt und mehrmals invertiert damit sie an das Resin binden kann. Die Proben werden nun auf die Aufreinigungssäulen gegeben und mit Hilfe der Vakuumpumpe über die Säulen laufen gelassen. Wenn die DNA durchgelaufen ist, werden die Säule mit 2 ml 80% Isopropanol gewaschen. Nach dem Waschschrift werden die Säulen auf 1,5 ml Reaktionsgefäße gesetzt und mit der Tischzentrifuge für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nun werden die Säulen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gesetzt und für eine Minute mit je 50 µl 50-60°C warmen HPLC-H₂O inkubiert und anschließend für 20 s abzentrifugiert. Das Eluat (die DNA) wird mit 5,5 µl NaOH (3 M) für 5 min bei RT inkubiert. Die Präzipitation der DNA erfolgt dann über Nacht bei -20°C mit 17 µl Ammoniumacetat (10 M) und 170 µl 100% EtOH.

Nach der Inkubation wird die DNA für 25 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit 70% EtOH bei 14.000 rpm für 5 min gewaschen. Der Überstand wird wiederum verworfen und das Pellet kann, nachdem es kurz luftgetrocknet wurde, in 30-50 µl HPLC-H₂O gelöst werden. Die Lagerung Bisulfit-behandelter DNA erfolgt bei -80°C.

2.2.14 DNA-Sequenzierung

Bei der DNA-Sequenzierung nach Sanger ("Kettenabbruchmethode") [Sanger et al., 1977] wird zunächst ein Primer an die zu sequenzierende DNA hybridisiert, d.h. eine kurze komplementäre DNA bindet an die lange zu untersuchende DNA. Dieser Primer wird von einer DNA-Polymerase in Anwesenheit von Desoxynukleotiden (dNTP, dATP, dCTP, dGTP und dTTP) verlängert. Zusätzlich befindet sich in dem "klassischen" Reaktionsansatz auch noch 4 an unterschiedliche Farbstoffe gekoppelte Didesoxynukleotide (ddNTP), jedoch nur in geringer Konzentration. Baut die Polymerase eines dieser Abbruchnukleotide ein, so kann der DNA-Strang nicht weiter verlängert werden, da das 3'-OH am C3 des Zuckers, das dem

Abbruchnukleotid fehlt, essentiell für die Verlängerung der DNA durch die Polymerase ist, da dadurch die kovalente Bindung zum nächsten dNTP geknüpft würde. Die Polymerase bricht ihre Aufgabe ab und eine nicht vollständige Kopie des zu sequenzierenden Stranges bleibt zurück. Da diese Reaktion sehr oft durchlaufen wird, entstehen statistisch an allen Positionen Abbruchprodukte.

Neben dem sequenzspezifischen Primer werden 10-100 ng DNA sowie 2 µl PRISM Big Dye Terminator RR Mix (Applied Biosystems) pro Ansatz eingesetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgt im GeneAmp 9600 Thermocycler (Perkin-Elmer). Nach der Sequenzierreaktion wird das Produkt entsprechend Abschnitt 2.2.3.2 aufgereinigt und gefällt. Das Pellet wird in 3 µl Proben-Ladepuffer aufgenommen. Nach kurzer Denaturierung bei 90°C wird die Probe auf ein 6%-iges PAGE-Gel auf dem semiautomatischen Sequenzierer 377 (ABI). Die Gelelektrophorese erfolgt bei 2.500 V, 40 mA und 30 W für 8-10 h. Die Analyse der Sequenzen erfolgt am Computer mit Hilfe der Programme „Data Collection“ in der Version 1.2.0 und „Data Analysis“ Version D1.7.1 analysiert. Die Auswertung erfolgt dann mit Hilfe der „Sequence Editor 1.0.3“-Software (Applied Biosystems).

Reaktionsansatz:

DNA (entsp. 10-100 ng)	1-4 µl
Primer (1pmol/µl)	2 µl
Big Dye Terminator RR Mix	2 µl
	Ad 10 µl mit H ₂ O bidest.

Sequenzier-Reaktion:

1	Denaturierung	initial	5 min	
2	Denaturierung	zyklisch	10 s	Schritt 2-4: 25 Zyklen
3	Hybridisierung	zyklisch	5 s	
4	Synthese	zyklisch	3,5 s	

6%iger Gelmix	36 g Harnstoff 20 ml 30% AA/Bisacrylamid (29:1; Invitrogen) 39 ml 10x TBE 39 ml H ₂ O bidest
----------------------	--

2.2.14.1 Bisulfitsequenzierung

Als Modifikation der normalen Sequenzierung erlaubt die Sequenzierung von zuvor Natriumbisulfit-behandelter DNA nicht nur eine Aussage über die reine Sequenzabfolge, sondern auch über den Methylierungsgrad des Ausgangsprodukts. Nach einer PCR-Amplifikation Bisulfit-behandelter DNA werden alle vorher methylierten Cytosinreste als normale Cytosine erkannt. Unmethylierte Cytosine werden als Thymin erkannt. Wird Bisulfit-behandelte DNA sequenziert, steht bei der Auswertung jedes detektierte Cytosin für ein 5-Methylcytosin der unbehandelten Ausgangs-DNA. Die Sequenzierung erfolgt analog der Beschreibung in Abschnitt 2.2.15. Da wenige Cytosine in den modifizierten Strang eingebaut werden und sich der Mix dadurch anders verbraucht, muss der Reaktionsmix modifiziert werden und mehr Terminator Dye Mix enthalten. Für die Bisulfitsequenzierung werden 3 µl ddNTPs aber nur 1 µl Primer (1 ppm/ µl) eingesetzt.

2.3 Kompetitive RT-PCR zum quantitativen Nachweis der Genexpression

Die cRT-PCR ist ein sensitives Verfahren zur Analyse des Expressionsstatus eines Zielgens in einem großen Probenkollektiv. Bei der cRT-PCR werden exogene, Sequenz-spezifische Kompetitor-RNA-Moleküle verwendet. Der Kompetitor besitzt dieselbe Sequenz wie das entsprechende Zielgen, weist aber eine interne Deletion von ca. 10% auf, so dass dieser durch den Größenunterschied bei gelelektrophoretischer Auftrennung vom Zieltranskript unterschieden werden kann. Als Ausgangspunkt zur Herstellung eines Kompetitors dient ein PCR-Produkt des zu untersuchenden Gens. In einer einzigen PCR werden die Deletion mittels Mutagenese-Primer und die Addition einer T7-Promotorsequenz mittels Primer mit entsprechendem Überhang generiert. Durch anschließende *in vitro*-Transkription entsteht das Kompetitor-RNA-Molekül, welches in verschiedenen, in Vorexperimenten genau titrierten Konzentrationen zur Zielgen-RNA zugegeben wird. In der darauf folgenden reversen Transkription wird der Kompetitor mit derselben Effizienz wie die Zielgen-RNA transkribiert und in der anschließenden PCR unter gleichen Bedingungen und mit denselben, fluoreszenzmarkierten Primern

amplifiziert. Durch die Analyse der Relation Produkte aus Zielgen-RNA / Produkte aus Kompetitor-RNA kann eine zuverlässige Aussage über die mRNA-Menge des Zielgens gemacht werden [Waha et al., 1998].

2.3.1 Herstellung exogener Kompetitor-RNA-Moleküle

Zur Generierung exogener Kompetitoren wurde ein Pool verschiedener cDNAs verwendet. Für Expressionsversuche in Tumoren wurde dafür ein cDNA-Gemisch von Normalgeweben verwendet. Zielfragmente wurden mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte aus Agarosegelen ausgeschnitten. Ca. 10 ng wurden als Matrize in die entsprechende Mutagenese-PCR eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurde unter Verwendung eines reversen Mutagenese-Primers und eines forward-T7-Promotor-Primers ein PCR-Produkt mit einer internen Deletion von ca. 10-20 bp und einer zusätzlichen T7-Promotorsequenz amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Überprüfung von 5 µl des Produkts wurde das Restvolumen aufgereinigt (s. 2.2.2.2) und in 30 µl DEPC-H₂O eluiert.

2.3.2 cRT-PCR

Mittels PCR-Amplifikation wird ein PCR-Produkt mit den ursprünglichen Primern generiert. Dieses PCR-Produkt dient im Folgenden als Template für die Mutagenese-PCR mit Primern, die *in vitro* eine Deletion einführen und somit das Fragment kürzen. Das so gewonnene Fragment wird subsequentiell verdünnt und in der jeweiligen Verdünnungsstufe (T1-T5, s. Abb) der kompetitiven PCR als Kompetitor zugegeben. Diejenige Verdünnung des Kompetitors wird als optimal bewertet, bei der sich nach kompetitiver PCR die Produkte des Kompetitors und des Zielgens quantitativ entsprechen. Nach diesem Vorversuch werden für alle zu analysierenden Gene die jeweiligen cDNA-Kompetitoren in der optimalen Konzentration bzw. in den Titrationspunkt umrahmenden Konzentrationen in eine neue serielle Verdünnungsreihe eingesetzt. RT und die anschließende kompetitive PCR erfolgen wie oben beschrieben. 1 µl aus der PCR wird 1:10 mit Ladebuffer verdünnt, bei 94°C für 5 min denaturiert, sofort auf Eis gestellt und auf ein 4,5%iges Genescan-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Produkte erfolgt auf dem semi-

automatischen Sequenzierer ABI377 bei 1.500 V, 40 mA und 40 W. Mittels entsprechender Software („Genescan collection“ und „Genescan analysis“, Version 1.2.1, Applied Biosystems) werden die PCR-Produkte quantitativ bestimmt.

Genescanladepuffer	5 ml Formamid 1 ml 25 mM EDTA pH: 8,0 2 Spatelspitzen Dextranblau
---------------------------	---

4,5%iges Genescan-Gel	10,8 g Urea 3,6 ml 10x TBE 3,4 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid (1:29) 14,5 ml H ₂ O
------------------------------	--

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierung humaner Gliomzellen aus primären Glioblastomen

Um die epigenetischen Vorgänge in Hirntumoren *in vitro* in frühen Passagen von kultivierten Zellen untersuchen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik für Neurochirurgie primäre Glioblastomzellen in Kultur genommen (Abb. 3-1). Durch die Kultivierung von Zellen über lange Zeiträume kommt es zu sekundären Veränderungen des Karyotyps, der Genexpression und zu Alterationen der DNA-Methylierung. Damit solche Zellkulturartefakte ausgeschlossen werden können, war die Kultivierung von Glioblastomzellen aus primärem Tumormaterial eine wichtige Voraussetzung für meine Untersuchungen. Zu diesem Zweck wurden Zellen von fünf operativ entfernten Glioblastomen in Kultur genommen und histologisch untersucht. Bei den, für die Versuche in dieser Arbeit verwendeten Zellen erkannte man im HE-gefärbten Schnittpräparat Anteile eines astroglial-differenzierten, mäßig zeldichten Tumors mit einer deutlich kleinzellig undifferenzierten Komponente. Die Tumorzellen hatten runde bis ovale Zellkerne, ein eosinophiles Zytoplasma (Abb. 3-1A) und deutliche Fortsätze. Es fanden sich zahlreiche, zum Teil glomeruloide Kapillarproliferate (Abb. 3-1B). Zudem fanden sich strichförmige Nekrosen mit Pseudopalisadenbildung (Abb. 3-1C) der umliegenden Tumorzellen. Es waren zahlreiche Mitosefiguren (Abb. 3-1D) zu erkennen. Das Zytoplasma der Astrozyten weist ein charakteristisches Zytoskelett mit stark ausgebildeten Intermediärfilamenten auf. Diese Intermediärfilamente bestehen aus Vimentin und dem für Astrozyten spezifischen Markerprotein GFAP (Gliäres fibrilläres saures Protein). Mit einem Antikörper gegen GFAP (Dianova) ließen sich neben einer reaktiven Gliose auch die Tumorzellen zum Teil deutlich anfärben (Abb. 3-2A). Zusätzlich waren die Zellen positiv in einer Färbung gegen das Microtubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2). MAP2 ist ein Protein, das neoplastische Zellen anfärbt (3-2B). Die proliferative Aktivität von Zellen kann mit Hilfe des MIB1-Antikörpers gegen das proliferationsassoziierte, nukleäre Antigen Ki-67 bestimmt werden. Auch hier zeigte sich in den Schnittpräparaten eine deutliche Färbung (Abb. 3-2C), die auf eine hohe Teilungsfrequenz hinweist. Nachdem im gefärbten Gewebe alle Charakteristika eines Glioblastoms beobachtet werden konnten und auch immunhistochemisch eine hohe Teilungsrate und sowohl der astrozytäre Ursprung als auch der neoplastische

Charakter nachgewiesen wurden, konnte man die Präparate eindeutig als malignen, astroglial differenzierten Tumor beurteilen und als Glioblastom WHO Grad IV einstufen.

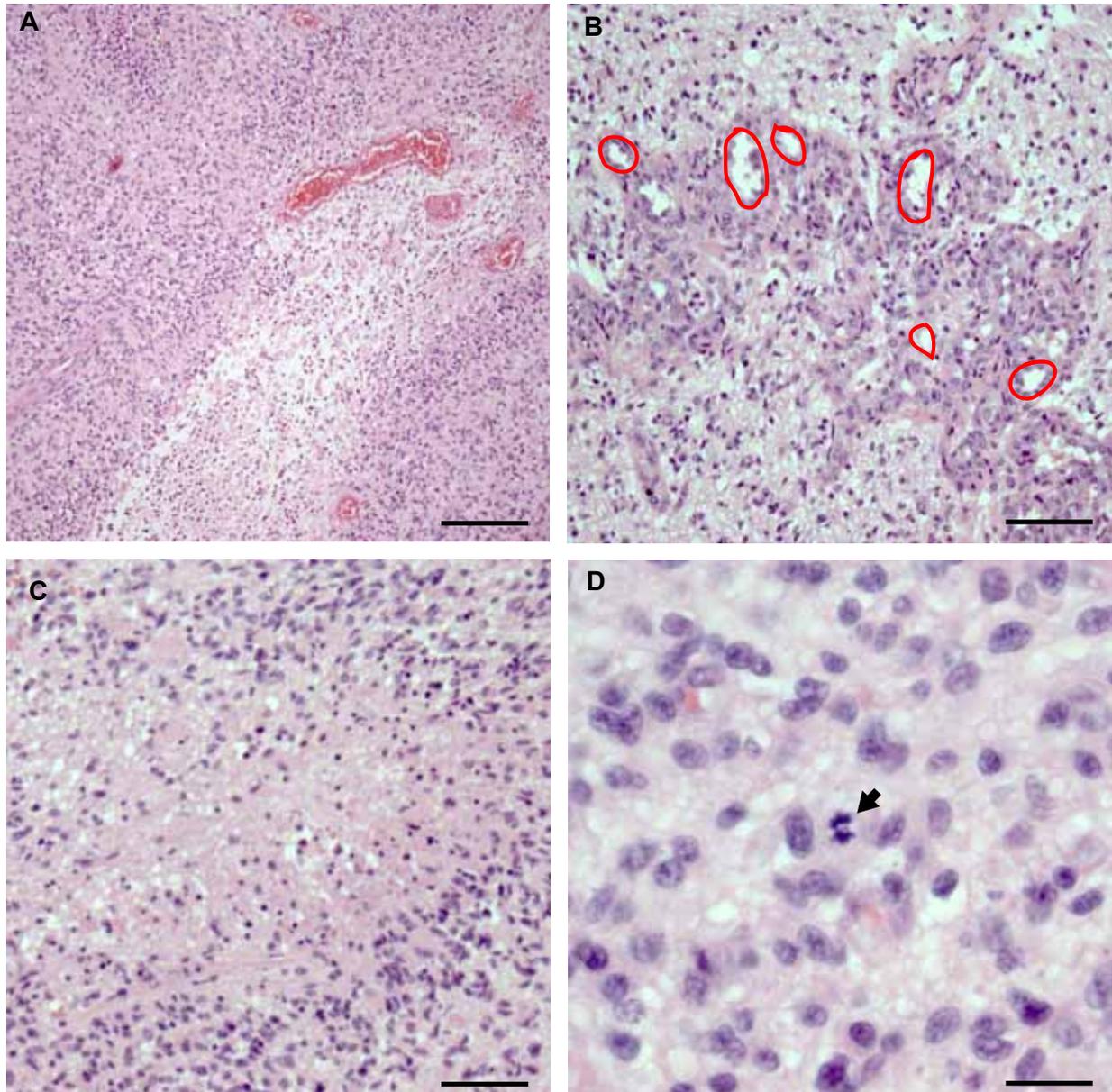


Abb 3-1: HE-Färbungen des entnommenen Tumorgewebes. In der Übersicht (**A**) sind die typischen Merkmale eines Glioblastoms zu erkennen: sehr zeldichte Bereiche, Nekrosen und Gefäßproliferate. Die Vergrößerung eines Bereichs (**B**) zeigt die für Glioblastome typischen Gefäßproliferate (rot umrandet). In (**C**) ist ein nekrotischer Bereich ohne Zellkerne (violett) dargestellt, der von einem Bereich mit hoher Zelldichte, mit typischer Pseudopalisadenstruktur, umgeben ist. Die Vergrößerung (**D**) zeigt neben einer Mitose (Pfeil) vor allem die Pleiomorphie der Zellkerne, die für Glioblastome typisch ist.

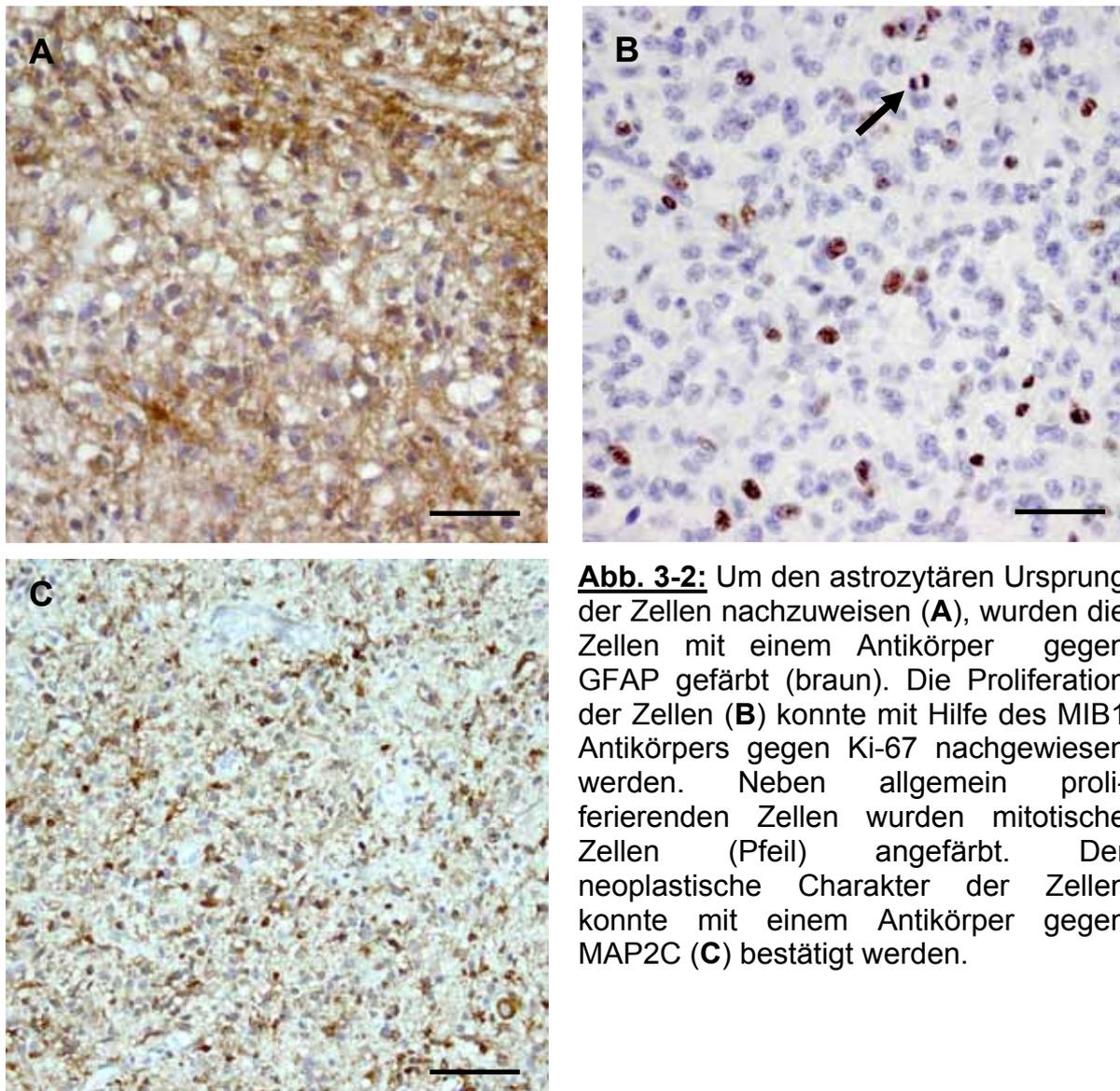


Abb. 3-2: Um den astrozytären Ursprung der Zellen nachzuweisen (A), wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen GFAP gefärbt (braun). Die Proliferation der Zellen (B) konnte mit Hilfe des MIB1 Antikörpers gegen Ki-67 nachgewiesen werden. Neben allgemein proliferierenden Zellen wurden mitotische Zellen (Pfeil) angefärbt. Der neoplastische Charakter der Zellen konnte mit einem Antikörper gegen MAP2C (C) bestätigt werden.

Nach dem mechanischen Lösen der Zellen aus dem Gewebeverband wurden die Zellen über zwei Passagen kultiviert. Bereits nach zwei Passagen zeigten die Zellen eine sehr einheitliche Morphologie (Abb. 3-3). Die Teilungsrate der Zellen war auffällig hoch. Die durchschnittliche Dauer des Zellzyklus betrug etwa 12 Stunden, so dass die Zellen ähnlich häufig wie eine Zelllinie nach jeweils 4 bis 5 Tagen gesplittet werden mussten. Wurden die konfluent wachsenden Zellen nicht gesplittet, sondern lediglich mit frischem Medium versorgt, proliferierten die Zellen weiter über den Monolayer hinaus und wuchsen übereinander (Abb 3-2). Dieser Verlust der Kontaktinhibition des Wachstums ist ein deutlicher Hinweis auf den transformierten Phänotyp der Zellen.

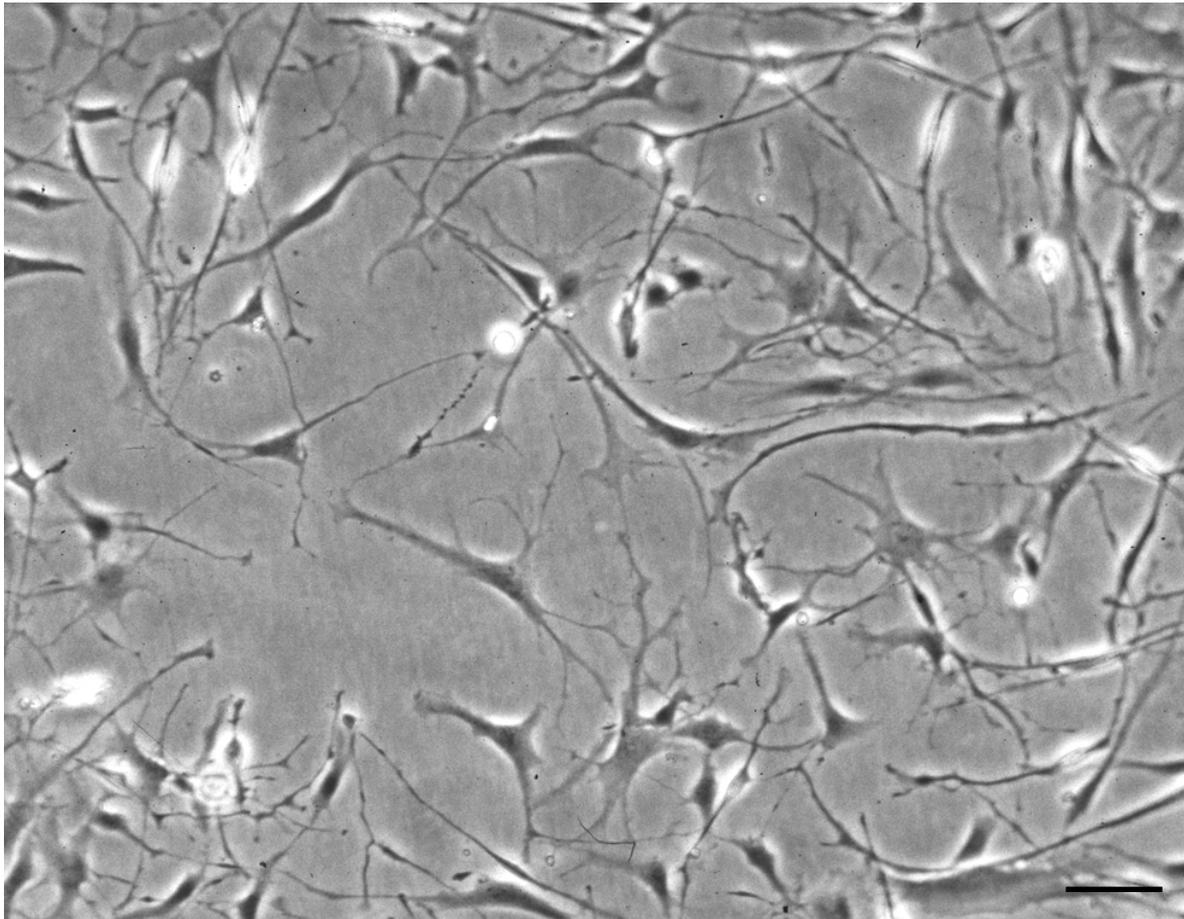


Abb 3-3: Die Abbildung zeigt eine Phasenkontrastaufnahme der aus dem Tumor eines Patienten gewonnenen Zellen nachdem sie über Nacht bei 4°C mit Trypsin dissoziiert und anschließend in einer Zellkulturflasche bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert wurden. Die Zellen sind polar aufgebaut. Sie haben relativ kleine Zellkörper und zeigen die für Zellen astrozytären Ursprungs typischen Fortsätze.

Wurden die Zellen vereinzelt ausgesät, zeigten sie eine unveränderte Teilungsfrequenz, was auf eine weitgehende Unabhängigkeit von durch benachbarte Zellen sezernierte Wachstumsfaktoren hindeutet. Diese drei Eigenschaften lieferten erste Hinweise darauf, dass es sich tatsächlich um Tumorzellen des Patienten handelt. Um auch immunhistochemisch sicherzustellen, dass es sich bei den Zellen um Tumorzellen handelt, wurden Antikörperfärbungen durchgeführt. Die proteinbiochemische Komposition der Zellen stellt neben der Morphologie das wichtigste Hilfsmittel zur Charakterisierung von Zellen dar. Auf Grund ihrer Funktion bei der Versorgung von Neuronen mit Nährstoffen aus den Hirnkapillaren und des Abtransports neuronaler Stoffwechselprodukte zu den Kapillaren sind Astrozyten polare Zellen, d.h. eine Zellseite ist den Kapillaren, die andere dem Neuron zugewandt. Da Astrozyten zahlreiche Fortsätze besitzen wird dieser polare Bau nicht

auf den ersten Blick deutlich. Mit ca. 8 μm besitzen die Astrozyten einen vergleichsweise kleinen Zellkörper, der zu etwa zwei Dritteln vom Nukleus ausgefüllt wird.

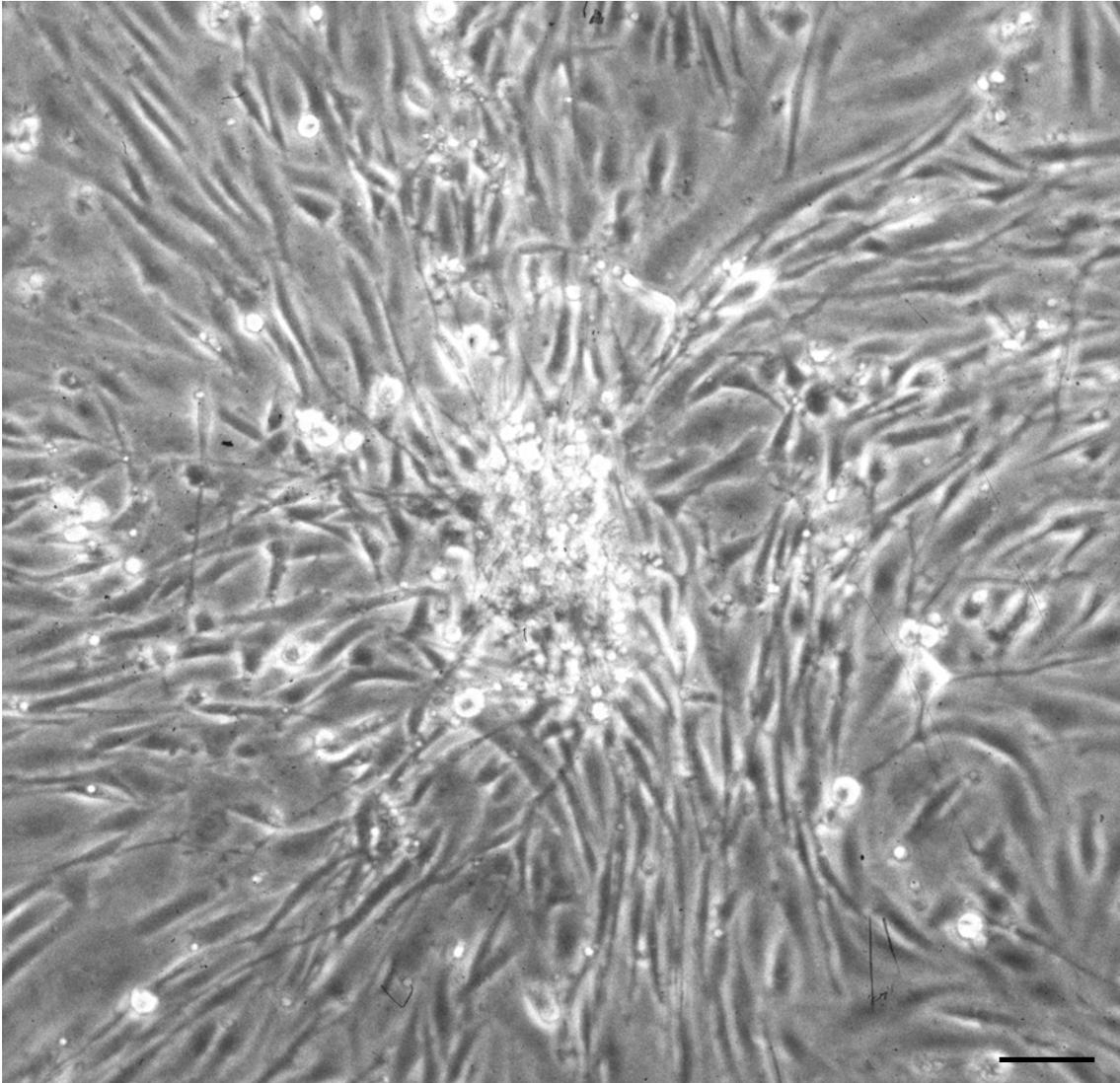


Abb. 3-4: Die kultivierten Zellen zeigen keine Kontaktinhibition des Wachstums. Werden die Zellen mit frischem Medium versorgt, proliferieren sie auch nach dem Erreichen der Konfluenz weiter und wachsen in mehreren Lagen übereinander.

Um zu zeigen, dass es sich bei den extrahierten und kultivierten Zellen tatsächlich um Zellen glialen Ursprungs und nicht etwa um Fibroblasten handelt, wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen GFAP gefärbt. Das Ergebnis des immunhistochemischen Nachweises ist in Abb. 3-5 gezeigt. Man erkennt eine positive Immunaktivität in mehr als 90% der Zellen. Deutlich sind auch die oben beschriebenen, für Astrozyten typischen Fortsätze sowie der polare Aufbau zu erkennen.

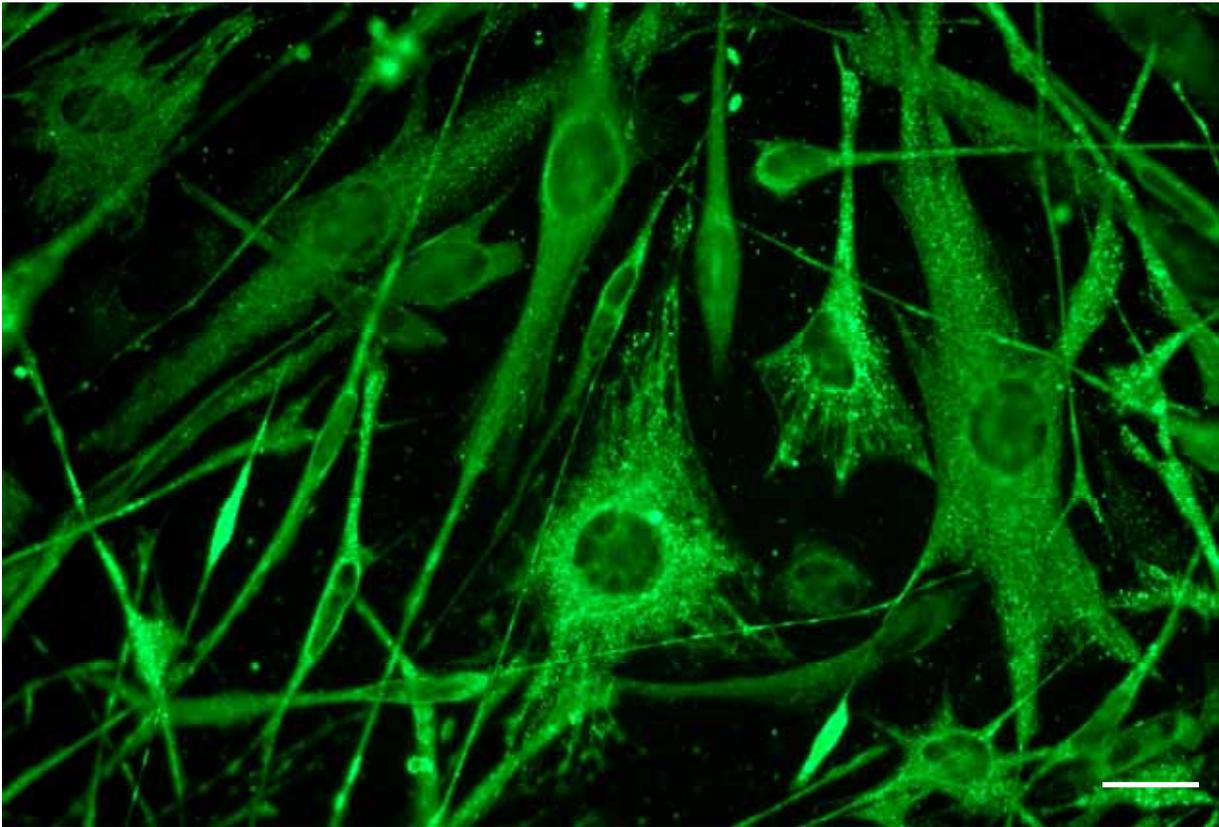


Abb 3-5: Kultivierte Gliomzellen wurden mit einem Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein GFAP markiert. GFAP ist ein Markerprotein für Zellen astrozytischen Ursprungs. Die Verteilung des GFAP im Zytoplasma der Zellen ist deutlich zu erkennen.

Nachdem gezeigt wurde, dass es sich bei den aus dem Patienten gewonnenen Zellen tatsächlich um Zellen glialen Ursprungs handelt, wurden die Zellen mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch gegen das N-terminale Ende der humanen DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) gerichtet ist, gefärbt. DNMT1 ist das Mitglied der DNMT-Familie, welches für die *de novo* Methylierung von Genen verantwortlich ist. DNMT1 ist mit Replikation genomischer DNA assoziiert und wird in sich schnell teilenden Zellen stark exprimiert. Dies ist auch bei den hier etablierten Zellen der Fall. Eine Gegenfärbung der Zellen mit DAPI zeigte deutlich die Lokalisierung von DNMT1 im Zellkern und perinukleären Bereich der Tumorzellen (Abb. 3-6). In allen Zellen war DNMT1 kernassoziiert vorhanden und konnte gleichmäßig stark angefärbt werden. Im Zytoplasma wurde keine, bzw. nur in unmittelbarer Nähe zum Kern eine geringe Menge DNMT1 mit dem Antikörper markiert (Abb 3-6).

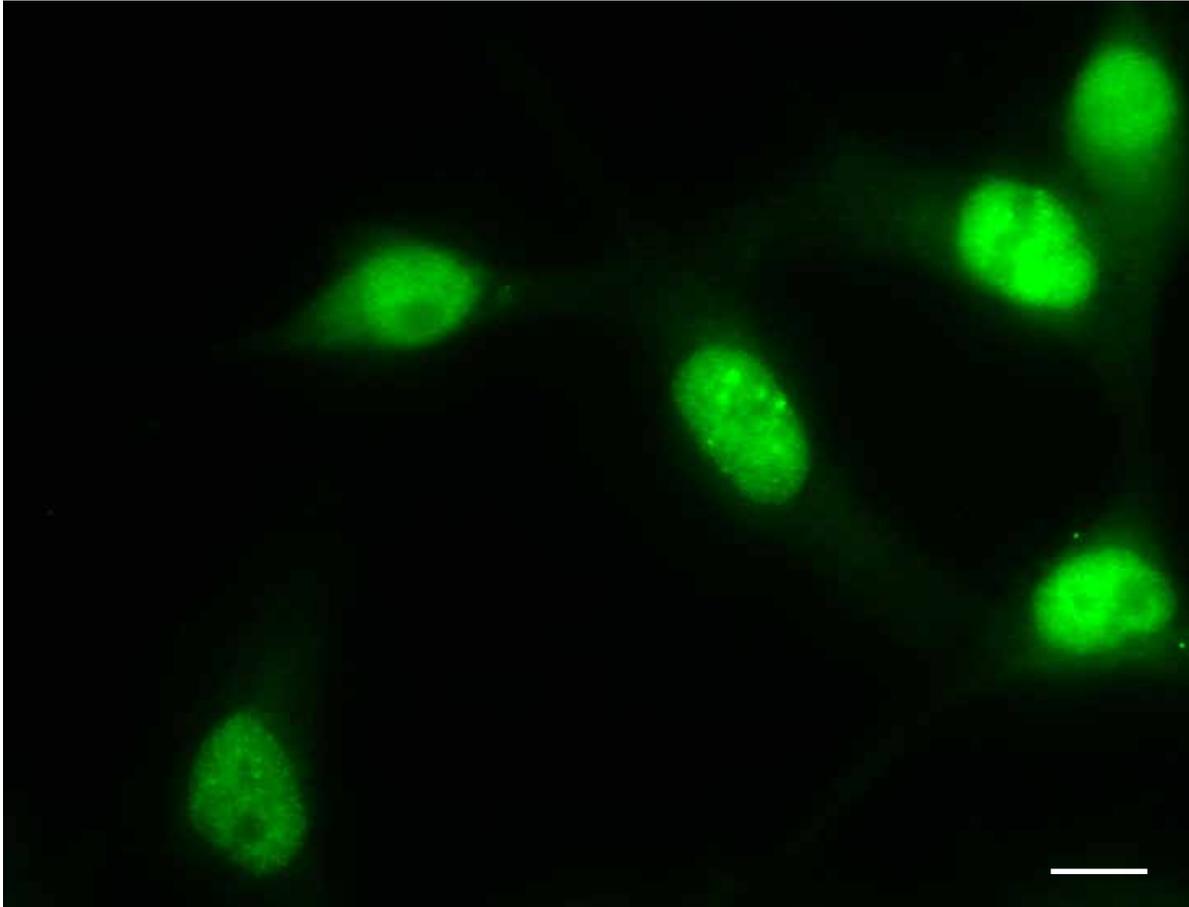


Abb 3-6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kultivierten Gliomzellen, die mit einem Antikörper (Santa Cruz) gegen das N-terminale Ende von DNMT1 markiert sind. DNMT1 ist ausschließlich im Kern der Zellen lokalisiert.

3.2 Differentielle Methylierungsanalyse von Astrozytomen WHO Grad II und normalem Gehirngewebe mittels DMH

Um genomweit neue Kandidatengene zu identifizieren, die ein verändertes Methylierungsmuster in niedriggradigen Gliomen zeigen, wurden in der vorliegenden Arbeit von 8 schockgefrorenen Tumorgeweben isoliert. Als Kontrolle wurde DNA aus der weißen Substanz neurochirurgisch entfernten Temporallappen von Epilepsiepatienten verwendet. Um für den weiteren Versuchsverlauf kohäsive Enden für die Adapterligation an der DNA zu generieren, wurden die DNAs über Nacht mit der Restriktionsendonuklease *MseI* verdaut. Die Fragmente hatten nach dem Restriktionsverdau eine Größe von ca. 100-1000 bp (Abb. 3-7).

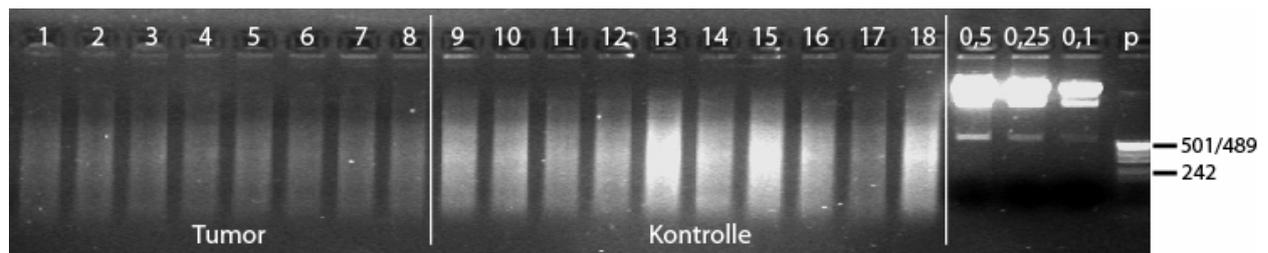


Abb 3-7: Um den erfolgreichen *MseI*-Verdau zu dokumentieren, wurden je 5 µl DNA auf ein 2%iges Agarosegel geladen. Die Spuren 1-8 zeigen die Patienten DNAs. Die Spuren 9-18 zeigen die entsprechenden Normalgewebe-DNAs, die nach der Amplifikation vereinigt wurden. 0,5; 0,25; 0,1 [µg DNA] λ -*HindIII* Mengenstandard. Als Längenstandard diente pUC19 (p).

Nach Adapterligation und methylierungssensitivem Restriktionsverdau mit *Bst*UI und *Hpa*II konnten mittels PCR mit H24 als Primer die Fragmente angereichert werden, die an beiden Enden von Adaptoren flankiert sind. In Abbildung 3-8 sind je 5 µl der PCR-Produkte nach Adapterligation und Restriktionsverdau aufgetragen. An dieser Stelle war es wichtig auszuschließen, dass die genomischen Fragmente sich zu großen, distinkten Banden zusammenlagern. Abb. 3-8 zeigt, dass sich keine Banden gebildet haben und der Restriktionsverdau erfolgreich war.

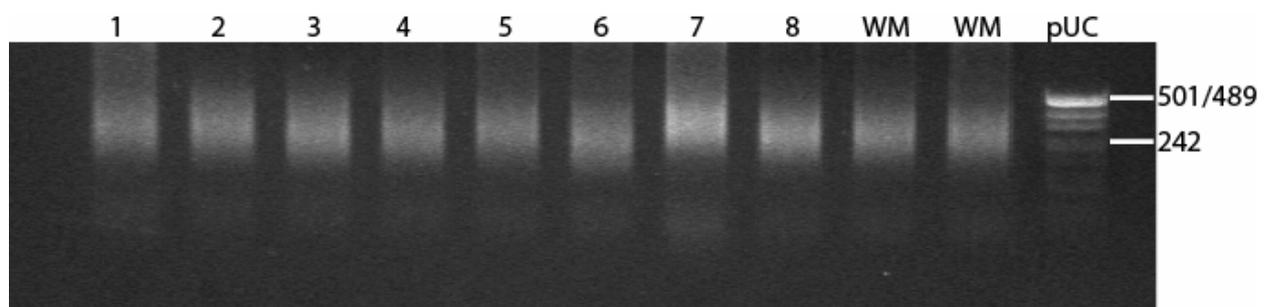


Abb. 3-8: Auf diesem Gel sind die DNAs der Patienten (Spur 1-8) gezeigt. Auf den Spuren 9 und 10 ist das Gemisch der Normalgewebe-DNAs (WM) aufgetragen. Als Größenstandard dient pUC19 (pUC).

Die so hergestellten *MseI*-Amplikons wurden über Nacht mit Cyaninfarbstoffen markiert. In die Normalgewebe-DNA wurde Cy3-dCTP (grünes Signal) bzw. Cy5-dCTP in die Tumor-DNA (rotes Signal) durch *random priming* eingebaut (vgl. 2.3.11.). Aufgrund der Größe der modifizierten Nukleotide liegt die erreichte Effektivität der Markierung weit hinter der theoretisch zu erwartenden. Um später bei der Auswertung die Signalstärken der einzelnen Arrays besser vergleichen zu können, wurde die Effizienz des Einbaus photometrisch bestimmt (Absorptionsmaximum Cy3: 550 nm bzw. Cy5: 650 nm) (Tab. 3-1).

Damit gleiche Mengen Cy3- und Cy5-markierter DNA in den Versuch eingesetzt werden konnten, wurde der Einbau der Farbstoffe anhand der Absorption berechnet:

Patient-Nummer	pmol Cy3	pmol Cy5
1		552
2		497
3		281
4		448
5		601
6		455
7		229
8		231
Normalgewebe	483	

Tab 3-1: Quantifizierung des Einbaus der Cyaninfarbstoffe in die Tumor-DNA bzw. die Normalgewebe-DNA. Dabei handelt es sich bei der Normalgewebe-DNA jeweils um einen Pool aller in den Versuch eingegangenen Normalgewebe.

Nach der Hybridisierung gleicher DNA-Mengen auf den CpG-Insel Microarrays wurden diese wie unter 2.2.11 beschrieben gewaschen und eingescannt. Aufgrund der Markierung mit Cy3 und Cy5 ergeben sich nach der Hybridisierung auf den CpG-Insel-Arrays folgende mögliche Signale: Wird ein grünes Signal detektiert, bedeutet das, dass die betreffende Sequenz im Normalgewebe methyliert und im Tumor nicht methyliert bzw. deletiert ist. Ein gelbes Signal zeigt an, dass die Sequenz sowohl im Normalgewebe als auch im Tumor methyliert ist. Bei Signalen die als rot detektiert werden, ist die betreffende Sequenz im Normalgewebe unmethyliert und im Tumor methyliert. Da die Farbgrenzen fließend ineinander übergehen, wurden Grenzen gesetzt, innerhalb derer ein gemessener Farbwert als positiv für das entsprechende Signal angesehen wurde (vgl. Tab. 3-2). Diese Grenzwerte wurden in früheren Arbeiten [Yan et al., 2000] festgelegt und ermöglichen einen Vergleich unterschiedlicher Arrays miteinander.

Signal	Bedeutung	Farbintensität
	Die Sequenz ist im Normalgewebe methyliert und im Tumor demethyliert.	<0,5
	Die Sequenz ist sowohl im Normalgewebe wie auch im Tumor gleichermaßen methyliert.	0,5 – 2,5
	Die betreffende Sequenz ist im Normalgewebe unmethyliert und im Tumor methyliert.	>2,5

Tab 3-2: Überblick über die möglichen Signale bei der Hybridisierung von DNAs aus Normalgewebe (Cy3 grün-markiert) und Tumor-DNA (Cy5 rot-markiert) mit einer auf Objektträgern gespotteten CGI-Bibliothek.

Damit unterschiedliche Microarrayhybridisierungen miteinander vergleichbar waren, mussten die Signale normalisiert werden. Dazu wurde ein Microarray mit Cot-1 DNA hybridisiert, um repetitive Elemente identifizieren zu können. Die repetitiven Sequenzen haben im Kontrollgewebe und im Tumor den gleichen Methylierungsstatus und ergeben daher ein gelbes Signal. So konnte die Farbintensität des roten und grünen Kanals nach dem Scannen so eingestellt werden, dass die repetitiven Sequenzen eindeutig gelbe Signale ($Cy3/Cy5=1$) zeigen. Abb. 3-9A/B zeigt ein hybridisiertes und gewaschenes Microarray. Da CpG-Inseln im Regelfall nicht methyliert sind, sind nach der Hybridisierung nur in einem geringen Prozentsatz der möglichen auf dem Array repräsentierten CpG-reichen Sequenzen Signale zu erwarten (Abb. 3-9B). Über die gescannten Microarrays wurde eine Maske gelegt, mit deren Hilfe die Signale ausgewertet und den Bakterienklonen in den Mikrotiterplatten zugeordnet werden konnten (Abb. 3-9C). Spots von CpG-reichen Sequenzen, die nicht methyliert sind, können aus der Auswertung entfernt werden. Ausserdem ermöglicht die Maske, die Signale für die Normalisierung der Farbwerte auszuwählen.

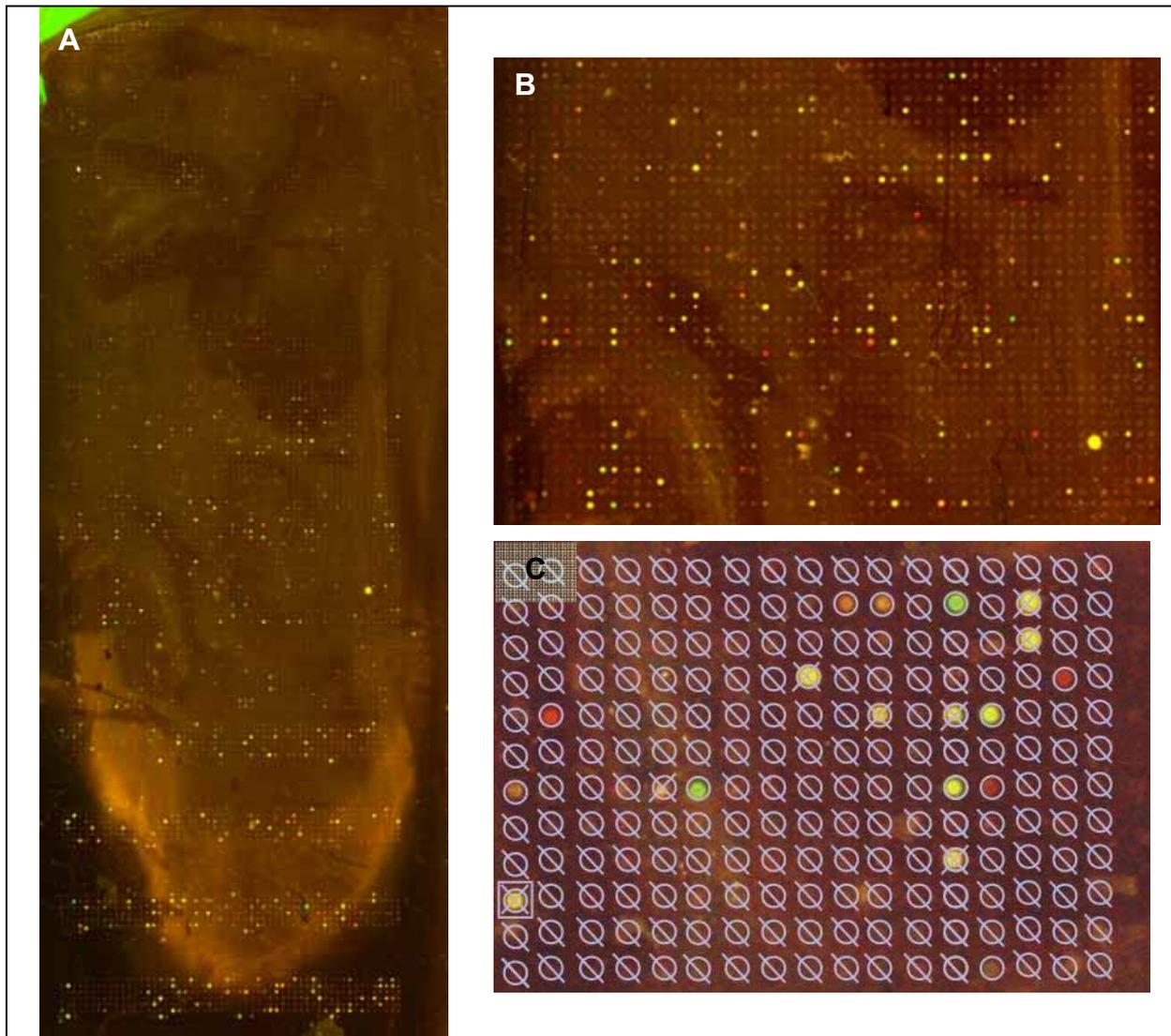


Abb. 3-9: (A) Übersicht über ein eingescanntes CpG-Insel Microarray. Auf dem Array sind 7680 CpG-reiche Fragmente gespottet. (B) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Arrays. In (C) wird ein eingescannter Ausschnitt aus dem DMH-Microarray gezeigt, über den die Auswertungsmaske gelegt wurde. Dabei markieren unausgefüllte Kreise valide Signale. Einfach gestrichene Kreise markieren Sequenzen, mit denen weder Normalgewebe-DNA noch Tumor-DNA hybridisiert haben. Durchkreuzte Kreise markieren bereits identifizierte Repeats. Durchkreuzte Kreise mit Box markieren die identifizierten repetitiven Sequenzen, die zur Normalisierung der Farbwerte herangezogen werden.

Die analysierten und normalisierten Farbwerte wurden mit Hilfe des Acuity Cluster-Moduls entsprechend ihrer Farbwerte sortiert. Die Häufigkeit des positiven Signals, d.h. einer Hypermethylierung der Sequenz im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe, lässt sich so leicht ablesen (Abb. 3-10A). Anhand der so sortierten Signale wurde eine Kandidatenliste mit den zu identifizierenden Sequenzen erstellt.

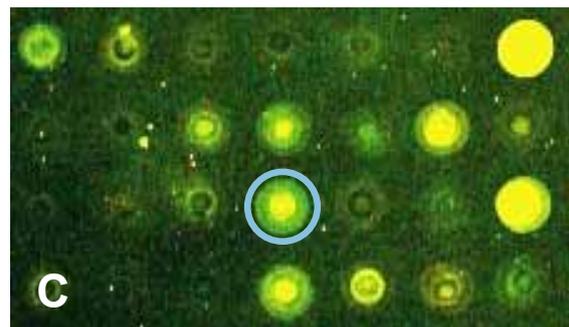
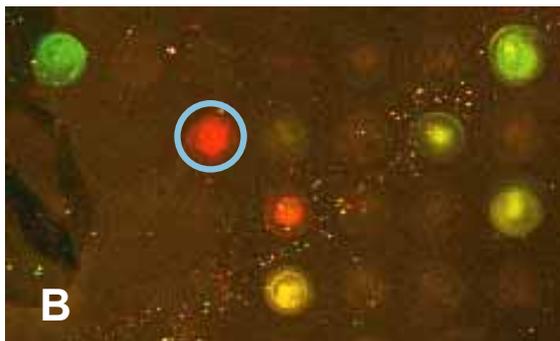
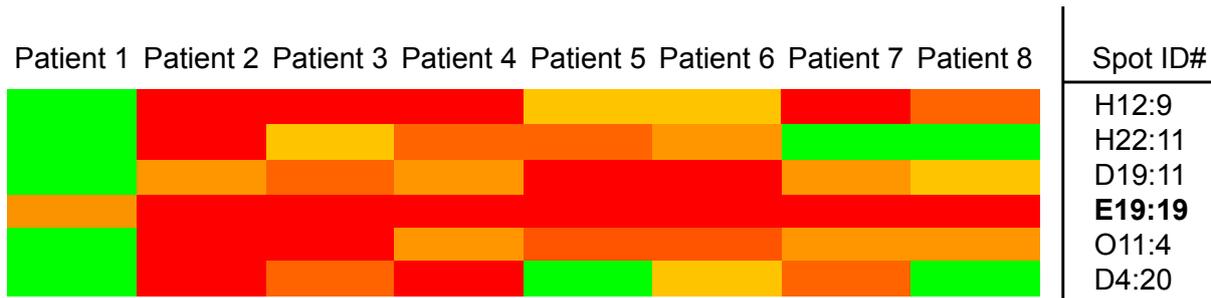
A

Abb. 3-10: (A) zeigt für 4 der untersuchten Patienten die Häufigkeit für ein positives Signal des Spots E19:19. Die an diesem Punkt gespottete DNA ist in allen untersuchten Patienten im Tumor hypermethyliert. (B) zeigt die Aufnahme des Spots E19:19 (Kreis) bei einem der untersuchten Patienten. Zum Vergleich zeigt (C) den Spot bei der Tumorprogression des gleichen Patienten [Felsberg et al, in Vorbereitung]. Das grüne Signal dort zeigt an, dass die Sequenz im Verlauf der Tumorprogression deletiert wurde.

Nach der Microarray Analyse, wurden die korrespondierenden Bakterienklone aus der CpG-Bibliothek angeimpft und das enthaltene Insert mit Hilfe von Plasmidprimern amplifiziert. Die Identität des klonierten humanen DNA-Fragments wurde anschließend durch automatische DNA-Sequenzierung und den Vergleich mit online-Datenbanken bestimmt. Die auf diese Weise identifizierten Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms EMBOSS-cpgplot [<http://www.rfcgr.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/Apps/cpgreport.html>] auf die Kriterien für das Vorliegen einer CpG-Insel nach der Definition von Takai&Jones (2001) analysiert (Abb. 3-11). Durch die strengen Kriterien dieser Definition werden so ausschließlich Sequenzen detektiert, die in den 5' Bereichen von Genen liegen. Repetitive Elemente wie z.B. ALU-Sequenzen werden zuverlässig ausgeschlossen.

A

TCNGTGCCNCNTTANAGNCNG **CGCG**GTACGTGAGTNCTNCCCCATGCCAGGCG
AATGGTGTGGCCTTGAGCTGGTTTTTNNAG **CGGG**CTCGACGTGTCTGAGGGAGG
CCNTTTTNGGGGGCGGGGAGGTGGCCACAGAA **CGCG**GGTTCTGTAAAGAGA
CGTTGGGAAGATT **CG**ATTCCGAGAAGAGGAAGAA **CGGG**ATTGAAAGAGAGCCA
GGCCGCTGAGGGGGAGGGGGCTGCTAAGATGGCGT **CGGC**CTCCT **CGGG**GCC
GT **CGT**CTT **CGGT** **CGG**TTTTTCATCCTTTGATCC **CGCG**GTCCCTTCCTGTACCTTG
TCCTCAGGTAAGC **CGGG**CAGGGCCGTGGGTAGGGAGCTGGTGAGGAATAT **CG**
CGATGGGAGGAAGAGCGGAGACCTAAGAGGGTACCTGTAGCTGGGAATGTCCTA
CCGTGTTA **CGGG**TAAGTGGGCGCCGAGCTGGGGCTTTCAAATAGGGGATTTAT
GAGCGGGCAGGNAGTTTGAGGGAAAGGGATAAAGTTTTG **TTAA**AGGGAGAAG
CTCCCACG

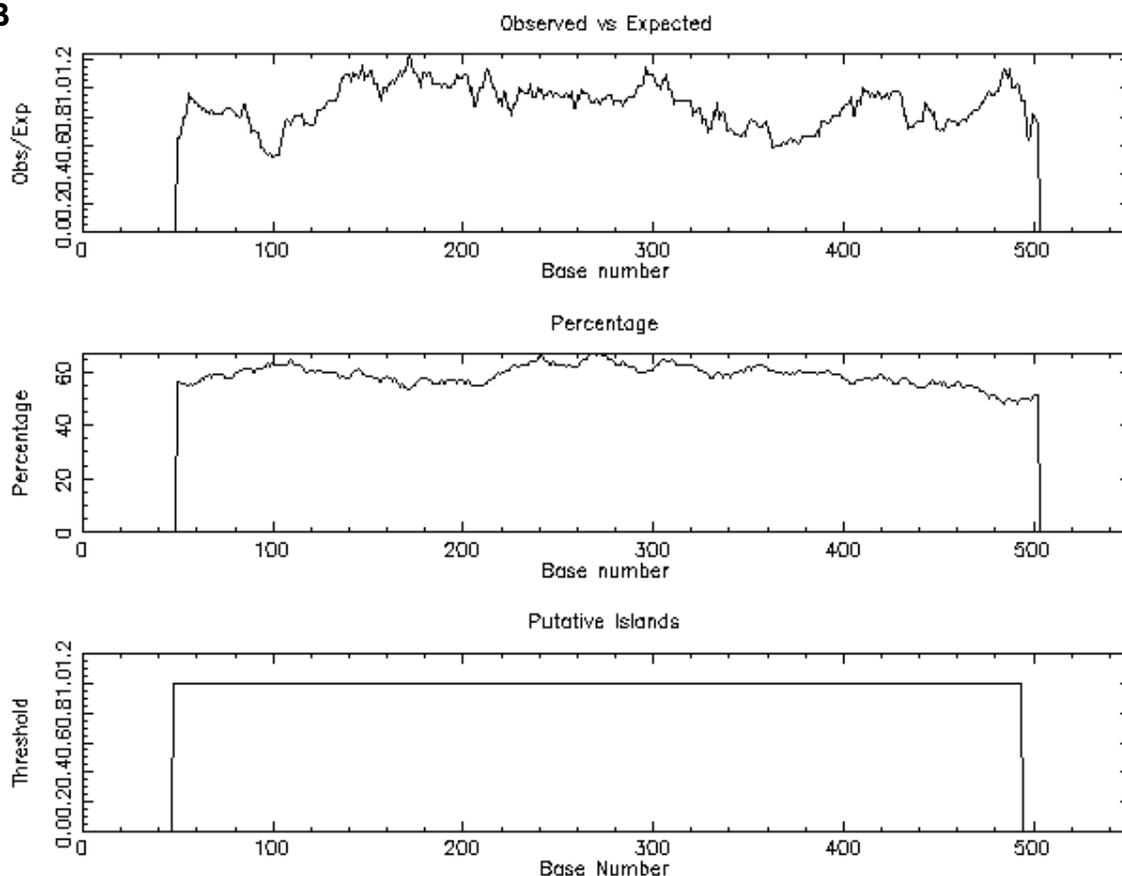
B

Abb 3-11: (A) zeigt die Sequenz von Klon E19:19. Eingezeichnet sind Schnittstellen für *Bst*UI/ *Hpa*II (rot) sowie *Mse*I (grün). (B) zeigt das Ergebnis der EMBOSS-cpgplot Analyse. EMBOSS-cpgplot wertet eingegebene Sequenzen aus und berechnet, ob die Sequenz den Kriterien für eine CpG-Insel nach Takai&Jones (2001) genügt. Nach dieser Definition muss der C+G-Gehalt der zu analysierenden Sequenz >55% sowie die Ratio zwischen beobachteter und erwarteter CG-Häufigkeit ≥ 0.65 in einem mindestens 500bp langen Sequenzabschnitt sein. Die analysierte Sequenz aus (A) zeigt durchgehend alle hinreichenden Kriterien für eine CpG-Insel.

Die identifizierten CpG Nukleotide wurden schließlich mit der UCSC-Datenbank abgeglichen (Abb. 3-12) um die Identität der assoziierten Gene zu bestimmen.

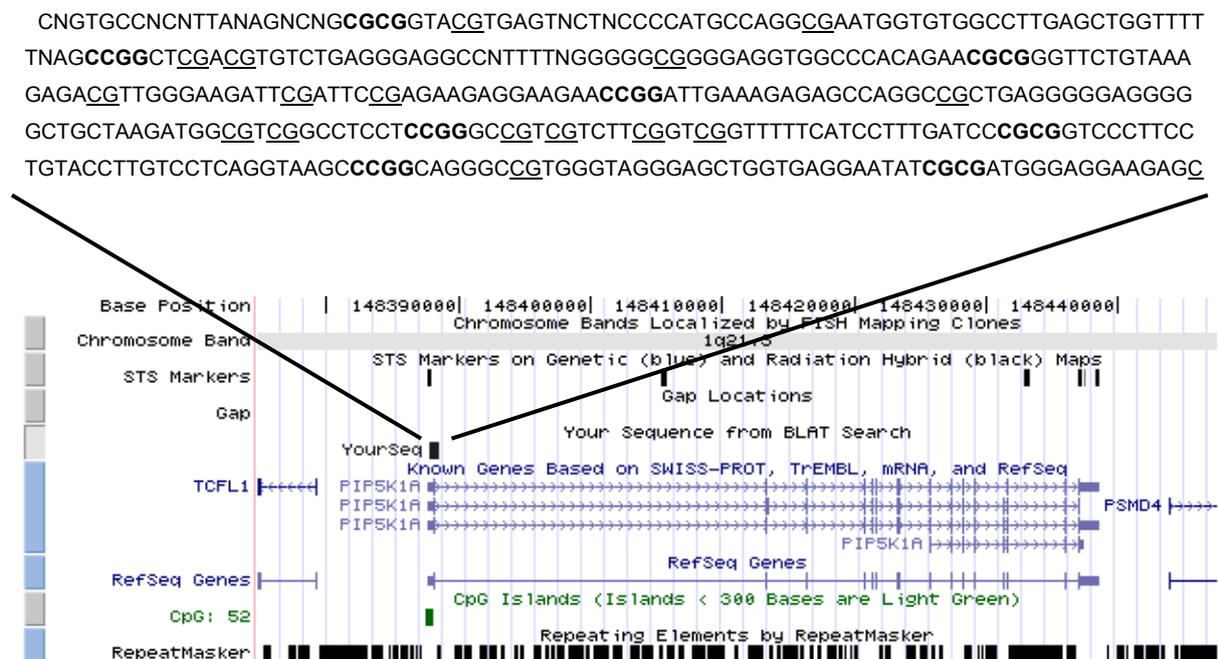


Abb. 3-12: Die identifizierte Sequenz wird gegen die humane Datenbank vom Mai 2004 des UCSC Genome Bioinformatics Servers [<http://genome.ucsc.edu>] abgeglichen. Die identifizierte Sequenz liegt im 5'-Bereich des *PIP5K*-Gens innerhalb einer bereits bekannten CpG-Insel.

Wie für das ausführlich dargestellte Beispiel, dass zur Identifikation von PIP5K führte, wurde für die anderen methylierten Sequenzen verfahren. Durch die hier vorgestellten Arbeiten konnte erstmals mittels eines genomweiten Ansatzes eine Gruppe von 16 Kandidatengen identifiziert werden, die in niedriggradigen Astrozytomen methyliert werden. Die identifizierten Kandidatengene sind in Tabelle 3-3 aufgelistet.

Gen	Funktion	Locus
<i>Birc3</i>	Apoptoseregulator	11q22
<i>CDY2</i>	Chromodomain Bindedomäne	Yq11
<i>DOC1</i>	Downregulated in ovarian cancer 1	3q12
<i>ETS2</i>	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homologe 2	21q22
<i>FOLH1</i>	Folat Hydrolase	11q11
<i>KIF21A</i>	Kinesin	12q11
<i>NUFIP1</i>	Fragiles X Protein-Interaktionsprotein 1	13q14
<i>OSR2</i>	odd-skipped related 2	8q22
<i>PIP5K</i>	Phosphoinositol Phosphat 5 Kinase	1q21
<i>PMS2LS</i>	Postmeiotische Segregation	7q11
<i>Rock1</i>	Rho-assoziierte Proteinkinase 1	16q11
<i>RPIP8</i>	Rap2 Interaktionspartner	17q21
<i>TP53G3</i>	Apoptoseinhibitor	16q11
<i>VPS35</i>	Transport Endosom - TGN	16q11
<i>ZFP37</i>	Transkriptionsregulation	9q23
<i>ZNF248</i>	Zinc finger protein 248	10q11

Tab. 3-3: Auflistung der hypermethylierten Gene in niedriggradigen Tumoren bei 8 Patienten mit einem Astrozytom WHO Grad II.

Um einen besseren Überblick über die funktionelle Verteilung der methylierten Gene zu erhalten, wurden die identifizierten Gene (Tab 3-3) in einem Diagramm, das 6 tumorrelevante Kategorien zeigt, zusammengefasst (Abb 3-13). Dabei fällt auf, dass die Gruppe der Transkriptionsfaktoren den größten Anteil der identifizierten Gene stellt. Allerdings zeigt die funktionelle Zusammenfassung der an der Zellmotilität beteiligten Kategorien „Zelladhäsion“ und „Zytoskelett“, dass es sich bei den identifizierten Genen oft um Gene handelt, die für das Invasionspotential des Tumors von Relevanz sind.

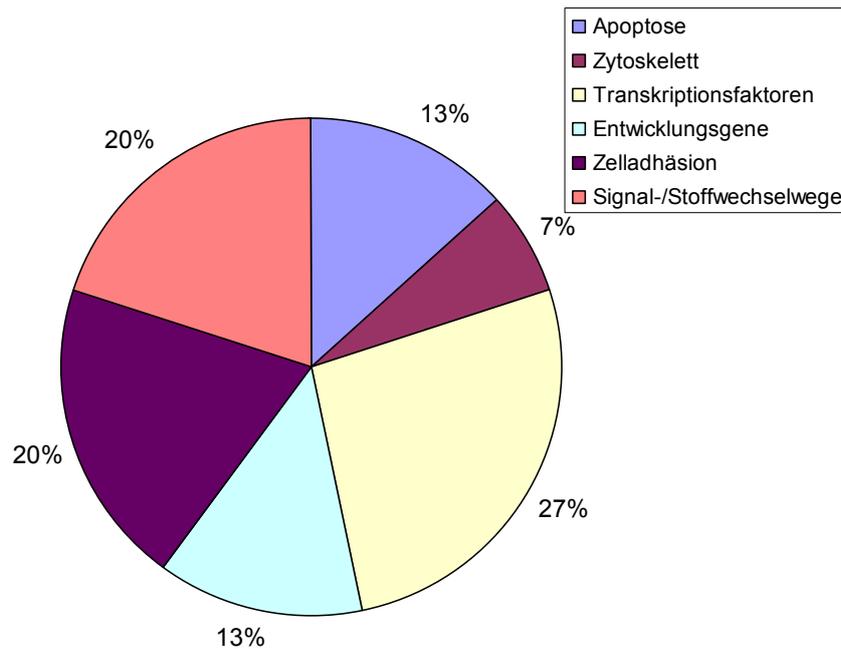


Abb 3-13: Zusammenfassung der mittels DMH in 8 Patienten mit niedriggradigen Astrozytomen als methyliert identifizierten Gene in 6 tumorrelevante Kategorien. Der größte Anteil der identifizierten Gene rekrutiert sich aus dem Bereich der Transkriptionsfaktoren. Fasst man allerdings die Bereiche „Zytoskelett“ und „Zelladhäsion“ funktionell als „Zellmotilität“ zusammen, machen diese Gene 27% der von Methylierung betroffenen Gene aus.

In dieser Arbeit wurde eine Gruppe von Genen identifiziert, die für niedriggradige Tumore offenbar an der Onkogenese beteiligt sind. Da die DNA-Methylierung vermehrt zum Ansatzpunkt von tumortherapeutischen Maßnahmen wird, sollte in dieser Arbeit die Auswirkung demethylierender Agenzien auf die Methylierung in Gliomen untersucht werden. Um diese Untersuchungen nah am Tumor durchführen zu können, wurden die von mir kultivierten Zellen mit verschiedenen demethylierenden Substanzen behandelt.

3.3 Auswirkungen demethylierender Substanzen auf die Methylierung von Gliomzellen

Im Vergleich zu dem demethylierenden Agens 5'-Aza-2-deoxycytidin, das bei der Replikation in die DNA eingebaut wird und zu einer genomweiten Demethylierung und damit verbunden zu einer strukturellen Desintegration des Genoms führt, soll der DNMT1-Inhibitor RG-108 (Kooperation mit Dr. F. Lyko, Deutsches

Krebsforschungszentrum Heidelberg) die Eigenschaft besitzen, vor allem bei transkribierten Genen, die CpG-Methylierung aufzuheben. Untranskribierte Bereiche wie repetitive Sequenzen und ALU-Sequenzen sind davon nicht betroffen. Um diese Eigenschaft zu überprüfen, wurden die in der vorliegenden Arbeit etablierten Glioblastomzellen jeweils mit 5-Azacytidin bzw. RG-108 behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen benutzt, die in Quantum 263 Medium mit DMSO/H₂O aber ohne Methylierungsinhibitoren kultiviert wurden. Auf den CpG-Insel Arrays wurde DNA von RG-108 und 5-Azacytidin behandelten Zellen mit den Genomen von Kontrollzellen verglichen. Zusätzlich wurden die mit den beiden Substanzen behandelten Zellen auf einem CpG-Insel Microarray direkt miteinander verglichen. Alle Hybridisierungen zeigten vorwiegend demethylierte (grüne) Signale. Die positiven Signale (Spots, in denen die Sequenz demethyliert war) wurden ausgezählt und jeweils der Quotient der identifizierten Gene mit den repetitiven Sequenzen jeweils für 5-Azacytidin und RG-108 behandelte Zellen gebildet. Um zu zeigen, dass der Unterschied in der Spezifität für transkribierte Gene signifikant ist, wurde der chi-Quadrat Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, dass bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von ($p=5\%$) wie erwartet, dass der Anteil von demethylierter repetitiven Sequenzen zu informationstragenden demethylierten Sequenzen signifikant geringer ist, als bei 5'-Azacytidin-behandelten Zellen. Diese Verteilung zeigt, dass RG-108 zwar nicht ausschließlich transkribierte Gene demethyliert, allerdings im Vergleich zu 5-Aza-2-deoxycytidin eine höhere Spezifität gegenüber Gen-assoziierten CpG-Inseln besitzt und signifikant weniger repetitive Elemente demethyliert.

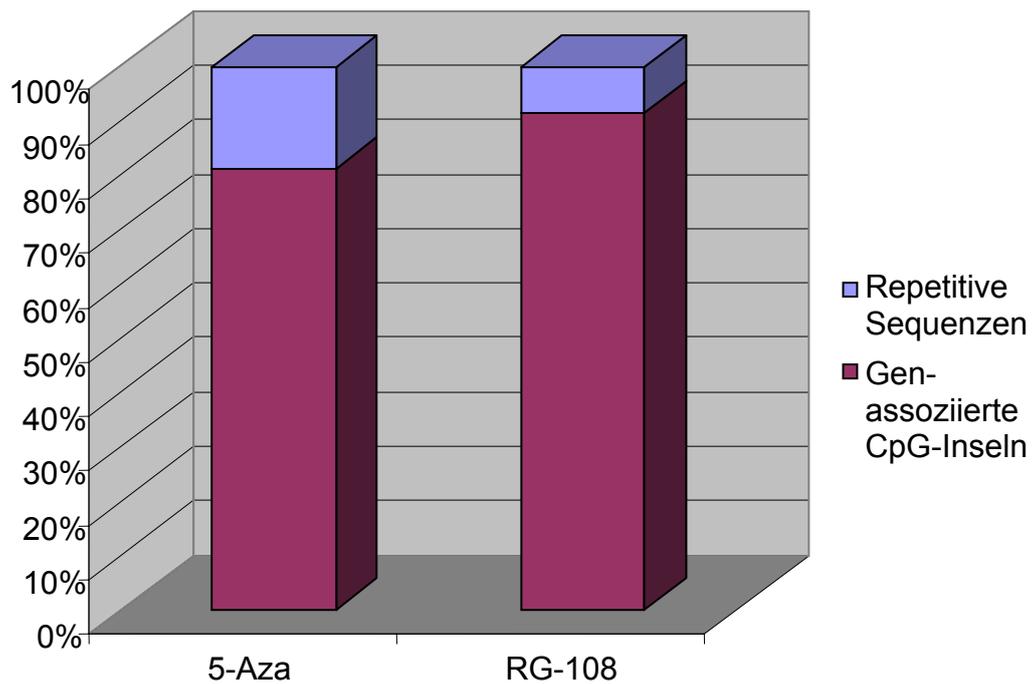


Abb 3-14: Relative Häufigkeiten von demethylierten repetitiven Sequenzen im Verhältnis zu den identifizierten Genen. Bei Zellen, die mit 5-Azacytidin behandelt wurden, werden fast doppelt so häufig (1:5) repetitive Elemente demethyliert wie bei einer Kultivierung mit RG-108 (1:9).

Die Gene der von mir kultivierten Gliomzellen, die durch die Behandlung mit RG-108 demethyliert wurden, konnten verschiedenen tumorrelevanten Kategorien zugeordnet werden. Die identifizierten Gene sowie eine kurze Beschreibung ihrer Funktion sind in den Tabellen 3-4 bis 3-8 zusammengefasst.

Gen	Funktion	Locus
<i>BIRC3</i>	Apoptose Repressor. Das BIR-Motiv interagiert mit den TNF assoziierten Faktoren 1 und 2.	11q22
<i>TP53TG3</i>	Apoptose assoziiertes Protein	16p11

Tab. 3-4: Apoptose assoziierte Gene, die mittels DMH nach RG-108 Behandlung, in den von mir kultivierten Gliomzellen.

Gen	Funktion	Locus
<i>ACTR1A/SUFU</i>	Alpha-centractin (Centractin)	10q24
<i>ROCK1</i>	Aktivator der rho-Kinase	16q11
<i>DNAH7</i>	Dynein, axonemal, heavy polypeptide 7	2q32
<i>GPRK7</i>	Reaktion auf umweltbedingten Streß. Wirkt transkriptionsregulierend durch Phosphorylierung von EIF4E.	3q23
<i>KIF13B</i>	Reorganisation des Zytoskeletts	8p12
<i>MTSS1</i>	An der Tumorprogression beteiligt	8q24

Tab. 3-5: Zytoskelett assoziierte Gene, die durch die Behandlung mit RG-108 demethyliert wurden.

Gen	Funktion	Locus
<i>NINJ2</i>	Adhäsionsmolekül bei der Axonbildung	12p13
<i>PCDHA12</i>	Ca ²⁺ -abhängiges Zelladhäsionsprotein	5q31
<i>PCDHA3</i>	Protocadherin alfa3	5q31
<i>KCNG2</i>	Kalium-Kanal	18q23
<i>PECAM1</i>	Plättchen/ Endothel-Adäsion	17q23
<i>CLSTN1</i>	Beteiligt am Aufbau der Synapsen	1p36
<i>DSCAML1</i>	Neurales Zelladhäsionsmolekül	11q23

Tab. 3-6: Demethylierte Gene, die bei der Vermittlung von Zell-Zell-Zell-Kontakten aktiv sind.

Gen	Funktion	Locus
<i>DCOHM</i>	Reguliert die Dimerisierung von HNF-1- alpha r	5q31
<i>FOXB1</i>	Forkhead Box Protein B1	15q22
<i>FOXP4</i>	Transkriptionsfaktor	6p21.1
<i>MJD</i>	Interagiert mit den transkriptionsregulierenden Proteinen CBP, p300 und PCAF. Wirkt transkriptionsregulierend als Histonbindeprotein.	14q32
<i>PNLDC1</i>	Negative Transkriptionsregulation	6q25
<i>SRCAP</i>	Transkriptionsaktivator	16p11.2
<i>TTC4</i>	Tetratricopeptide repeat protein 4 (TPR repeat protein 4)	1p32
<i>UNQ3030</i>	Leucin-reiche Domäne mit TF-Aktivität	3q29
<i>WIPI2</i>	Transkriptionsregulation	7p22.1
<i>ZDHHC14</i>	Zinc finger DHHC domain containing protein 14	6q25
<i>ZFP37</i>	Transkriptionsregulation	9q32

Tab. 3-7: Als demethyliert identifizierte Gene von Transkriptionsfaktoren nach Behandlung von kultivierten Gliozellen mit RG-108.

Gen	Funktion	Locus
<i>FMN2</i>	Beteiligt an der Entwicklung des Nervensystems	1q43
<i>SDC3</i>	Zelloberflächen Proteoglykan	1p35
<i>ZIC1</i>	Beteiligt an der Kleinhirnentwicklung	3q24
<i>VAX2</i>	Beteiligt an der Augenentwicklung	2p13
<i>LHX9</i>	LIM/Homeoboxprotein	1q31.3
<i>LHX4</i>	LIM/ Homeoboxprotein	1q25.2
<i>DGCR8</i>	Am der Entwicklungsstörung DiGeorge Syndrom beteiligt.	22q11

Tab. 3-8: Demethylierte Gene, die an der Gewebe- und Embryonalentwicklung beteiligt sind.

Gen	Funktion	Locus
<i>USP42</i>	Ubiquitinierung	7p22
<i>PI3K-P101</i>	Regulation der PI3-Kinase	17q13
<i>PDE6D</i>	Purinsynthese	2q37.1
<i>MYEF2</i>	RNA-Bindefaktor	15q21.1
<i>MGLL</i>	Fettsäuresynthese	3q21.3
<i>MDF1</i>	Myo D Inhibitor	6p21.1
<i>CAV1</i>	G-Protein bindendes Membranprotein	7q31

Tab. 3-9: Liste der sowohl durch RG-108, als auch 5'-Azacytidin demethylierten Sequenzen, die keiner der vorangegangenen Kategorien zugeordnet werden können.

Zusätzlich zu den Genen aus den 6 Kategorien wurden noch 24 weitere Gene identifiziert, die für hypothetische Proteine kodieren. Vor allem aus dem Bereich der Transkriptionsfaktoren sind viele Gene demethyliert worden. Gene, die ursächlich an der Einleitung des Apoptoseprogramms beteiligt sind, wurden hingegen vergleichsweise seltener demethyliert (Abb. 3-13). Alle identifizierten Gene der 6 tumorrelevanten Kategorien wurden entsprechend ihrer Häufigkeit in ein Diagramm eingetragen. Die Verteilung der Gene entspricht in etwa der Verteilung, die bei der Methylierung der niedriggradigen Tumoren gefunden wurde (Abb 3-15).

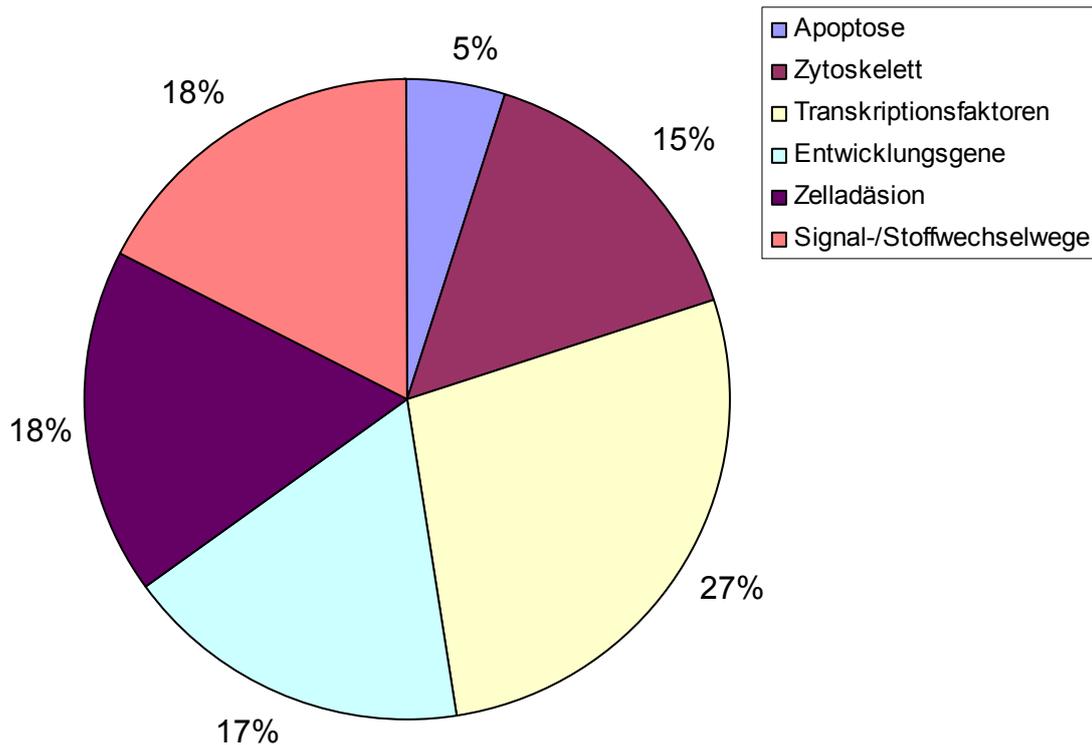


Abb 3-15: anteilige Verteilung der als demethyliert identifizierten Gene bei Glioblastomzellen, die mit RG-108 behandelt wurden. Zusätzlich zu der hier dargestellten Verteilung wurden 24 Gene identifiziert, die für hypothetische Proteine kodieren.

Sowohl für die Methylierung in niedriggradigen Tumoren, als auch für die Demethylierung von Genen bei RG-108 behandelten, kultivierten Gliomzellen stammte jeweils ein Drittel der identifizierten Gene dem Bereich der Zellmotilität. Daher sollte im Folgenden an den kultivierten Gliomzellen untersucht werden, ob es eine Gruppe von Genen gibt, die beim Erwerb der Migrationsfähigkeit methyliert werden.

3.4 Migrationsuntersuchung an kultivierten Gliomzellen

Die Invasion diffuser Astrozytomzellen in das umliegende normale Gehirnparenchym ist eine wesentliche Komplikation bei der Behandlung von Gliompatienten. Auch die Hybridisierungen mit demethylierenden Agenzien haben gezeigt, dass insgesamt 33% der identifizierten Gene eng mit der Zellmotilität in Verbindung stehen. Um weitere Gene zu identifizieren, deren Methylierung mit der Eigenschaft zu migrieren einhergeht, wurde ein Migrationsassay mit den in Kultur genommenen Gliomzellen

durchgeführt. Dazu wurden Zellen in der oberen Kammer eines Transwells ausgesät und für 48 Stunden inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die DNA der migrierten sowie der nicht-migrierten Zellen extrahiert und auf CpG-Insel Microarrays hybridisiert. Mit diesem Versuch konnten neben den schon in niedriggradigen Tumoren identifizierten Genen wie *Procadherin-γA11* weitere Gene identifiziert werden, die über differentielle DNA-Methylierung bei migrationsfähigen Zellen hypermethyliert sind.

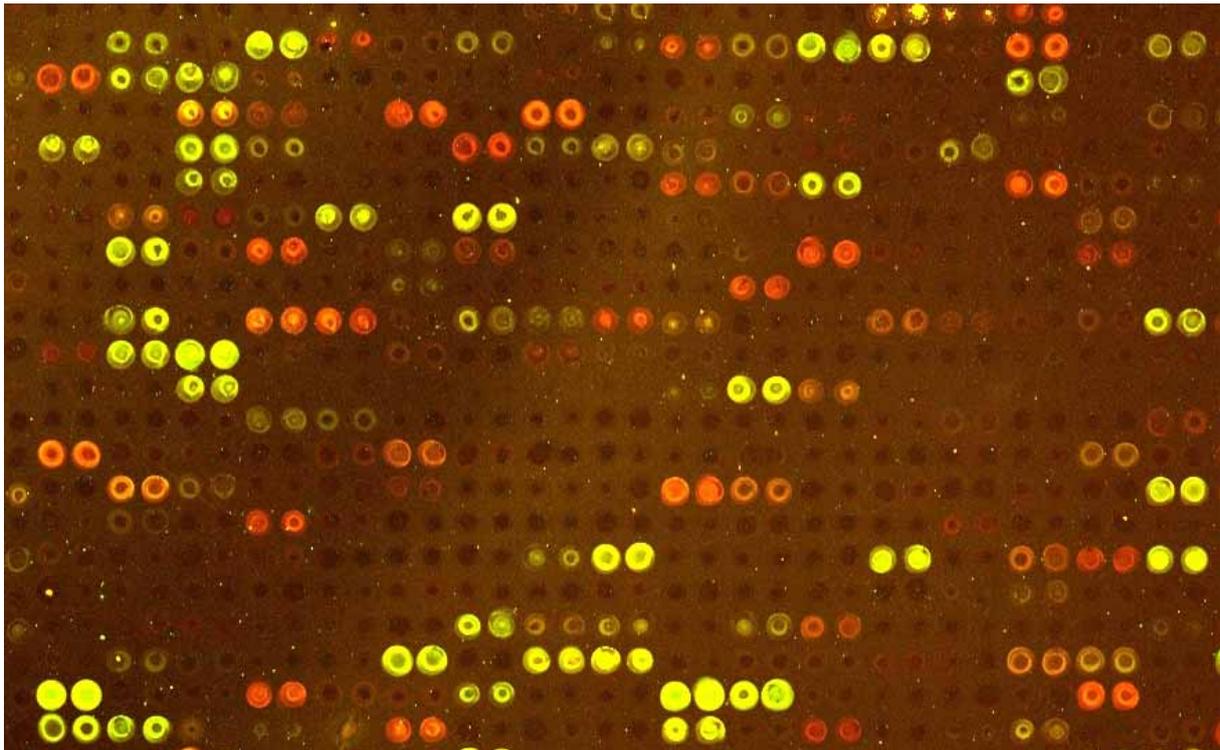


Abb. 3-16: Eingescannter Microarray aus der Hybridisierung von migrierten und nicht migrierten Gliomzellen. Auffällig ist, dass auf dem Array keine grünen Signale zu finden waren. Das nur rote und gelbe Signale detektiert wurden bedeutet, dass bei den migrierten Zellen im Vergleich zu den nicht-migrierten Zellen ausschließlich weitere Gene *de novo* methyliert wurden aber keine Sequenzen demethyliert oder deletiert wurden.

Mit Hilfe der von mir durchgeführten Migrationsversuche, konnten weitere *de novo* methylierte Kandidatengene identifiziert werden, die für den Erwerb der Migrationsfähigkeit verantwortlich sein könnten. Die neuen Kandidaten wurden in Tabelle 3-10 zusammengefasst.

Gen	Funktion	Locus
<i>CAV1</i>	caveolin 1, caveolae protein	7q31
<i>CLSTN1</i>	Non-classical cadherin XB31alpha	11p36
<i>EIF1AY</i>	eucaryotic translation initiation factor 1A	Yq11
<i>LHX4</i>	lim homeobox 4	1q25
<i>MADH2</i>	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 2 (Drosophila)	18q21
<i>OSR2</i>	odd-skipped related 2	8q22
<i>PRODH</i>	proline dehydrogenase (oxidase) 1	22q11
<i>TPCN2</i>	two pore segment channel 2	11q13
<i>WINS1</i>	Hypothetical protein FLJ10583	15q26
<i>ZFP37</i>	zinc finger protein 37 homolog	9q32

Tab. 3-10: Liste der Kandidatengene, die ausschließlich in den migrierten Zellen hypermethyliert vorliegen.

3.5 Herstellung eines Methylierungs-Target-Arrays für primäre Glioblastome

Mit der differentiellen Methylierungshybridisierung (DMH) wurden genomweit CpG-haltige Sequenzen auf Veränderungen der Methylierungsfrequenz bei niedriggradigen Tumoren hin untersucht. Diese Untersuchung lieferte eine Liste von Kandidatengenen in niedriggradigen Tumoren. Um die Bedeutung von DNA-Methylierung auch in höhergradigen Tumoren zu untersuchen, wurde für die vorliegende Arbeit ein Methylierungs-Target-Array (MTA) etabliert, das sich aus 46 Glioblastomen, Glioblastom-Zelllinien und Kontrollgewebe zusammensetzt. Mit Hilfe dieses Arrays sollten DNMT1-regulierte Kandidatengene, die zum Teil schon aus der Literatur bekannt waren oder mit Hilfe der DMH identifiziert wurden, auf ihren Methylierungszustand bei den hochgradigen Tumoren untersucht werden.

3.5.1 Herstellung der Array-Membran

86 DNAs aus primären Glioblastomen und 8 Glioblastom-Zelllinien wurden über Nacht mit der Restriktionsendonuklease *MseI* verdaut, um kohäsive Enden für die anschließende Adapterligation zu erhalten. Das Restriktionsenzym *MseI* schneidet

die Sequenz TTAA nach dem ersten Thymin mit einem überhängenden Ende und lässt die CpG-Inseln intakt (Abb 3-17).

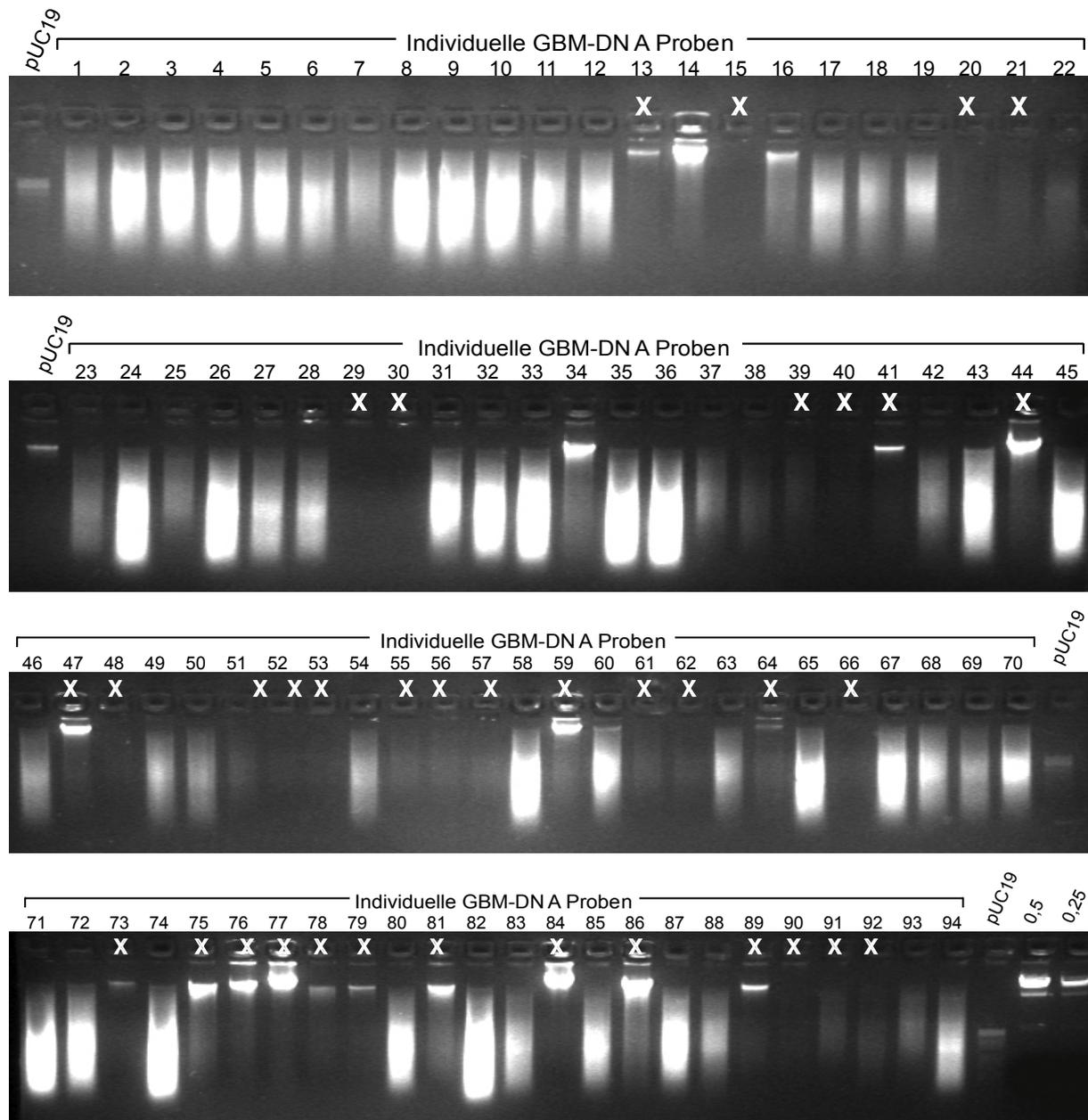


Abb 3-17: Durch den Restriktionsverdau der hochmolekularen genomischen DNA mit der Restriktionsendonuklease *MseI* über Nacht bei 37°C ist die DNA vollständig fragmentiert. Die Fragmentgrößen lagen dabei durchschnittlich zwischen 100 und 1000 Basenpaaren. Die nicht geschnittenen Tumorgenome (X) wurden nicht weiter bearbeitet.

Um die erfolgreiche Adapterligation zu überprüfen wurde eine PCR durchgeführt, bei der das H24-Adapter-Oligonukleotid als Primer diente. Nur die Fragmente, bei denen eine erfolgreiche Adapterligation stattgefunden hat, ließen sich auf diese Weise aus

der Menge aller vorliegenden Fragmente amplifizieren. Das Ergebnis der Amplifikation ist in Abb. 3-18 dargestellt.

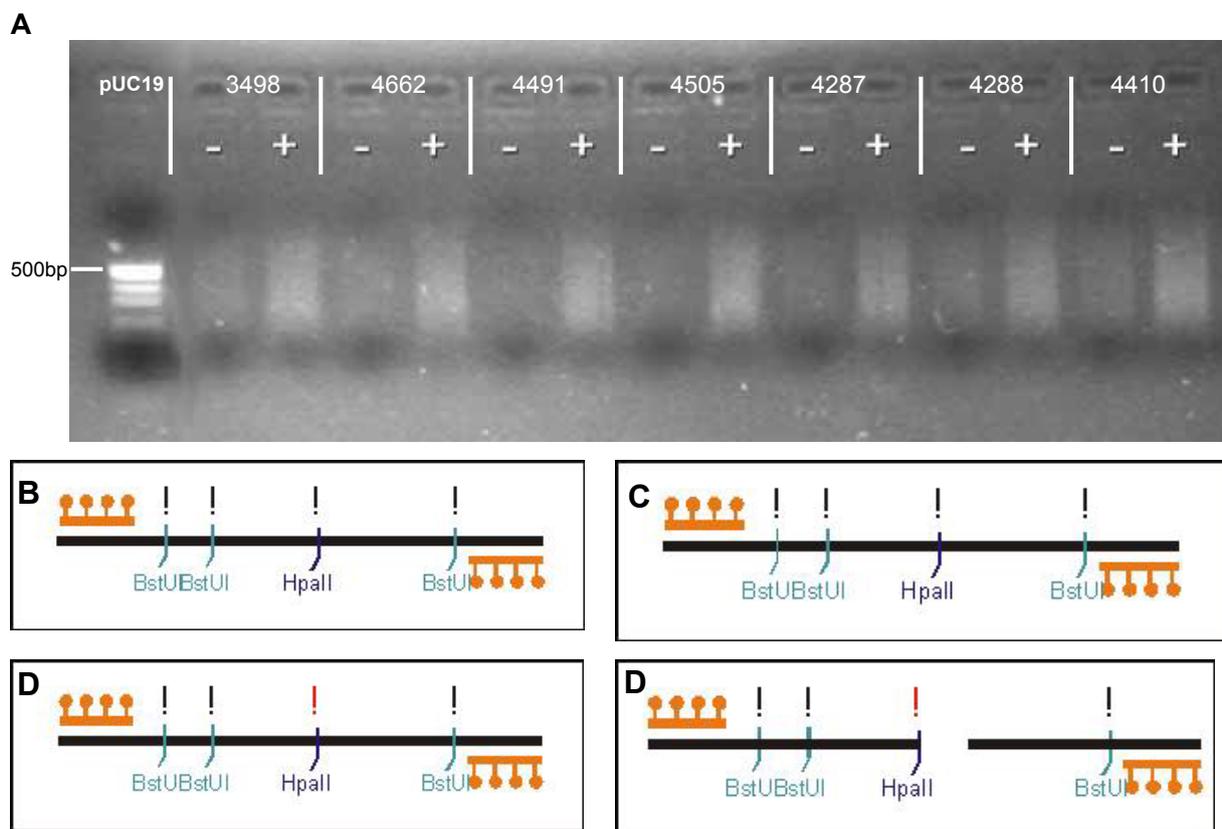


Abb. 3-1: **A** zeigt ein Agarosegel von ausgewählten, *MseI*-verdauten, PCR-amplifizierten DNAs vor („-“) und nach („+“) Adapterligation. Die Abbildung zeigt, dass ausschließlich die Fragmente, bei denen die Adapterligation erfolgreich war amplifiziert. Da die Adaptern als Primersequenzen für die verdauten DNA-Sequenzen dienten, konnten Fragmente, die keinen oder nur einen Adapter tragen, nicht angereichert werden. (**B** - **E**) zeigen die schematische Darstellung der methylierungsspezifischen Restriktionen: Befindet sich ein unmethyliertes CpG-Dinukleotid (**D**) in Form einer *BstUI*- (CGCG) bzw. *HpaII*- (CCGG) Schnittstelle im betreffenden Fragment, sind die Enzyme in der Lage, dieses Fragment zu schneiden (**E**). Dadurch entstehen kleinere Fragmente, die nicht mehr auf beiden Seiten von Adaptern flankiert sind. Nur wenn alle *BstUI*/*HpaII*-Schnittstellen in einem Fragment vollständig methyliert sind (**B**), bleibt das Fragment trotz des methylierungssensitiven Restriktionsverdau erhalten (**C**).

Die *MseI*-verdauten und anschließend ligierten Fragmente wurden mit *BstUI* und *HpaII* verdaut. Beide Enzyme sind methylierungssensitiv und können die DNA nur dann schneiden, wenn die Cytosine an den enzymespezifischen Erkennungssequenzen nicht methyliert sind. Die methylierungssensitiven Restriktionsansätze führten zu einer weiteren Fragmentierung, bei der die DNA an allen unmethylierten *BstUI*/*HpaII* CpG-Schnittstellen geschnitten wird. Ausschließlich die von den

Adaptoren flankierten Fragmente, in denen keine CpG-Dinukleotide enthalten sind, sowie die Fragmente, in denen sämtliche enthaltenen *Bst*U1/*Hpa*II-Schnittstellen vollständig methyliert sind, sind noch mittels Adapter-PCR, bei der die Adaptoren als Primer dienen, amplifizierbar (Abb. 3-19).

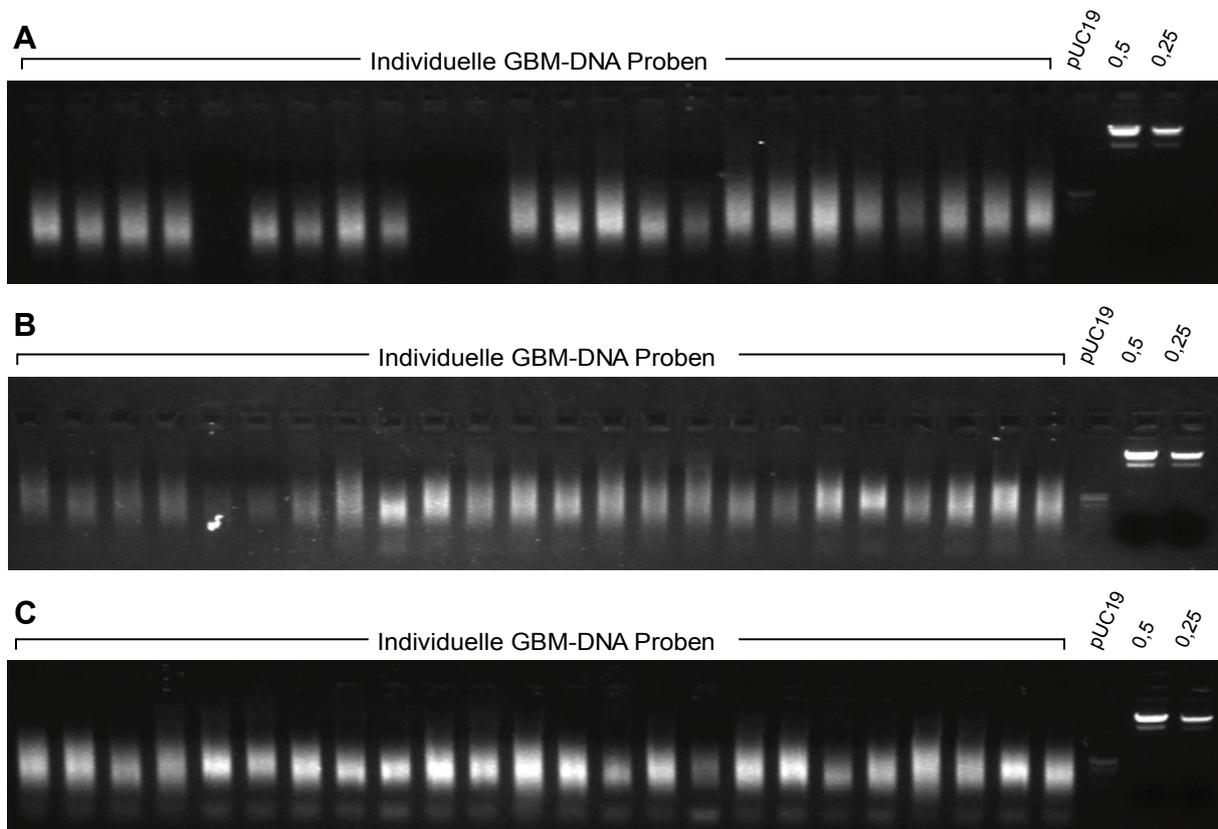


Abb 3-19: 2%iges Agarosegel nach der PCR Amplifikation mit H24-Primern. Amplifiziert wurden nur die Fragmente, die sowohl von zwei Adaptoren flankiert als auch komplett methyliert waren. Aufgetragen sind die DNAs in der Reihenfolge wie in Abb. 3-19 (A) die Reihen A-D (B) die Reihen E-F (C) die Reihen G-H.

Die fertig prozessierten Fragmente wurden aufgereinigt und mit NaOH denaturiert. Anschließend wurden die Fragmente mit einem 96-Pin Replikatorstempel jeweils 4 Mal auf eine Nylon-Membran übertragen. Abb. 3-20 stellt einen Überblick über die Belegung der Membran dar.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Msel	3498	4661	2973	4486	3494	3552	4287	4421	4510	4540	Msel
B	4401	4505	H ₂ O	4614	4499	4662	4713	4581	T98G	U87M G	A172	4664
C	4582	4581	U87 MG	1207	U138 MG	A172	LN22 9	1207	LN/30 8	LNZ3 08	LN22 9	4673
D	4331	4713	U138 MG	T98G	4662	4499	3498	4661	2973	4486	3494	4469
E	4268	3552	4287	4421	4510	4540	4664	4710	H ₂ O	4469	4491	4491
F	4673							4294	4410	4462	4464	4630
G	4612							4582	4401	4505	4614	4678
H	Msel	4508	4496		4462	4410	4294				4288	Msel

Abb. 3-20: Schematische Darstellung über die Belegung der Mikrotiterplatte mit Kontrollen, Glioblastomen und Glioblastomzelllinien für den MTA-Versuch. Zur Kontrolle wurden sowohl Wasserproben als auch ausschließlich Msel-verdaute Fragmente mit auf die Membran übertragen.

3.5.2 Sondenauswahl

Als Sonden wurden Sequenzen aus dem Promotorbereich (bis 2000 bp upstream des ersten Exons) des zu untersuchenden Gens ausgewählt. Bei der Auswahl der Sequenzen wurde darauf geachtet, dass die Sequenzen möglichst viele Erkennungssequenzen für die methylierungssensitiven Endonukleasen *Bst*UI und *Hpa*II enthalten, die beidseitig von *Mse*I-Schnittstellen flankiert sind. Der Aufbau der Sonden ist schematisch in Abb. 3-21 dargestellt. Außerdem durften in den Sondensequenzen keine *Mse*I-Erkennungssequenzen enthalten sein.

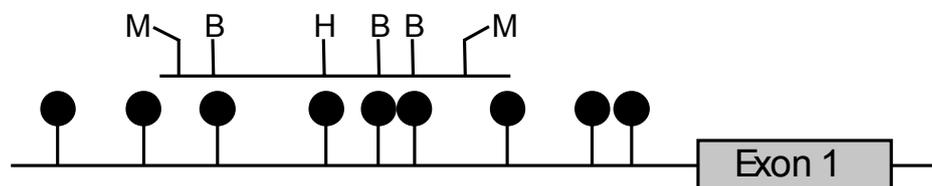


Abb. 3-21: Schematischer Aufbau der MTA Sonden. Für die Sonden wurden Sequenzen zwischen 100 und 250 bp Länge ausgewählt, die in einem CpG-reichen Bereich (ausgefüllte Kreise) vor dem ersten Exon liegen. Die Sondensequenzen sind beidseitig von *Mse*I-Schnittstellen (M) flankiert. Innerhalb der Sequenz liegen möglichst viele Schnittstellen für die methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen *Bst*UI (B) und *Hpa*II (H).

Nachdem die aufgereinigten PCR-Produkte, die als Sonden verwendet werden sollten, mit dig-UTP markiert worden waren, wurde die sondenspezifische Signalstärke bestimmt. Je nachdem bei welchem Verdünnungsschritt die Sonden bei der Testfärbung das letzte erkennbare Signal zeigten, wurde die entsprechende Sondenmenge für die Hybridisierung eingesetzt. Sonden, die nicht wenigstens bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 ein Signal zeigten, wurden verworfen.

Die hybridisierten Arrays wurden im Nikon Lumilmager im Automatik-Modus eingescannt und die Signalstärke mit AIDA 5.0 für PC quantifiziert. Zur Normalisierung der Signalstärke wurde einerseits der lokale Hintergrund im Umkreis von 2 Pixeln um das Signal subtrahiert, zum anderen wurde die gemessene Signalstärke mit der gespotteten DNA-Menge ins Verhältnis gesetzt. Dazu wurde eine Membran ausschließlich mit einer Sonde gegen Cot-1 hybridisiert (s. Abb. 3-22). Da Cot-1 an repetitive Elemente der DNA hybridisiert, verhält sich die nach der

Hybridisierung bestimmte Signalstärke direkt proportional zur DNA-Konzentration des Spots.

3.5.3 Auswertung der hybridisierten Sonden

Die Hybridisierung der gespotteten Membran mit *Cot-1* zeigte eine sehr heterogene Verteilung der DNA-Menge auf der Membran. Da die Menge der repetitiven Elemente proportional zur gesamt DNA ist, gibt diese Sonde zuverlässig Aufschluss über die DNA-Menge (Abb. 3-22). Die bei dieser Hybridisierung gemessenen Signalintensitäten wurden bei den Hybridisierungen mit den genspezifischen Sonden eingerechnet, um die Signalstärke auf die gespottete DNA-Menge nach folgender

Formel $\frac{\text{Signalstärke}(\sum \text{ZielGen}(\text{Spot}_{1-4}))}{\text{Signalstärke}(\sum \text{Cot}(\text{Spot}_{1-4}))}$ zu normalisieren.

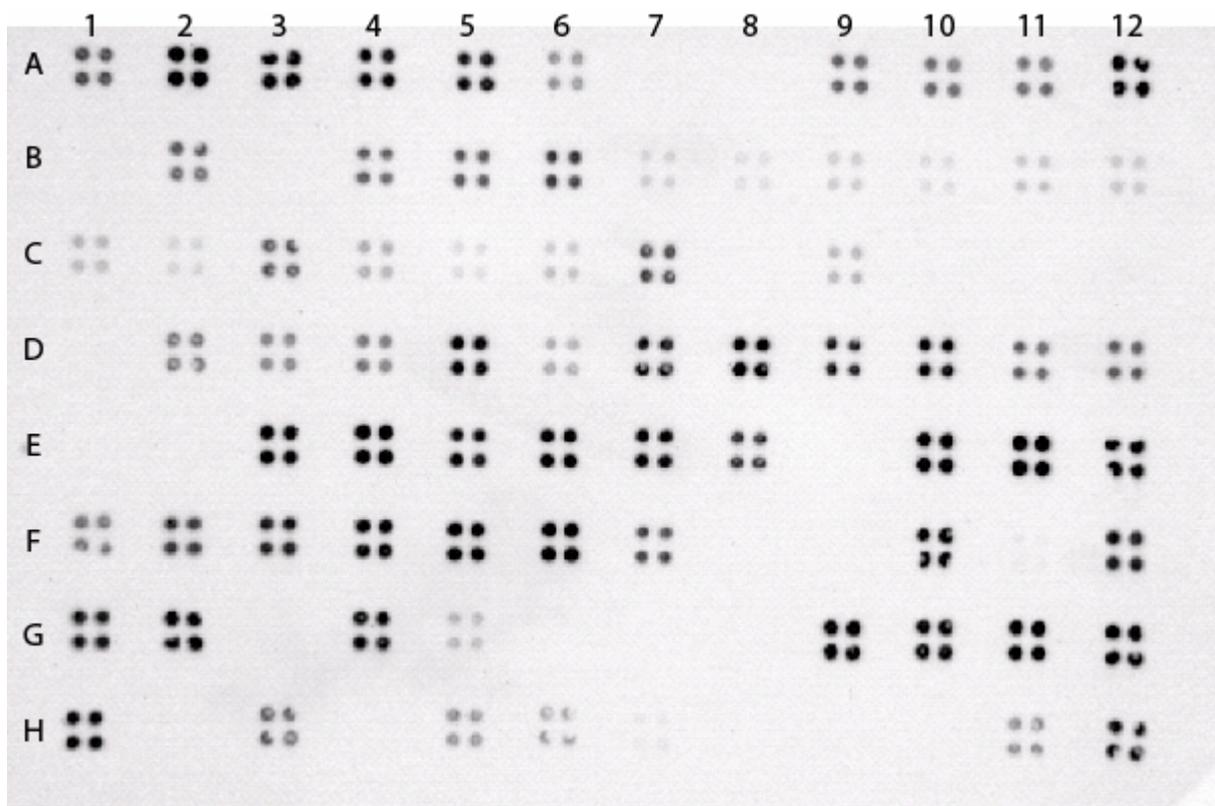


Abb. 3-22: Die mit den vorbereiteten Tumor-DNAs gespottete Nylonmembran wurde mit einer Sonde gegen *Cot-1* hybridisiert. *Cot-1* hybridisiert mit den repetitiven Sequenzen der DNA. Die Hybridisierung mit *Cot-1* dient der Normalisierung der Signalstärke. Der Anteil der repetitiven Sequenzen an der Gesamtmenge der gespotteten DNA ist konstant.

Als Negativkontrolle für den MTA-Versuch wurde das Array mit einer Sonde gegen *BRCA-1* hybridisiert. Das *BRCA-1* Gen spielt für die Entwicklung von Mammakarzinomen eine große Rolle. Dabei sind nicht nur klassische Mutationen des Gens für die Tumorentstehung verantwortlich. Es konnte vielmehr nachgewiesen werden, dass Hypermethylierungen im Promotorbereich des Gens zur Geninaktivierung führen. Mittels MS-PCR konnte gezeigt werden, dass das *BRCA-1* Gen bei primären Glioblastomen nicht methyliert wird. Für den MTA-Versuch wurde *BRCA-1* ausgewählt, um zu überprüfen, inwieweit die Signalstärke der Replikate streut und ob die Methode versehentlich falsch-positive Sequenzen detektiert. Das dargestellte Array (Abb. 3-23) zeigt auf den ersten Blick einige starke Signale. Die Normalisierung mit den Werten der Cot-1 Hybridisierung zeigt jedoch, dass keine der Signale den Schwellenwert aus der Summe der Mittelwerte und der 3fachen Standardabweichung oberhalb dessen Hypermethylierung angenommen wird, liegt (Abb. 3-23). Nach der Hybridisierung und Analyse in AIDA 5.0 wurde für keine der gespotteten Tumor-DNAs eine Hypermethylierung detektiert.

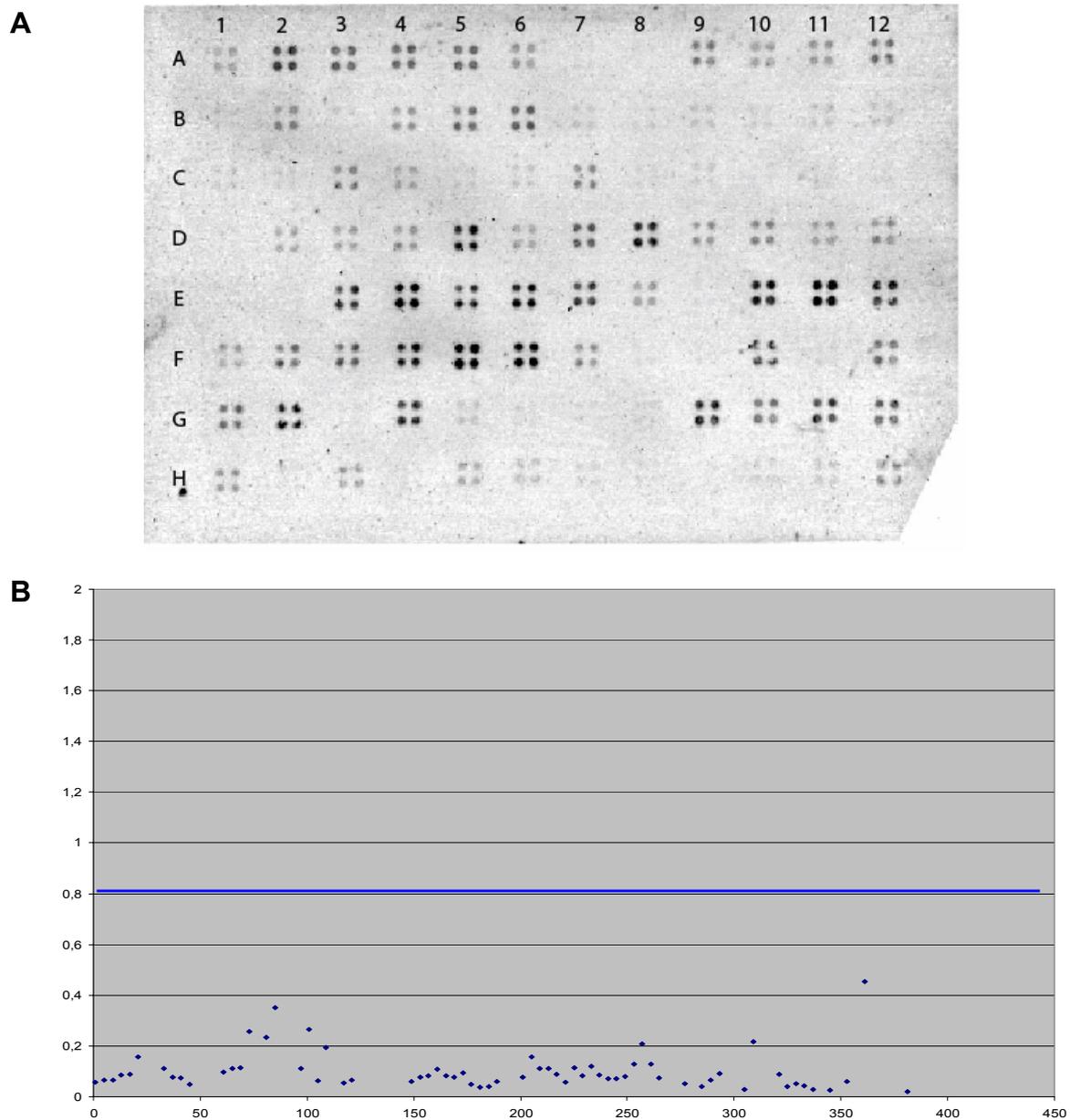


Abb. 3-23: Um die Ergebnisse der MTA-Analyse mit bekannten Daten zu validieren, wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen *BRCA-1* durchgeführt (**A**). Es ist bekannt, dass *BRCA-1* eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Mammakarzinomen spielt, jedoch in primären Glioblastomen nicht hypermethyliert wird. (**B**) zeigt die Normalisierung der Ergebnisse durch Einbeziehung der DNA-Mengen. Kein Wert liegt über dem Schwellenwert der Signalintensität (Y-Achse) von 0,8.

Für die Methylierungsanalyse eines großen Tumorkollektivs wurden die zuvor gespotteten Glioblastom-DNAs mit einer Sonde gegen die Promotorsequenz des *Chfr-1*-Gens. Aus jüngeren Arbeiten ist bekannt, dass die Expression des mitotischen Checkpoint-Proteins Chfr in 20-50% von primären Tumoren und tumor-abgeleiteten

Zelllinien stark reduziert ist [Yu et al., 2005]. *Chfr*-defiziente Mäuse entwickeln häufig spontane Tumore [Chaturvedi et al., 2002]. Vom Tumorsuppressorgen *Chfr-1* ist bekannt, dass es in verschiedenen neoplastischen Tumoren durch Methylierung reguliert wird [Brandes et al., 2005]. Bei der Untersuchung dieses Gens zeigen 3 (14%) der untersuchten Tumoren eine Signalstärke, die auf Hypermethylierung schließen lässt (Abb. 3-24).

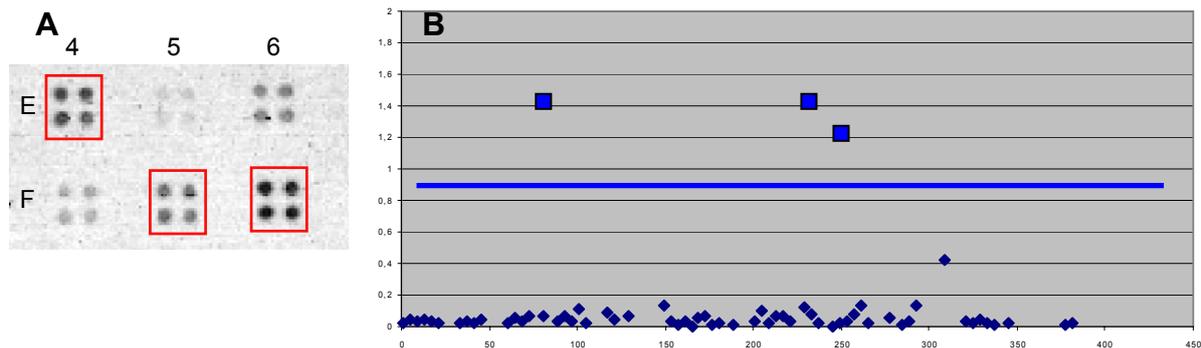


Abb. 3-24: (A) zeigt eine Aufnahme der mit *Chfr-1* hybridisierten Membran. Auffällig ist die vergleichsweise schwache Signalintensität. Normalisiert man die Werte (B), liegen die Signalwerte von 3 Tumoren (14%) weit über dem Schwellenwert (blaue Linie), für den man eine Hypermethylierung annimmt.

MFAP kodiert für ein Protein, das maßgeblich an der Bildung des Zytoskeletts beteiligt ist. In einer DMH-Analyse pilozytischer Astrozytome wurde häufig eine Hypermethylierung von *MFAP* nachgewiesen [Waha et al., 2004], daher war es interessant, die Methylierung dieses Gens auch in Glioblastomen zu untersuchen (Abb. 3-245).

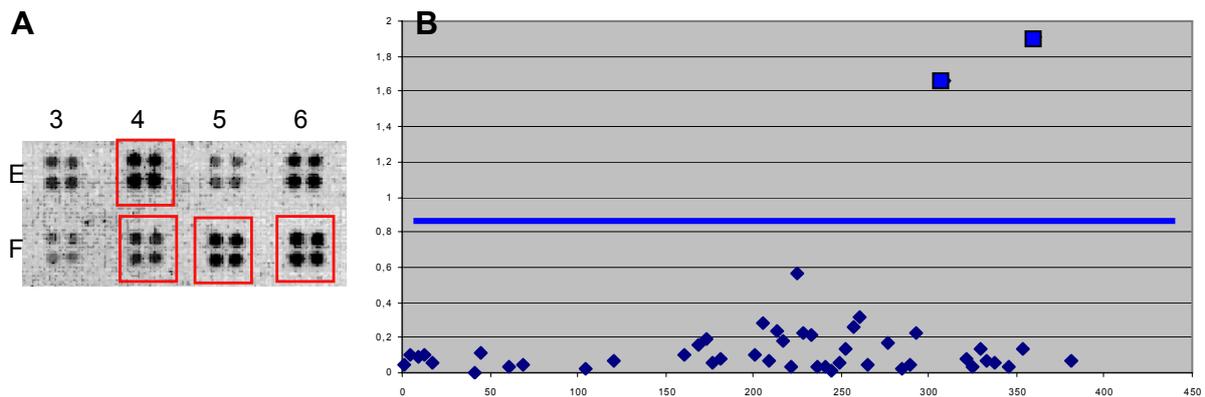


Abb. 3-24: Hybridisierte MTA-Membran (A) mit einer Sonde gegen das erste Exon des *MFAP*-Gens, das für das Mikrofibrillen assoziierte Protein (MFAP) kodiert. Nachdem der Hintergrund subtrahiert wurde und eine Normalisierung der Werte mit der Cot-1 Membran stattgefunden hat, zeigen etwa 5% der Signale eine Methylierung der Tumor-DNA (B).

Nachdem die Ergebnisse der MTA-Untersuchungen für Gene bei denen die Methylierung bekannt war den Erwartungen entsprechen und durchgehend zuverlässig positiv Signale lieferten, wurde eine Sonde gegen das *Odd-skipped-related-2*-Gen (*Osr2*) generiert. *Osr2* ist ein Gen, das von mir zuvor sowohl in den niedriggradigen Tumoren wie auch in den migrierten Gliomzellen als methyliert gefunden worden war. Das Ergebnis der Hybridisierung mit den Glioblastomen des MTA lieferte in einem der untersuchten Tumoren (2%) ein eindeutig „methyliertes“ Signal (Abb. 3-26).

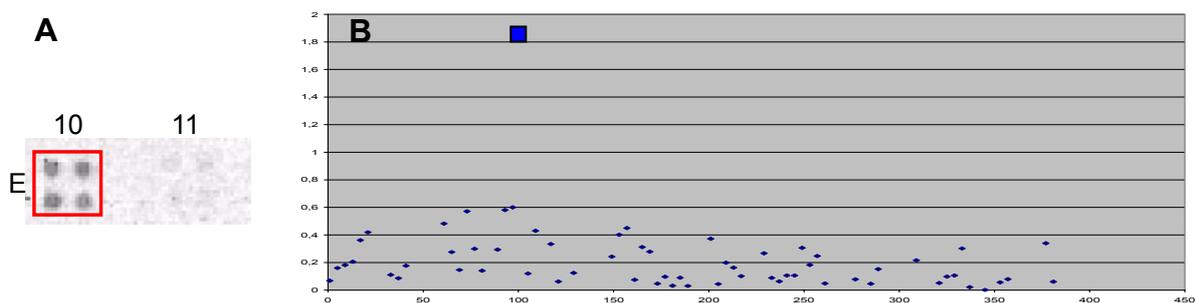


Abb. 3-26: (A) zeigt einen Ausschnitt aus der MTA-Membran, die mit einer Sonde gegen *Osr2* hybridisiert wurde. Auf der Membran sind einige starke Signale zu erkennen, die, wenn man sie mit den Signalen der Cot-1 Membran normalisiert (B) nur für 3 Punkte (eine Hypermethylierung anzeigen). Auffällig ist die vergleichsweise schwache Signalintensität der hybridisierten Membran.

Um die Ergebnisse der MTA-Analyse zu validieren wurde eine Bisulfit-Sequenzierung der Tumor-DNA durchgeführt. Mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung konnten für die

entsprechenden Sequenzen der Tumor-DNAs sowohl die erhaltenen Schnittstellen der methylierungssensitiven Restriktionsenzyme *Bst*UI und *Hpa*II gezeigt werden als auch dass die entsprechenden Cytosine der CpG-Dinukleotide methyliert sind, konnte auf diese Weise nachgewiesen werden. Ein Ausschnitt der Bisulfitsequenzierung ist in Abb. 3-27 dargestellt.

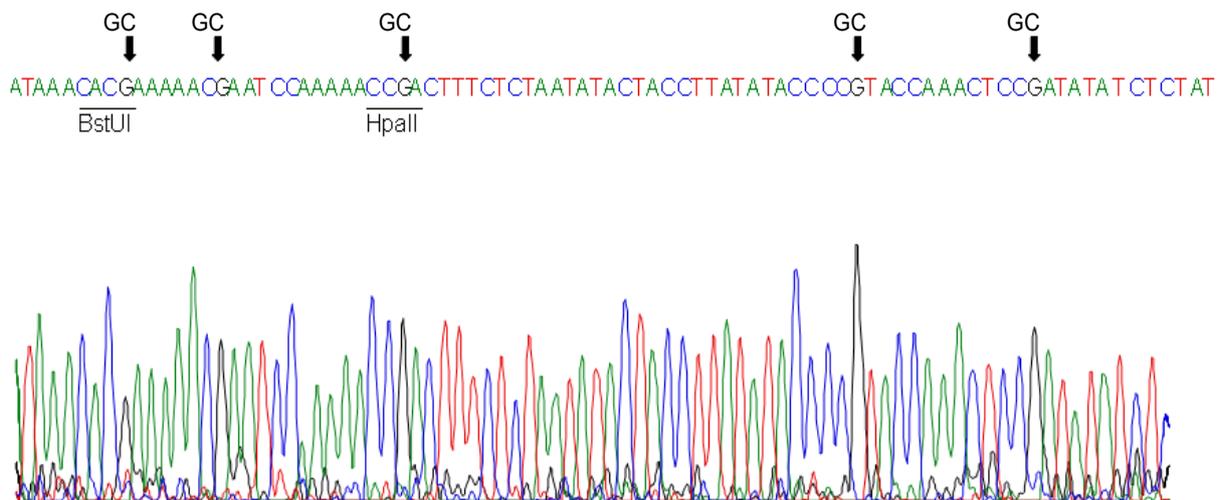


Abb. 3-27: Sequenzierung des reversen Strangs einer Tumor-DNA mit positivem Signal aus dem MTA-Versuch. Nach der Bisulfitbehandlung bleiben nur noch die Cytosine erhalten, die in der ursprünglichen Sequenz methyliert waren. Ein sequenziertes „C“ ist daher als 5-Methylcytosin zu lesen. Da der reverse Strang sequenziert wurde, entsprechen die hier gezeigten Guaninbasen den Cytosinen auf dem vorwärts-Strang. Sämtliche methylierten Cytosine sind durch einen Pfeil hervorgehoben. Zusätzlich eingezeichnet sind die Erkennungsstellen von *Bst*UI und *Hpa*II.

3.6 Methylierungsabhängige Transkriptionsregulation in niedriggradigen Astrozytomen und Gliomzelllinien

Im Agarosebild (Abb. 3-28) einer PCR von Glioblastomzelllinien mit Primern für *Rock1*, waren unterschiedlich starke Banden zu erkennen. Um zu zeigen, dass eine Hypermethylierung von Genpromotoren transkriptionssenkend wirkt, wurde für die identifizierten Kandidaten eine kompetitive RT-PCR Analyse durchgeführt.

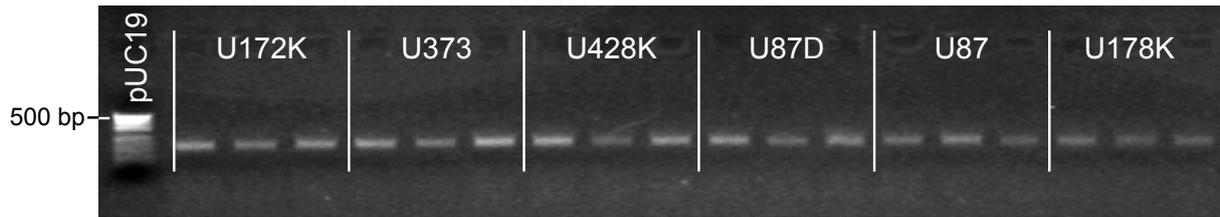


Abb. 3-28: Agarosegel der PCR von *Rock1* mit 6 Glioblastom-Zelllinien. Mit Hilfe dieser PCR sollte gezeigt werden, dass die entsprechende cDNA mit den ausgewählten Primern zuverlässig amplifizierbar ist.

Dazu wurde die PCR mit den Primern für *Rock1* mit der cDNA von 6 Normalgeweben durchgeführt (Abb. 3-29).

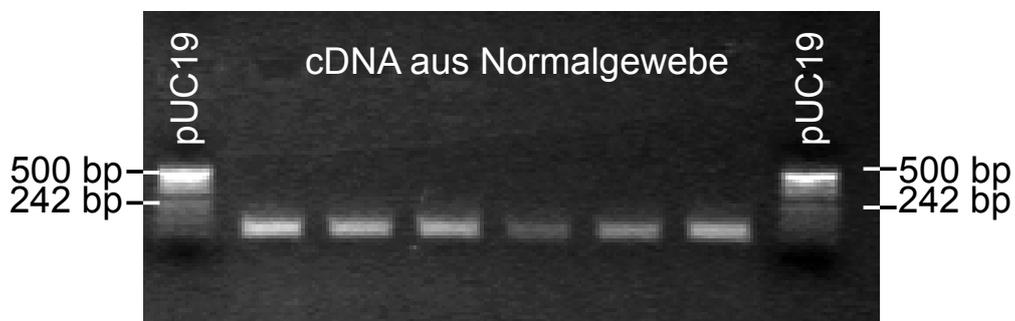


Abb. 3-29: PCR Amplifikation von *Rock1* verschiedener cDNAs. Die Banden wurden ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Die extrahierten Banden dienen als Template für die Herstellung des Standards.

Die auf diese Weise amplifizierten Produkte wurden vereinigt und als Template für eine PCR mit den jeweiligen Mutagenese-Primerpaaren (s. 2.1.6.2.3) eingesetzt und aufgereinigt (Abb. 3-30).

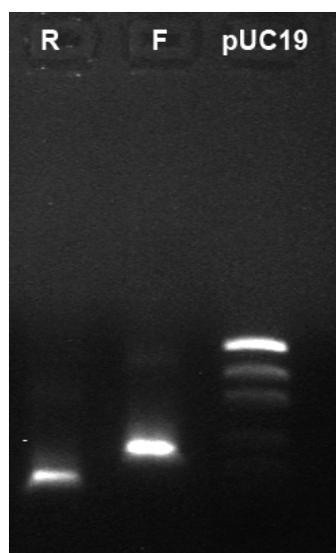


Abb. 3-30: Agarosegel der PCR zur Herstellung des cDNA-Standards, der später der cRT-PCR zutitriert wird. Das spezifische PCR-Produkt von *Rock1* (R) und *Folh1* (F) wurde aufgereinigt und auf ein Gel geladen.

Um den Titrationspunkt zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe mit jeweils 8 Schritten mit einer Verdünnung von 1:1000 (T1 – T8 entspr. $1:10^3$ – $1:10^{10}$) für beide Gene angefertigt. Damit die Produkte des Zielgens und des korrespondierenden cDNA-Standards bei der Analyse unterschieden werden konnten, wurde über die Primer eine kurze Deletion eingeführt, anhand derer es zu Laufunterschieden bei der Gelelektrophorese kommt. In der kompetitiven PCR wurde ein FAM-markierter Primer eingesetzt und je 1 µl des Standards zu jeweils der kompetitiven PCR mit einem Mix aus 4 Normalgewebe cDNAs hinzupipettiert. Je 1 µl des PCR-Produkts wurde 1:10 mit Genescan-Ladepuffer versetzt und im Sequenzierautomat analysiert. Der Punkt, an dem die Signale von Standard und Kompetitor die gleichen Intensitäten hatten, wurde als Titrationspunkt (Abb. 3-31) definiert, der als Ausgangspunkt für eine weitere Titration zur genaueren Bestimmung der Transkriptmenge diene. Der Ausgangspunkt für *FOLH1* (Abb.3-31) ist T5, also eine Verdünnung von $1:5 \cdot 10^7$. Für *Rock1* wurde der Titrationspunkt bei $1:5 \cdot 10^8$ bestimmt. Ausgehend von den ermittelten Titrationspunkten wurden weitere Verünnungsreihen jeweils 1:5 und 1:10 oberhalb und unterhalb des Titrationspunktes hergestellt. Diese Verdünnungsreihe diene der genaueren Bestimmung der Transkriptmenge im Titrationsbereich.

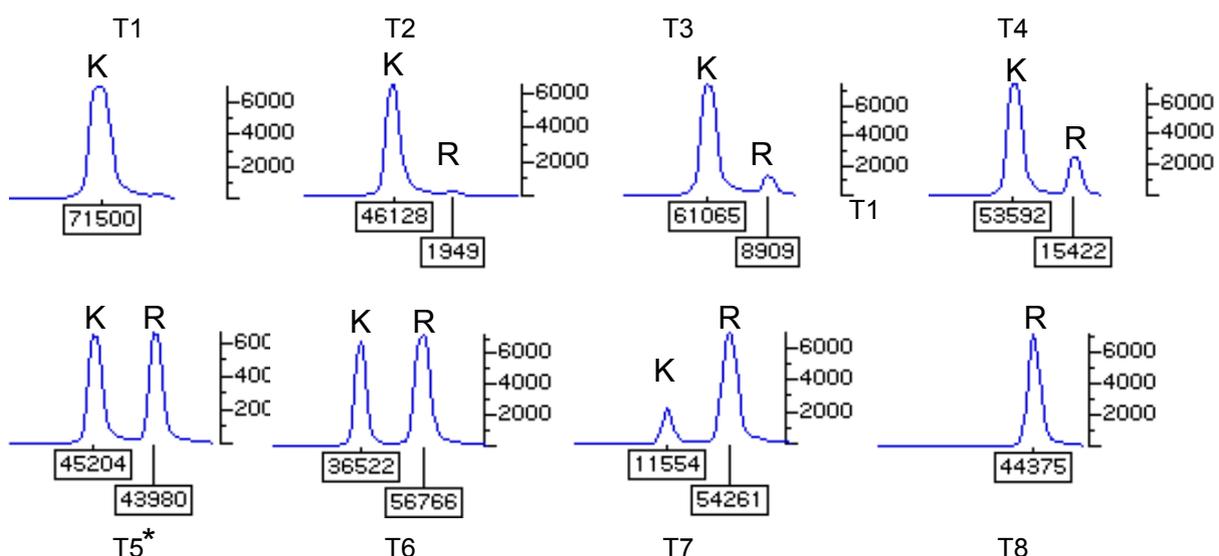


Abb. 3-31: Elektrogramm der PCR-Produkte von *Rock1* (R) und dem zutitrierten Kompetitor (K) mit Normalgewebe cDNA. Die mit (*) markierte Kurve stellt den Titrationspunkt dar, von dem ausgehend eine weitere Verdünnungsreihe angefertigt wurde.

Auf diese Weise wurden die Titrationspunkte der weiteren untersuchten Gene bestimmt (Tab. 3-11)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>FOLH1</i>	0,004	0,0054	0,012	0,013	0,096	0,11	1,0	55,8
<i>Rock1</i>	0	0,0423	0,146	0,288	0,98	1,48	4,7	44375

Tab. 3-11: Quotient der Flächen unter den Kurven aus Standard und endogenem PCR-Produkt zur Bestimmung des Titrationspunkts von *FOLH1* und *Rock1*. Die Titrationspunkte sind jeweils hervorgehoben.

3.6.1 cRT-PCR von *ROCK1* in niedriggradigen Astrozytomen

Nachdem der Titrationspunkt von *Rock1* im Normalgewebe bestimmt wurde, wurde die kompetitive RT-PCR mit jeweils 9 Astrozytomen WHO Grad II und 9 Astrozytomen WHO Grad III durchgeführt und mit dem Normalgewebe verglichen. Während die DNA im Normalgewebe wie erwartet ihren Titrationspunkt bei einer Verdünnung von $1:50 \cdot 10^6$ hat, ist der Titrationspunkt von *Rock1* bei 6 von 9 Astrozytomen WHO Grad II und bei 7 von 9 Astrozytomen WHO Grad III erst bei einer Verdünnung von $1:10 \cdot 10^9$ erreicht (Abb. 3-32). Für diesen Versuch wurde die gleiche Menge DNA von Normalgewebe und Tumor eingesetzt, so dass sich das Ergebnis als eine Verringerung der Transkriptmenge von *Rock1* an der gesamt cDNA-Menge verstehen lässt.

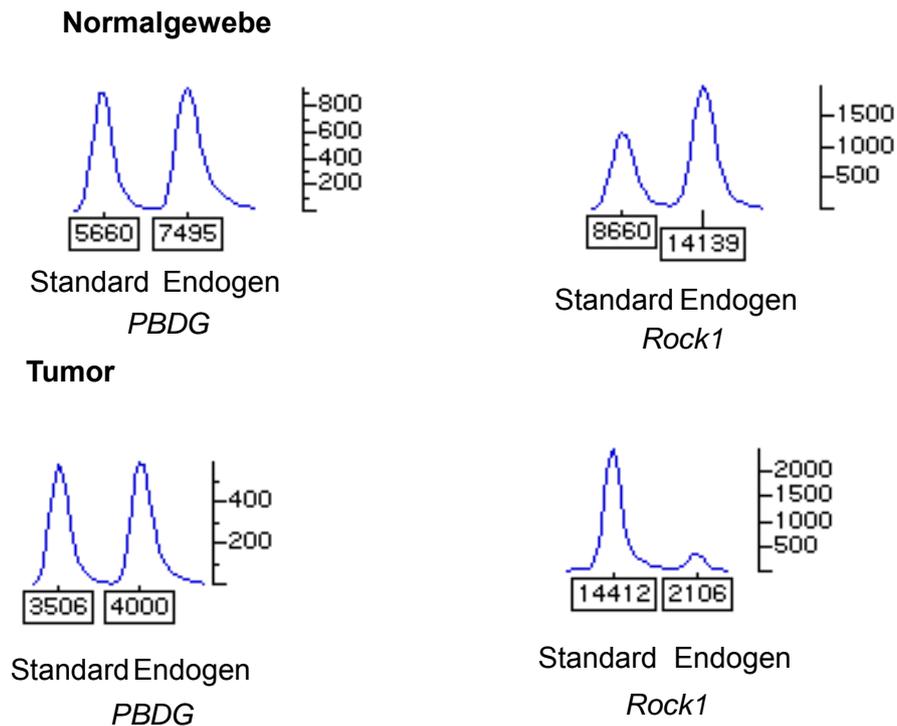


Abb. 3-32: Kompetitive RT-PCR von *Rock1* im Tumor und Normalgewebe. Bei gleicher Menge eingesetzter cDNA wird *Rock1* im Tumor weniger stark transkribiert.

Um zu überprüfen, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen Methylierung und verminderter Transkription von *Rock1* in Astrozytomen besteht, wurde für jeweils 9 Astrozytome WHO Grad II und WHO Grad III eine Bisulfit-Sequenzierung (Abb. 3-33) und Expressionsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 3-12 zusammengefasst.

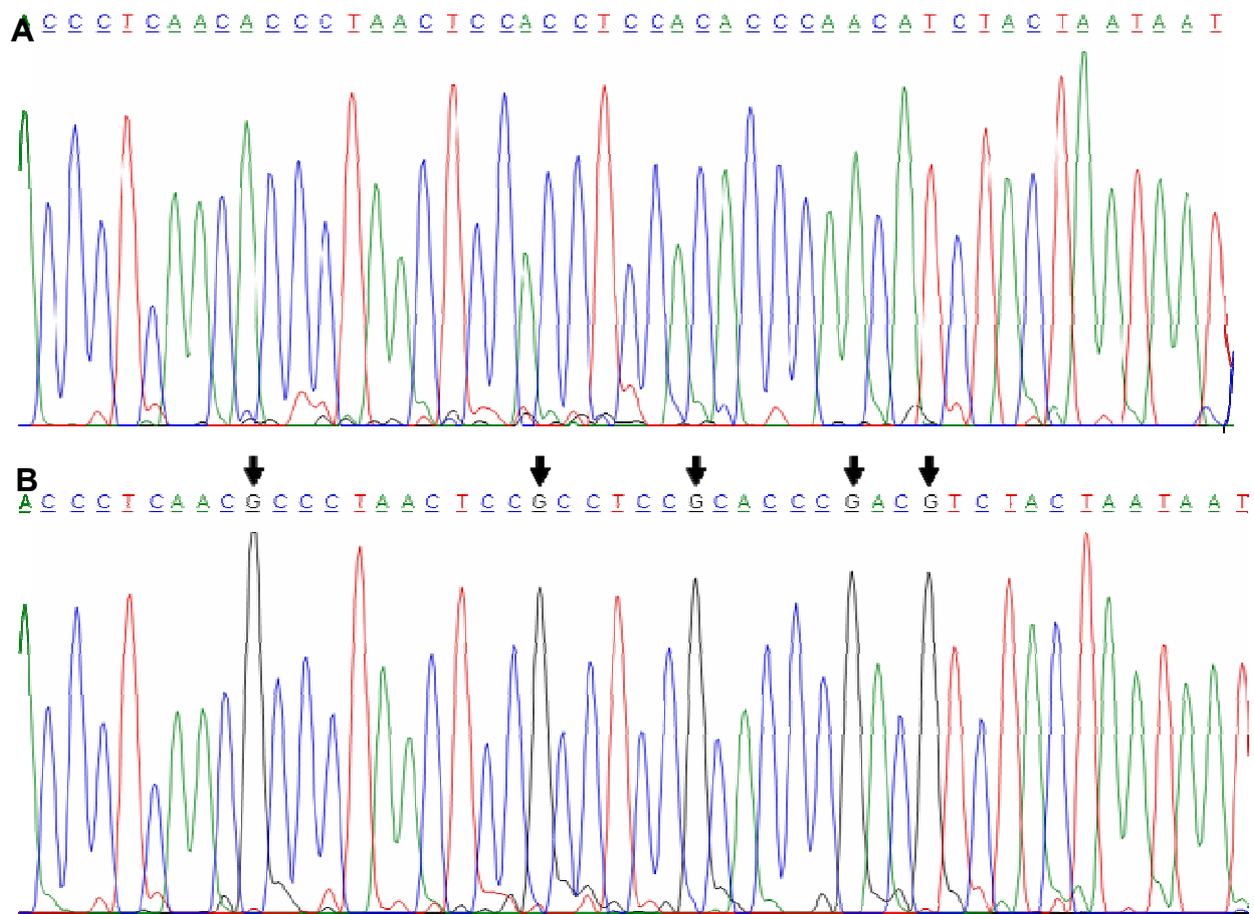


Abb. 3-33: Bisulfitsequenzierung von *Rock1*. (A) in der DNA aus Normalgewebe sind alle Cytosine unmethyliert. In der korrespondierenden Tumor-DNA eines Astrozytoms WHO Grad II (B) sind 5 CpG Dinukleotide methyliert. Die methylierten Cytosine sind durch Pfeile markiert.

Diagnose	Alter	Geschlecht	<i>Rock1</i> - methyliert	Expression
All	25	m	+	↓
All	44	m	-	↔
All	28	m	+	↓
All	38	f	-	↔
All	51	m	+	↓
All	32	m	-	↔
All	34	m	+	↓
All	37	f	+	↓
All	29	m	+	↓
All	34	m	+	↓
All	42	w	+	↓
All	48	w	-	↔
All	46	m	+	↓
All	25	m	-	↔
All	53	m	+	↓
All	52	m	+	↓
All	47	w	+	↓
WM	k.A.	k.A.	-	
WM	k.A.	k.A.	-	

Tab. 3-12: Zusammenfassung der Ergebnisse von Bisulfidsequenzierung und Transkriptionsänderung für das in niedriggradigen Astrozytomen untersuchte Gen *Rock1*

Da alle Tumoren mit der methylierten *Rock1*-Sequenz eine Senkung der Transkription von *Rock1* bei der kompetitiven RT-PCR zeigten, sollte im folgenden untersucht werden, ob die Transkription von *Rock1* tatsächlich durch Methylierung reguliert werden. Dazu wurden Gliomzellen mit Hilfe von 5-Aza-2-deoxycytidin *in vitro* demethyliert und die Transkription von *Rock1* vor bzw. nach der Demethylierung verglichen.

3.6.2 Re-Expression von *Rock1* nach Behandlung mit 5-Aza-2-deoxycytidin

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, dass besonders in den Astrozytomen WHO III eine verminderte Expression vorliegt, bei denen *Rock1* methyliert ist, sollte nun der kausale Zusammenhang, der zwischen Methylierung und transkriptioneller Inaktivierung besteht und zur Senkung der Transkriptionsmenge geführt

hat, untersucht werden. Hierzu wurden Gliomzellen mit 5-Aza-2-deoxycytidin behandelt um die genomische DNA zu demethylieren. Die unbehandelten Gliomzellen zeigten im Vergleich zum Normalgewebe eine um weit über das 1000fache reduzierte Transkriptmenge (Abb 3.34 oben). Nach der Behandlung von Zellen mit 5-Azacytidin konnte dieser Effekt rückgängig gemacht werden. Die von mir nachgewiesene Transkriptmenge betrug in den behandelten Zellen im Schnitt mehr als 90% der ursprünglichen Menge im Normalgewebe (Abb. 3-34 unten).

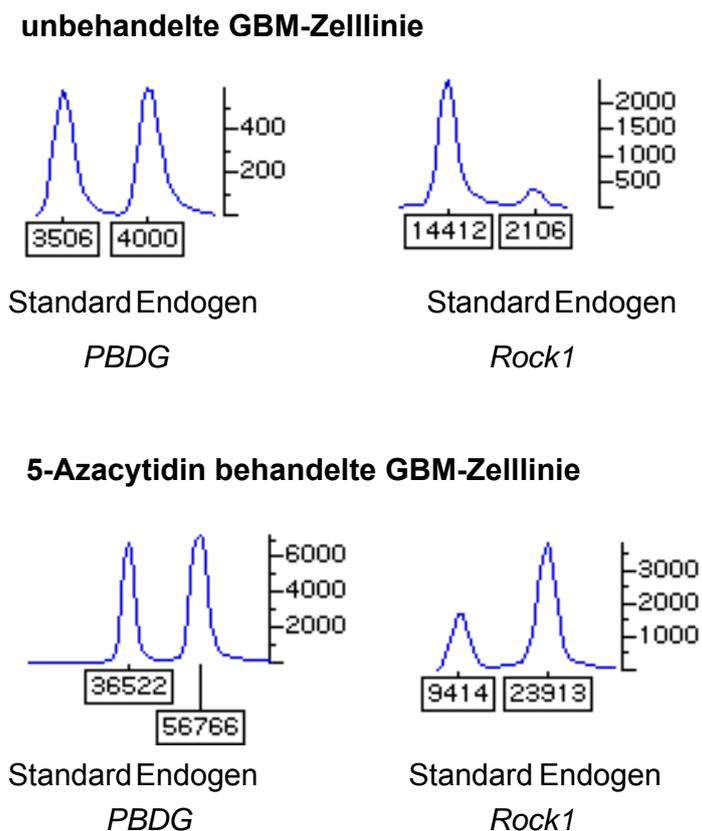


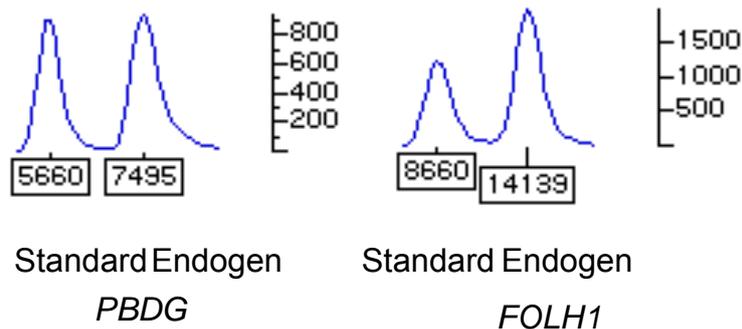
Abb. 3-34: Expressionsänderung von *Rock1* in unbehandelten und mit 5-Azacytidin behandelten Zelllinien. In den unbehandelten Zellen wird *Rock1* kaum transkribiert. Nach einer Behandlung der Zellen mit 5-Azacytidin erreicht die Transkriptmenge von *Rock1* fast wieder die ursprüngliche Transkriptmenge des Normalgewebes.

3.6.3 cRT-PCR von *FOLH1* in niedriggradigen Astrozytomen

Neben *Rock1* konnte auch das Gen der Folathydrolase (*FOLH1*) von mir mittels DMH in niedriggradigen Astrozytomen methyliert gefunden werden. Da *FOLH1* eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung des C1-Körpers für die Methylierung der DNA spielt, wurde der Einfluss der Methylierung auf die Transkription dieses Gens

untersucht. Der Versuch wurde analog zur Untersuchung der Transkription von *Rock1* an je 9 Astrozytomen Grad II und III untersucht. In allen untersuchten Tumoren konnte für *FOLH1* eine Reduktion der Transkription um den Faktor 1000 nachgewiesen werden. Diese Reduktion entspricht 2 Titrationsstufen. Die Titration des Transkripts ist in Abb. 3-35 gezeigt.

Normalgewebe



Tumor

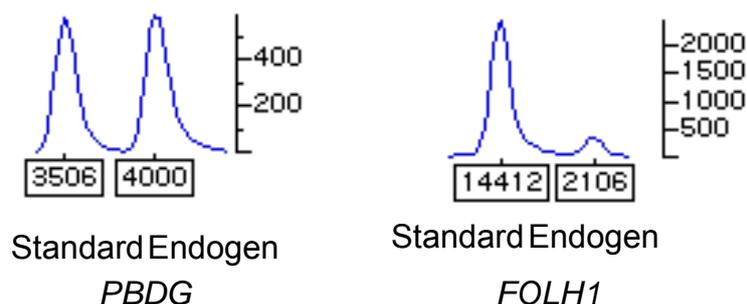


Abb. 3-35: Titrationspunkte von Normalgewebe und Astrozytomen für das Gen *FOLH1*. Während *FOLH1* im Normalgewebe der weißen Substanz stark exprimiert wird, ist die Expression von *FOLH1* im Tumor stark reduziert.

Um zu zeigen, dass die reduzierte Transkription mit der Methylierung von *FOLH1* korreliert, wurden die Tumore Bisulfit-sequenziert. Im Bisulfit-sequenzierten Normalgewebe konnten keine methylierten CpG Dinukleotide nachgewiesen werden. In den sequenzierten Tumoren, bei denen die kompetitive RT-PCR eine Transkriptionsminderung nachweisen konnte, sind hingegen mindestens 5 von 8 CpG Dinukleotiden methyliert (Abb. 3-36).

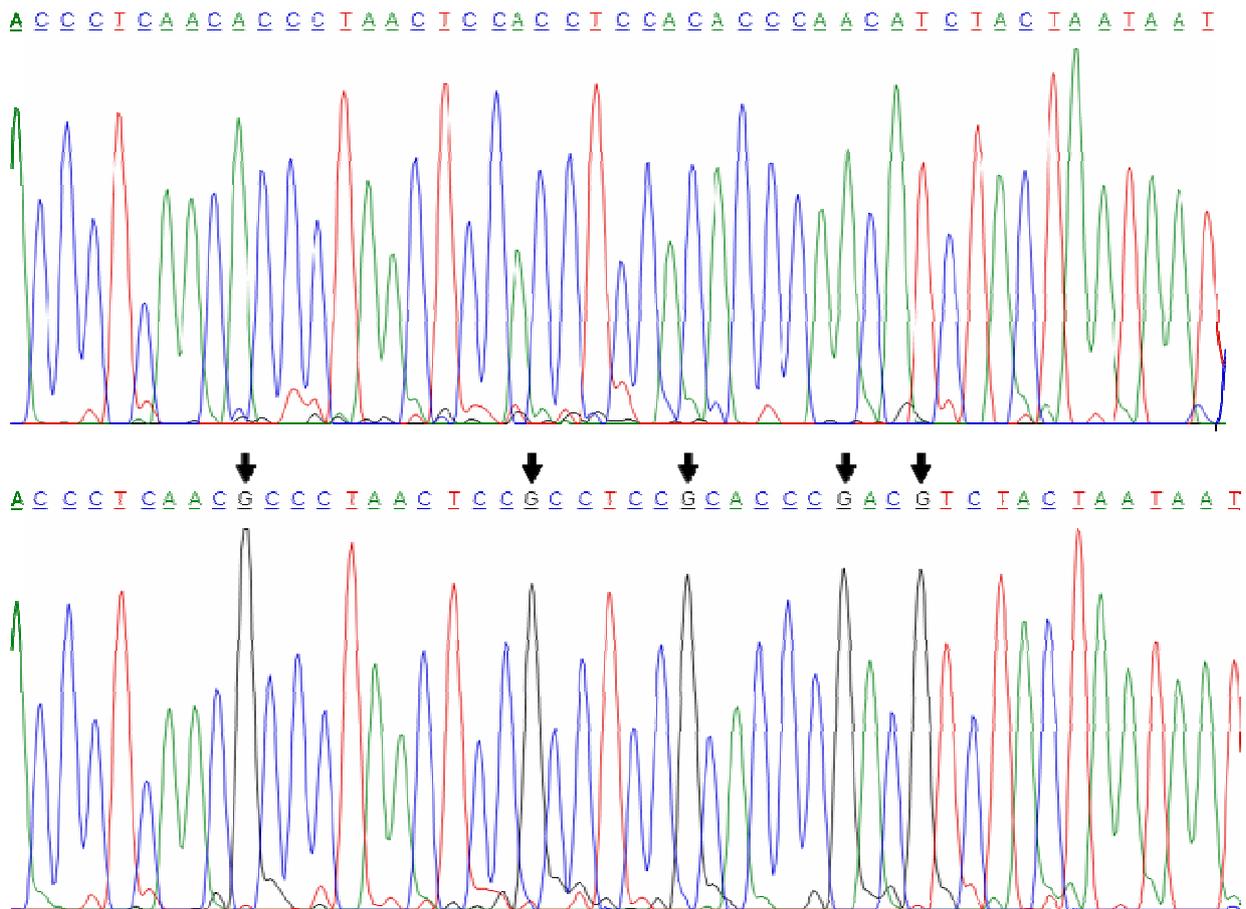


Abb. 3-36: Bisulfitsequenzierung von *FOLH1*. Im Normalgewebe (A) sind alle Cytosine unmethyliert. In der Tumor-DNA (B) sind mindestens 5 von 8 Cytosine methyliert worden (Pfeil).

Die Ergebnisse der Bisulfitsequenzierungen und der Expression von *FOLH1* sind in Tab. 3-13 zusammengefaßt.

Diagnose	Alter	Geschlecht	<i>FOLH1</i> -methyliert	Expression
All	25	m	+	↓
All	44	m	+	↓
All	28	m	+	↓
All	38	f	+	↓
All	51	m	+	↓
All	32	m	+	↓
All	34	m	+	↓
All	37	f	+	↓
All	29	m	+	↓
AllI	34	m	+	↓
AllI	42	w	+	↓
AllI	48	w	+	↓
AllI	46	m	+	↓

AIII	25	m	+	↓
AIII	53	m	+	↓
AIII	52	m	+	↓
AIII	47	w	+	↓
WM	k.A.	k.A.	-	
WM	k.A.	k.A.	-	

Tab. 3-13: Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung und der Expressionsanalyse an jeweils 9 Astrozytomen WHO Grad II und Grad III

3.6.4 cRT-PCR von *Odd-skipped-related (Osr2)* in niedriggradigen Astrozytomen

Ein weiterer interessanter Kandidat, der in der vorliegenden Arbeit identifiziert wurde, ist *Osr2*. *Osr2* ist ein DNA-bindendes Protein und wird in verschiedenen Tumorzelllinien nur schwach exprimiert. *Osr2* wurde 5 von 9 Astrozytomen WHO Grad II und 9 von 9 Astrozytomen WHO Grad III methyliert gefunden. Obwohl *Osr2* bisher nicht als Tumorsuppressorgen beschrieben wurde, macht die Beteiligung an der DNA-Replikation das Protein für die Tumorenstehung interessant. Für die untersuchten Tumoren wurde eine kompetitive RT-PCR durchgeführt und eine deutliche Transkriptsenkung nachgewiesen. Abb. 3-37 zeigt deutlich, dass die Transkriptmenge im Tumor weniger als ein Tausendstel dem Transkript im Normalgewebe entspricht. Wie schon bei den anderen untersuchten Genen in der vorliegenden Arbeit habe ich versucht, die Methylierung des Gens mit der verminderten Transkription zu korrelieren (Abb. 3-37).

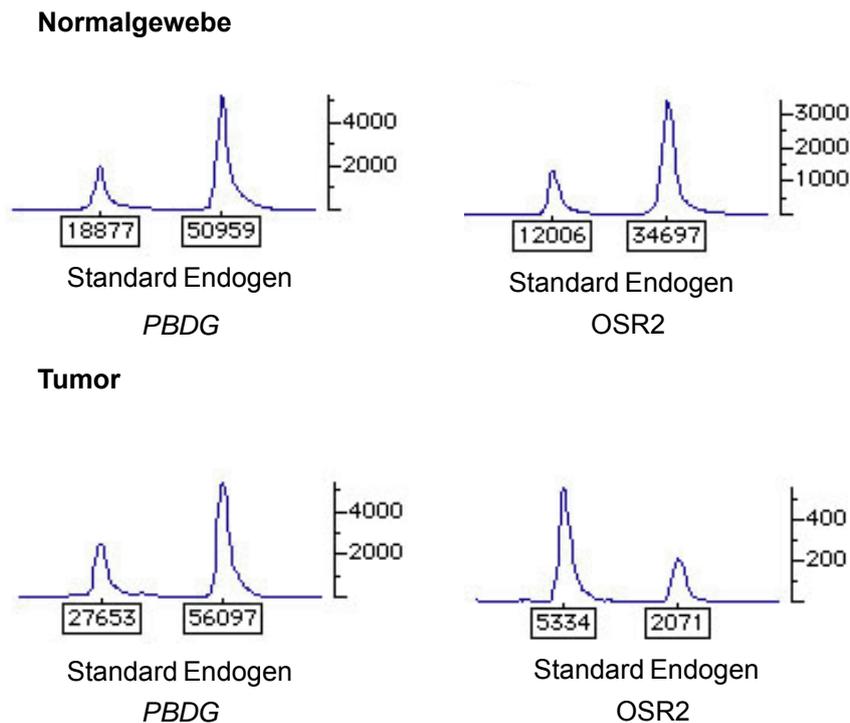


Abb. 3-37: für das Haushaltsgen beträgt der Quotient 2,7 im Normalgewebe und 2,1 im Tumor. Für das Zielgen *OSR2* ergibt sich für das Normalgewebe ein Quotient von 2,9 und im Tumor von 0,39. Beim Vergleich der Quotienten errechnet sich eine Transkriptionssenkung um den Faktor 1000.

Nachdem bei der Bisulfitequenzierung (Abb. 3-38) im Normalgewebe keine Methylierung gefunden wurde, wurde *Osr2* in den vorliegenden Astrozytomen auf seine Methylierung untersucht. Alle Tumoren, die eine reduzierte Expression von *Osr2* zeigten, waren in der Bisulfitequenz weitläufig methyliert (Tab. 3-14).

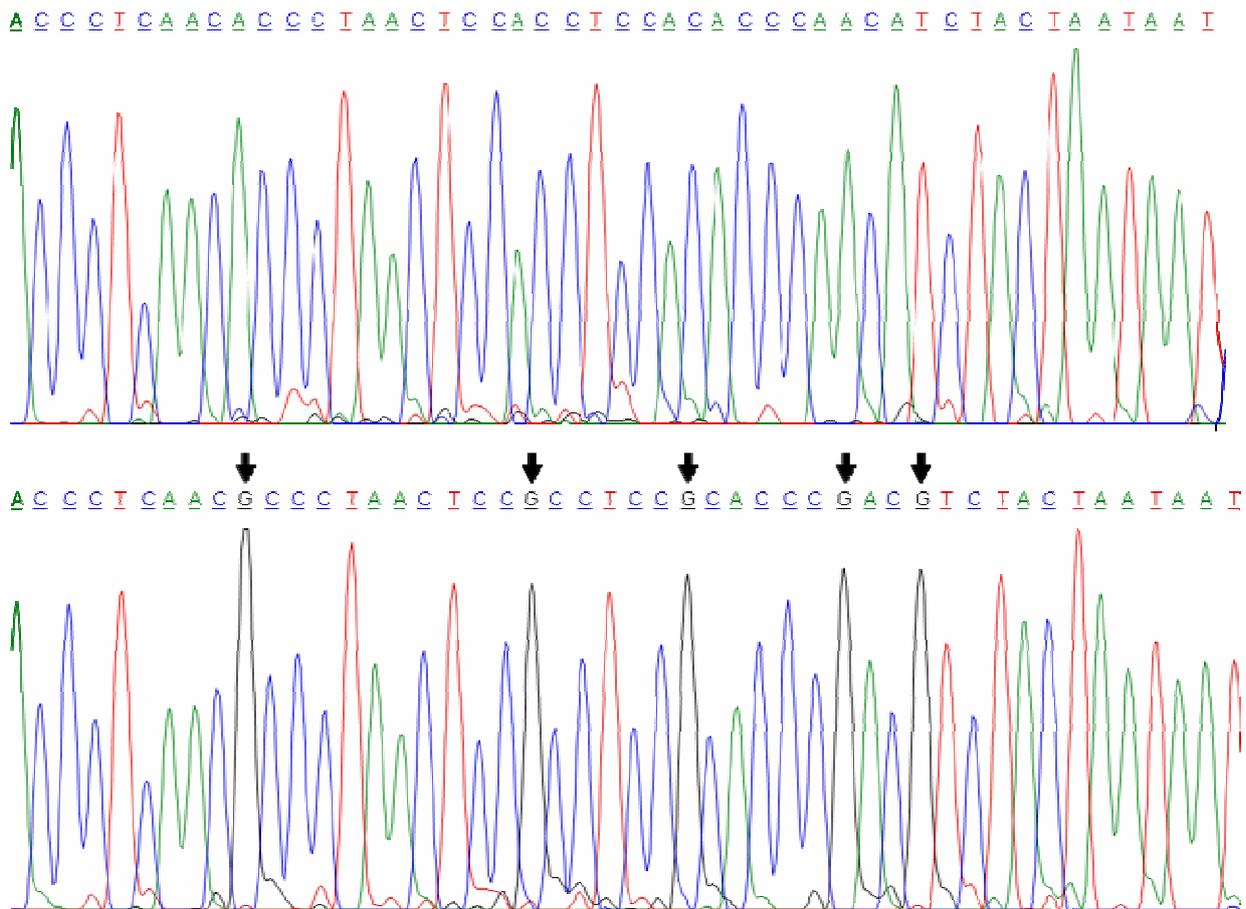


Abb. 3-38: Bisulfitsequenzierung von *Osr2*. (A) in DNA aus Normalgewebe (B) in der Tumor-DNA. In der gezeigten Sequenz sind 5 CpG-Dinukleotide methyliert (Pfeil).

Diagnose	Alter	Geschlecht	Osr2-methyliert	Expression
All	25	m	-	↔
All	44	m	+	↓
All	28	m	+	↓
All	38	f	+	↓
All	51	m	-	↔
All	32	m	+	↓
All	34	m	+	↓
All	37	f	+	↓
All	29	m	-	↔
All	34	m	+	↓
All	42	w	+	↓
All	48	w	+	↓
All	46	m	+	↓
All	25	m	+	↓
All	53	m	+	↓
All	52	m	+	↓
All	47	w	+	↓

WM	k.A.	k.A.	-	
WM	k.A.	k.A.	-	

Tab. 3-14: Eine Sequenz im Promotorbereich von *Osr2* wurde in insgesamt 18 Astrozytomen WHO Grad II und III Bisulfitsequenziert. In allen Tumoren konnte eine weitläufige Methylierung gezeigt werden. Das Ergebnis der Transkriptionsuntersuchungen zeigt, dass bei allen untersuchten Tumoren die Transkription von *Osr2* reduziert ist.

3.6.5 cRT-PCR von *PI3K-P101* in niedriggradigen Astrozytomen

Ein äußerst interessanter Kandidat, der mittels DMH in niedriggradigen Astrozytomen methyliert gefunden wurde, war die regulative Untereinheit *P101* der Phosphatidylinositol-3 Kinase. PI3K hat eine Schlüsselfunktion im AKT-Signalweg. In diesem Signalweg wirkt PI3K AKT-aktivierend. Die Aktivierung von AKT ist in vielen Tumorentitäten mit Tumorprogression assoziiert und verschlechtert die Prognose für den Patienten signifikant. Da *PI3K-P101* in allen DMH-untersuchten Tumoren methyliert war, wurde die Expression von *PI3K-P101* für niedriggradige Tumore von mir untersucht. Durch die kompetitive RT-PCR stellte sich heraus, dass die Expression von *PI3K-P101* in 5 der 9 untersuchten Astrozytome Grad II und in 7/9 Astrozytomen WHO Grad III um mehr als das 1000-fache reduziert war (Abb. 3-39). Ob diese Reduktion mit der Methylierung von *PI3K-P101* korreliert, wurde mittels Bisulfitsequenzierung von Normalgewebe und Tumor-DNAs untersucht (Abb. 3-40)

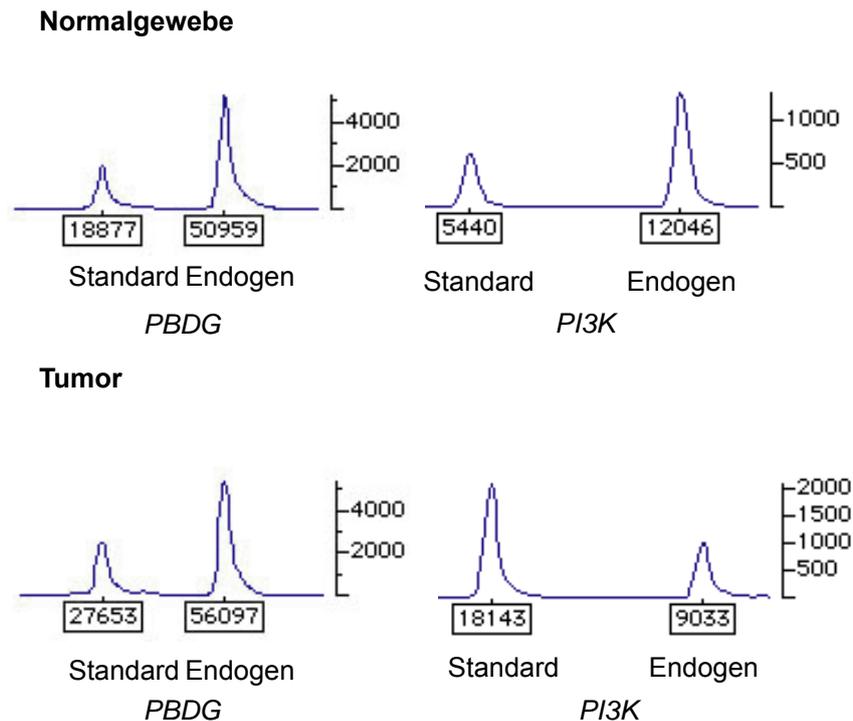


Abb. 3-39: Transkriptionsuntersuchung von *PI3K-P101* in niedriggradigen Astrozytomen. Im Normalgewebe Quotient Haushaltsgen im Normalgewebe 2,7; im Tumor 2,1. Zielgen im Normalgewebe 2,2; im Tumor 0,5

Die Expression von *PI3K-P101* in den untersuchten Astrozytomen ist stark reduziert. Um zu zeigen, dass diese Reduktion mit der erhöhten DNA-Methylierung der Sequenz assoziiert ist, wurde für die untersuchten Tumoren eine Bisulfitsequenzierung durchgeführt. Alle Tumoren mit reduzierter *PI3K-P101*-Transkription zeigten bei der Bisulfit-Sequenzierung viele methylierte Cytosin-Nukleotiden (Abb. 3-40).

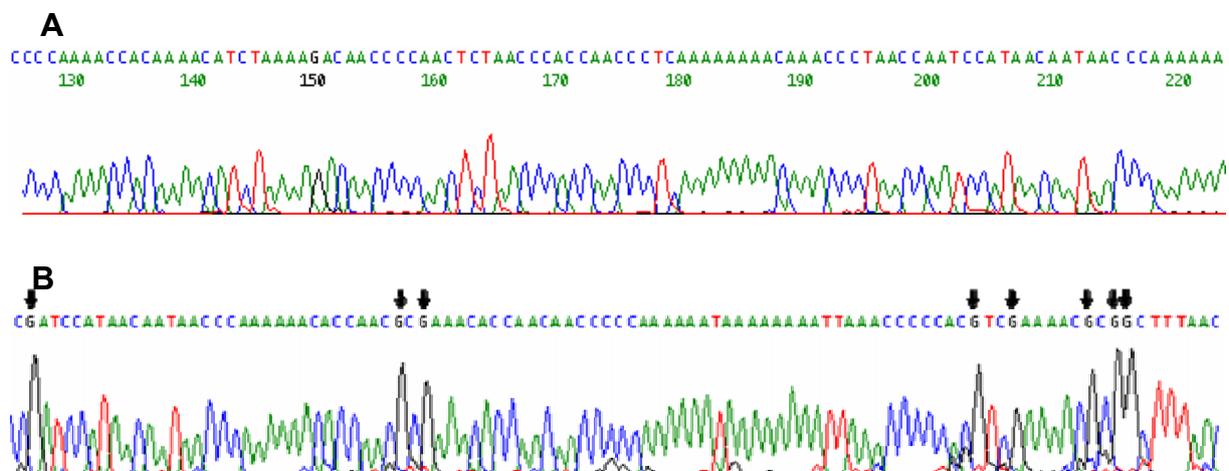


Abb. 3-40: Die Bisulfitsequenzierung von *PI3K-P101* im Normalgewebe (**A**) zeigt, dass alle CpG Dinukleotide methyliert sind. Im Tumor sind in der entsprechenden Sequenz (**B**) 8 CpG Dinukleotide methyliert.

Diagnose	Alter	Geschlecht	<i>PI3K-P101</i> - methyliert	Expression
All	25	m	+	↓
All	44	m	-	↔
All	28	m	+	↓
All	38	f	-	↔
All	51	m	+	↓
All	32	m	-	↔
All	34	m	+	↓
All	37	f	+	↓
All	29	m	-	↔
AIII	34	m	+	↓
AIII	42	w	+	↓
AIII	48	w	+	↓
AIII	46	m	+	↓
AIII	25	m	+	↓
AIII	53	m	+	↓
AIII	52	m	+	↓
AIII	47	w	+	↓
WM	k.A.	k.A.	-	
WM	k.A.	k.A.	-	

Tab. 3-15: Zusammenfassung der Ergebnisse von Bisulfit-Sequenzierung und Transkriptionsuntersuchung an 18 Astrozytomen.

4 Diskussion

Das Erscheinungsbild und das Verhalten von Zellen werden durch die Genexpression in der Zelle bestimmt. Das abnormale Verhalten von Tumorzellen kann durch quantitative und/ oder qualitative Veränderungen des aktiven Gensatzes verstanden werden. Lange Zeit wurden ausschließlich qualitative, also strukturell genomische Veränderungen zur Erklärung der Tumorigenese herangezogen. Das liegt vor allem daran, dass diese Veränderungen in der genomischen DNA konserviert bleiben, was die Identifizierung und Charakterisierung der korrespondierenden genetischen Veränderung ermöglicht hat. Zum anderen bestand das Problem darin, die epigenetische „Vererbung“ von Eigenschaften über mehrere Zellzyklen hinweg konzeptionell zu erfassen. Erst die Entdeckung der enzymatischen Übertragung von Methylgruppen auf das C-5 Atom von Cytosinresten und der damit verbundenen Inaktivierung von Genen lieferte das Gerüst zum Verständnis epigenetischer Ereignisse bei der Tumorentstehung [Yang et al., 1996]. DNA-Methylierung ist ein effektiver Mechanismus der zur Unterdrückung der Genaktivität führen kann, wie von mehreren Gruppen unabhängig gezeigt werden konnte [Razin et al., 1991; Yeivin & Razi, 1993; Kass et al., 1997]. Allerdings findet eine solche Regulation nur statt, wenn die Methylierung im Promotorbereich oder dem 1. Exon des Gens liegt [Jones, 1999]. Mechanistisch ist es aber nicht die Methylgruppe, die die Basenpaarung beeinflusst, sondern die erschwerte Protein – DNA-Interaktion an den Histonen [Razin & Riggs, 1980]. Der transkriptionshemmende Effekt, den 5-Methylcytosin in Promotorregionen verursacht, führte zu der Annahme, dass DNA-Methylierung die Bindungsaffinität von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren senkt [Clark et al., 1997; Prendergast et al., 1991]. Zusätzlich dazu wirken methylierungsabhängige, DNA-bindende Proteine wie das MDB-Protein [Zhang et al., 1986] als Repressoren der Transkription [Asiedu et al., 1994].

Viele Veränderungen der Methylierung in Tumorzellen sind nicht ursächlich an der Tumorigenese beteiligt, sondern stellen Begleiterscheinungen der Zellentartung und Zellalterung dar. Darüber hinaus ist die Frage, ob *de novo* Methylierung eines Promotors primär die Inaktivierung des Gens verursacht, oder nur die Inaktivierung, die durch einen anderen Mechanismus induziert wurde, fixiert. Aus zahlreichen Arbeiten an unterschiedlichen Tumorentitäten geht eindeutig hervor, dass die DNA

Methylierung und die konsekutive Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen eine bedeutende Rolle für die Tumorentstehung und -Progression spielt. So wurden bei Patienten mit Wilms-Tumoren abnormale Methylierungen im Promotor beider Allele von *H19* und eine verminderte Expression des Transkripts gefunden [Moulon et al., 1994; Steenman et al., 1994]. Außer bei Patienten mit Wilms-Tumoren wurden auch abnormale Methylierung von *Van-Hippel-Lindau (VHL)* bei Patienten mit dem VHL-Syndrom, sowie Hypermethylierung von *RB1* in unilateralen Retinoblastomen gefunden. Alle drei Gene werden als ursächlich für die Entstehung von Neoplasmen angesehen, daher kann die nachgewiesene verminderte Transkription dieser Gene durchaus als Beweis für die ursächliche Beteiligung der Methylierung an der Tumorentstehung verstanden werden [Gonzalzo et al., 1998; Ohtani-Fujita et al., 1993].

4.1 Differentielle Methylierungshybridisierung (DMH)

Während für späte hochmaligne Astrozytome bereits Informationen über strukturelle und epigenetische Veränderungen vorliegen, ist über niedriggradige Astrozytome sehr wenig bekannt. Um differentielle Methylierungsmuster bei diesen Tumoren genomweit zu detektieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die DMH angewendet, um die *de novo* Methylierung von Genen in niedriggradigen Astrozytomen zu untersuchen. Neben strukturell-genomischen Veränderungen tragen epigenetische Veränderungen der DNA entscheidend zur Entstehung von Tumoren bei. Aufgrund der Schwierigkeit, Normalgewebe zum Vergleich der Methylierung in niedriggradigen Tumoren zu bekommen, war bisher wenig über die frühen epigenetischen Ereignisse der Entstehung dieser Tumoren bekannt. Die DMH ist eine sehr zuverlässige Methode zur Identifikation differentieller Methylierung. So wurde in der vorliegenden Arbeit z.B für ZFP37 ein rotes Signal, entsprechend einer *de novo* Methylierung entdeckt. Bei der anschließenden Bisulfitsequenzierung der Tumor-DNA konnte jedoch keine ausgedehnte CpG Methylierung, sondern nur die Methylierung einer einzelnen *Bst*UI Schnittstelle nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt besonders deutlich die hohe Sensitivität der Methode, da die DMH in der Lage ist, den Unterschied eines einzigen methylierten Cytosins innerhalb der zu untersuchenden Sequenz zu detektieren, falls dieses Cytosin in der

Erkennungssequenz von der methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen *Bst*UI bzw. *Hpa*II liegt.

4.2 Methylierungs- Target-Array (MTA)

Nachdem mit der DMH an einem kleinen Tumorkollektiv genomweit nach Kandidatengenen gesucht wurde, die in niedriggradigen Tumoren methyliert vorliegen, sollte in der vorliegenden Arbeit eine Methode etabliert werden, die eine Methylierungsuntersuchung der Kandidatengene an einem größeren Tumorkollektiv erlaubt. Mit dem Methylation Target Array (MTA) steht erstmals eine solche Methode zur Verfügung. Lange Zeit war das wichtigste Mittel zur gezielten Methylierungsuntersuchung an großen Tumor-DNA Kollektiven die methylierungsspezifische PCR (MSP). Bei der MSP werden unterschiedliche Methylierungszustände durch Primer detektiert, die selektiv die modifizierten Sequenzen Bisulfit-behandelter DNA binden.

Da die MSP häufig falsch negative Ergebnisse liefert und der Aufwand zur Etablierung der Primer viel Zeit beansprucht, wurde ein Protokoll für ein Methylierungs-Target-Array etabliert, mit dem gleichzeitig bis zu 96 Tumor-DNA Proben in 4-facher Wiederholung untersucht werden können um schneller zuverlässige Aussagen über den Methylierungszustand spezifischer Gensequenzen in großen Tumorkollektiven treffen zu können. Ausgehend vom Originalprotokoll [Yan et al., 1998] wurde die Technik in der vorliegenden Arbeit so modifiziert, dass es möglich ist, die DNA nicht-radioaktiv zu markieren und dennoch ausreichend starke Signale für eine zuverlässige Auswertung zu erhalten. Da zum Einen nur wenig Ausgangsmaterial (DNA) der niedriggradigen Tumore zur Verfügung stand, wurde die MTA-Technik für die vorliegende Arbeit an Glioblastom-DNA etabliert. Zum Anderen sollte mit dieser Methode der Einfluß der Methylierung in höhergradigen Tumoren gezeigt werden. Damit die Ergebnisse der MTA zuverlässig ausgewertet und interpretiert werden konnten, habe ich mich im Rahmen dieser Arbeit zunächst darauf konzentriert, Gene, von denen der Methylierungszustand in Glioblastomen bekannt ist, zu untersuchen. Eine erste Hybridisierung wurde mit Cot-1 durchgeführt. Die Signalstärken der Cot-1 Hybridisierung sind zur Normalisierung der Signalstärken der eigentlichen Gensonden geeignet. Als Kontrollen wurden auch *Mse*I-Amplikons aus Blut-DNA ohne *Bst*UI/*Hpa*II-Verdau gespottet. Da die Signalstärke individuell den

gespotteten DNA-Mengen angeglichen werden können, bleibt das Array offen für Erweiterungen weiterer Tumorentitäten. Eine weitere Qualitätssicherung fand bei der Auswertung der Signale statt; damit nicht jedes beliebige Signal in die Auswertung einging, wurde ein Schwellenwert aus den Mittelwerten aller detektierten Signale gebildet. Nur Signale, die diesen Mittelwert plus die 3-fache Standardabweichung überschritten, wurden als positives Methylierungssignal angenommen. Aufgrund dieser strengen Kriterien wurden bei den untersuchten Genen in Glioblastomen nur wenige methylierte Tumor-DNAs identifiziert. Allerdings konnte die großflächige Methylierung der untersuchten Sequenzen diese Kandidaten sehr zuverlässig mittels Bisulfit-Sequenzierung bestätigt werden. Um zu zeigen, dass mit der MTA keine falsch-positiven Signale detektiert werden, wurde die gespottete Membran mit einer Sonde gegen *BRCA1* hybridisiert. Von *BRCA1* ist bekannt, dass die Expression in Mammakarzinomen über Methylierung reguliert wird; in Glioblastomen jedoch konnte eine solche Regulierung bisher nicht nachgewiesen werden. Keiner der untersuchten Tumoren zeigt ein signifikantes Methylierungssignal für *BRCA1*. Alle Signale bleiben weit unter dem Schwellenwert der Standardabweichungen. Die Hybridisierung mit *BRCA1* hat gezeigt, dass zumindest keine falsch-positiven Signale detektiert werden. Im nächsten Schritt wurde eine Sonde für *Chfr-1* generiert. Aus älteren Arbeiten ist bekannt, dass dieses Gen in höhergradigen Tumoren methyliert ist. Bei den von mir durchgeführten Hybridisierungen konnte in 14% der untersuchten Glioblastome eine Hypermethylierung von *Chfr-1* gezeigt werden. Nachdem die Ergebnisse der Hybridisierungen mit bekannten Genen die erwarteten Ergebnisse bestätigt hat, wurden die Glioblastom-DNAs mit einer Sonde gegen das durch DMH identifizierte Gen *Osr2* hybridisiert. Für *Osr2* konnte nur in 4% der untersuchten Glioblastome eine Hypermethylierung festgestellt werden. Scheinbar spielt eine Methylierung dieses Gens in primären Glioblastomen keine Rolle für die Tumorentstehung. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungen konnten die Signale ausgewertet werden, da es keine „Ausreißer“-Werte außerhalb der 1-fachen Standardabweichung gab. Die in dieser Arbeit etablierte nicht-radioaktive Markierung der DNA mit digUTP ermöglicht so bei einem geringen Verbrauch an DNA pro gespottetem Array eine sehr sensitive Nachweismethode für genspezifische Hypermethylierung.

4.3 Hypermethylierung als Inaktivierungsmechanismus von Genen

Verschiedene Tumorentitäten, vor allem Metastasen haben häufig einen im Vergleich zu anderen postnatalen Geweben niedrigen Gehalt an 5-Methylcytosin [Gama-Sosa et al., 1983], dennoch gibt es Bereiche der DNA, in denen der Anteil an 5-Methylcytosin stark erhöht ist. Die Veränderung des Methylierungsmusters zählt zu den epigenetischen Modifikationen, die für eine Reihe von Tumorsuppressorgenen in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben wurden. [Gregor et al., 1994; Herman et al., 1994, 1995; Wales-Makos et al., 1995]. Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten hypermethylierter Bereiche in den Promotorregionen der Gene *VHL*, *CDKN2A* und *HIC-1* mit einer verminderten Genexpression assoziiert ist [Herman et al., 1994, 1995; Wales-Makos et al., 1995]. Die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen fügt sich als Mechanismus sehr gut in das „2-hit-modell“ von Knudson ein, in dem gefordert wird, dass sich zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zwei distinkte Ereignisse („hits“) addieren müssen (siehe Einleitung). So bietet DNA-Methylierung neben Allelverlusten und Mutationen einen weiteren Erklärungsansatz für den Expressionsverlust von Tumorsuppressorgenen.

4.4 Hypermethylierung von Genen in Astrozytomen WHO Grad II

Aufgrund der Schwierigkeit Normalgewebe für den Vergleich der Methylierungsänderung des niedriggradigen Tumors zu bekommen sind bisher nur wenige Gene in Astrozytomen WHO Grad II bekannt, deren Expression durch Methylierung reguliert wird. In einer breit angelegten Methylierungsuntersuchung von anaplastischen Astrozytomen WHO Grad II an großen Patientenkollektiven [Yu et al., 2004] wurden 36 Kandidatengene untersucht. Bei diesem Kandidatengenansatz wurden nur 8 Gene gefunden, die zumindest in einem Teil der untersuchten Tumoren hypermethyliert waren. Zu den wenigen Genen, von denen bekannt ist, dass sie in niedriggradigen Tumoren epigenetisch reguliert sind, gehören *RASSF1A*, *p73* und *MGMT*. In weiteren Studien wurden weitere epigenetisch regulierte Gene, wie *DBCCR1* bzw. das Zelladhäsionsmolekül *PCDH- γ A11* [Yu et al., 2004; Beetz et al., 2005; Waha et al., 2005] beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnten zusätzliche Kandidaten mit tumorbiologisch relevanten Funktionen erstmals in Astrozytomen

WHO Grad II nachgewiesen werden. Nach der erfolgreichen Identifizierung dieser neuen potentiellen Kandidatengene wurde eine Auswahl der identifizierten Gene, von denen eine besondere Schlüsselfunktion für die Tumorentstehung angenommen werden kann, auf deren Expression hin untersucht.

4.4.1 Die Rho-assoziierte, coiled-coil Protein Kinase 1 (*Rock1*)

Bei den in dieser Arbeit mit Hilfe der DMH untersuchten niedriggradigen Astrozytome wurde bei den 8 untersuchten Patienten ein Methylierung von *Rock1* detektiert. Da sich die identifizierte Sequenz im Bereich bereits identifizierter CpG Inseln im Promotorbereich von *Rock1* befindet, wurde die Methylierung mittels Bisulfitsequenzierung an 5 weiteren niedriggradigen Astrozytomen untersucht. Wie auch in den schon bei der DMH positiv identifizierten Tumoren konnte in allen Tumoren eine ausgeprägte Hypermethylierung nachgewiesen werden. *Rock1* ist ein Effektor von Rho. Die GTPasen der Rho Familie (Rho, Rac and CDC42) haben eine etwa 30%ige Aminosäure-Sequenzhomologie mit anderen GTPasen und sind essentiell für RAS-induzierte maligne Transformationen wie ungehemmtes Wachstum und morphologische Veränderungen, die auf Störungen des Zytoskeletts zurückgehen. Der Rho-Signalweg ist einer der zentralen Signalwege für zelluläre Vorgänge, die das Actin-Zytoskelett betreffen. Die Aufrechterhaltung der Zellform, die Kontraktionsfähigkeit der Zelle, Adhäsion an das Substrat und an andere Zellen des Gewebes, Migration, Zytokinese und Membrantransport gehören zu den Eigenschaften, die auf diese Weise vermittelt werden. Darüber hinaus ist Rho auch an der Transkriptionsregulation beteiligt. All diese kritischen zellulären Funktionen benötigen die GTPase Funktion von Rho. Rho reguliert den Zusammenbau der Aktinfilamente und der SRF-vermittelten Gentranskription. Wird Rho aktiviert, stimuliert es einen Signalweg der eine entsprechende Reaktion des Zytoskeletts oder eine transkriptionelle Reaktion hervorruft. Diese Reaktion wird durch verschiedene Effektoren vermittelt. Einer dieser Effektoren ist *Rock1*. *Rock1* ist zusammen mit der Rho-Kinase für die Rho-vermittelte Bildung von Stressfasern verantwortlich. Wenn man das Zielprotein von *Rock1*, die LIM-Kinase in *Rock1*-defizienten Zellen überexprimiert, wird der ursprüngliche Phänotyp der Zelle wieder hergestellt [Sahai et al., 2001].

4.4.1.1 Korrelation der Hypermethylierung von *Rock1* mit reduzierter Expression und re-Expression nach Behandlung mit 5-Azacytidin

Da dem Rho-Signalweg eine wichtige Bedeutung für die Entstehung maligner Tumore zukommt, war es für diese Arbeit interessant, die Methylierung von *Rock1* mit der Menge an Transkript zu korrelieren. Dazu wurde an je 9 Astrozytomen WHO Grad II bzw. WHO Grad III eine kompetitive RT-PCR durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden die Transkriptmengen von *Rock1* in Normalgewebe mit denen in den Tumoren durchgeführt. Die Ergebnisse der kompetitiven RT-PCR zeigen deutlich eine Abnahme des *Rock1*-Transkripts in den methylierten Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe (Abb. 3-35). In der untersuchten Serie von 18 Astrozytomen wurden sowohl 6 Grad II- als auch in 7 Grad III Astrozytomen signifikante Unterschiede in der vorhandenen Transkriptmenge im Vergleich zum Normalgewebe gefunden. Die Transkriptmenge in den Tumoren betrug nur etwa ein Tausendstel der Menge im Normalgewebe. Das Ergebnis der in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsuntersuchung zeigt für *Rock1* den Zusammenhang von Promotormethylierung und reduzierter Transkription. Um zu zeigen, dass es sich bei der beobachteten verminderten Transkriptmenge wirklich um einen durch Hypermethylierung verursachten Effekt handelt, wurden in einem Zellkulturexperiment 6 unterschiedliche Glioblastomzelllinien sowohl unbehandelt als auch mit 5-Azacytidin kultiviert. Mit beiden Fraktionen der Zelllinien wurden kompetitive RT-PCRs durchgeführt. Die unbehandelten Zellen zeigten bei diesem Versuch im Durchschnitt nur etwa eine Transkription von 0,001% der Transkription von *Rock1* im Normalgewebe. Dieser Wert entsprach in etwa der Transkriptmenge in den niedriggradigen Astrozytomen. Bei 80% der mit 5-Azacytidin behandelten Zelllinien konnte in dieser Arbeit eine Wiederherstellung der ursprünglichen Transkriptmenge auf etwa 90% der Transkriptionsmenge im Normalgewebe gezeigt werden. Dieser Versuch beweist die regulatorische Abhängigkeit der Transkriptmenge von der Methylierung im Promotor von *Rock1*. Außerdem zeigt dieser Versuch die Bedeutung demethylierender Substanzen in der Tumorthherapie, denn durch die Behandlung der Zellen mit 5-Azacytidin konnte die ursprüngliche Transkriptmenge fast wieder erreicht werden.

4.4.1.2 Identifizierung differentiell methylierter Gene in einem Migrations-Assay

Die Fähigkeit in normales Gehirngewebe zu infiltrieren ist charakteristisch und von besonderer klinischer Bedeutung für alle Astrozytome. Daher ist es nur selten möglich, alle Tumorzellen operativ zu entfernen. Der Verbleib von Tumorzellen, die in das normale Gehirngewebe eingewandert sind, und ihre starke Tendenz zur malignen Progression resultieren in einer schlechten Prognose für Astrozytom-Patienten. Das Invadierungspotential von Tumoren umfasst die Aktivierung von Zellen, die Veränderung der Adhäsivität der extrazellulären Matrix, die veränderte Ausprägung von Adhäsionsmolekülen und den Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix durch die Sekretion von Proteasen. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben den bekannten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, auch physiologischer Stress, wie Hypoxie [Brahimi-Horn et al., 2003; Wousters et al., 2003; Acker & Plate, 2004] und eine mangelhafte Vaskularisation [Barhimi-Horn et al., 2001] auf das Gen-Expressionsverhalten von Tumorzellen einwirken und zum infiltrierenden Wachstum der Tumorzellen beitragen. Die molekularen Ursachen der Astrozytom-Invasion sind bis heute weitgehend unverstanden, allerdings konnte in Tumoren und abgeleiteten Zellen anderer Gewebe die Methylierung zahlreicher Gene wie *Cadherine*, *Laminine* [5, 2, 3], *Maspin* (Ser Protease Inhibitor), *TFPI-2* (Tissue factor pathway inhibitor-2), *TIMP3* (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3), *uPA* (Urokinase plasminogen activator) und *MMP* (Matrix Metalloproteinases) mit der Invasion bzw. Metastasierung assoziiert werden. Darüber ist bekannt, dass die Behandlung von Tumorzellen mit Inhibitoren der DNA-Methylierung einen Einfluss auf das Invasionsverhalten von Tumorzellen hat. Neben *PCAD-γA11* [Waha et al., 2005] wurde in der vorliegenden Arbeit mit *Rock1* ein weiteres, an der Zellmotilität beteiligtes Gen als hypermethyliert identifiziert. Um funktionelle Hinweise auf die Migrationsfähigkeit kultivierter Gliomzellen zu erlangen, wurde in dieser Arbeit ein Migrationsassay mit den von mir kultivierten primären Gliomzellen durchgeführt. Dieser Assay hat dazu beigetragen weitere tumorrelevante Gene zu identifizieren, die mutmaßlich an der Ausbildung der Migrationsfähigkeit beteiligt sind. Das interessanteste Kandidatengen, das bei diesem Versuch identifiziert wurde, ist *Caveolin-1*. Caveolin -1 spielt eine wichtige Rolle bei der onkogenen Transformation von Zellen im Besonderen bei der Metastasierung. Für Mammakarzinome und aus Tierversuchsexperimenten mit *Caveolin-1^{-/-}* Mäusen ist bekannt, dass Caveolin-1 als

negativer Regulator der Transformation von Zellen wirkt. Dass Cav-1 ausschließlich in der migrierten Fraktion der Zellen methyliert ist, lässt vermuten, dass Cav-1 auch bei dem Erwerb der Migrationsfähigkeit von Gliomzellen eine übergeordnete Rolle spielt.

4.4.2 Die regulatorische Untereinheit P101 der Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase (PI3K-P101)

Bei der Progression von Gliomen kommt es zur Deregulation unterschiedlicher Signalwege, zum Beispiel zu Amplifikationen und/oder Überexpression von Genen der Rezeptor Tyrosinkinase (RTK) wie *EGFR* und *PDGFR*. Ebenso ist häufig eine Aktivierung der RAS-MAPK und des PI3K-AKT Signalwegs zu beobachten [Zhu & Parada, 2002]. Häufig geht die Tumorprogression mit der Aktivierung von AKT einher [Sonoda et al., 2001]; in vielen menschlichen Tumoren sind darüber hinaus verschiedene Komponenten des AKT Signalwegs verändert [Vivanco & Sawyers, 2002]. Zusätzlich zu Veränderungen in RTK und PTEN ist die Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) eindeutig an der Onkogenese beteiligt. PI3K ist ein Heterodimer, das sich aus einer katalytischen Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit zusammensetzt [Vivanco & Sawyers, 2002] und mittels Phosphorylierung AKT aktiviert. Die Aktivierung von AKT verhindert den Eintritt in das Apoptoseprogramm durch Inhibierung von Bad, Caspase9 und AFX. Darüber hinaus wird über den Ras-Signalweg indirekt auch die Rho-Signalkaskade reguliert. In menschlichen Glioblastomen ist eine Aktivierung von AKT in über 80% der Tumoren bekannt [Holland et al., 2000], wobei Mutationen im *PTEN* Gen nur in etwa 20-40% der Fälle bekannt sind [Li et al., 1997; Rasheed et al., 1997; Duerr et al., 1998; Schmidt et al., 1999]. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass es neben PTEN noch weitere Aktivatoren für AKT in Tumoren mit einem intakten *PTEN* Gen gibt. Die EGFRvIII Mutante aktiviert den AKT Signalweg bei intaktem PTEN [Choe et al., 2003] und in EGFRvIII transformierten Zellen ist das PI3K-AKT Signal konstitutiv aktiviert [Moscatello et al., 1998]. Aktiviertes AKT wirkt auf mehrere Zielproteine wie MDM2, BAD, NF- κ B und mTOR. Dadurch bewirkt AKT Wachstum, Überleben und Proliferation der Zelle [Vivanco & Sawyers, 2002; Cantley, 2002]. Genetische Veränderungen von PI3K konnten für viele Tumorentitäten dokumentiert werden:

Erhöhte PI3K Aktivität wurde sowohl für Mutationen in den regulatorischen [Philip et al., 2003] sowie auch in den katalytischen Untereinheiten [Samuels et al., 2004] gezeigt. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels differentieller Methylierungs-Hybridisierung gezeigt werden, dass *PI3K-P101* in allen DMH-untersuchten niedriggradigen Astrozytomen methyliert ist. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde eine Bisulfitsequenzierung der untersuchten DNAs durchgeführt. Anschließend wurde die Transkription von *PI3K-P101* in den untersuchten Tumoren mit der Transkriptmenge in normalem Gehirngewebe verglichen.

4.4.2.1 Korrelation von Hypermethylierung mit reduzierter Expression von *PI3K-P101*

In den mit Hilfe der DMH untersuchten niedriggradigen Astrozytomen war *PI3K-P101* in den 8 untersuchten Patienten-DNAs hypermethyliert. Da bekannt ist, dass PI3K in anderen Tumoren ursächlich an der Onkogenese beteiligt ist, sollte für die regulatorische Untereinheit P101 des *PI3K* Gens eine Untersuchung der methylierungsbedingten Transkriptionsregulation an niedriggradigen Astrozytomen durchgeführt werden. In 5 von 9 untersuchten Astrozytomen WHO Grad II und in 7 von 9 untersuchten Astrozytomen WHO Grad III war die Transkriptmenge um etwa den Faktor 1000 niedriger als im Normalgewebe. Bei P101 handelt es sich um eine bisher kaum charakterisierte regulatorische Untereinheit von PI3K. Es ist bekannt, dass häufig Mutationen in den regulatorischen Untereinheiten der PI3K zu einer verstärkten Aktivierung von AKT führen können und dass AKT die maligne Transformation der Zelle fördert [Vivanco & Sawyers, 2002; Cantley, 2002]. In der vorliegenden Arbeit konnte dabei zum ersten Mal gezeigt werden, dass bei niedriggradigen Astrozytomen, neben den für andere Tumorentitäten beschriebenen strukturell-genetischen Veränderungen, auch Methylierung an der Regulation von PI3K und somit am AKT-Signalweg beteiligt sein kann. Der in dieser Arbeit gezeigte epigenetische Mechanismus zur Regulation der Transkriptmenge von *PI3K-P101* verdeutlicht die zentrale Rolle und die unterschiedlichen Wege, die zu einer Aktivierung von AKT führen und deren unmittelbare Bedeutung für die Tumorprogression.

4.4.3 Das Odd-skipped related Gen (*Osr2*)

Ein weiterer interessanter Kandidat, der in der vorliegenden Arbeit identifiziert wurde, ist *Osr2*. *Osr2* ist ein DNA-bindendes Protein und wird in verschiedenen Tumorzelllinien nur schwach exprimiert. *Osr2* wurde in 5 von 9 Astrozytomen WHO Grad II und 9 von 9 Astrozytomen WHO Grad III methyliert gefunden. Obwohl *Osr2* bisher nicht als Tumorsuppressorgen beschrieben wurde, macht die Beteiligung an der DNA-Replikation das Protein für die Tumorenstehung interessant. Bis heute ist wenig über die genaue Funktion von *Osr2* bei der Replikation bekannt, allerdings wurde dieses Gen in der vorliegenden Arbeit untersucht, da es häufig auch in höhergradigen Tumoren im Zusammenhang mit Hypermethylierung identifiziert wurde.

4.4.3.1 Korrelation von Hypermethylierung mit reduzierter Expression von *Osr2*

Wie schon für die Gene, die an der Zellmotilität beteiligt sind, wurde auch für *Osr2* eine cRT-PCR Untersuchung durchgeführt. Das Ergebnis zeigte bei 5 Astrozytomen Grad II und allen Astrozytomen Grad III für *Osr2* eine deutliche Senkung der Transkriptmenge um etwa den Faktor 1000 im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe. Auch hier deuten die Ergebnisse deutlich auf eine methylierungsabhängige Regulation der Transkription hin. Da die Funktion von *Osr2* noch weitgehend unbekannt ist, muss die Bedeutung dieses Befunds durch geeignete Überexpressions und *knock-out*-Versuche gezeigt werden.

4.4.4 Die Bedeutung der Folathydrolase (*FOLH1*) für die Tumorentstehung

Der C1-Metabolismus ist in zwei Zweige unterteilbar. Ein Zweig führt zur Synthese der Purine und Thymidine. Der zweite Ast führt zur Synthese von Methionin und s-Adenosylmethionin (SAM) für die Proteinsynthese und die Polyaminsynthese sowie Methylierungsreaktionen. Folsäure-arme Ernährung führt zu genomweiter Hypomethylierung in Mäusen [Zapisek et al., 1992; Wainfan et al., 1989; Wainfan et

al., 1992; Dizik et al., 1991; Christman et al., 1993; Pogribny et al., 1995] sowie zu spezifischer Hypomethylierung von *p53* [Pogribny et al., 1995; 1997]. Diese Befunde führten zu der Annahme, dass die Entwicklung hepatozellulärer Karzinome mit Methyl-defizienten Diäten assoziiert ist [Zapisek et al., 1992; Wainfan et al., 1989; Wainfan et al., 1992; Dizik et al., 1991; Christman et al., 1993; Pogribny et al., 1995]. Bei Versuchen am Menschen konnte gezeigt werden, dass verminderte orale Gabe von Folsäure zu einer Hypomethylierung in Leukozyten führt [Jakob et al., 1998; Rampersaud et al., 2000]. Verschiedene andere Studien am Menschen zeigten eine positive Korrelation von Methylierungsstatus in Colonzellen und dem Folsäuregehalt im Blutserum [Pufulete et al., 2003]. Andere Studien führten sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen zu dem paradoxen Befund, dass neben umfangreichen Verlusten der DNA-Methylierung selektiv Promotorregionen hypermethyliert wurden [van Engeland et al., 2003; Fowler et al., 1998]. Das Gen *FOLH1* ist Teil dieses biochemischen Wegs der C1-Abspaltung von Folsäure. Daher kommt *FOLH1* eine große Bedeutung im Zusammenhang mit der Regulation der Gentranskription durch Methylierung zu.

Nicht nur ein Folsäuremangel, sondern auch eine verminderte Expression und Funktionalität der prozessierenden Enzyme kann zu einem C1-Mangel für die DNA-Methylierung führen. Die Tatsache, dass ein Schrittmacher Enzym für die Bereitstellung von Methylgruppen zur DNA-Methylierung selbst durch diese reguliert wird, deutet auf einen neuen autoregulatorischen Mechanismus hin, der unter physiologischen Bedingungen den genomweiten Methylierungszustand aufrechterhält.

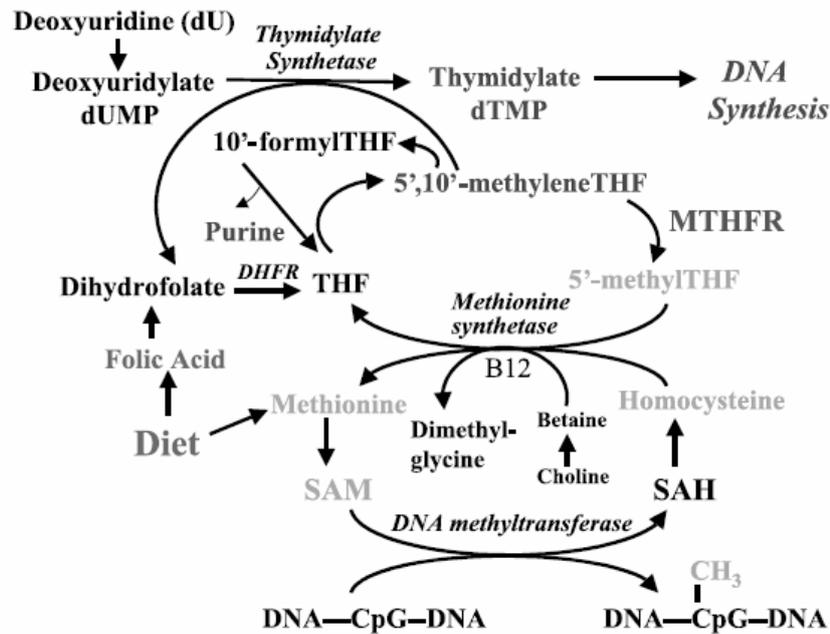


Abb. 4-1: Der C1-Körper der für die DNA-Methylierung benötigt wird, stammt aus dem Folsäurestoffwechsel. Das Enzym FOLH1 ist dabei an der Abspaltung der Methylgruppe beteiligt und stellt somit den C1-Körper zur Verfügung, der anschließend durch die DNA-Methyltransferasen von SAM auf die DNA übertragen wird.

4.4.4.1 Korrelation von Hypermethylierung mit reduzierter Expression von *FOLH1*

Das mit Hilfe der DMH identifizierte Gen *FOLH1* lag in allen 8 untersuchten Tumoren hypermethyliert vor. Die ausgedehnte Methylierung der untersuchten Promotorregion wurde mit Hilfe der Bisulfitsequenzierung bei allen untersuchten Patienten nachgewiesen. Um zu zeigen, dass die Methylierung des Gens sich auch auf die Menge des vorhandenen Transkripts auswirkt, wurde eine kompetitive RT-PCR durchgeführt. In allen untersuchten niedriggradigen Tumoren konnte eine signifikante Senkung der Transkriptmenge nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass in einem großen Teil der Tumoren auch die Transkriptmenge von *FOLH1* im Vergleich zum Normalgewebe stark reduziert ist. Wie schon in anderen Arbeiten gezeigt wurde, korreliert eine verminderte Menge bereitgestellter Methylgruppen nicht unbedingt mit einer genomweiten Hypomethylierung und der damit verbundenen genomischen Instabilität. Vielmehr scheint es so zu sein, dass eine Abweichung der bereitgestellten Menge an Methylgruppen aus dem Folsäurestoffwechsel zu einer unkoordinierten Methylierung in der Zelle führt, die sich einerseits in Hypomethylierungen bestimmter DNA-Regionen und andererseits auch in einer

starken Hypermethylierung von Genen manifestiert. Betrachtet man das Ergebnis der vorliegenden Arbeit in Bezug auf ältere Studien, die sich mit dem Zusammenhang von vorhandenen Methylgruppen und der tatsächlichen Methylierung beschäftigen, erscheint die hier gezeigte methylierungsabhängige Inaktivierung von *FOLH1* als anteilig ursächlich an einer weiteren Disregulation der DNA-Methylierung beteiligt zu sein. Alle Befunde zum Folsäuremangel belegen, dass sie eine unmittelbare Auswirkung auf die DNA-Methylierung haben. Selbst wenn die Auswirkungen eines Folsäuremangels zur Zeit noch nicht eindeutig geklärt sind, da es keine eindeutige Tendenz zu entweder folsäureabhängiger Hypo- oder Hypermethylierung gibt, scheint es doch gesichert, dass ein C1-Mangel in der Zelle die zuverlässige Aufrechterhaltung der Methylierungsmuster negativ beeinflusst.

4.4.4.2 Mögliche Ursachen für aberrante Transkriptionsregulation

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene *Rock1*, *FOLH1*, *Osr2* und *PI3K* wurden in der Mehrzahl der in dieser Arbeit untersuchten niedriggradigen und anaplastischen Astrozytomen als methyliert identifiziert. Diese Hypermethylierung konnte im Einzelnen quantitativ mit Hilfe der Bisulfitsequenzierung dokumentiert werden, und die Auswirkung der Methylierung auf die Transkriptmenge war für die untersuchten Gene eindeutig. Bei einem geringen Teil der Tumoren war trotz dieser Ergebnisse auf cDNA-Ebene keine Transkriptionsregulation nachweisbar. Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass die Genexpression nicht allein vom Promotor gesteuert wird, sondern auch durch Enhancer, also genregulative Elemente der DNA, die sowohl an den 5'- und 3'-Enden des Gens, als auch in Intronen liegen können. Enhancer regulieren die Genexpression oft über sehr große Entfernungen vom Promotor weg, in dem sie über die Ausbildung komplexer Sekundärstrukturen in die unmittelbare Nähe des kontrollierten Gens gelangen. Eine weitere Erklärung für eine unverminderte Transkription des Gens trotz starker Methylierung im Promotor könnte sein, dass das untersuchte Gen in mehreren Kopien vorliegt und sich die nachgewiesene Methylierung in einer der Kopien nicht auf die Gesamttranskriptionsrate auswirkt. Von einigen Genen ist bekannt, dass sie unter der Kontrolle von komplexen Promotoren stehen, das heißt, dass es mindestens zwei unterschiedliche Promotorregionen gibt, deren Kontrolle die Genexpression unterliegt. Da sich die untersuchten Bereiche immer auf eine Größe von 150 – 350

bp beschränken, kann man keine Aussage über den Methylierungszustand der Bereiche vor oder hinter dem untersuchten Fragment machen. Es ist also durchaus möglich, dass sich eine funktionell aktive Minimalpromotorsequenz außerhalb des untersuchten Fragments befindet. In Untersuchungen mit adenoviralen Promotoren konnte ferner gezeigt werden, dass die gezielte Methylierung von drei bestimmten 5'-CCGG-3' Sequenzen benötigt wird, um das Gen effektiv zu inaktivieren [Dörfler et al., 1989]. Neben diesen strukturellen Erklärungen, darf man aber nicht vernachlässigen, dass man Methylierung nicht isoliert von anderen transkriptionsregulierenden Faktoren betrachten darf. Am transkriptionell aktiven Heterochromatin finden parallel zur DNA-Methylierung eine Reihe weiterer transkriptionsregulierender Vorgänge u.a. Acetylierung und Phosphorylierung sowie die Bindung positiver und negativer Transkriptionsfaktoren, statt. Diese Vorgänge konkurrieren direkt mit den Enzymen der Methylierungsmaschinerie um den Zugang zur DNA.

4.5 Hypermethylierte Bereiche bilden „hot-spot“-Regionen für Mutationen

Nicht nur die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen, sondern auch die Tatsache, dass hypermethylierte Regionen gegenüber Mutationen anfällig sind, ist von Interesse für die Tumorentstehung. Es ist bekannt, dass 5-Methylcytosin sehr anfällig für spontane Desaminierung ist und so Mutationen in diesen Bereichen durch die Transition von Cytosin zu Thymin zustande kommen. In diesem Zusammenhang wurde bereits in älteren Arbeiten gezeigt, dass z.B. die in Colonkarzinomen auftretenden Mutationen im *TP53* Gen häufig auf eine C → T Transition zurückzuführen sind [Cooper et al., 1988; Jones et al., 1992; Greenblatt et al., 1994]. Das Gen *KIF21A* wurde in der vorliegenden Arbeit bei 6 niedriggradigen Astrozytomen methyliert gefunden. Es ist bekannt, dass *KIF21A* mitverantwortlich für angeborene Störungen der Entwicklung der Kranialnerven (CFEOM) ist. Diese Entwicklungsstörungen sind auf Mutationen im *KIF21A* Gen zurückzuführen [Traboulsi, 2004]. Bei Mutationsstudien dieses Gens wurde bereits 2004 festgestellt, dass die häufigste Mutation eine C → T Substitution in Exon 21 ist [Ali et al., 2004]. Mit Hilfe von Bisulfitsequenzierung konnten Ali et al. zeigen, dass diese Region ein „hot spot“ für Mutationen des *KIF21A* Gens ist und diese Mutation zumindest

teilweise auf die Desaminierung eines methylierten Cytosins zurückzuführen ist [Ali et al., 2004]. Obwohl bis jetzt kein direkter Zusammenhang zwischen KIF21A und der Onkogenese gezeigt werden konnte, macht die Identifikation dieses Gens auch in der vorliegenden Arbeit deutlich, dass es im Genom „hot spots“ für Methylierung gibt und die Methylierung von DNA kein auf die Tumorbilogie beschränktes Phänomen darstellt.

4.5.1 Veränderung der Methylierung im Verlauf der Tumorprogression

Die Daten aus den vorliegenden Hybridisierungen bei denen DNA aus Normalgewebe und niedriggradigen Tumoren auf den Microarrays hybridisiert wurden, konnten mit Daten aus einem Experiment verglichen bei dem die niedriggradigen Tumoren mit den korrespondierenden Progressionsfällen des gleichen Patientenkollektivs hybridisiert worden waren, verglichen werden. Bei den Progressionsfällen konnten insgesamt 43 Gene als hypermethyliert im Vergleich zu den niedriggradigen Tumoren identifiziert werden. Ein Teil der in beiden Tumorstadien identifizierten Gen-assoziierten CpG-reichen Sequenzen zeigte ein gelbes Signal, was eine Beibehaltung des Methylierungsstatus dieser Sequenzen darstellt. Dazu wurden auch einige grüne Signale in den Progressionsfällen von Sequenzen, die im niedriggradigen Tumor methyliert waren, detektiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass zumindest ein Teil der methylierten Sequenzen während der Tumorprogression entweder wieder demethyliert, oder deletiert wird. Es gibt Hinweise, dass DNA-Methylierung mehr als nur ein Mechanismus zur effektiven Inaktivierung von Genen darstellt, sondern durch die Hypermethylierung auch eine „Markierung“ gesetzt wird, die dafür sorgt, dass das betreffende Gen langfristig strukturellgenetisch ausschaltet wird [Zardo et al., 2002]. Mit Hilfe dieser Hypothese lässt sich auch erklären warum es bei sekundären Glioblastomen, also solchen Glioblastomen, die aus niedriggradigen Tumoren entstehen im Vergleich zu primären Glioblastomen häufiger zu Deletionen und Verlust der Heterozygotie kommt. Indem Tumorsuppressorgene bei niedriggradigen Tumoren epigenetisch markiert und inaktiviert werden, können sie im Verlauf der Progression strukturellgenetisch dauerhaft abgeschaltet werden.

4.6 Weitere Identifizierte Gene und ihre Bedeutung in der Tumorentwicklung

Neben den näher untersuchten Genen konnten noch weitere interessante Kandidatengene durch die DMH-Analysen identifiziert werden. So wurde mit *PIP5K* noch ein weiteres Gen aus dem Rho-Signalweg bei allen untersuchten Patienten methyliert gefunden. *PIP5K* kodiert für die Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-Kinase. Es ist bekannt, dass sowohl RhoA, als auch Rock in der Lage sind *PIP5K* zu stimulieren [Weerninck et al. 2000]. Während Rock1 selbst als Effektor für die LIM-Kinase wirkt und so filamentöse Aktinstrukturen stabilisiert, wirkt *PIP5K* parallel als Effektor für Vinculin und Gelsolin. Gelsolin ist das regulative Protein für die Zunahme der Actinpolymerisierung und Vinculin kommt eine zentrale Bedeutung für die Ausbildung von Fokalkontakten zu. Die Inaktivierung von *Rock1* und *PIP5K* und der damit verbundene Expressionsverlust der beiden Gene könnten somit die Ausbildung von Stressfasern und Fokalkontakten führen. Die Ausbildung dieser beiden Strukturen ist die Voraussetzung für die Ausbildung von Lamellipodien und somit für die Fähigkeit der Zellen zu migrieren.

Außerdem konnten mit den vorliegenden Arbeiten noch weitere hypermethylierte Gene in niedriggradigen Tumoren identifiziert werden: *ZFP37*; *BIRC3*; *RPIP*; *NUFIP1*; *PMS2LS*; *VPS35* sind Gene die bisher noch nicht in Zusammenhang mit der Tumorentstehung gestellt werden konnten. Von einigen weiteren identifizierten Genen konnte eine Rolle bei der Tumorigenese anderer Tumorentitäten nachgewiesen werden: Die Transkription von *downregulated in ovarian cancer (DOC1)*, einem Protein aus dem Signalweg der insulinartigen Wachstumsfaktoren ist häufig in Ovarialkarzinomen gesenkt [Mok et al., 1994]. 2002 konnte bei Untersuchungen der Seneszenz gezeigt werden, dass *Doc1* in Prostatakarzinomzellen und immortalisierten HPEC-Zellen signifikant weniger exprimiert wird [Schwarze et al., 2002]. Die Transkription des humanen *erythroblastosis virus oncogene homologe 2 (ETS-2)* ist in Mammakarzinomen häufig reduziert [Watson et al., 1990; Papas et al., 1990; Satge et al. 1997]. Eine verminderte Transkription von *ETS-2* bei Mammakarzinomen führt zu einer schlechteren Behandelbarkeit der Patientinnen mit Tamoxifen [Svensson et al., 2005]. Scheinbar ist eine verminderte *ETS-2* Expression an der Ausbildung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika beteiligt.

4.7 Klinische Bedeutung der Methylierung in der Tumordiagnostik und Therapie

Seit mindestens 15 Jahren werden genetische Marker in der Tumordiagnostik eingesetzt. Aber erst seit einigen Jahren wird systematisch nach Markern, die eine Aussage über den Verlauf der Erkrankung sowie Therapiemöglichkeiten erlauben, gesucht. Vor allem in diesem Bereich der Tumordiagnostik wird die DNA-Methylierung eine zunehmend wichtige Rolle spielen [Costello et al., 1999]. Die gleichzeitige Analyse einer zunehmenden Zahl von Methylierungsereignissen kann dazu beitragen präzisere und individuellere Diagnosen zu stellen sowie Behandlungen besser auf den jeweiligen Subtypen des Tumors abzustimmen. Durch neue Techniken bei der Analyse ist es möglich, differentielle Methylierungsänderungen schnell und zuverlässig zu detektieren. Dabei erlauben Methoden wie COBRA eine schnelle erste Einschätzung des Methylierungsstatus eines Tumors. Aber nicht nur bei der Diagnose eines manifestierten Tumors kann ein Methylierungsprofiling helfen, die Situation für den Patienten entscheidend zu verbessern. Gerade bei hochmalignen Tumoren wie den primären Glioblastomen kann ein frühzeitiges Auffinden des Tumors stark zum Behandlungserfolg beitragen [Silvani et al. 2004].

Neben der frühzeitigen Erkennung spielt vor allem eine effektiv an die molekularbiologischen Veränderungen des Tumors angepasste Therapie die Entscheidende Rolle bei der Behandlung der Patienten. Mit zunehmendem Verständnis für die Rolle, die DNA-Methylierung bei der Tumorentstehung und Progression spielt, wächst das Bestreben den Vorgang der *de novo* Methylierung von Tumorsuppressorgenen zu stoppen, bzw. umzukehren. Heute wird zur Behandlung von Tumorpatienten vor allem 5-Aza-2'-deoxycytidin bzw. dessen Derivate eingesetzt [Aparico et al., 2003].

4.7.1 Vergleich der Spezifität von RG-108 und 5-Azacytidin bei der Demethylierung von Genen

Die Behandlung von Zellen mit 5-Azacytidin *in vitro* führt zu einer genomweiten Demethylierung [Sadikovic et al., 2004]. Genomweite Demethylierung scheint an der

Tumorentstehung beteiligt zu sein [Fearon et al., 1996]. Diese Annahme begründet sich auf der Beobachtung, dass DNA aus Tumorzellen häufig global hypomethyliert ist [Laird et al., 1996], sowie auf eine Studie an Kolonkarzinomen, derzufolge mangelnde DNA-Methylierung zur genomischen Instabilität beiträgt [Lengauer et al., 1997]. DNA Hypomethylierung konnte ausserdem mit abnormaler Chromosomenstruktur, wie z.B. in Zellen von Patienten mit ICF (Immunodeficiency, Centromeric Instability an Facial abnormalities) Syndrom [Jeanpierre et al., 1993; Ji et al., 1997] und mit Zellen, die mit 5-Azacytidin behandelt wurden [Haaf, 1995] assoziiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die demethylierende Wirkung von 5-Azacytidin mit dem neuen DNMT1-Inhibitor RG-108 verglichen. RG-108 ist ein kleines hydrophobes Molekül, dass kompetitiv die Bindungsstelle der Methyltransferase DNMT1 besetzt und somit eine Methylierung verhindert. Der große Vorteil der Substanz liegt darin, dass sie auf Grund dieser Eigenschaft nicht zu einer ausgeprägten globalen Hypomethylierung, wie es bei einer Behandlung von Zellen mit 5-Azacytidin der Fall ist, führen sollte. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden Gliomzellen kultiviert und mit 5-Azacytidin bzw. mit RG-108 behandelt und für jeweils 5 Tage inkubiert. Die DNAs der so behandelten Zellen wurden auf einem DMH-Microarray hybridisiert. Die Effektivität beider Substanzen wurde quantifiziert und ein Quotient aus demethylierten Genen und demethylierten repetitiven Sequenzen gebildet. Das Ergebnis entspricht sehr gut der Erwartung, so werden von insgesamt 43 demethylierten bei den 5-Aza-behandelten Zellen 8 repetitive Sequenzen identifiziert. Im Vergleich dazu waren bei RG-108 nur 4 von 45 identifizierten Sequenzen repetitive Elemente. Um das Ergebnis zu validieren wurde der Versuch noch mal mit vertauschten Farbstoffen wiederholt. Auch hier war das Ergebnis eindeutig und unterstützt die These, dass RG-108 eine sensitivere Methode zur gezielten Demethylierung von Genen darstellt.

4.8 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass in niedriggradigen Hirntumoren *de novo* DNA-Methylierung von Genen auftreten. In einem nächsten Schritt müssen die gewonnenen Daten an einem größeren Patientenkollektiv getestet und mit den klinischen Daten der Patienten korreliert werden.

Mit den Methoden der DMH und des modifizierten MTA sind die technischen Voraussetzungen gegeben, die epigenetischen Ursachen der Tumorentstehung zuverlässig zu untersuchen. Die DMH-Analyse erlaubt einen schnellen Zugriff auf eine ganze Bibliothek an Genen, deren differentielle Methylierung allerdings immer nur an kleinen Kollektiven untersucht werden kann. Als nächster Schritt muss die Spotdichte auf den Chips soweit erhöht werden, dass alle CpG-Inseln des menschlichen Genoms auf einen Microarray repräsentiert sind. Bedingt durch die höhere Spotdichte müssen DNA-Menge, Hybridisier- und Waschprotokolle den veränderten Bedingungen angepasst werden. Ein Chip der diese Anforderungen erfüllt, wäre dann in der Lage genomweit schnell die Frage nach differentieller Methylierung in unterschiedlichen Geweben zu beantworten und wäre ein nützliches Werkzeug für Methylierungsuntersuchungen in Tumoren und anderen Geweben, deren unterschiedliche DNA-Methylierung untersucht werden soll.

Die Stärke des Methylation-Target-Arrays liegt in der gezielten Untersuchung jeweils eines Kandidatengens in vielen Tumoren gleichzeitig. Auch bei diesem Ansatz muss die Konsequenz aus den gewonnenen Ergebnissen sein, möglichst viele Tumor-DNAs auf einen Array zu spotten um möglichst rasch eine gesicherte Aussage über die Methylierung eines Gens in vielen Tumoren gleichzeitig zu erhalten. Dazu wäre ein eleganter Ansatz, die präparierten DNAs nicht mehr auf Nylon-Membranen zu spotten, sondern die DNAs analog zum DMH-Protokoll in konstanten Mengen auf Glas-Objektträger zu spotten. Dieses Verfahren würde es erlauben, mehrere Tausend Tumoren gleichzeitig auf den Methylierungszustand eines bestimmten Gens hin zu untersuchen und gleichzeitig die benötigte DNA-Menge pro Tumor weiter reduzieren.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung *de novo* methylierter Gene auf die Entstehung von Gliomen untersucht. Gliome sind die häufigsten intrakraniellen Neoplasien beim Menschen. Mit einer Inzidenz von 7 Fällen pro 100.000 Einwohnern machen sie über 60% aller Hirntumore aus. Aufgrund ihrer Fähigkeit das umliegende gesunde Gewebe zu infiltrieren, stellt die neurochirurgische Entfernung dieser Tumoren keinen befriedigenden Therapieansatz dar. In den letzten Jahren konnten viele strukturell-genomische Aberrationen und größere chromosomale Bereiche die maßgeblich an der Tumorentstehung und Progression beteiligt sind, identifiziert werden. Dennoch sind die Identität und die Mechanismen der Regulation der Gene, die in Gliomen für diese Fähigkeit verantwortlich sind weitgehend ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde die *de novo* Methylierung der DNA niedriggradiger Tumoren mit Hilfe verschiedener Techniken untersucht. Um Kandidatengene zu identifizieren, wurde die DNA von niedriggradigen Tumoren zusammen mit Normalgewebe-DNA auf CpG-Insel Microarrays hybridisiert. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen führten zu einer Liste von Kandidatengenen, die in niedriggradigen Tumoren methyliert vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Kandidaten mit tumorbiologisch relevanter Funktion näher charakterisiert. Hierzu wurden die identifizierten Kandidatengene Bisulfit-sequenziert um die Methylierung quantitativ erfassen zu können. Für die sequenzierten Tumorgenome wurde mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR überprüft, in wieweit die Transkription der Gene von der *de novo* Methylierung reguliert ist. Für alle untersuchten Gene wurde auf diese Weise eine Reduktion der Transkriptmenge im Tumor festgestellt. Durch die Kultivierung von primären Gliomzellen mit 5-Azacytidin wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine Demethylierung des Genoms zur Wiederherstellung der ursprünglichen Transkriptionsmenge bei den untersuchten Genen führte.

Um größere Tumorkollektive schnell und zuverlässig auf den Methylierungszustand von Kandidatengenen untersuchen zu können, wurde das bestehende Protokoll des Methylierungs-Target-Arrays (MTA) dahingehend modifiziert, dass die Signaldetektion statt über eine radioaktive Markierung der DNA durch den Einbau von digUTP stattfindet. Diese modifizierte Form des MTA ermöglicht eine leichtere

Handhabung des Untersuchungskollektivs und eine relativ einfach durchzuführende Hybridisierung mit genspezifischen Sonden.

Da viele Gene, die mit Hilfe der DMH identifiziert wurden, an der Zellmotilität beteiligt sind und darüber hinaus die Fähigkeit umgebendes Gewebe zu invadieren charakteristisch für Gliome ist, wurden aus frischen Tumorgewebestücken von Patienten mit einem Glioblastom WHO Grad IV Gliomzellen in Kultur genommen. Diese Zellen ermöglichten weitere *in vitro* Untersuchungen der Methylierung in frühen Passagen. Um nach charakteristischen Veränderungen der Methylierung, die mit der Fähigkeit zur Migration einhergehen zu suchen, wurde mit den kultivierten Gliomzellen Migrationsassays durchgeführt, die zur Identifikation weiterer Gene die mit dem Erwerb der Migrationsfähigkeit methyliert werden, führte.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse führten zu einem tieferen Verständnis der Bedeutung von methylierungsabhängig regulierten Genen in der Entstehung astrozytärer Neoplasien. Ein Teil der Ergebnisse liefert darüber hinaus wichtige Informationen zum Verständnis der Beteiligung methylierter Gene beim Erwerb charakteristischer Eigenschaften von Gliomzellen, wie die ausgeprägte Fähigkeit gesundes Gewebe zu invadieren. Da die heute eingesetzten demethylierenden Chemotherapeutika aufgrund ihres Wirkmechanismus zu starken Nebenwirkungen führen, wurde in dieser Arbeit in Kooperation mit Dr. Frank Lyko (DKFZ, Heidelberg) ein neues, potentiell Chemotherapeutikum auf seine demethylierende Eigenschaften getestet. Zusammen mit den gewonnenen Erkenntnissen über die Beteiligung von DNA-Hypermethylierung an der Tumorentstehung verspricht dieser Wirkstoff eine spezifischere Demethylierung von hypermethylierten Genen, als es heute zugelassene Medikamente vermögen.

6 Literaturverzeichnis

Acker T, Plate KH. **Hypoxia and hypoxia inducible factors (HIF) as important regulators of tumor physiology.** *Cancer Treat Res.* 2004;117:219-48

Alaminos M, Davalos V, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. **Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in Neuroblastoma.** *J Natl Cancer Inst.* 2004 Aug 18;96(16):1208-19.

Ali M, Venkatesh C, Rangunath A, Kumar A. **Mutation analysis of the KIF21A gene in an Indian family with CFEOM1: implication of CpG methylation for most frequent mutations.** *Ophthalmic Genet.* 2004 Dec;25(4):247-55.

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. **Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2.** *Nat Genet.* 1999 Oct;23(2):185-8.

Aparicio A, Eads CA, Leong LA, Laird PW, Newman EM, Synold TW, Baker SD, Zhao M, Weber JS. **Phase I trial of continuous 5-aza-2'-deoxycytidine.** *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003 51: 231-239.

Aparicio A, Eads CA, Leong LA, Laird PW, Newman EM, Synold TW, Baker SD, Zhao M, Weber JS. **Phase I trial of continuous infusion 5-aza-2'-deoxycytidine.** *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003 Mar;51(3):231-9.

Araujo FD, Croteau S, Slack AD, Milutinovic S, Bigey P, Price GB, Zannis-Hajopoulos M, Szyf M. **The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus.** *J Biol Chem.* 2001 Mar 9;276(10):6930-6. Epub 2000 Dec 4.

Barker FG 2nd, Davis RL, Chang SM, Prados MD. **Necrosis as a prognostic factor in glioblastoma multiforme.** *Cancer.* 1996 Mar 15;77(6):1161-6.

Beetz C, Brodoehl S, Patt S, Kalf R, Deufel T. **Low expression but infrequent genomic loss of the putative tumour suppressor DBCCR1 in astrocytoma.** *Oncol Rep.* 2005 Feb;13(2):335-40,

Bishop, J.M., and Weinberg, R.A., eds. (1996). **Molecular Oncology** (New York: Scientific American, Inc.).

Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. **How tumors become angiogenic.** *Adv Cancer Res.* 1996;69:135-74. Review. No abstract available.

Bouck N. **P53 and angiogenesis.** *Biochim Biophys Acta.* 1996 May 16;1287(1):63-6. No abstract available.

Brahimi-Horn C, Berra E, Pouyssegur J. **Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway.** *Trends Cell Biol.* 2001 Nov;11(11):S32-6.

Brandes JC, van Engeland M, Wouters KA, Weijenberg MP, Herman JG. **CHFR promoter hypermethylation in colon cancer correlates with the microsatellite instability phenotype.** *Carcinogenesis*. 2005 Mar 10

Burger PC, Green SB. **Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme.** *Cancer*. 1987 May 1;59(9):1617-25.

Chandler SP, Guschin D, Landsberger N, Wolffe AP. **The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA.** *Biochemistry*. 1999 Jun 1;38(22):7008-18.

Choe G, Horvath S, Cloughesy TF, Crosby K, Seligson D, Palotie A, Inge L, Smith BL, Sawyers CL, Mischel PS (2003) **Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo.** *Cancer Res* 63: 2742-2746.

Closse A, Huguenin R. Isolation and structural clarification of chlamydocin *Helv Chim Acta*. 1974 Apr 27;57(3):533-45.

Cottrell SE. **Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology.** *Clin Biochem*. 2004 Jul;37(7):595-604.

Cross SH, Charlton JA, Nan X, Bird AP. **Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column.** *Nat Genet*. 1994 Mar;6(3):236-44.

Darkin-Rattray SJ, Gurnett AM, Myers RW, Dulski PM, Crumley TM, Allocco JJ, Cannova C, Meinke PT, Colletti SL, Bednarek MA, Singh SB, Goetz MA, Dombrowski AW, Polishook JD, Schmatz DM. **Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 12;93(23):13143-7.

Datto MB, Hu PP, Kowalik TF, Yingling J, Wang XF. **The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B.** *Mol Cell Biol*. 1997 Apr;17(4):2030-7.

De Marzo AM, Marchi VL, Yang ES, Veeraswamy R, Lin X, Nelson WG. **Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis.** *Cancer Res*. 1999 Aug 15;59(16):3855-60.

Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C, von Deimling A (1998) **PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors.** *Oncogene* 16:2259-2264.

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg PV, Laird PW. **CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression.** *Cancer Res*. 1999 May 15;59(10):2302-6. Erratum in: *Cancer Res* 1999 Nov 15;59(22):5860.

Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. **Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 May 15;89(10):4309-13.

- Eppenberger U, Mueller H. **Growth factor receptors and their ligands.** J Neurooncol. 1994;22(3):249-54.
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. **A genetic model for colorectal tumorigenesis.** Cell 61, 759–767 (1990).
- Folkman J. **Addressing tumor blood vessels.** Nat Biotechnol. 1997 Jun;15(6):510.
- Gonzalzo ML, Isaacs WB. **Molecular pathways to prostate cancer.** J Urol. 2003 Dec;170(6 Pt 1):2444-52. Review.
- Gura T. **Gene defect linked to Rett syndrome.** Science. 1999 Oct 1;286(5437):27.
- Haaf, T. **The effects of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromosome structure and function: implications for methylation-associated cellular processes.** Pharmacol. Ther. 65, 19–46 (1995)
- Hanahan D, Folkman J. **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** Cell. 1996 Aug 9;86(3):353-64.
- Hayatsu H, Miura A. **The mutagenic action of sodium bisulfite.** Biochem Biophys Res Commun. 1970 Apr 8;39(1):156-60.
- Hayatsu H, Wataya Y, Kai K, Iida S. **Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives.** Biochemistry. 1970 Jul 7;9(14):2858-65.
- Hayatsu H, Wataya Y, Kazushige K. **The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine.** J Am Chem Soc. 1970 Feb 11;92(3):724-6.
- Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, de Tribolet N, Stupp R. **Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide.** Clin Cancer Res. 2004 Mar 15;10(6):1871-4.
- Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. **Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases.** Cell Mol Life Sci. 2004 Oct;61(19-20):2571-87.
- Hiesiger EM, Hayes RL, Pierz DM, Budzilovich GN. **Prognostic relevance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-neu/erbB2 expression in glioblastomas (GBMs).** J Neurooncol. 1993 May;16(2):93-104.
- Hirota A, Suzuki A, Aizawa K, Tamura S. **Mass spectrometric determination of amino acid sequence in Cyl-2, a novel cyclotetrapeptide from *Cylindrocladium scoparium*.** Biomed Mass Spectrom. 1974 Feb;1(1):15-9.
- Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN (2000) **Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice.** Nat Genetics 25: 55-57.

Hsu SC, Volpert OV, Steck PA, Mikkelsen T, Polverini PJ, Rao S, Chou P, Bouck NP. **Inhibition of angiogenesis in human glioblastomas by chromosome 10 induction of thrombospondin-1.** *Cancer Res.* 1996 Dec 15;56(24):5684-91.

Hurt MR, Moossy J, Donovan-Peluso M, Locker J. **Amplification of epidermal growth factor receptor gene in gliomas: histopathology and prognosis.** *J Neuropathol Exp Neurol.* 1992 Jan;51(1):84-90.

Jeanpierre, M. et al. **An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome.** *Hum. Mol. Genet.* 2, 731–735 (1993).

Ji, W. et al. **DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1.** *Mutat. Res.* 379, 33–41 (1997).

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. **Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.** *Nat Genet.* 1998 Jun;19(2):187-91.

Kawai M, Rich DH, Walton JD. **The structure and conformation of HC-toxin.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1983 Mar 16;111(2):398-403.

Kijima M, Yoshida M, Sugita K, Horinouchi S, Beppu T. **Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase.** *J Biol Chem.* 1993 Oct 25;268(30):22429-35.

Kim YB, Lee KH, Sugita K, Yoshida M, Horinouchi S. **Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase.** *Oncogene.* 1999 Apr 15;18(15):2461-70.

Kleihues P, Ohgaki H. **Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis.** *Neuro-oncol.* 1999 Jan;1(1):44-51.

Kochanek S, Renz D, Doerfler W. **Transcriptional silencing of human Alu sequences and inhibition of protein binding in the box B regulatory elements by 5'-CG-3' methylation.** *FEBS Lett.* 1995 Feb 27;360(2):115-20.

Krokan HE, Drablos F, Slupphaug G. **Uracil in DNA occurrence, consequences and repair.** *Oncogene.* 2002 Dec 16;21(58):893548.

Kwon HJ, Owa T, Hassig CA, Shimada J, Schreiber SL. **Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3356-61.

Laird, P.W. & Jaenisch, R. **The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics.** *Annu. Rev. Genet.* 30, 441–464 (1996).

Lam CW, Yeung WL, Ko CH, Poon PM, Tong SF, Chan KY, Lo IF, Chan LY, Hui J, Wong V, Pang CP, Lo YM, Fok TF. **Spectrum of mutations in the MECP2 gene in patients with infantile autism and Rett syndrome.** *J Med Genet.* 2000 Dec;37(12):E41.

Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW. **Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors.** J Neurosurg. 1994 Sep;81(3):427-36.

Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. **DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells.** Proc. Natl Acad. Sci. USA 94, 2545–2550 (1997).

Levenson VV. **DNA methylation biomarkers of cancer: moving toward clinical application.** Pharmacogenomics. 2004 Sep;5(6):699-707.

Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A. **Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA.** Cell. 1992 Jun 2;69(6):905-14.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R (1997) **PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer.** Science 275:1943-1947.

Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J. **Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin.** Nature. 1985 Jan 10-18;313(5998):144-7.

Liu Z, Fisher RA. **RGS6 interacts with DMAP1 and DNMT1 and inhibits DMAP1 transcriptional repressor activity.** J Biol Chem. 2004 Apr 2;279(14):14120-8. Epub 2004 Jan 20.

Louis DN, Gusella JF. **A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma.** Trends Genet. 1995 Oct;11(10):412-5.

Louis DN. **The p53 gene and protein in human brain tumors.** J Neuropathol Exp Neurol. 1994 Jan;53(1):11-21.

Margot JB, Ehrenhofer-Murray AE, Leonhardt H. **Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family.** BMC Mol Biol. 2003 May 30;4(1):7.

Medema RH, Bos JL. **The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling.** Crit Rev Oncog. 1993;4(6):615-61. Review.

Meehan RR, Lewis JD, Bird AP. **Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA.** Nucleic Acids Res. 1992 Oct 11;20(19):5085-92.

Moggs JG, Goodman JI, Trosko JE, Roberts RA. **Epigenetics and cancer: implications for drug discovery and safety assessment.** Toxicol Appl Pharmacol. 2004 May 1;196(3):422-30. Review.

Mok SC, Wong KK, Chan RK, Lau CC, Tsao SW, Knapp RC, Berkowitz RS. **Molecular cloning of differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer.** *Gynecol Oncol.* 1994 Feb;52(2):247-52.

Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emlet DR, Montgomery RB, Wong AJ (1998) **Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor.** *J Biol Chem* 273:200-206.

Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. **TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights.** *Cell.* 1990 Oct 19;63(2):245-7.

Muller-Tidow C, Kugler K, Diederichs S, Klumpen S, Moller M, Vogt U, Metzger R, Schneider PM, Berdel WE, Serve H. **Loss of expression of HDAC-recruiting methyl-CpG-binding domain proteins in human cancer.** *Br J Cancer.* 2001 Oct 19;85(8):1168-74.

Muromoto R, Sugiyama K, Takachi A, Imoto S, Sato N, Yamamoto T, Oritani K, Shimoda K, Matsuda T. **Physical and functional interactions between Daxx and DNA methyltransferase1-associated protein, DMAP1.** *J Immunol.* 2004 Mar 1;172(5):2985-93.

Nakajima H, Kim YB, Terano H, Yoshida M, Horinouchi S. **FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor.** *Exp Cell Res.* 1998 May 25;241(1):126-33.

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. **Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.** *Nature.* 1998 May 28;393(6683):386-9.

Nelson JS, Tsukada Y, Schoenfeld D, Fulling K, Lamarche J, Peress N. **Necrosis as a prognostic criterion in malignant supratentorial, astrocytic gliomas.** *Cancer.* 1983 Aug 1;52(3):550-4.

Newmark HL, Lupton JR, Young CW. **Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status.** *Cancer Lett.* 1994 Apr 1;78(1-3):1-5.

Ng HH, Bird A. **DNA methylation and chromatin modification.** *Curr Opin Genet Dev.* 1999 Apr;9(2):158-63.

Ng HH, Jeppesen P, Bird A. **Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1.** *Mol Cell Biol.* 2000 Feb;20(4):1394-406.

Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. **MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex.** *Nat Genet.* 1999 Sep;23(1):58-61.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al. **Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types.** *Nature.* 1989 Dec 7;342(6250):705-8.

Ohgaki H, Schauble B, zur Hausen A, von Ammon K, Kleihues P. **Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumours.** Virchows Arch. 1995;427(2):113-8.

Papas TS, Watson DK, Sacchi N, Fujiwara S, Seth AK, Fisher RJ, Bhat NK, Mavrothalassitis G, Koizumi S, Jorcyk CL, et al. **ETS family of genes in leukemia and Down syndrome.** Am J Med Genet Suppl. 1990;7:251-61.

Pierallini A, Bonamini M, Pantano P, Palmeggiani F, Raguso M, Osti MF, Anaveri G, Bozzao L. **Radiological assessment of necrosis in glioblastoma: variability and prognostic value.** Neuroradiology. 1998 Mar;40(3):150-3.

Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. **Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation.** J Biol Chem. 1999 Nov 12;274(46):33002-10.

Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH (1997) **PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas.** Cancer Res 57:4187-4190.

Razin A, Riggs AD. **DNA methylation and gene function.** Science. 1980 Nov 7;210(4470):604-10.

Razin A. **CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection.** EMBO J. 1998 Sep 1;17(17):4905-8.

Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. **A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 17;95(6):3003-7.

Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. **DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters.** Nat Genet. 2000 Jul;25(3):338-42.

Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. **The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors.** Nucleic Acids Res. 1999 Jun 1;27(11):2291-8.

Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. **DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci.** Nat Genet. 2000 Jul;25(3):269-77.

Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O. **A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Apr 13;96(8):4592-7.

Sano T, Lin H, Chen X, Langford LA, Koul D, Bondy ML, Hess KR, Myers JN, Hong YK, Yung WK, Steck PA. **Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis.** Cancer Res. 1999 Apr 15;59(8):1820-4.

Satge D, Sasco AJ, Cure H, Leduc B, Sommelet D, Vekemans MJ. **An excess of testicular germ cell tumors in Down's syndrome: three case reports and a review of the literature.** Cancer. 1997 Sep 1;80(5):929-35.

Schmidt EE, Ichimura K, Goike HM, Moshref A, Liu L, Collins VP (1999) **Mutational profile of the PTEN gene in primary human astrocytic tumors and cultivated xenografts.** J Neuropathol Exp Neurol 58:1170-1183.

Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, Fulton D, Hagen NA, MacKinnon JA, Sutherland G, Cairncross JG, Forsyth P. **Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study.** Can J Neurol Sci. 1998 Aug;25(3):197-201.

Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, Fulton D, MacKinnon JA, Hamilton M, Cairncross JG, Forsyth P. **Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study.** Ann Neurol. 1999 Aug;46(2):183-8.

Shafqat S, Hedley-Whyte ET, Henson JW. **Age-dependent rate of anaplastic transformation in low-grade astrocytoma.** Neurology. 1999 Mar 10;52(4):867-9.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** Science. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.

Slamon DJ. **Proto-oncogenes and human cancers.** N Engl J Med. 1987 Oct 8;317(15):955-7.

Sporn MB. **The war on cancer.** Lancet. 1996 May 18;347(9012):1377-81. Review.

Stellmach V, Volpert OV, Crawford SE, Lawler J, Hynes RO, Bouck N. **Tumour suppressor genes and angiogenesis: the role of TP53 in fibroblasts.** Eur J Cancer. 1996 Dec;32A(14):2394-400.

Takita J, Ishii M, Tsutsumi S, Tanaka Y, Kato K, Toyoda Y, Hanada R, Yamamoto K, Hayashi Y, Aburatani H. **Gene expression profiling and identification of novel prognostic marker genes in neuroblastoma.** Genes Chromosomes Cancer. 2004 Jun;40(2):120-32.

Tao W, Levine AJ. **P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jun 8;96(12):6937-41.

Taylor SM, Jones PA. **Histochemical demonstration of myosin Ca²⁺-ATPase accumulation in primary cultures of skeletal and heart muscle cells.** Histochem J. 1980 Mar;12(2):169-81.

Torp SH et al. **Relationships between Ki-67 labelling index, amplification of the epidermal growth factor receptor gene, and prognosis in human glioblastomas.** Acta Neurochir Wien 1992 117: 182-186

Traboulsi EI. **Congenital abnormalities of cranial nerve development: overview, molecular mechanisms, and further evidence of heterogeneity and complexity of syndromes with congenital limitation of eye movements.** Trans Am Ophthalmol Soc. 2004;102:373-89.

Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K. **A new antifungal antibiotic, trichostatin.** J Antibiot (Tokyo). 1976 Jan;29(1):1-6.

Umehara K, Nakahara K, Kiyoto S, Iwami M, Okamoto M, Tanaka H, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. **Studies on WF-3161, a new antitumor antibiotic.** J Antibiot (Tokyo). 1983 May;36(5):478-83.

Ushijima T, Watanabe N, Shimizu K, Miyamoto K, Sugimura T, Kaneda A. **Decreased fidelity in replicating CpG methylation patterns in cancer cells.** Cancer Res. 2005 Jan 1;65(1):11-7.

Vanden Heuvel JP, Holden P, Tugwood J, Ingle C, Yen W, Galjart N, Greenlee WF. **Identification of a novel peroxisome proliferator responsive cDNA isolated from rat hepatocytes as the zinc-finger protein ZFP-37.** Toxicol Appl Pharmacol. 1998 Sep;152(1):107-18.

von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Hoell T, Chung RY, Martuza RL, Schoenfeld DA, Yasargil MG, Wiestler OD, et al. **Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme.** J Neurosurg. 1992 Aug;77(2):295-301.

Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. **Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation.** Nat Genet. 1999 Sep;23(1):62-6.

Waha A, Guntner S, Huang TH, Yan PS, Arslan B, Pietsch T, Wiestler OD, Waha A. **Epigenetic Silencing of the Protocadherin Family Member PCDH-gamma-A11 in Astrocytomas.** Neoplasia. 2005 Mar;7(3):193-9.

Waha A, Watzka M, Koch A, Pietsch T, Przkora R, Peters N, Wiestler OD, von Deimling A. **A rapid and sensitive protocol for competitive reverse transcriptase (cRT) PCR analysis of cellular genes.** Brain Pathol. 1998 Jan;8(1):13-8.

Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M. **Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues.** Nucleic Acids Res. 1980 Oct 24;8(20):4777-90.

Warrell RP Jr, He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP. **Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase.** J Natl Cancer Inst. 1998 Nov 4;90(21):1621-5.

- Watson DK, Ascione R, Papas TS. **Molecular analysis of the ets genes and their products.** Crit Rev Oncog. 1990;1(4):409-36.]
- Weinberg RA. **How cancer arises.** Sci Am. 1996 Sep;275(3):62-70.
- Weinberg RA. **The retinoblastoma protein and cell cycle control.** Cell. 1995 May 5;81(3):323-30.
- Willard HF, Hendrich BD. **Breaking the silence in Rett syndrome.** Nat Genet. 1999 Oct;23(2):127-8.
- Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. **Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 1;89(7):2965-9.
- Wouters BG, Koritzinsky M, Chiu RK, Theys J, Buijsen J, Lambin P. **Modulation of cell death in the tumor microenvironment.** Semin Radiat Oncol. 2003 Jan;13(1):31-41.
- Yarden Y, Ullrich A. **Growth factor receptor tyrosine kinases.** Annu Rev Biochem. 1988;57:443-78. Review.
- Yarden Y, Ullrich A. **Molecular analysis of signal transduction by growth factors.** Biochemistry. 1988 May 3;27(9):3113-9. Review.
- Yisraeli J, Adelstein RS, Melloul D, Nudel U, Yaffe D, Cedar H. **Muscle-specific activation of a methylated chimeric actin gene.** Cell. 1986 Aug 1;46(3):409-16.
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. **Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites.** Trends Genet. 1997 Aug;13(8):335-40.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. **Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A.** J Biol Chem. 1990 Oct 5;265(28):17174-9.
- Yu J, Zhang H, Gu J, Lin S, Li J, Lu W, Wang Y, Zhu J. **Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma.** BMC Cancer. 2004 Sep 14;4(1):65.
- Yu X, Minter-Dykhouse K, Malureanu L, Zhao WM, Zhang D, Merkle CJ, Ward IM, Saya H, Fang G, van Deursen J, Chen J. **Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation.** Nat Genet. 2005 Apr;37(4):401-6.
- Zardo G, Tiirikainen MI, Hong C, Misra A, Feuerstein BG, Volik S, Collins CC, Lamborn KR, Bollen A, Pinkel D, Albertson DG, Costello JF. **Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors.** Nat Genet. 2002 Nov;32(3):453-8.

Originalarbeiten

Regenbrecht CRA, Bauer R, Müller H, Gestmann I, Hoch M, Tikkanen R **Function of sAPP in morphogenesis of epithelia**, in Vorbereitung

Regenbrecht CRA, Becker AJ, **Implanting telemetric EEG-devices**, in Vorbereitung

Regenbrecht CRA, Felsberg J, Pietsch T, Reifenberger G, Wiestler OD, Waha A, **Methylation analysis of gliomas on a non-radioactive methylation target array**, in Vorbereitung

Kurzveröffentlichungen

Regenbrecht CRA, Bauer R, Gestmann I, Hoch M, Tikkanen R **Function of sAPP in morphogenesis of epithelia**. Mol Biol Cell 2001 Nov; 12:30a

Regenbrecht CRA; Felsberg J, Pietsch T Reifenberger G, Huang T, Wiestler OD, Waha A. **Analysis of candidate gene methylation on glioma microarrays**. Acta Neuropath. 2004 Oct;108(4):352.

Kongressbeiträge& wissenschaftliche Vorträge

Poster:

Function of the ectodomain of Alzheimer amyloid precursor protein in morphogenesis of epithelia, Annual meeting of the American Society for Cell Biology, December 8-12, 2001, Washington DC

Analysis of candidate gene methylation on glioma microarrays, German Society for Neuropathology and neuroanatomy, 2004, Cologne, Germany

Vorträge:

Implanting telemetric devices, DSI workshop 2002

Methylation analysis in human gliomas, Max-Planck-Institut für Molekulargenetik, Berlin

DMH and MTA an approach to high-throughput methylation analysis, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg

Array based methylation analysis in gliomas, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie, Köln

Identification of DNMT1 regulated genes in gliomas, NKI Amsterdam, Niederlande

Finding methylation, an overview, Insitut für Biochemie II, Universitätsklinik Frankfurt/ Main

Zusätzliche Fachqualifikationen

Zulassung als Leiter von Tierversuchen nach FELASA, seit September 2002

Mitgliedschaften in wissenschaftlichen Gesellschaften

- American Society of Cell Biology (ASCB)
- Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ)
- Society for Neuroscience (SfN)
- New York Academy of Sciences (NYAS)