

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie -
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. Heribert Jürgens -

DNA-Methylierungsstörungen in ZNS-Tumoren des Kindes- und Jugendalters -
Klonierung und Charakterisierung von hypermethylierten Gensequenzen im Genom
von Medullblastomen, ZNS-PNET und Ependymomen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Kreth, Jonas Hieronymus

aus Würzburg

2012

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhem Schmitz

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. med. Michael C. Frühwald

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. W. Stummer

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2012

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin – Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
-Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Heribert Jürgens-
Referent: Prof. Dr. Dr. med. M. Frühwald
Koreferent: Univ-Prof. Dr. med. W. Stummer

ZUSAMMENFASSUNG

DNA-Methylierungsstörungen in ZNS-Tumoren des Kindesalters – Klonierung und
Charakterisierung von hypermethylierten Gensequenzen im Genom von
Medullblastomen, ZNS-PNET und Ependymomen
Jonas Kreth

ZNS-Tumoren sind die häufigsten soliden Tumoren des Kindes- und Jugendalters. Obwohl sich in den letzten Jahrzehnten die Überlebenschancen deutlich verbesserten, bleiben ZNS-Tumoren die häufigste Ursache für krebsbedingte Todesfälle des Kindesalters.

Neben genetischen Veränderungen können auch epigenetische Veränderungen, wie zum Beispiel DNA-Methylierung und Histonmodifikationen, zur Entstehung von Tumoren beitragen. Für ZNS-Tumoren des Kindesalters wurden Methylierungsveränderungen beschrieben.

In dieser Arbeit wurde ein genomweites Screening von Methylierungsveränderungen mittels Restriction Landmark Genomic Scanning in Medulloblastomen, primitiven neuroektodermalen Tumoren des ZNS und Ependymomen durchgeführt. Es wurden 18 hypermethylierte CpG-Inseln gefunden. Mit Hilfe einer Klonbank-basierten Methode und eines virtuellen Genomscreens konnten Homologien zu Genen, EST und mRNA zugeordnet werden.

Es wurden fünf neu identifizierte Kandidatengene in einer Serie von Tumorproben untersucht. Es konnte in quantitativen Methylierungsanalysen gezeigt werden, dass diese Kandidatengene in ZNS-Tumoren stärker methyliert sind als in normalen Kontrollen. Abschließend wurden Tumorzelllinien mit demethylierenden Substanzen behandelt. Durch die Behandlung konnte die stillgelegte Genexpression in 4 von 5 Genen wiederhergestellt werden.

Diese Arbeit liefert einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Tumorgenese von ZNS-Tumoren des Kindes- und Jugendalters. Neue epigenetisch veränderte Kandidatengene konnten identifiziert werden. Epigenetische Medikamente könnten in Zukunft durch gezielte epigenetische Beeinflussung bestehende Therapien verbessern.

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2012

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

DNA-Methylierungsstörungen in ZNS-Tumoren des Kindes- und Jugendalters -
Klonierung und Charakterisierung von hypermethylierten Gensequenzen im Genom von
Medulloblastomen, ZNS-PNET und Ependymomen

im

Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie -
Direktor: Prof. Dr. med. H. Jürgens

unter Anleitung von:

Prof. Dr. Dr. med. M. Frühwald

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 01.02.2012

Jonas Kreth

Den Kindern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	ZNS-Tumoren des Kindes- und Jugendalters	2
1.1.1	Medulloblastome	4
1.1.2	Primitive neuroektodermale Tumoren des Zentralen Nerven-systems	8
1.1.3	Ependymale Tumoren	9
1.2	Epigenetik und DNA-Methylierung	10
1.3	Ziele der vorliegenden Dissertation	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Proben und klinische Angaben der Patienten	17
2.2	Primer	18
2.3	Zellkultur	19
2.4	RNA-Isolierung aus Zelllinien	20
2.5	cDNA-Synthese	21
2.6	Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	22
2.7	DNA-Extraktion	23
2.7.1	Extraktion hochmolekularer DNA	23
2.7.2	DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten	24
2.7.3	DNA-Extraktion aus Plasmiden	25
2.8	Restriction Landmark Genomic Scanning	25
2.9	Identifizierung hypermethylierter CpG-Inseln	28
2.9.1	Klonbank-basierte Methode	29
2.9.2	Virtueller Genomscan (VGS)	30
2.10	Southern Blot	30
2.11	Kalibrierte „Combined Bisulfite Restriction Analysis“	33
2.11.1	Bisulfit-Behandlung	33
2.11.2	Bisulfit-PCR (BS-PCR)	34
2.11.3	Combined Bisulfite Restriction Analysis	35
2.11.4	Kalibrationsfunktion	35
2.11.5	Densitometrische Auswertung	36
2.12	Kalibrationsfunktion und Statistik	36
3	Ergebnisse	38
3.1	DNA-Hypermethylierung als häufigste tumorspezifische Veränderung	38
3.2	Identifizierung neuer hypermethylierter CpG-Inseln und assoziierter Gene	39
3.3	Bestätigung der DNA-Methylierung in Kandidatengen	41
3.4	Tumorspezifische DNA-Methylierung von fünf Kandidatengen	42
3.5	Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Alter bei Diagnose	51
3.6	Reexpression von epigenetisch inaktivierten Genen	52

4 Diskussion und Ausblick	55
5 Abkürzungsverzeichnis	66
6 Literaturverzeichnis.....	68
7 Anhang mit detaillierten klinischen Angaben der Proben	I

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

Tumoren des Zentralnervensystems sind die häufigsten soliden Tumore im Kindesalter. Mit 22,1% aller zwischen 1997 und 2006 beim Deutschen Kinderkrebsregister gemeldeten Patienten unter 15 Jahren repräsentieren sie insgesamt die zweithäufigste Tumorart im Kindes- und Jugendalter nach den Leukämien (34,1%) [55].

In einer Metaanalyse untersuchten Rickert et al. 2001 10.582 pädiatrische ZNS-Tumoren. Danach sind mit 37,6% die Astrozytome die größte Tumorgruppe [92]. Die häufigsten Astrozytome sind pilozytische Astrozytome WHO Grad I mit 23,5% aller ZNS-Tumoren [92]. Die häufigsten malignen ZNS-Tumoren bei Kindern und Jugendlichen sind Medulloblastome, primitive neuroektodermale Tumoren des Zentralen Nervensystems (ZNS-PNET) und Ependymome.

Die 5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeiten für ZNS-Tumoren im Kindes- und Jugendalter bleiben mit 71% deutlich hinter dem Durchschnitt aller malignen Tumorerkrankungen (80%) zurück [55]. Auch wenn sich die Überlebenswahrscheinlichkeiten im Verlauf der letzten Dekaden verbessert haben (1980 – 1984: 55% versus 2000 – 2004: 71%) so leiden die überlebenden Kinder bösartiger Hirntumoren weiterhin häufig an schwerwiegenden krankheits- oder therapiebezogenen Einschränkungen. Dies verdeutlichen zum Beispiel Nachuntersuchungen bei 51 Kindern mit Medulloblastomen am Universitätskinderspital Zürich im Zeitraum zwischen 1980 und 2000. Es traten in 61% endokrinologische Defizite, in 72% neurologische Komplikationen und in 72% nennenswerte Schulprobleme auf. Alle Patienten hatten signifikante Defizite in den neurokognitiven Funktionen [91]. Diese Häufigkeit von Nebenwirkungen wird auch in anderen Studien bestätigt [54, 73].

Bisher basieren Diagnosestellung und klinische Einteilung von Risikogruppen bei ZNS-Tumoren des Kindes- und Jugendalters noch alleine auf klinischen und histopathologischen Informationen, wie zum Beispiel Histologie, Ausmaß der Resektion, Vorliegen von Metastasen und Alter bei Erstdiagnose [85]. Außer ihrer pathogenetischen Relevanz haben molekularbiologische Veränderungen nicht selten auch prognostische Relevanz

für den einzelnen Patienten. Zum Beispiel geht eine MYC-Amplifikation in Medulloblastomen mit einer deutlich ungünstigeren Überlebenschance einher [104]. Dies erlaubt risikoangepasste Therapiestratifizierungen mit Therapieintensivierung für Hochrisiko-Patienten und Therapiereduktion für Standardrisiko-Patienten [100, 101, 104].

Ziel der aktuellen Grundlagenforschung ist es, durch Charakterisierung neuer Biomarker, wie zum Beispiel DNA-Methylierung oder Expressionsanalyse von Kandidatengen, bessere Therapiestratifizierungen zu etablieren, um damit therapieassoziierte Nebenwirkungen zu reduzieren. Zudem erlaubt das bessere Verständnis der zugrundeliegenden molekularbiologischen Ursachen der Tumorgenese die Entwicklung neuer spezifischer Behandlungsstrategien, wie zum Beispiel die Reaktivierung von epigenetisch stillgelegten Tumorsuppressor-Genen.

1.1 ZNS-Tumoren des Kindes- und Jugendalters

ZNS-Tumoren setzen sich aus einem breiten Spektrum verschiedener Krankheitsentitäten zusammen. Ihnen gemeinsam ist die intrakranielle Lokalisation und das therapeutische Dilemma, an dieser hochsensiblen, kritischen Stelle behandelt werden zu müssen [42]. Für Hirntumoren wird seit 1979 eine Gradeinteilung nach der WHO-Klassifikation vorgenommen (Abb.1). Die WHO Grade I - IV basieren auf histologischen Kriterien, korrelieren aber auch mit dem biologischen Verhalten der Tumoren und stellen einen prognostischen Faktor dar.

Bei Hirntumoren des Kindes- und Jugendalters besteht eine leichte Knabenwendigkeit (männlich : weiblich, 1,29 : 1)[92].

	Charakteristika	Beispiele von Hirntumoren des Kindes- und Jugendalters
WHO Grad I	Niedriggradig-benigner, hochdifferenzierter Tumor mit langsamer Wachstumstendenz, gute Prognose; meist chirurgische Entfernung ausreichend	Pilozytisches Astrozytom, Gangliogliom, Pineozytom, Dysembryoblastischer neuroepithelialer Tumor, Kraniopharyngiom
WHO Grad II	Generell infiltrativ wachsend, jedoch geringe Proliferationsaktivität, erhöhte Neigung zur Rezidivbildung, Übergang in bösartige Tumoren möglich	Pilomyxoides Astrozytom, Pleomorphes Xanthoastrozytom, Oligodendrogliom, Ependymom
WHO Grad III	Histologisch mit Nachweis von Malignitätskriterien (Kernatypien, hoher Mitoseindex), nach der Operation sind Strahlen- und/oder Chemotherapie notwendig	Anaplastisches Ependymom, Anaplastisches Astrozytom, Choroid-Plexuskarzinom, Anaplastisches Meningeom
WHO Grad IV	Hochgradig-maligner, undifferenzierter Tumor mit hoher Proliferationsrate, schlechte Prognose, häufig aggressiv-infiltrative Wachstumstendenz und kraniospinale Dissemination	Medulloblastom, primitive neuroektodermale Tumoren des ZNS (ZNS-PNET), Atypischer teratoider/rhabdoider Tumor (AT/RT), Pinealoblastom, Glioblastom, Gliosarkom

Abb. 1: WHO Gradeinteilung für ZNS-Tumoren, modifiziert nach [70].

Im Allgemeinen wird die Prognose eines Hirntumors aus mehreren Faktoren bestimmt, wie dem WHO Grad, Alter bei Erstdiagnose, Lokalisation des Tumors, Ausmaß der operativen Entfernung, Metastasierung und genetischen Veränderungen [70]. Die Metastasierung wird nach Chang et al. [36] klassifiziert (Abb.2).

Metastasierung	
M0	Kein Anhalt für Metastasen
M1	Mikroskopischer Nachweis von Tumorzellen im Liquor cerebrospinalis
M2	Makroskopische Metastasen im intrakraniellen Subarachnoidalraum
M3	Makroskopische Metastasen im spinalen Subarachnoidalraum
M4	Metastasen außerhalb des Zentralnervensystems

Abb.2: Klassifikation der Metastasierung des Medulloblastom nach [36].

Auf eine Besonderheit bei kindlichen Hirntumoren sei verwiesen. Das heranreifende Gehirn des Säuglings und Kleinkindes ist besonders strahlensensibel. Die Bestrahlung führt häufig zu kognitiven Defiziten [51, 56]. Aktuelle Therapieprotokolle sehen deshalb eine postoperative Bestrahlung der kraniospinalen Achse erst ab einem Alter von

drei bis vier Jahren vor [100]. Dies kann jedoch auch mit ungünstigen Überlebensraten einhergehen, wie Timmermann und Kollegen bei anaplastischen Ependymomen und dem Verzicht auf eine postoperative Bestrahlung für Kinder unter drei Jahren zeigen konnten [114].

Die Behandlung aller Hirntumoren wird in Deutschland und Österreich im Rahmen multizentrischer Therapie-Optimierungsstudien durchgeführt. Ein Beispiel ist die Studie HIT 2000 für Kinder und Jugendliche bis 21 Jahre mit einem intrakraniell lokalisierten primitiv neuroektodermalen Tumor (ZNS-PNET/Medulloblastom) oder Ependymom.

1.1.1 Medulloblastome

Das Medulloblastom ist ein maligner, invasiv-wachsender embryonaler Tumor des Kleinhirns, mit bevorzugter Manifestation im Kindesalter. Das Medulloblastom ist ein WHO Grad IV Tumor. Es ist der häufigste maligne Hirntumor des Kindesalters mit circa 20% aller Hirntumoren [92]. Es besitzt einen Häufigkeitsgipfel im Alter von 7 Jahren [93] und weist eine Knabenwendigkeit auf (65% der Patienten sind männlich). Bis zu 75% der Medulloblastome entwickeln sich im *Vermis cerebelli* und wachsen lokal-infiltrierend per continuitatem in den vierten Ventrikel oder Hirnstamm.

Klinisch werden die Patienten meist durch Hirndruckzeichen oder neurologische Symptome des Kleinhirns auffällig, wie zum Beispiel Gang-, Rumpf- und Extremitätenataxie, Kopfschiefhaltung, Nystagmus, Nackensteifigkeit, skandierende Sprache, Dysdiadochokinese und Intentionstremor.

Medulloblastomzellen zeigen überwiegend neuronale Zelldifferenzierung und besitzen eine starke Neigung zur Metastasierung in Liquorräume [70]. Histologisch besteht die klassische Form des Medulloblastoms aus dicht zusammenliegenden, kleinen, blauen Zellen mit runden bis ovalen Zellkernen umrandet von spärlichem Zytoplasma. Die meisten Zellen differenzieren sich entlang neuronaler Linien. Zu einem geringen Anteil sind auch Zellen mit glialer Differenzierung vorhanden [70]. Neben dem klassischen

Medulloblastom unterscheidet man als weitere histopathologische Varianten das desmoplastische, anaplastische und großzellige Medulloblastom.

Medulloblastome sind mit familiären Tumorsyndromen, die eine erbliche Prädisposition für die Entwicklung von Tumoren aufweisen, assoziiert. Hierzu gehören Keimbahnmutationen im *TP53*-Gen (Li-Fraumeni-Syndrom), im *PATCH1*-Gen (Gorlin-Syndrom, synonym mit Basalzellnävus-Syndrom oder NBCCS), im *APC*-Gen (Turcot-Syndrom), im *CBP*-Gen (Rubinstein-Taybi-Syndrom) und im *SUFU*-Gen [70, 77, 112].

Im Medulloblastom-Genom wurden zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen gefunden.

Die häufigste zytogenetische Veränderung ist ein Isochromosom 17q, welches in ca. 30 – 40% der Tumoren auftritt [25, 87, 97] und mit dem Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 einhergeht. Das Tumorsuppressorgen *TP53* ist auf 17p13 lokalisiert. Es wurde nur in 5 –10% der sporadischen Medulloblastome mutiert gefunden [2]. Auf 17p13.3 wurde ein potentielles Tumorsuppressor-Gen, nämlich *HIC1*, gefunden, welches in Medulloblastomen häufig hypermethyliert ist [96]. Es besteht jedoch keine Korrelation zwischen „loss of heterozygosity“ und Hypermethylierung von 17p. Die zweithäufigste zytogenetische Veränderung ist eine Trisomie 7 und assoziiert mit einem Isochromosom 17q, jedoch tritt eine zusätzliche Kopie von Chromosom 7 auch in anderen Tumoren auf und scheint am ehesten ein sekundäres Phänomen im Tumorgenom zu sein [10]. Unbalanzierte Translokationen oder Deletionen betreffen die Chromosomen 8, 10q, 11p und 11q und 16q.

Bis zu 10% der Medulloblastome weisen eine Amplifikation der *MYC*- oder *MYCN*-Gene auf [87]; vor allem großzellige und anaplastische Histologievarianten, die mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Es konnte gezeigt werden, dass *MYC*-/*MYCN*-Amplifikationen mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind [86]. In derselben Studie konnte auch dargestellt werden, dass Zugewinn von genetischem Material auf 6q und 17q ebenfalls mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist.

In molekulargenetischen Untersuchungen bei Medulloblastomen wurde die Beteiligung von verschiedenen Signaltransduktionswegen an der Tumorentstehung aufgeklärt. Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg, welcher embryonal bei der Kleinhirnentwicklung eine entscheidende Rolle spielt [28], ist in bis zu 8% sporadischer Medulloblastome mutiert [126]. Einen weiteren wichtigen Signaltransduktionsweg stellt der Wnt-Signalweg dar. Hier finden sich wiederum in einer kleineren Gruppe von ca. 15% der sporadischen Medulloblastome Inaktivierungen oder Aktivierungen des Wnt-Signalweges durch verschiedene „Zwischenprodukte“, wie zum Beispiel APC oder β -Catenin [70]. Ein weiterer wichtiger Signalweg ist NOTCH. *NOTCH2* ist in stark proliferierenden neuronalen Progenitorzellen der äußeren Körnerzellschicht des Cerebellums überexprimiert [108] und findet sich in 15% von Medulloblastomen amplifiziert [27]. Im ERBB-Signaltransduktionsweg wirken die Tyrosinkinase ERBB1-4 mit den beteiligten Faktoren, wie MAPK, AKT und STAT auf die Regulierung von wichtigen Zellzyklusprozessen (Proliferation, Apoptose, Migration und Differenzierung). Auch sie werden in Medulloblastomen verändert exprimiert [36, 44, 72].

Andere neuronale Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel *PAX5*, *PAX6*, *ZIC*, *REST* und *SOX*, fanden sich nur selten genetisch alteriert [70].

Genetische Veränderungen scheinen nicht allein für das Entstehen aller Medulloblastome verantwortlich zu sein. Daher rücken epigenetische Veränderungen wie die DNA-Methylierung in den Fokus der Forschung. DNA-Methylierung ist an der Tumorgenese zum Beispiel durch Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen beteiligt [52, 53]. Auch unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Medulloblastome abweichende Methylierungsmuster im Vergleich zu Normalgeweben aufweisen, wie genomweite Hypomethylierung und CpG-Insel assoziierte Hypermethylierung [18, 34].

In umfangreichen Studien von Kandidatengenen, insbesondere Tumorsuppressorgenen, konnte *RASSF1A* als häufigster Kandidat mit knapp 80% hypermethyliert in Medulloblastomen [40, 48, 71] gefunden werden. Andere Kandidatengene sind *Caspase-8*, *p16^{INK4A}*, *MGMT*, *TIMP-3*, *CDH1*, *HIC1*, *p14^{ARF}*, *p15^{INK4b}*, *TSLC1* und *EDNRB* [23, 67, 80, 96].

In den letzten drei Jahren wurden zwei interessante Arbeiten veröffentlicht, die Medulloblastome in verschiedene molekulare Varianten untergliedern. Kool und Mitarbeiter untersuchten kombiniert mRNA-Expressionsprofile und genetische Veränderungen von 62 Medulloblastomen. Sie identifizierten fünf molekulare Subgruppen [59]. Northcott et al. bestätigten diese Erkenntnisse 2011, indem sie auf die gleiche Art 103 Medulloblastome untersuchten. Northcott und Mitarbeiter identifizierten vier, sich nicht überschneidende, molekulare Subgruppen von Medulloblastomen [83]. Diese vier Gruppen enthalten jeweils spezifische molekulare Signaturen. Gruppe A besteht zum Beispiel vor allem aus Genen des Wnt-Signaltransduktionsweges und Gruppe B des Sonic Hedgehog-Signaltransduktionsweges. Interessanterweise weisen diese molekularen Varianten spezifische demographische und histopathologische Eigenschaften sowie Metastasierungsverhalten und genetische Veränderungen auf. Auch für die Überlebensraten unterschieden sich die vier Varianten. Zum Beispiel geht ein großzelliges oder anaplastisches Medulloblastom der Gruppe C mit der schlechtesten Prognose einher. Besonders bemerkenswert ist die Arbeit von Northcott et al., denn sie zeigen dass diese vier Gruppen jeweils immunhistochemisch durch einen einzelnen Marker identifiziert werden können. Immunhistochemische Untersuchungen stellen eine einfache und kostengünstige Technik dar, die auch von nicht spezialisierten Neuropathologien vorgenommen werden könnten.

Bisher etablierte klinische Stratifizierungsmarker sind das Alter bei Diagnose, der Resektionsgrad und das Vorliegen einer Metastasierung [70]. Mit einer schlechteren Prognose gehen einher: Alter < 3 Jahre, Vorhandensein von Metastasen, inkomplette Resektion, weite Ausdehnung des Medulloblastoms, niedrige Expression von *TRCK*, hohe Expression von *ERBB2* [85]. Gerade prognostischen molekularen Markern wird heutzutage eine große Aufmerksamkeit gewidmet. Es bleibt abzuwarten, welche in großen prospektiven Studien statistischen Anforderungen gerecht wird. Ellison et al. veröffentlichte 2011 eine interessante Studie, in der sie klinische, histopathologische und molekulare Angaben miteinander kombinierten [26]. Sie definieren zum Beispiel eine Hochrisikogruppe (großzelliges oder anaplastisches Medulloblastom, Vorliegen von Metastasen oder MYC-Amplifikation), eine Niedrigrisikogruppe (klassische Medulloblastome mit Metastasierungsstatus M0, ohne MYC-Amplifikation und β -Catenin positiv) und eine

Standardrisikogruppe. Diese Risikogruppen unterschieden sich signifikant in den Überlebensraten.

1.1.2 Primitive neuroektodermale Tumoren des Zentralen Nervensystems

Primitive neuroektodermale Tumoren des Zentralen Nervensystem (ZNS-PNET) sind seltener als Medulloblastome und machen ca. 2,5% aller Hirntumoren des Kindes- und Jugendalters aus [90]. Es handelt sich um embryonale Tumoren, die aus undifferenzierten oder nur wenig differenzierten neuroepithelialen Zellen bestehen. Diese Zellen haben die Möglichkeit, sich in neuronale, astrozytäre, myozytäre und melanozytäre Linien zu differenzieren. Tumoren, die nur neuronale Differenzierung aufweisen, werden auch als zerebrale Neuroblastome bezeichnet [70]. Die ZNS-PNET treten vor allem in den Hemisphären auf. Das durchschnittliche Alter der Kinder bei Auftreten wird mit 5,5 Jahren angegeben [70].

Patienten mit ZNS-PNET werden in Deutschland gemäß MET-HIT 2000-BIS4 (Alter bei Diagnose < 4) bzw. MET-HIT 2000-AB4 (Alter bei Diagnose > 4) behandelt. Dies schließt nach der neurochirurgischen Resektion eine Hochdosischemotherapie und Strahlentherapie ein (nach HIT 2000, Hirntumorprotokoll der Arbeitsgruppe für Hirntumoren, aktualisierte Version – Stand 05.12.2005). Die Prognose für Kinder mit ZNS-PNET ist deutlich schlechter als für Kinder mit Medulloblastomen. So lag in einer Studie mit 22 Kindern das progressionsfreie Überleben (PFS) nach fünf Jahren mit cPNET bei 37%, das Gesamtüberleben nach fünf Jahren bei 53%. Zum Vergleich lag das progressionsfreie Überleben nach 5 Jahren für Hochrisiko-Medulloblastom-Patienten, die das gleiche Therapieprotokoll erhalten hatten, bei 85% [90].

Zur genetischen Ursache des Tumorwachstum existieren nur wenige Studien. Man weiß, dass sich ZNS-PNET und Medulloblastome in ihren zytogenetischen und genetischen Veränderungen unterscheiden [76, 99]. Spezifische genetische Veränderungen sind bisher in ZNS-PNETs nicht beschrieben. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass

das Tumorsuppressor-Gen *RASSF1A* in fast 80% von ZNS-PNET epigenetisch durch DNA-Hypermethylierung inaktiviert ist [81].

1.1.3 Ependymale Tumoren

Von den beiden vorgenannten embryonalen Tumoren unterscheiden sich die ependymalen Tumoren. Sie stammen von Ependymzellen ab, die die vier Hirnventrikel und den *Canalis spinalis* auskleiden. Man unterscheidet je nach Dignität ependymale Tumoren WHO Grad I (Subependymom, myxopapilläres Ependymom), Ependymome WHO Grad II und anaplastische Ependymome WHO Grad III [70]. Die gesamte Gruppe der Ependymome macht 10% aller Hirntumoren des Kindes- und Jugendalters aus; sie stellen damit die dritthäufigste Entität [42, 54, 92]. Bei Kleinkindern unter drei Jahren machen Ependymome sogar bis zu 30% aller intrakraniellen Tumoren aus [70].

Die Therapie besteht aus der möglichst kompletten neurochirurgischen Resektion und anschließender Bestrahlung im Falle eines malignen Ependymoms. Zur Zeit sind folgende Parameter zur Stratifizierung relevant: Alter größer oder kleiner 4 Jahren, komplette oder inkomplette Resektion, Dignität WHO Grad II oder III und Metastasierungsgrad (M0 – M4) ([78] sowie zitiert nach HIT 2000, aktualisierte Version vom 05.12.2005). Nur ungefähr jeder zweite Patient mit WHO Grad II oder III Ependymom ist nach fünf Jahren tumorfrei. Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach fünf Jahren liegt bei 64% [94].

Zytopenetisch und molekularbiologisch lassen sich zwei Varianten unterscheiden. Die erste tritt überwiegend im Erwachsenenalter und bei spinaler Manifestation auf. Die zweite, im Kindesalter auftretende, weist in der Mehrzahl balanzierte Karyogramme auf [87]. Dabei ist die häufigste Ausnahme der Zugewinn von genetischem Material auf Chromosom 1q, welches mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf einhergeht [87]. Gilbertson et al. untersuchten mehr als 100 Ependymome des Kindesalters auf Expressionsunterschiede der ERBB-Rezeptoren 1 – 4. Sie zeigten, dass in mehr als $\frac{3}{4}$ der Fälle ERBB2 und ERBB4 überexprimiert werden und dass dies mit einer erhöhten Prolifera-

tionsrate in den Tumoren einhergeht [37]. Auch Taylor und Kollegen präsentierten 2005 eine sehr interessante Arbeit. Sie isolierten Stammzellen aus Ependymomen, die den Phänotyp von radialen Gliazellen aufwiesen. Diese Zellen könnten die Ursprungszellen von Ependymomen sein, welche sich je nach anatomischer Lokalisation in verschiedene histologische Untergruppen weiterentwickeln. Dies könnte eine Erklärung für die genetische Heterogenität von Ependymomen darstellen [111]. Hamilton und Kollegen veröffentlichten eine der wenigen Arbeiten, die epigenetische Veränderungen in Ependymomen analysierten. Sie untersuchten den Methylierungsstatus von 9 Tumorsuppressorgenen in pädiatrischen Ependymomen mittels COBRA-Technik. Dabei war *RASSF1A* in 9 von 11 Ependymomen hypermethyliert. Dies zeigt, dass epigenetische Veränderungen in Ependymomen vorkommen und noch nicht identifizierten Kandidatengenen eine wichtige Rolle zukommen könnte [39].

1.2 Epigenetik und DNA-Methylierung

Der Begriff Epigenetik wurde vor über 60 Jahren eingeführt, um die „Epigenesis“, sprich die Mechanismen, die von einem Genotyp zu unterschiedlichen Phänotypen von Zellen oder Organismen führen, zu beschreiben [50]. Heutzutage beschreibt Epigenetik unterschiedliche Zellphänotypen, die nicht durch genetische Unterschiede festgelegt sind, potentiell veränderbar sind und während der Zellteilung weitestgehend auf die Tochterzellen vererbt werden [5, 6, 61, 95]. Prägnanter ausgedrückt, meint Epigenetik alle vererbaren Veränderungen im Genexpressionsmuster, die nicht auf Veränderungen der Nukleotidsequenz der Gene beruhen.

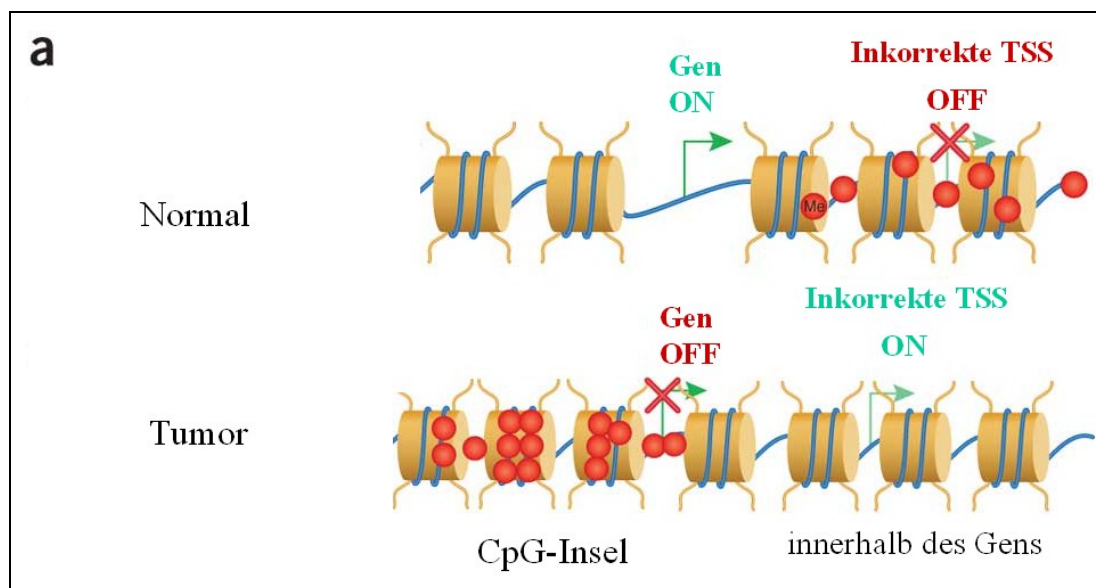
Epigenetische Prozesse sind essentiell für die Entwicklung und Zelldifferenzierung [50]. Sie spielen funktionell eine wichtige Rolle in der Regulation von Genexpression, in der Inaktivierung von Transposons, in der Prävention von genomischer Instabilität, in der Inaktivierung von Virusgenomen, beim genomischen Imprinting und bei der Inaktivierung des X-Chromosoms [15]. Sie können zufällig auftreten oder auch durch spezifische Umwelteinflüsse getriggert werden [50]. Die Genexpression im menschlichen Organismus wird reguliert vom Zustand des Chromatins. Das aktive Euchromatin erlaubt

das Ablesen der DNA für die Transkription; das stillgelegte Heterochromatin ist dicht mit Nukleosomen bepackt und verhindert so die Transkription. Das Gleichgewicht zwischen Euchromatin und Heterochromatin befähigt die Zellen ihr Genexpressionsmuster zu vererben [11]. Eine Vielzahl von epigenetischen Mechanismen ist an der Modifikation der Chromatinstruktur beteiligt. Zu diesen zählen DNA-Methylierung und kovalente Histonmodifikationen, wie Deazetylierung, Methylierung, Sumoylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und Ribosylierung [61, 95].

DNA-Methylierung findet üblicherweise an der 5'-Position des Cytosinringes von CpG-Dinukleotiden und nach der Replikation statt. Über das gesamte menschliche Genom verteilt sind in den adulten somatischen Zellen circa 80% der CpG-Dinukleotide methyliert [50]. CpG-Inseln sind sehr kleine Regionen des Genoms mit einer Größe zwischen 0,5 und 5 kb. Sie besitzen eine hohe CpG-Dichte, die mit 60 - 70% höher ist als man im restlichen Genom erwarten würde [11, 50]. Ungefähr 60% der menschlichen Gene sind mit CpG-Inseln assoziiert, welche größtenteils die gesamte Zeit in allen Geweben unmethyliert bleiben [11], [18]. Unmethylierte CpG-Inseln erlauben den mit ihnen assoziierten Genen Transkriptionsaktivität durch die Möglichkeit, euchromatische DNA-Struktur einzunehmen. Ausnahmen sind unter anderem die X-Chromosom Inaktivierung und das genomische Imprinting [95]. DNA-Methylierung von CpG-Dinukleotiden oder CpG-Inseln bewirkt auf zweifache Art und Weise eine Repression der Transkription: erstens stört die Methyl-Gruppe direkt die normale Bindung eines Transskriptionsfaktors und zweitens binden Proteine spezifisch an methylierte CpG-Dinukleotide (z.B. MBD1), wodurch die Transkription verhindert wird [11].

DNA-Methylierung wird durch die Enzymfamilie der Methyltransferasen katalysiert. Diese transferieren, vereinfacht ausgedrückt, Methylgruppen vom Donor S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) zum 5' Carbanion des Cytosins in CpG-Dinukleotiden. Man kennt die Methyltransferasen Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a und Dnmt3b, welche sich funktionell unterscheiden. So ist zum Beispiel die Methyltransferase Dnmt1 für die Erhaltung des Methylierungsmusters bei der Zellteilung verantwortlich [43].

Im letzten Jahrzehnt hat die Forschung einen enormen Wissenszuwachs auf dem Gebiet der Epigenetik erlebt, so dass epigenetische DNA-Modifikationen sowohl bei normalen biologischen Prozessen als auch bei Krankheiten in den Vordergrund gerückt sind. So finden sich bei der Tumorentstehung, aber auch bei vielen anderen Krankheiten epigenetische Veränderungen [95]. Tumorspezifisch ist sowohl eine globale DNA-Hypomethylierung als auch eine DNA-Hypermethylierung von Genpromoterregionen mit konsekutivem Genexpressionsverlust [11, 18, 61]. Dabei ist DNA-Methylierung von nicht CpG-Inseln im normalen Gewebe wichtig für die genomische Integrität, das Stilllegen von Transposons und das Verhindern von inkorrekten Transkriptionsstartstellen (TSS) [95]. Diese Zusammenhänge lassen sich der Abbildung 3 entnehmen:



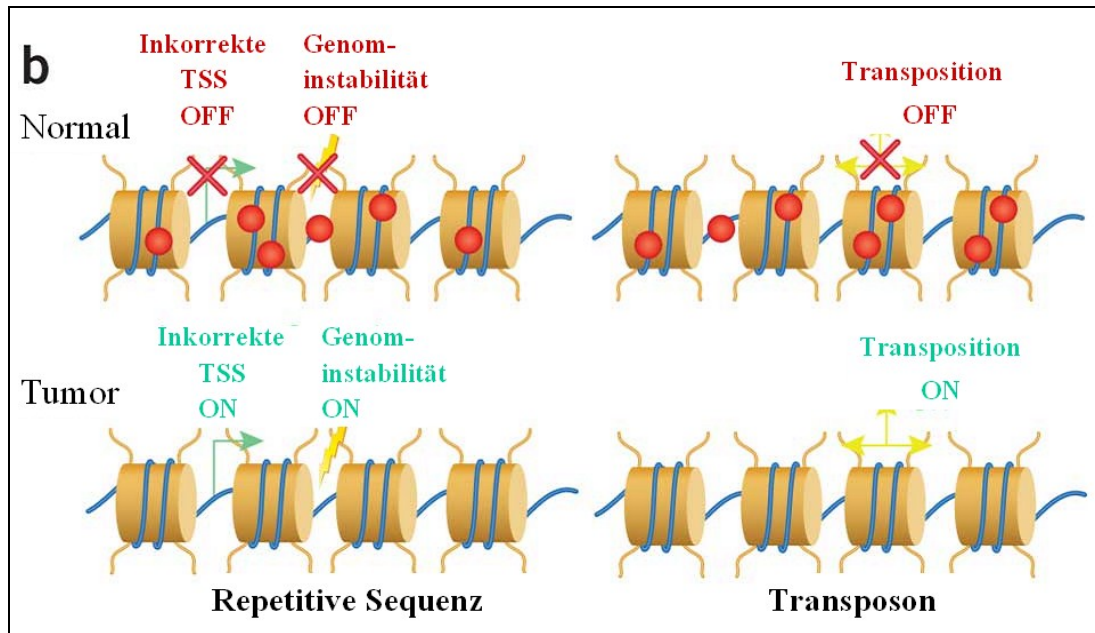


Abb.3: DNA-Methylierungsmuster in normalen Geweben und in malignen Tumoren, modifiziert nach [95]. a) In den normalen Geweben, die in der oberen Zeile dargestellt sind, bleiben die CpG-Inseln im 5'-Bereich der Gene in der Regel unmethyliert. Dies erlaubt der DNA eine euchromatische Struktur einzunehmen, Transkription ist möglich („Gen On“). Zusätzlich verhindert DNA-Methylierung innerhalb des Gens die Initiierung von nicht korrekten Transkriptionsstartstellen. In den Tumoren ist dieses Methylierungsmuster umgekehrt; innerhalb des 5'-Bereichs von Genen ist die Tumor-DNA hypermethyliert; dies inaktiviert die Transkription durch Einnahme einer heterochromatischen DNA-Struktur („Gen Off“). Im Gegensatz dazu ist die Tumor-DNA innerhalb des Gens häufig unmethyliert. Dies kann zu fehlerhaften Startstellen einer Transkription und trunkierten funktionslosen Proteinen führen. b) In den normalen Geweben verhindert DNA-Methylierung von repetitiven Sequenzen, durch Einnahme einer heterochromatischen DNA-Struktur genomische Instabilität. Zudem wird fehlerhafte Transkription an falschen Stellen verhindert und Transposons werden inaktiviert. Im Tumor-Genom passiert durch die globale DNA-Hypomethylierung das Gegenteil: genomische Instabilität und fehlerhafte Transkription an falschen Stellen wird getriggert; Transposons werden aktiviert.

Besonders interessant ist die DNA-Hypermethylierung im Promoterbereich von Tumorsuppressorgenen, welche so in Tumoren inaktiviert werden können [6]. Ein sehr gut studierter Kandidat ist das Tumorsuppressorgen *RASSF1A* (Ras-Assoziationsdomäne Familie 1 Variante A), das in zahlreichen Tumorentitäten, wie zum Beispiel bei Brust-, Lungen- Nierenzellkarzinomen, aber auch in ZNS-PNET, atypischen teratoiden/rhabdoiden Tumoren und Medulloblastomen, hypermethyliert und inaktiviert wird [71, 81]. Besonders interessant ist diese epigenetische Regulierung im Gegensatz zu genetischen Veränderungen, wie zum Beispiel einer Änderung in der Abfolge der Nukleotidsequenz durch eine Punktmutation, da die DNA-Hypermethylierung reversibel

und therapeutisch beeinflussbar ist. In den letzten Jahren sind daher viele epigenetische Krebsmedikamente entwickelt worden. Sie sind in einem Review von Rodríguez-Paredes und Esteller übersichtlich zusammengestellt (Abb. 4).

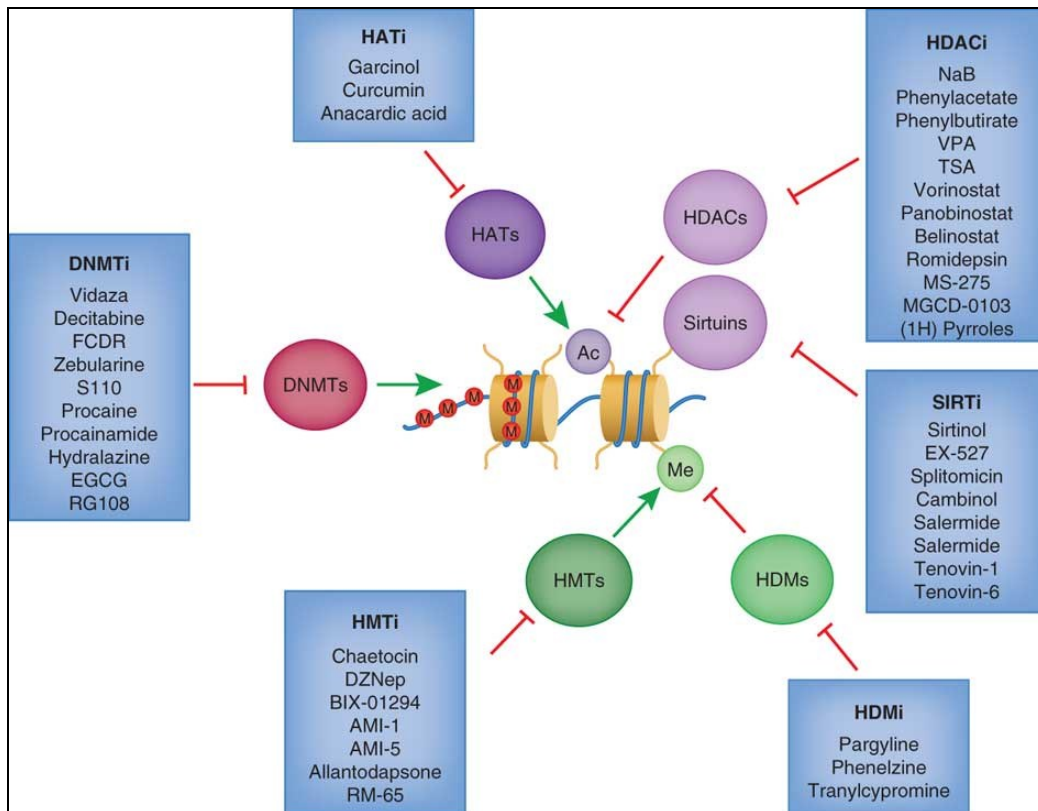


Abb. 4: Inhibitoren des Epigenoms als epigenetische Medikamente nach [95]. i als Suffix an den Enzymen bedeutet Inhibitor; HMT, Histonmethylase; HDM, Histondemethylase; SIRT, Sirtuin; HDAC, Histondeazetylase; HAT, Histonazetylase; DNMT, DNA-Methyltransferase; Decitabine entspricht 5-AZA.

Inhibitoren von DNA-Methyltransferasen und Histondeazetylasen sind die bisher am besten untersuchten Substanzgruppen. Jeweils zwei Substanzen sind mittlerweile von der US Food and Drug Administration zur Krebsbehandlung zugelassen. Eine Substanz ist Decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) für Patienten mit myelodysplastischem Syndrom, die eine akute Leukämie entwickeln. Alle Substanzklassen konnten in zahlreichen *In-vitro*-Studien zeigen, dass sie in der Lage sind, epigenetisch inaktivierte Gene zu reaktivieren. Auch die Arbeiten unserer Arbeitsgruppe in Hirntumoren des Kindes- und Jugendalters haben dies gezeigt [35, 81]. In den Behandlungsprotokollen für Hirntumo-

ren des Kindes- und Jugendalters werden epigenetische Medikamente bisher noch nicht benutzt. In der Literatur finden sich nur wenige Einzelfallberichte über die Anwendung. So wurden zum Beispiel von Witt et al. Valproat eingesetzt, nachdem das konventionelle Behandlungsprotokoll keine kurative Wirkung bei einem Glioblastoma multiforme bewirken konnte [121].

Epigenetische Medikamente sind ein Hoffnungsschimmer in der Therapie von hochmalignen Tumoren, die mit konventionellen Therapiekonzepten nicht zu behandeln sind. Jedoch muß man kritisch feststellen, dass man noch nicht über genügend Wissen und Erfahrung verfügt, was die unerwünschten Veränderungen anbetrifft, die diese Substanzen an anderen Stellen des Epigenoms/Genoms eventuell hervorrufen könnten.

1.3 Ziele der vorliegenden Dissertation

Von unserer Arbeitsgruppe und anderen Forschungsgruppen konnte gezeigt werden, dass epigenetische Veränderungen bei der Tumorentstehung und -ausbreitung von Hirntumoren des Kindes- und Jugendalters eine wichtige Rolle spielen. Von anderen Tumorentitäten bekannte Kandidatengene wurden intensiv in pädiatrischen ZNS-Tumoren untersucht. Mit Ausnahme von einzelnen Signaltransduktionswegen in Subgruppen sind die genetischen und vor allem epigenetischen Ursachen dieser Tumoren noch nicht komplett verstanden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels eines genomweiten Methylierungsscreenings (Restriction Landmark Genomic Scanning, RLGS) neue Kandidatengene in Medulloblastomen, ZNS-PNET und Ependymomen zu identifizieren. Im Anschluß wurde die DNA-Hypermethylierung im Southern Blot bestätigt. Zudem wurde die DNA-Methylierung der interessantesten Kandidatengene mittels Methylierungsanalysen in einer Serie von Tumorproben quantifiziert. Hierfür wurde ein Modell zur Methylierungsquantifizierung etabliert. Anschließend wurde durch semiquantitative Expressionsanalyse untersucht, ob DNA-Hypermethylierung der CpG-Inseln mit einer Inaktivierung der Genexpression einhergeht. Auch wurde analysiert, ob die epigenetisch inakti-

vierte Genexpression durch demethylierende Substanzen *in vitro* wiederhergestellt werden kann. Abschließend wurden die klinischen Daten der Patienten mit den molekularbiologischen Daten statistisch korreliert.

2 Material und Methoden

2.1 Proben und klinische Angaben der Patienten

Es wurden 11 Medulloblastome, zwei primitive neuroektodermale Tumoren des ZNS, drei Medulloblastom Zelllinien, eine ZNS-PNET Zelllinie und drei anaplastische Ependymome mittels Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) untersucht. Die klinischen Angaben der Proben, die mittels kalibrierter Combined Bisulfite Restriction Analysis untersucht wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt (detaillierte Angaben im Anhang der Arbeit):

Normale Gewebe	n	Alter bei Diagnose [Jahre] Median; Spannweite	Geschlechts- verteilung [m:w]
Cerebellum (CE) ^{a,b}	10	3,8; 0,5 – 17	1:1,25
Cortex cerebri (CM)	3	22,1; 0,25 – 60	1:2
Humane Lymphozyten aus Venenblut (PBL)	10	29,1; 24 – 39	1:1
Tumorgewebe			
MB (klassisch)	50	7,9; 0,42 – 21,58	2,57:1
MB (desmoplastisch)	5	8,8; 6,95 – 13,4	4:1
Ependymom WHO Grad II	15	6,8; 1,43 – 15,85	2,75:1
Anaplastisches Ependymom WHO Grad III	15	5,2; 0,98 – 11,08	1:1,14
ZNS-PNET	15	8,8; 0,1 – 33,89	1,16:1

Tab. 1: Übersicht über die Proben, die mittels kalibrierter Combined Bisulfite Restriction Analysis (kCOBRA) untersucht wurden.

^a zusätzlich noch Kleinhirngewebe von zwei 60- und 67-jährigen Männern

^b in einem Fall ist Geschlecht und Alter bei Diagnose unbekannt

Nach Genehmigung der Arbeit durch die Ethikkommissionen wurden sämtliche Proben vom Children`s Hospital der Ohio State University in Columbus Ohio, USA, von der Neuropathologie der Universitätsklinik Münster, Deutschland und vom Northern Institute for Cancer Research der Newcastle University, Großbritannien bezogen. Die Verwendung von Tumorgeweben oder von Gewebeproben nicht-tumorkranker Probanden erfolgte nach Zustimmung der lokalen Ethikkommissionen und nach Einverständnis der

Patienten respektive der Eltern. Es wurde Gewebe benutzt, welches intraoperativ oder autoptisch asserviert wurde und entweder sofort in Flüssigstickstoff eingefroren oder in Paraffinblöcken für die histologische Aufarbeitung fixiert wurde.

Als normale Kontrollen diente DNA aus dem Kleinhirn von 10 Kindern und zwei Erwachsenen und DNA aus dem Großhirn von zwei Kindern und einem Erwachsenen. Die Todesursachen waren nicht durch onkologische oder neurometabolische Erkrankungen bedingt. Darüberhinaus wurde DNA benutzt, die aus peripheren Blutlymphozyten (PBL) von 10 gesunden erwachsenen Spendern isoliert wurde.

2.2 Primer

Gen	F Primer	R Primer	Amplicon [bp]	Ta [°C]
<i>LPAR5</i>	CTCTGAGGGCAATGCTTCC	AGGTCGGTAGTCAGGACACG	488	58
<i>SFRP4</i> [106]	GTCCTCTCCATCCTAGTGG	GCTGAGATACGTTGCCAAAG	574	58
<i>KY</i>	CGAAAACCTGGTGGAGAAGC	CATGGATTTCAGGCTAGATCG	238	56
<i>SLC16A8</i>	CATGATCCTAGCTTCCTTGC	GTGCACACTGCCAAGTCC	201	53
<i>HoxC6</i>	TCTACTCGCGGTACCAGACC	AAGAGAGTTGTGCGGTGAGG	456	56
<i>GPI</i>	GACCCCCAGTTCAGAAGCTGC	GCATCACGTCTCCGTCACC	178	60

Tab. 2: RT-PCR Primer. F Primer, Forward Primer ; R Primer, Reward Primer ; Ta, Annealingtemperatur, das heißt die Temperatur, bei der die beiden Primer an die DNA hybridisieren.

Gen	Sonde		DNA-Verdau	Banden	
	Größe [bp]	Verdau/PCR		methyliert	unmethyliert
<i>HoxC6</i>	735	<i>PstI</i>	<i>AscI/XbaI</i>	4,6	2,9
<i>LPAR5</i>	1163	<i>BsrGI</i>	<i>AscI/XbaI</i>	9,8	5,9
<i>KY</i>	455	<i>NcoI</i>	<i>AscI/EcoRV</i>	5	3
<i>SFRP4</i>	650	F:CTGAACTTTGCTCCCTCTGC R:GAGCCAGCAATTGGACTACC [Ta: 55°C]	<i>AscI/XbaI</i>	3,5	1,8
<i>SLC16A8</i>	1128	<i>AscI/MseI</i>	<i>AscI/NcoI</i>	5,8	2,23/2,53

Tab. 3: Southern Blot der fünf Kandidatengene. Die Länge in Basenpaaren und die Generierung der Southern Blot-Sonden mittels PCR oder DNA-Verdau mit den dazugehörigen Restriktionsenzymen sind angegeben. Desweiteren ist die Kombination der gewählten Restriktionsenzymkombination und die resultierenden Bandengrößen in Abhängigkeit des Methylierungsstatus der *AscI*-Schnittstelle angegeben.

Gen	F Primer	R Primer	Amplicon [bp]	Ta [°C]	Restriktionsenzym
<i>HoxC6</i>	ATTGGAGAAGGAATTTTATTTAAT	CAATCCTAATCACTCTTCTACTTCTC	253	53	<i>BstUI</i>
<i>LPAR5</i>	GGTAGTAGTTTGTTTTTATAGTT	ACTACATCTTCTAATACTCATCAAC	247	48	<i>TaqI</i>
<i>KY</i>	GTATAGGGAGTGAAATTGGGGTAAT	TTAACCTCCTTACCACAAAAACCTA	188	57	<i>BstUI</i>
<i>SFRP4</i>	GTTTATTGTATTTTGGAGTTTTTGTA	GCCCCTAACACCTTAAATATAACC	296	54	<i>TaqI</i>
<i>SLC16A8</i>	AGAGGAGATTAGGGGTTTTTATT	ATAACCCTACCCTACCCACAAC	188	53	<i>BstUI</i>

Tab. 4: PCR-Primer und Restriktionsenzyme für die Combined Bisulfite Restriction Analysis. Es sind die Forward und Reverse Primer, die Länge des Amplicons, das mittels PCR vervielfältigt wird, die Annealingtemperatur für die PCR-Zyklen und das Restriktionsenzym für den abschließenden DNA-Verdau aufgeführt.

2.3 Zellkultur

Für die Reexpressionsuntersuchungen benutzten wir sechs Zelllinien aus humanen Medulloblastomen und jeweils eine Zelllinie aus einem spinalen und einem ZNS-PNET (Tab. 5). Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medi-

um (DMEM) mit hohem Glucoseanteil (Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland), 10-15% FCS und 4 mM L-Glutamin (Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland) ohne Zusatz von Antibiotika kultiviert. Hierfür wurden 75 cm² Zellkulturflaschen verwendet. Adhärenente Zelllinien wie Daoy, UW-228, PFSK, sowie die semiadhärenente Zelllinie MHH-PNET-5 wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (bei einer 80-95%-igen Konfluenz) mittels 0,05%-iges Trypsin (Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland) vom Zellkulturboden abgelöst. Die Suspensionszelllinien D283 Med, D341 Med, D425 Med und MHH-MED-1 wurden durch Zentrifugation (SIGMA 4K15C, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) geerntet, wenn die Dichte zwischen 1×10⁶ und 2×10⁶ Zellen/ml betrug. Exponentiell wachsende Zellen wurden für 24h und 72h mit den Testsubstanzen inkubiert. Es wurden die Testsubstanzen 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in den Konzentrationen von 5, 10, 20 und 40 µM allein und in Kombination mit 0,1 – 0,8 µM Trichostatin A (TSA, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) verwendet.

Zelllinie	Tumortyp	Herkunft
Daoy	Medulloblastom	ATCC, Rockland, USA
D283 Med	Medulloblastom	ATCC, Rockland, USA
MHH-MED-1	Medulloblastom	T.Pietsch, Universität Bonn, Deutschland
D341 Med	Medulloblastom	ATCC, Rockland, USA
MHH-PNET-5	spinaler PNET	T.Pietsch, Universität Bonn, Deutschland
D425 Med	Medulloblastom	T.Pietsch, Universität Bonn, Deutschland
UW-228	Medulloblastom	J. Silber, Washington State University, Seattle, USA
PFSK	ZNS-PNET	ATCC, Rockland, USA

Tab. 5: Herkunft der Zelllinien.

2.4 RNA-Isolierung aus Zelllinien

Für die Extraktion der Gesamt-RNA aus den Kulturzellen wurden pro 6×10⁶ Zellen 0,75 ml TRIzol[®] Reagenz (enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat von Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Pro 0,75 ml Trizol[®] Reagenz wurden 0,2 ml Chloroform (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zugefügt und anschließend wurde die homo-

genisierte Probe für 2-3 Minuten bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Lysat 15 Minuten bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, Wesseling-Berzdorf, Deutschland). In dem entstandenen 3-Phasen-Gemisch wurde die sich in der wässrigen oberen Phase befindliche RNA in ein frisches Gefäß überführt (bis 600 µl), ohne Verschmutzungen durch übrige Zellkomponenten und DNA aus der Interphase bzw. Unterphase mitzunehmen. Zur Präzipitation der RNA wurden 0,5 ml Isopropanol sowie 2 µl Glykogen (Roche, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt, geschüttelt und für 1h bei -20°C inkubiert. Dann wurde die Probe bei 12.000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abpipettiert und das RNA-Pellet mit 75%-igem Ethanol gewaschen (pro 0,75 ml Trizol 1 ml 75%-igem Ethanol) sowie bei 7.500 rpm und 4°C 5 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Ethanol-Überstand entfernt und das RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das RNA-Pellet in 30 µl DEPC H₂O bei 55-60°C 10 Minuten gelöst.

Die Qualität der Aufreinigung wurde durch Auftragen von 1 µl isolierter RNA auf ein 1%-iges denaturiertes Agarosegel (Serva, Heidelberg, Deutschland) und gelelektrophoretische Auftrennung kontrolliert.

Die RNA-Konzentration wurde über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (Eppendorf BioPhotometer, Hamburg, Deutschland) bestimmt; sie berechnet sich nach der Formel: $Abs_{260} \times 4 \times \text{Verdünnung}$ (Verdünnung: 2 µl RNA ad 200 µl TE-Puffer).

2.5 cDNA-Synthese

Die RNA wurde mittels thermostabiler Polymerasen in cDNA umgeschrieben (ThermoskriptTM, Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland). Insgesamt wurden 2 µg RNA verwendet, die zunächst in zwei Ansätzen à 1 µg verwendet und zum Schluss zusammengefügt wurden. In ein Eppendorfggefäß wurden zu 1 µg RNA 1 µl Zufallshexamere (random primer) gegeben und mit DEPC H₂O auf 10 µl aufgefüllt, während im anderen Ansatz 1 µl Oligo (dT)₂₀-Primer hinzugegeben wurden. Zum Denaturieren der Sekun-

21

därstrukturen der RNA wurden beide Proben 5 Minuten bei 65°C erwärmt und im Anschluß auf Eis gekühlt. Ein Master-Mix, bestehend aus 4 µl 5×cDNA-Puffer, 1 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 1 µl RNase OUT (40 U/µl), 2 µl dNTP (10 mM), 1 µl Thermoscript (15 U/µl) als reverse Transkriptase und 1 µl DEPC H₂O, wurde jeweils hinzugefügt. Anschließend wurde der Ansatz mit den Random Hexamerprimern 10 Minuten bei 25°C und danach 50 Minuten bei 50°C, der Oligo (dT)₂₀-Primer Ansatz 60 Minuten lang bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme in beiden Proben 5 Minuten bei 85°C hitzeinaktiviert. Abschließend wurden die Ansätze zusammengefügt und mit 20 µl DEPC H₂O aufgefüllt. Die Qualität der cDNA-Synthese wurde mittels RT-PCR des Housekeeping-Gen Glukosephosphatisomerase (*GPI*) kontrolliert.

2.6 Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer Express (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) entworfen und bei Invitrogene (Karlsruhe, Deutschland) bestellt (Tab. 2). Das Volumen der PCR-Reaktion betrug 25 µl. Pro Reaktion wurde zur cDNA der PCR-Master-Mix, bestehend aus 1 µl Forward Primer (10 µM), 1 µl Reverse Primer (10 µM), 1 µl dNTP (10 mM, Q-Biogene, Heidelberg, Deutschland), 1 µl DMSO (100%, Serva, Heidelberg, Deutschland), 2 µl MgCl₂ (25 mM, Q-Biogene, Heidelberg, Deutschland), 2,5 µl 10×Puffer (Q-Biogene, Heidelberg, Deutschland), 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl, Q-Biogene, Heidelberg, Deutschland) und ddH₂O (Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland) zu einem Gesamtvolumen von 25 µl, gegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte in dem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die Proben wurden initial für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Dann schlossen sich 40 Zyklen, bestehend aus einem Denaturierungsschritt (30 s bei 96°C), einem Annealingschritt (30 s bei primerspezifischer Annealingtemperatur, Tab.2) und einem Elongationsschritt (1 Minute bei 72°C), an. Zuletzt erfolgte eine finale Elongation für 5 Minuten bei 72°C.

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese auf einem 1,8%-igen Agarosegel (Serva, Heidelberg, Deutschland) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid durch UV-Licht

visualisiert. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe eines Videodokumentationssystems GelDoc System (Bio-Rad, Hercules, USA).

2.7 DNA-Extraktion

2.7.1 Extraktion hochmolekularer DNA

Hochmolekulare DNA wurde für die Analysen mittels Southern Blot und kCOBRA aus Zelllinien (ZL), humanen Lymphozyten aus Venenblut (PBL) und Geweben isoliert. Die benutzte Methode wurde von Blin und Stafford 1976 erstbeschrieben [13]. Zunächst wurde das gefrorene Material auf Eis aufgetaut, in 25 ml Lösung (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM EDTA pH 8,8 und 1% Sarkosyl) für Gewebe und 10 ml Lösung für PBL und Zelllinien mit 150 µl Proteinase K (für PBL und ZL 70 µl) (10 mg/ml, Roche, Mannheim, Deutschland) resuspendiert und 20 Minuten bei 55°C inkubiert. Das Gemisch wurde für 5 Minuten auf Eis gekühlt und DNA durch Zugabe gleicher Menge PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 50:49:1) extrahiert. Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde im Rotator bei 25 rpm durchmischt. Nach Abzentrifugieren für 20 Minuten bei 3.500 rpm wurde die obere klare Flüssigkeit, welche die Nukleinsäuren enthält, in ein zweites Falcon Röhrchen überführt und der PCI-Schritt wiederholt. Der wässrige klare Überstand wurde nun in Dialyseschläuche (Gibco, München, Deutschland) überführt. Diese wurden zweimal gegen 4 l 10 mM Tris-HCl pH 8,0 dialysiert (über Nacht und für 2 Stunden). Die Lösung wurde nun aus den Dialyseschläuchen in frische 50 ml Falcon Röhrchen transferiert und RNase zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml (2 µl für Gewebe und 1 µl für PBL und ZL) hinzugefügt. Diese Proben wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde dann mit 2,5 Volumen 100% Ethanol gefällt und vorsichtig eine Stunde im Rotator bei 15 rpm gemischt. Das Pellet wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und kurz abzentrifugiert, und der Ethanolüberstand wurde verworfen. Nach kurzer Lufttrocknung wurde das Pellet in Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1 mM EDTA) gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

Die DNA-Qualität wurde durch elektrophoretische Auftrennung auf einem 0,8%-igem Agarosegel überprüft. Für kCOBRA-Untersuchungen wurde die Viskosität der DNA

durch Aspiration durch periphere Venenverweilkanülen (Größe 22 G) vermindert und weiter verdünnt. Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm durch ein UV-Spektrometer bestimmt.

2.7.2 DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten

Zur Extraktion genomischer DNA aus Paraffinschnitten für die kCOBRA-Untersuchungen wurden die Paraffinschnitte zunächst durch Zugabe von 1 ml Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland) pro Eppendorf Reaktionsgefäß deparaffiniert. Dazu wurden die Proben mit Xylol gevortext, 15 Minuten bei 63°C im Heizblock geschüttelt und anschließend 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Daraufhin wurde 1 ml 100% Ethanol auf das Pellet gegeben, geschüttelt, in verschraubbare Röhrchen überführt, für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Ethanolvorgang wurde zweimal durchgeführt. Anschließend wurde das Pellet 1 Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Auf das Pellet wurden dann 400 µl Extraktionspuffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 0,5% Tween 20 und Aqua-Bidest) und 50 – 60 µl Protein-kinase K (10 mg/ml, Roche, Mannheim, Deutschland) gegeben. Dieses Gemisch wurde für 2 Tage auf dem Rotator bei 56°C inkubiert. Nach dem Verdau erfolgte die DNA-Fällung mittels Phenol/Chloroform-Extraktion. Hierfür wurde 450 µl Phenol hinzugegeben, für 3 Minuten manuell durchmischt und 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 450 µl Phenol/Chloroform gemischt und 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum in ein neues Gefäß überführt. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand mit 450 µl Chloroform mit 4% Isoamylalkohol gemischt und 5 Minuten lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Auf den Überstand wurden 2 Volumenanteile eiskaltes 100%-iges Ethanol, 15 µl 5 M NaCl und 2 µl Glycogen gegeben und über Nacht bei – 80°C gefällt. Daraufhin wurde dieser Ansatz 30 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde auf das DNA-Pellet 50 µl Aqua-Bidest gegeben und das Röhrchen bei + 4°C aufbewahrt.

2.7.3 DNA-Extraktion aus Plasmiden

Konnten CpG-Inseln (z.B. a4E36) mittels des RLGS-Gelkatalogs der *AscI-EcoRV*-Klonbank einem Klon zugeordnet werden, wurde von der Klonadresse (z.B. 26I20) Bakterien mit der Plasmid-DNA gepickt. Die *AscI-EcoRV* Fragmente befanden sich in einem Bluescript KSII⁺-Vektor. Bakterien mit der Plasmid-DNA wurden zunächst auf Agarplatten, welche Ampicillin (100 µg/ml) enthielten, ausgestrichen. Nach Wachstum über Nacht wurde eine einzelne Bakterienkolonie gepickt und in 5 ml „Luria-Bertani“-Medium über Nacht inkubiert. DNA wurde nun mittels eines kommerziellen QIAprep Miniprep Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Dazu wurden zunächst die Bakterien 15 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterien-Pellet in 250 µl Puffer P1 (50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase) resuspendiert. 250 µl Lyse-Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde hinzugefügt, gut gemischt und 350 µl Neutralisationspuffer N3 hinzugegeben, um die Reaktion zu neutralisieren. Dieses Gemisch wurde 10 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert und mit dem klaren Überstand wurden die Spin-Säulen mit einer Silikat-Membran, an welche die DNA band, gefüllt. Diese Spin-Säulen wurden zunächst 1 Minute zentrifugiert, dann mit 500 µl Hochsalzpuffer equilibriert, wieder zentrifugiert und mit 750 µl Puffer PE aufgereinigt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl ddH₂O eluiert.

2.8 Restriction Landmark Genomic Scanning

Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) wurde als eine genomweite Screeningmethode verwendet, um verändert methylierte genassoziierte CpG-Inseln in kindlichen Hirntumoren zu detektieren. RLGS wurde erstmals von Hirotsune und Mitarbeitern beschrieben und genutzt, um Amplifikationen in Tumoren genomweit zu finden [46]. Dai et al.[19] etablierten RLGS mit dem methylierungssensitiven Enzym *AscI* kombiniert mit *EcoRV*.

Das Prinzip der RLGS basiert auf einem sequentiellen Restriktionsverdau in Kombination mit einer zweidimensionalen Gel-Elektrophorese (Abb. 5 und 6). Intakte genom-

sche DNA wird zunächst mit dem Restriktionsenzym *EcoRV*, einem methylierungsin-sensitiven 6 Basenpaar-Schneider, geschnitten. Im Anschluss erfolgt der Restriktions-verdau mit *AscI*, einem selten schneidenden methylierungssensitiven Enzym. *AscI* schneidet nur unmethylierte CpG-Stellen innerhalb der Restriktionsschnittstelle, ist die-se methyliert so kann das Enzym nicht schneiden. Die geschnittenen überlappenden Enden werden radioaktiv markiert. Anschließend wird eine Gel-Elektrophorese auf ei-nem zweidimensionalen Agarose-Gel durchgeführt. Die DNA im Gel wird nun mit ei-nem dritten Restriktionsenzym *Hinfl*, welches sehr häufig im Genom schneidet, verdaut. Im Anschluß wird die DNA über ein Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch in die zweite Dimension aufgetrennt. Im RLGS-Autoradiogramm kann man schließlich Signale von sogenannten Spots, die DNA Fragmenten entsprechen, detektieren. Diese DNA-Fragmente entsprechen *AscI-EcoRV*-Fragmenten, welche noch mit *Hinfl* geschnitten wurden. *AscI-EcoRV*-Fragmente sind besonders häufig in 5'-Bereichen von Genen und CpG-Inseln zu finden [19], daher wurden diese synonym in dieser Arbeit als CpG-Inseln bezeichnet. Durch den Vergleich zweier Proben können die RLGS-Muster unter-sucht werden. Alle RLGS-Profile von Tumoren wurden gegen drei Kontrollen, nämlich zwei Kleinhirnproben des oberen und unteren Vermis sowie peripheren Blutlymphozy-ten, verglichen. Dies erfolgte durch direktes Übereinanderlegen der Folien und visuelle Auswertung. Die Spotbezeichnung wurde in einem Masterprofil festgelegt (gemischte PBL-DNA). Der Verlust eines Spots, welcher eine CpG-Insel repräsentiert, kommt durch die Methylierung der *AscI*-Restriktionsschnittstelle oder durch genomischen Ver-lust, wie zum Beispiel Polymorphismen, innerhalb der Restriktionsschnittstelle zustan-de. Eine Amplifikation eines Spots kommt durch das Vorliegen einer hohen Kopienzahl des DNA-Bereiches, in dem sich die Restriktionsschnittstelle befindet, zustande. Wird im RLGS-Gel einer Probe im Gegensatz zur Kontrolle ein neuer Spot detektiert, so wird dieser durch Hypomethylierung der *AscI*-Restriktionsschnittstelle in der Probe gene-riert. Ein Verlust, ein Gewinn oder eine Amplifikation einer CpG-Insel in einer Tumor-probe wurde angegeben, wenn mindestens gegenüber drei Normalkontrollen die Verän-derung auftrat. Durch den Vergleich zu den Normalkontrollen wurde angestrebt, mögli-che alters- und gewebespezifische Unterschiede sowie Polymorphismen auszuschließen [50].

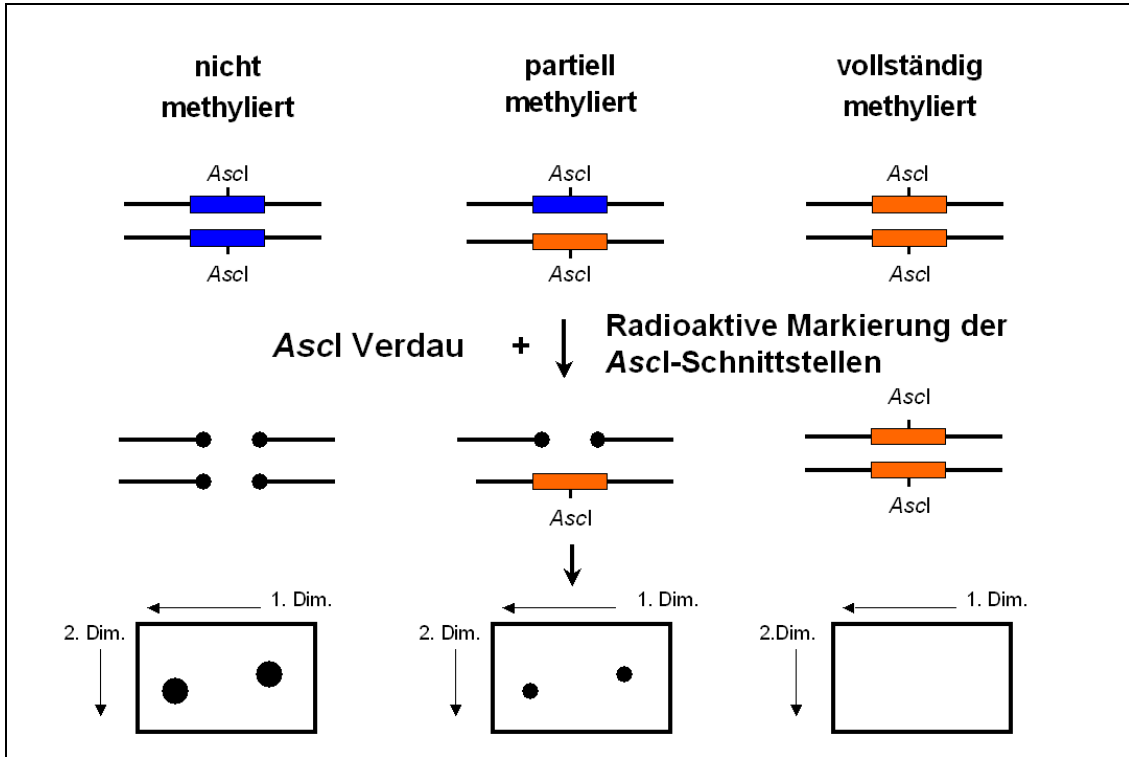


Abb. 5: Prinzip des Restriction Landmark Genomic Scanning. Im vereinfachten Schema ist die *Ascl*-Restriktionsschnittstelle alleine dargestellt. Es bestehen drei Möglichkeiten: nämlich beide Allele, die die Schnittstelle tragen, sind nicht methyliert, sind differentiell methyliert oder sind biallelisch methyliert. Im letzteren Fall ist in der Autoradiographie kein Signal vorhanden, bei partieller Methylierung ein schwächeres Signal und liegt keine Methylierung vor, so erhält man das volle Signal.

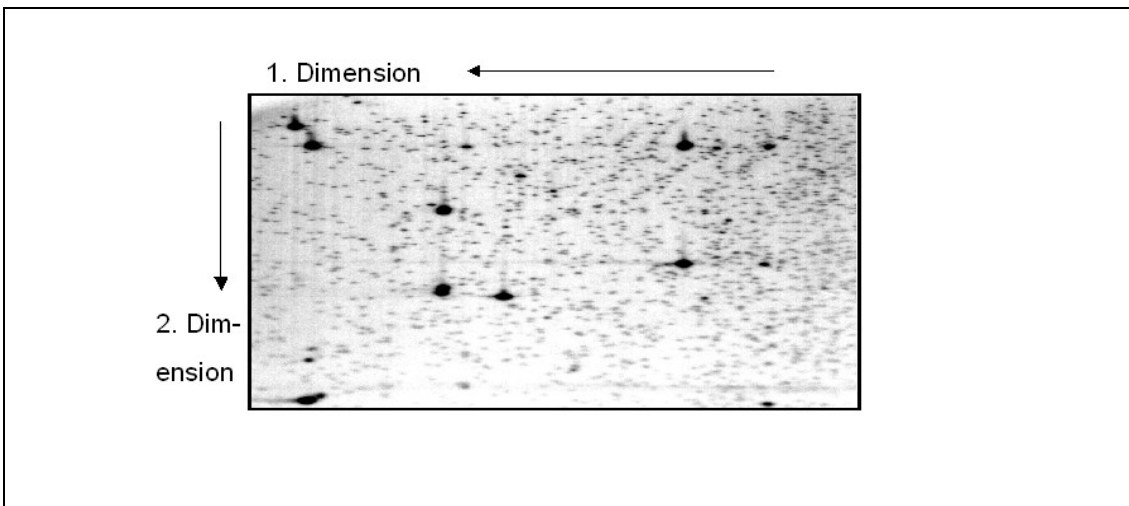


Abb. 6: *Ascl*-RLGS-Gel. Dargestellt ist ein Beispiel für die gelbasierte RLGS mit dem Landmark-Enzym *Ascl*. Die großen intensiven Spots entsprechen genomischen Amplifikationen, die einzelnen Spots oder auch CpG-Inseln werden anhand eines Master-Profils bezeichnet.

2.9 Identifizierung hypermethylierter CpG-Inseln

Hypermethylierte CpG-Inseln, welche in den RLGS-Gelen gefunden wurden, sollten mittels einer Klonbank-basierten Methode oder im virtuellen Genomscan (VGS) identifiziert werden (Abb.7).

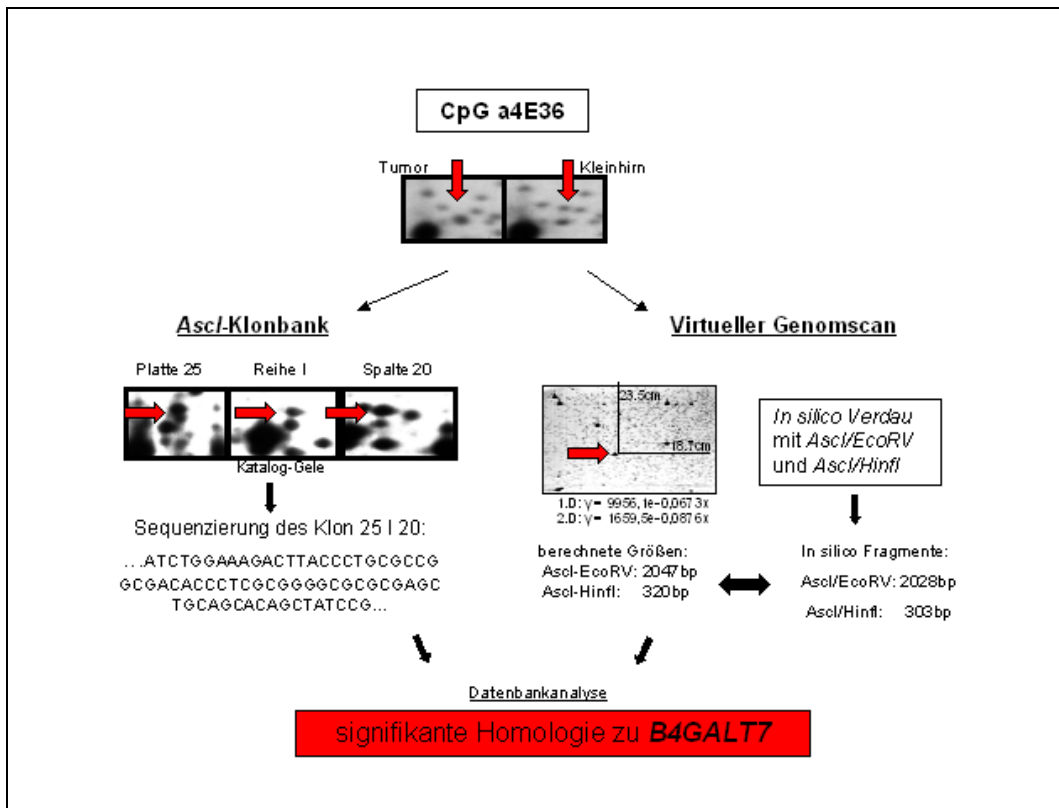


Abb. 7: Vorgehen bei der Identifizierung von CpG-Inseln. Die CpG-Inseln, die in der RLGS in Tumoren fehlten und sehr wahrscheinlich hypermethyliert waren, wurden nach dem Master-Profil benannt, zum Beispiel CpG-Inseln a4E36. Konnte die CpG-Inseln durch die etablierte Ascl-Klonbank einem Klon zugeordnet werden, so wurde dieser sequenziert und mit Hilfe von Datenbankanalysen Homologien im menschlichen Genom zugeordnet. War die Suche in der Klonbank nicht erfolgreich, wurde ein virtueller Genomscan durchgeführt, indem die Fragmentgrößen der CpG-Inseln mittels Algorithmen für die erste und zweite Dimension bestimmt wurden. Diese Fragmentgrößen wurden mit in silico verdauten DNA-Fragmenten des menschlichen Genoms verglichen. Weitere Erläuterungen folgen in 2.9.1 und 2.9.2.

2.9.1 Klonbank-basierte Methode

Hypermethylierte CpG-Inseln, die in der RLGS gefunden wurden, wurden vor allem durch eine Klonbank-basierte Klonierungstechnik identifiziert. Dai et al. etablierten 2002 [19] eine Klonbank, bestehend aus 32 Platten à 384 Kammern (16 Reihen x 24 Spalten). Hierzu wurden *AscI-EcoRV*-Fragmente aus genomischer DNA angereichert und nach einer Qualitätskontrolle in den Bluescript KSII⁺-Vektor kloniert. Zur eindeutigen Zuordnung von CpG Inseln in der Klonbank wurde ein Katalog von RLGS-Gelen angefertigt. Dieser Katalog enthält 32 RLGS-Gele (1-32), auf denen jeweils alle Klone der 32 Platten aufgetragen sind, sowie 16 RLGS-Gele (A-P), auf denen jeweils alle Klone dergleichen Reihen aufgetragen sind, und 24 RLGS-Gele (1-24), die jeweils alle Klone dergleichen Spalten repräsentieren. Auf diese Weise kann durch Vergleich des Master Profils mit dem Gel-Katalog eine zu interessierende CpG-Insel einem Klon zugeordnet werden, z.B. a2E34 entspricht der Klonadresse 25N21.

Da in der Klonbank gleiche Klone verschiedene Adressen aufweisen können, brachte diese Methode jeweils mehrere Möglichkeiten hervor, z.B. für a2E34 Treffer in den Platten 1, 8, 16, 25 und 27 sowie in den Reihen I, K und N und in den Spalten 6, 7, 18, 20 und 21. In dem Beispiel bedeutet dies 75 mögliche Klonadressen.

Um den richtigen Klon herauszufinden, wurden alle in Frage kommenden Klone aus der Bank gepickt, die Plasmid-DNA isoliert und ein Restriktionsverdau mit *AscI* und *EcoRV* durchgeführt. Sämtliche Restriktionsenzyme bezogen wir von New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland). Der Verdau von jeweils 1 µg DNA für 1 Stunde wurde gemäß den Herstellerempfehlungen für Zusätze und Temperatur durchgeführt.

Die Fragmentgrößen des RLGS Masterprofils für die erste Dimension (*AscI-EcoRV*) und für die zweite Dimension (*AscI-HinfI*) wurden gemäß folgender Formeln berechnet:

$$1. \text{ Dimension: } y = 9956.1 e^{-0.0673x}$$

$$2. \text{ Dimension : } y = 1659.5 e^{-0.0876x}$$

Bei Übereinstimmung der verdauten Klonfragmente mit den Fragmentgrößen aus dem RLGS-Gel wurde die Plasmid DNA des jeweiligen Klons sequenziert.

AscI-EcoRV Fragmente wurden mit den M13 forward und reward Primern im ABI PRISM 7700 System (Applied Biosystems, USA) sequenziert. DNA-Sequenzen wurden mit der Computersoftware Chromas ausgewertet.

Für die Suche nach Homologien wurden die sequenzierten Klone in die Datenbank von „human BLAT search“ (<http://genome.ucsc.edu>) eingegeben.

2.9.2 Virtueller Genomscan (VGS)

Da die Klonbank nicht alle CpG-Inseln enthält, wurde ein von Zardo und Mitarbeitern veröffentlichtes Perl-Skript benutzt [123], das an den *AscI-EcoRV*-Verdau angepasst wurde.

Im so genannten virtuellen Genomscan (VGS) wurden zunächst die Fragmentgrößen mit oben aufgeführtem Größenalgorithmus für die erste Dimension (*AscI-EcoRV*-Fragment) und die zweite Dimension (*AscI-HinfI*-Fragment) berechnet. Diese Fragmentgrößen wurden mit den Ergebnissen des *in silico* Verdau des menschlichen Genoms mit *AscI*, *EcoRV* und *HinfI* (Version Juli 2003 der University of California, Santa Cruz, USA (UCSC), <http://genome.ucsc.edu>) verglichen. Die richtige Lage der Schnittstellen der Restriktionsenzyme kontrollierten wir mit Hilfe des öffentlichen NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

2.10 Southern Blot

Um die Methylierung der *AscI*-Schnittstellen in den CpG-Inseln der RLGS-Gele zu bestätigen, wurden Southern Blot-Untersuchungen durchgeführt. Da für diese Methode große Mengen hochmolekularer DNA benötigt werden und Proben von ZNS-Tumoren des Kindes- und Jugendalters nur bedingt verfügbar sind, wurden drei MB- (Daoy, MHH-MED-1 und D425 Med) und eine ZNS-PNET- (MHH-PNET-5) Zelllinie und zwei normale Kleinhirnproben (PNO174 und PNO192) benutzt.

Genomische DNA wurde mit einem ausgewählten Restriktionsenzym zuerst allein (Tab.4, *EcoRV* (GAT^rATC), *HindIII* (A^rAGCTT), *NcoI* (C^rCATGG), *PvuII* (CAG^rCTG), *XbaI* (T^rCTAGA) und dann in einem zweiten Ansatz zusammen mit *AscI* (CG^rCGCGCC) verdaut.

7,5 µg verdaute DNA wurde im Anschluß auf einem 0,8%-igem Agarosegel bei 35 V über Nacht (14-16 h) aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel mit einem fluoreszierendem Lineal auf einer UV-Lichtquelle (GelDoc System) photographiert. Danach wurde das Gel für 20 Minuten in 0.25 M HCl depuriniert. Nach kurzem Waschen mit ddH₂O wurde das Gel in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) zweimal 20 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert. Nun wurde die DNA mittels Vakuum Blotter (Vacu Gene XL Vacuum Blotting system) auf eine Nylonmembran (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien) für 90 Minuten unter 55 mbar transferiert. Während des Transfers wurde das oben aufliegende Gel stets mit Denaturierungslösung feucht gehalten. Nach dem Transfer wurden die Geltaschen mit Bleistift auf der Membran markiert. Das Gel wurde nun entfernt, die Membran in 0,4 M Phosphatpuffer eingetaucht, kurz mit ddH₂O abgespült und bei Raumtemperatur auf Whatman Filterpapier getrocknet. Danach wurde die Membran in einem Crosslinker (Stratagene, La Jolla, USA) mit UV-Licht bestrahlt, damit die DNA kovalent an die Nylonmembran bindet. Im Anschluß wurde die Membran zusätzlich für 1-2 h bei 80°C gebacken.

Die Sondenmarkierung und Hybridisierung wurden leicht modifiziert nach der Beschreibung von Sambrook et al. [103] durchgeführt. Die Sonden für die Hybridisierung wurden durch Restriktionsenzymverdau aus den korrespondierenden *AscI/EcoRV*-Klonen oder durch PCR hergestellt (Tab. 3).

Die Sondenmarkierung mit Radioaktivität wurde durch „random priming“ mit Hilfe der DNA-Polymerase-Funktion von Klenow-Enzym von *Escherichia coli* (Roche, Mannheim, Deutschland) generiert. Hierfür wurde 20 ng Sonden-DNA mit 1,5 µl Zufallsheptameren (random primers) zu 12 µl Volumen mit ddH₂O aufgefüllt. Zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA wurde dieser Ansatz für 5-10 Minuten bei 100°C gekocht

und anschließend kurz zentrifugiert. Nun wurden zum Markieren radioaktiv markierte α -³²P-dCTP Nukleotide (1,5 μ l) sowie je 1,3 μ l restliche dNTPs mit 2 μ l Reaktionspuffer und 0,6 μ l Exo(-)Klenow-Enzym gemischt und kurz zentrifugiert. Zum Markieren wurde dieses Gemisch für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und im Anschluß durch Hinzufügen von 3 μ l 0,2 M EDTA gestoppt.

Die geblottete Nylonmembran wurde für mindestens 3 Stunden bei 65°C in 15 ml Prähybridisierungslösung (0,5 M Phosphatpuffer, 7% SDS) vorbereitet. Die Membran wurde mit einzelsträngiger Lachssperma-DNA (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) bestehend aus 0,5 mg/ml Lachssperma-DNA, 2 mg/ml Hefe tRNA, 33 mM Tris pH 8,0) geblockt, um unspezifische Bindung der radioaktiv-markierten Sonden zu verhindern. Hierfür wurde S256 für 10 Minuten bei 100°C gekocht und anschließend 2 Minuten auf Eis gekühlt. 1,5 ml S256 wurden zur Prähybridisierungslösung hinzugefügt sowie 400 μ l zur Hybridisierungslösung.

Nach der Prähybridisierung wurde die Lösung verworfen und 3 ml frische Hybridisierungslösung hinzugefügt. Die markierte Sonde wurde durch Kochen für 5 Minuten denaturiert und es wurden 500 μ l Hybridisierungslösung hinzugegeben und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde über Nacht für 12-18 Stunden bei 65°C bei stetiger langsamer Rotation hybridisiert.

Hierauf wurde die Membran mit Waschlösung 1 (0,2 M Phosphatpuffer, 0,1 % SDS) für 35 Minuten und anschließend mit einer stringenteren Waschlösung 2 (0,02 M Phosphatpuffer, 0,1% SDS) mindestens für 15 Minuten bei 65°C gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Orientierend wurde die Radioaktivität mittels Geigerzähler auf der Membran gemessen und der Waschvorgang angepasst.

Die Membran wurde nun in Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht bei -70°C auf einen Röntgenfilm (Autorad-Film von Kodak, Amersham, Freiburg, Deutschland) exponiert. Um eine Membran nochmals zu benutzen, wurde diese mit Waschlösung 2 für 30 Minuten bei 80°C gestrippt.

2.11 Kalibrierte „Combined Bisulfite Restriction Analysis“

2.11.1 Bisulfit-Behandlung

Die Behandlung von DNA mit Bisulfit bewirkt die Konversion von unmethylierten Cytosinresten zu Uracil. Methylierte Cytosinreste werden nur zu einem sehr geringen Anteil deaminiert [22, 32] und bleiben somit als Cytosinreste bestehen. Daher ist durch die Bisulfit-Behandlung eine Diskriminierung auf Basis von unterschiedlichen DNA-Sequenzen der methylierten und unmethylierten Cytosinreste möglich (Abb. 8).

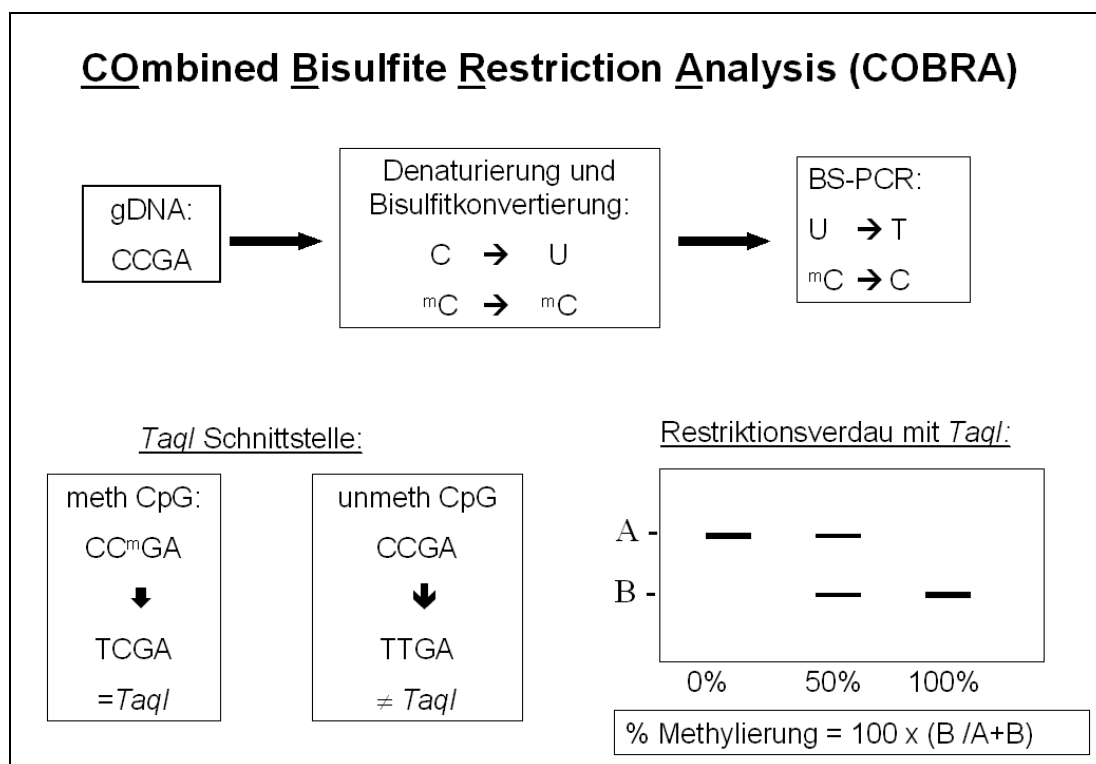


Abb. 8: Übersicht über die Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA). Zunächst wird genomische DNA mit Bisulfit behandelt. Dabei bleiben innerhalb von CpG-Dinukleotiden methylierte Cytosinreste (^mC) unverändert und unmethylierte Cytosinreste (C) werden zu Uracil deaminiert. Im Bisulfit-PCR-Schritt wird Uracil zu Thymin umgewandelt, Cytosin bleibt als Cytosin bestehen. Die BS-Primer werden so gewählt, dass ein DNA-Fragment amplifiziert wird, welches in der Bisulfit-behandelten DNA eine neue Restriktionsschnittstelle mit CpG-Dinukleotid enthält. Abschließend wird die amplifizierte DNA in einem enzymatischen Schritt mit Enzymen (*TaqI* oder *BstUI*) verdaut, die ein CpG-Dinukleotid in ihrer Schnittstelle tragen. Auf diese Weise wird zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinresten diskriminiert. Die verdaute DNA wird zur Visualisierung auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Schneidet das Restriktionsenzym das DNA-Fragment komplett, so

ist der ursprüngliche Cytosinrest im CpG-Dinukleotid komplett (Bande B 100%) methyliert. In dem Fall erhält man eine einzelne kleinere Bande im Gel. Das Restriktionsenzym schneidet nicht, wenn der unmethylierte Cytosinrest im CpG-Dinukleotid keine Restriktionsschnittstelle generiert. In diesem Fall erhält man beim Auftragen der Proben die komplette Bandenlänge des amplifizierten DNA-Fragmentes (Bande A entspricht 0% Methylierung). Bei partieller Methylierung des Cytosinrestes im CpG-Dinukleotid erhält man geschnittene und nicht geschnittene DNA-Fragmente. Das Verhältnis von verdauten Banden zu der Gesamtheit der aufgetragenen Banden ergibt den Methylierungsgrad (multipliziert mit 100 ergibt die Methylierung in Prozentpunkten).

Bei der Bisulfit-Behandlung wurde folgendermaßen vorgegangen:

2 µg genomische DNA wurde mit 0,3 M NaOH in einem Gesamtvolumen von 55,5 µl für 20 Minuten bei 45° inkubiert. Natriumbisulfit (5 mM Hydrochinon und 2,6 M Natriumbisulfit bei pH 5) wurde frisch hergestellt, hinzugefügt, gemischt und für 6 - 8 Stunden bei 55° inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des „QIAquick gel extraction kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) und einer Vakuumpumpe (Vac-Man® Laboratory vacuum Manifold, Madison, USA) nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA-Modifikation wurde mit der Desulfonisierung mit NaOH (Zielkonzentration 0,3 M) für 20 Minuten bei 45° komplettiert. Die mit Ethanol ausgefällte DNA wurde in 30 µl ddH₂O gelöst.

2.11.2 Bisulfit-PCR (BS-PCR)

Die Bisulfit-behandelte DNA wurde nun in einem PCR-Schritt amplifiziert. Unmethylierte Cytosinreste, welche durch die Bisulfit-Behandlung zu Uracil deaminiert wurden, wurden so in Thymin umgewandelt. Methylierte Cytosinreste blieben während der Bisulfit-Behandlung und PCR-Schritt als Cytosin bestehen. Zur Amplifikation benutzte Primer enthielten keine CpG-Dinukleotide, so dass im Amplifikationsschritt DNA unabhängig vom ursprünglichen Methylierungsstatus vervielfältigt wurde.

Die Primer wurden mit Hilfe der öffentlich zugänglichen Software von Methprimer® [66] gestaltet, die Primersequenzen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die BS-PCR Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt mit 1 x Platinum *Taq*-Polymerase Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 0,5 µM von jedem Primer, 1,5 mM MgCl₂, 250 mM dNTPs, 1,25 Units Platinum *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karls-

ruhe, Deutschland) und 1-1,5 µl von Bisulfit-behandelter DNA (entsprechend 66,7-100 ng von Bisulfit-behandelter gDNA). Dem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 3 Minuten schlossen sich 40 Zyklen (30 s bei 96°C, 30 s bei der spezifischen Annealingtemperatur, Extensionsphase bei 72°C für 30 s, komplettiert von einem letzten Extensio-
onsschritt bei 72°C für 4 Minuten). Die PCR-Fragmente wurden anschließend auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, nach Visualisierung unter Ultraviolettlicht herausgeschnitten und schließlich mit Hilfe des QIAquick Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

3 µl der aufgereinigten DNA wurden auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt, um die DNA-Konzentration durch Vergleich mit Hyperladder I und II (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) zu bestimmen.

2.11.3 Combined Bisulfite Restriction Analysis

Der Methylierungsgrad von den untersuchten CpG-Dinukleotiden wurde in einem abschließenden Schritt durch Enzymverdau bestimmt. Dabei wurden Restriktionsenzyme benutzt, die die methylierungsabhängigen CpG-Dinukleotide in ihren Schnittstellen tragen, wie *Bst*UI (CGCG) oder *Taq*I (TCGA). 60 ng der aufgereinigten BS-PCR-DNA wurde nach Herstellerangaben mit dem spezifischen Restriktionsenzym (Tab. 5, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) verdaut. Die verdauten DNA-Fragmente wurden anschließend auf einem 8%-igen Polyacrylamidegel mit einem 10-Basenpaarstandard (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht mittels eines GelDoc System (Bio-Rad, Hercules, USA) sichtbar gemacht.

2.11.4 Kalibrationsfunktion

Um die in der COBRA erhaltenen DNA-Fragmente besser quantifizieren zu können, wurde für fünf Kandidatengene jeweils eine Kalibrationsreihe etabliert. Zweck der Kalibrationsreihen war die Bestimmung von Kalibrationsfunktionen, mit denen der Me-

thylierungsgrad der untersuchten CpG-Regionen objektiv in Prozentpunkten angegeben werden kann. Dies war vorher in der Literatur nicht beschrieben. Die Kalibrationsreihen wurden durch das Mischen von Klonen, die komplett methylierte und unmethylierte DNA enthielten, erstellt, um eine Reihe von 0% bis 100% Methylierung in 10er Prozentschritten zu erhalten. Hierfür wurden die aufgereinigten BS-PCR Produkte benutzt und in den pCR2.1[®] Vektor (TA Cloning Kit, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Die Methylierung und die Bestätigung der richtig ausgewählten Klone erfolgten durch Sequenzierung. 200 – 250 ng der jeweiligen Plasmid-DNA wurde mit 1,5 pmol M13-F-Primer im Big Dye Terminator Chemistry v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA) sequenziert. Wie bei AT-Dinukleotid-reichen Sequenzen empfohlen, wurde folgendes Programm benutzt: 4 Minuten bei 96°C, 35 Zyklen à 15 s bei 96°C, 4 Minuten bei 50°C sowie Endtemperatur bei 12°C.

2.11.5 Densitometrische Auswertung

Die verschiedenen methylierten DNA-Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Die Polyacrylamid-Gele wurden mittels GelDoc-System abgebildet und als TIFF (Tagged Image File Format) exportiert. Die Software timage von T.J. Nelson (<http://brneurosci.org/timage.html>) wurde verwendet, um die DNA-Banden gemäß ihrer Dichte zu messen. Die Banden wurden wie in [81] senkrecht zur Laufrichtung gemessen, um Messfehler durch die Lauffront des Ethidiumbromid zu vermeiden.

2.12 Kalibrationsfunktion und Statistik

Die statistisch-mathematische Herleitung der Kalibrationsfunktion ist äußerst komplex. Die oben beschriebenen Kalibrationsreihen wurden dreimal erstellt, um die Exaktheit der Methylierungskalibrierung und die Reproduzierbarkeit zu beweisen. Die Kalibrierung wurde durch lineare Regression mit Prädiktoren der Polynominal-Verteilung zweiten Grades und durch die sogenannte „Kleinste-Quadrat“-Schätzung (OLS = ordinary least squares estimation) durchgeführt. Zwei verschiedene Annäherungen wurden be-

nutzt, um die Kalibrierungskurve zu bestimmen. In der ersten Herleitung wurde die Kalibrierungskurve, die durch Kalibrierungsreihen auf einem Gel bestimmt wurde, auf die Stichprobe desselben Gels durch Kreuzvalidierung angewandt. In der zweiten Herleitung wurde die Kalibrierungskurve auf die Stichprobe von anderen Gelen angewandt. Um die Güte der beiden Herleitungen zu vergleichen, wurden die Prädiktionsfehler bestimmt (Tab. 8). Die Prädiktionsfehler der verschiedenen Kalibrationsherleitungen sind in 5%-, 25%-, 75%- und 95%-Quantilen dargestellt. Ausreißer jenseits der äußeren Quantilen wurden einzeln dargestellt. Zur graphischen Darstellung wurden Box-und-Whisker-Plots gewählt, wobei die Whiskers (die von der Box ausgehenden Striche) zu den größten Abweichungen innerhalb der Standardabweichung der Quantile gezogen sind. Punkte jenseits der Whiskers wurden einzeln dargestellt. Streudiagramme wurden durch lineare Regressionslinien ergänzt, bestimmt durch die „Kleinste-Quadrat“-Schätzung. Zu erwähnen ist, dass durch die Anwendung der Kalibrationsfunktion auf die gemessenen Methylierungswerte auch unlogische Werte $> 100\%$ und $< 0\%$ möglich sind. Diese gehen ebenfalls in die statistische Auswertung ein.

Die Daten wurden statistisch mit Hilfe der Programme SigmaStat Software Release (SPSS Inc., Chicaco, USA), SAS® 8.2 (SAS Institute, North Carolina, USA) und S-Plus® 7.0 (Insightful, Seattle, Washington, USA) ausgewertet. Um statistisch Methylierungsmuster zwischen verschiedenen Tumorentitäten (zum Beispiel MB vs. E oder ZNS-PNET) zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney Rangsummentest benutzt. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman wurde angewandt, um den Zusammenhang von Methylierung verschiedener Kandidatengene und den Zusammenhang zwischen Methylierung und Alter bei Erstdiagnose zu testen. Der Einfluß klinischer Parameter wie Alter bei Erstdiagnose, Geschlecht und Tumorgrad auf den Methylierungsgrad wurde durch ANOVA (Analysis of Covariances) analysiert. p-Werte kleiner 0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 DNA-Hypermethylierung als häufigste tumorspezifische Veränderung

Die genomweite Methylierungsanalyse mittels Restriction Landmark Genomic Scanning wurde in 11 Medulloblastomen, zwei ZNS-PNET, drei anaplastischen Ependyomen und drei MB-Zelllinien durchgeführt. Es konnten pro RLGS-Gel durchschnittlich 1128 Spots (zwischen 564 und 1564 Spots), die CpG-Inseln repräsentieren [19], untersucht werden. Durchschnittlich 30 (zwischen 14 und 59) von den erfassten CpG-Inseln waren pro Probe verändert methyliert. Die häufigste Veränderung stellte mit 73% die Hypermethylierung dar (Abb. 9). Als wahrscheinlich hypermethylierte CpG-Inseln wurden 11,2% eingeschätzt. Dies bedeutet, dass CpG-Inseln in den Proben nur gegenüber zwei anstatt allen drei Normalkontrollen fehlten. Die Hypomethylierung mit 10,5% und Amplifikationen mit 3,9% Häufigkeit komplettierten die Methylierungsveränderungen im Epigenom der Tumorproben.

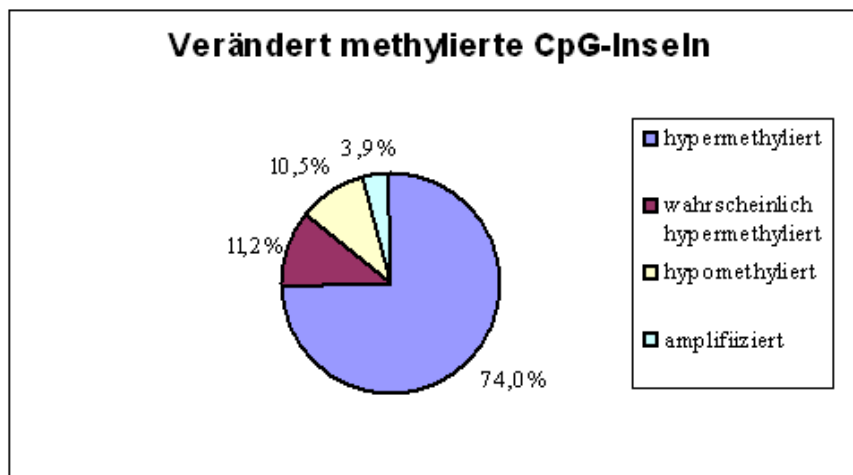


Abb. 9: Übersicht der Ergebnisse des Restriction Landmark Genomic Scanning in 19 pädiatrischen Hirntumoren und Zelllinien.

3.2 Identifizierung neuer hypermethylierter CpG-Inseln und assoziierter Gene

Die DNA von 18 CpG-Inseln, die häufig in den *AscI*-RLGS-Gelen hypermethyliert war, wurde durch die Klonbank-basierte Methode und den virtuellen Genomscan identifiziert und konnte Genen, mRNAs und Expressed Sequence Tags (EST) zugeordnet werden (Tab. 6). Expressed Sequence Tags sind transkribierte Nukleotidsequenzen, die man durch Sequenzierung von cDNA-Bibliotheken erhält.

Die DNA-Methylierung von fünf CpG-Inseln, deren Homologien zu Genorten bereits bekannt waren und von Professor C. Plass, Ohio, USA zur Verfügung gestellt wurden, konnten in diesen *AscI*-RLGS-Gelen bestätigt werden. Durch die Klonbank-basierte Methode konnten 7 neue Kandidatengene gefunden werden. Die in der Klonbank gefundenen *AscI*-*EcoRV* DNA-Fragmente wurden mittels BLAT-Suche in der öffentlichen Sequenzdatenbank der Universität von Kalifornien Santa Cruz (UCSC Genome Browser) dem humanen Genom zugeordnet und die dort lokalisierten Gene oder ESTs identifiziert. In Tabelle 6 sind die Positionen der CpG-Inseln zu den Genen angegeben. Wie in der Literatur beschrieben, finden sich die CpG-Inseln vorwiegend im 5'-Bereich der Gene, wo sie durch epigenetische Mechanismen an der Regulation der Transkription beteiligt sind.

Zusätzlich konnten sechs hypermethylierte CpG-Inseln durch den Virtual Genome Scan identifiziert werden.

Den Sequenzen konnten 13 Gene, drei mRNAs, ein EST und ein chromosomaler Lokus ohne Homologie zugeordnet werden. Die Gene kodieren für G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*LPAR5*, *DRD4*), ein Tumorsuppressorgen (*SIAH1*), einen Ionenkanal und Transporterprotein (*SLC16A8*, *SCNN1B*) sowie Gene, die in Regulationsvorgängen des Zytoskelett (*KY*), des Chromatin (*H2AVF*, *KDM2A*), der Signaltransduktion (*APPBP2*) und des Zellzyklus (*HNRPC*, *B4GALT7*, *SFRP4*) eine Rolle spielen.

RLGS Master Adresse	Anzahl methyl. Tumoren [n]	Methyl. Tumor-entitäten	CpG-Insel ^a Lokalisation	Homologien [Gen/EST]	Zugangsnummer der RNA-Sequenz	Chromosomale Lokalisation	ID
a4F22	8	MB, AE	Gen	<i>LPAR5</i>	NM_020400	12p13.31	K ^b
a5F32	7	MB, AE	5'	<i>KY</i>	NM_178554	3q22.2	K ^b
a3F14	7	MB, ZNS-PNET, AE	-	-	-	10p15.3	V
a5E12	6	MB, AE	5'	<i>APPBP2</i>	NM_006380	17q23.2	V
a2D34	5	MB, ZNS-PNET	5', Gen	<i>KDM2A</i>	NM_012308	11q13.2	V
a2G55	5	MB, ZNS-PNET	5'	<i>H2AFV</i>	NM_138635	7p13	V
a4E36	5	MB	5', Gen	<i>B4GALT7</i>	NM_007255	5q35.3	K
a3C07	5	ZNS-PNET, AE	5'	<i>HNRPC</i>	NM_031314	14q11.2	V
a2D40	5	MB, AE	5'	<i>SFRP4</i>	NM_003014	7p14.1	V
a3F34	4	MB, AE	5'	<i>SCNN1B</i>	NM_000336	16p12.2	K
a2F44	4	MB, ZNS-PNET, AE	5', Gen, 3'	<i>KBTBD11</i>	NM_014867	8p23.3	K ^b
a5D07	4	MB	5'	<i>AK094957^c</i>	AK094957	18q23	K
a3D08	4	MB, ZNS-PNET, AE	5', 3'	<i>EST</i>	BF733045	18p11.31	K ^b
a2D19	3	MB	5'	<i>CD514722^c</i>	CD514722	19q13.12	K
a2E34	3	MB	Gen	<i>SLC16A8</i>	NM_013356	22q13.1	K
a3F44	3	MB	5'	<i>SIAH1</i>	BC044920	16q12.1	K
a1E39	2	MB	5'	<i>BC038761^c</i>	BC038761	16p11.1	K
a2D16	2	AE	5', Gen	<i>DRD4</i>	NM_000797	11p15.5	K ^b

Tab. 6: Hypermethylierte Gene und EST in ZNS-Tumoren des Kindes- und Jugendalters.

Homologien und chromosomale Positionsangaben basieren auf der BLAT-Suche (BLAST-Like Alignment Tool) in der Sequenzdatenbank, betrieben von der University of California Santa Cruz, USA unter <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>, Version Februar 2009 (Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly).

^a 5' bedeutet, die Lage der CpG-Insel ist in 5'-Richtung vor dem ersten Exon oder im ersten Exon; Gen bedeutet, die CpG-Insel liegt im ORF des Gens und nicht im 5'-Exon oder 3'-Exon; 3' bedeutet, die CpG-Insel liegt im 3'-Exon oder stromabwärts des 3'-Exon; ^b Homologien dieser Kandidatengene wurden uns von Professor C. Plass, Ohio, USA zur Verfügung gestellt;

^c Referenzsequenz unbekannt; ID., Methode der Identifizierung: K, Klonbank-basierte Methode; VGS, virtueller Genomscan.

3.3 Bestätigung der DNA-Methylierung in Kandidatengen

Im Anschluss wurde die Methylierung der *AscI*-Schnittstelle mittels Southern Blot bestätigt, um mögliche Verluste von CpG-Inseln in den RLGS-Gelen durch DNA-Polymorphismen oder andere genetische Veränderungen in der *AscI*-Schnittstelle auszuschließen. Alle in Tabelle 7 aufgeführten Kandidaten zeigten in den Medulloblastom-Zelllinien zumindestens partielle Methylierung in der *AscI*-Schnittstelle. Exemplarisch ist ein Southern Blot von *HoxC6* dargestellt (Abb. 10).

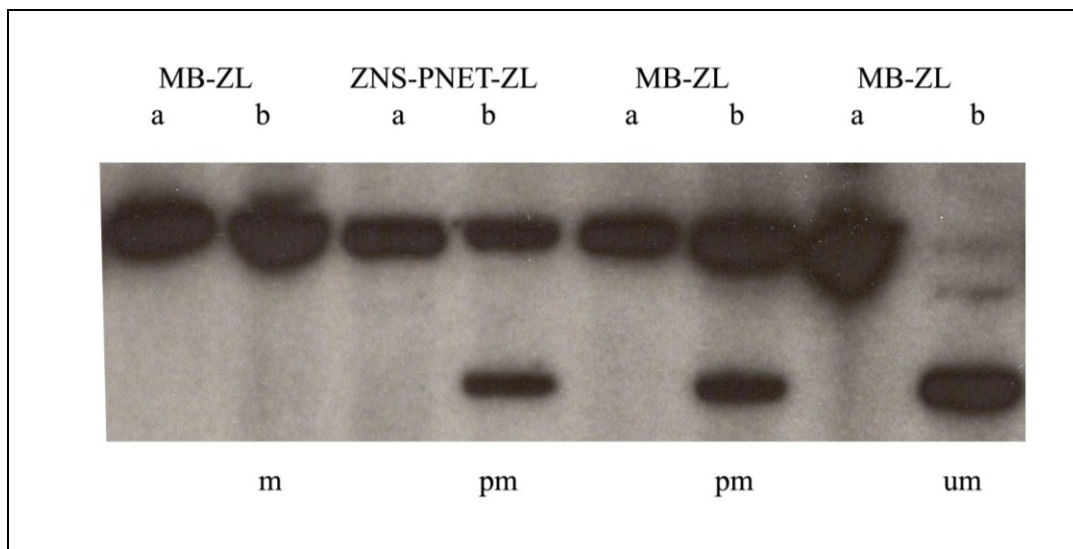


Abb. 10: Southern Blot von *HoxC6*. Drei Medulloblastom-Zelllinien (MB-ZL) und eine ZNS-PNET-Zelllinie (ZNS-PNET-ZL). a, mit Restriktionsenzym *XbaI* verdaut; b, mit Restriktionsenzymen *AscI-XbaI* verdaut; Fragmentgrößen 4,6 kb und 2,9 kb; m, methyliert; pm, partiell methyliert; um, unmethyliert.

Zusätzlich zur Southern Blot-Analyse wurden die CpG-Inseln, die durch die *AscI*-Klonbank identifiziert wurden, in sogenannten RLGS-Mischgelen bestätigt. Die Arbeitsgruppe unter Leitung von Professor C. Plass, Ohio, USA, führte diese durch. In RLGS-Mischgelen wird die Klon-DNA aus der Bibliothek verwendet. Auf diese Weise wurde kontrolliert, ob die Spots der Klon-DNA mit den RLGS-Adressen der Spots in den Tumorproben übereinstimmen.

HoxC6 wurde zunächst durch die Klonbank-basierte Methode zur CpG-Inselle a4F10 aus den RLGS-Gelen zugeordnet. In der Southern Blot-Analyse bestätigte sich eine Methylierung an der *AscI*-Schnittstelle. *HoxC6* kodiert für einen sehr interessanten Transskrip-

tionsfaktor, der in der embryonalen Gehirnentwicklung eine Rolle zu spielen scheint. In den RLGS-Mischgelen konnte *HoxC6* nicht als a4F10 bestätigt werden. Aus diesem Grund ist dieser Kandidat nicht in Tabelle 7 aufgeführt. Dennoch wurde *HoxC6* als ein potentiell wichtiger Kandidat, der in Hirntumoren des Kindes- und Jugendalters epigenetisch verändert ist, mit in die weiteren Methylierungsanalysen eingebunden.

3.4 Tumorspezifische DNA-Methylierung von fünf Kandidatengen

Es wurden fünf neu identifizierte Kandidatengene aufgrund ihrer häufigen DNA-Methylierung in Tumoren und aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften näher untersucht. Diese sind „homeobox protein C6“ (*HoxC6*), „lysophosphatidic acid receptor 5“ (*LPAR5*), „kyphoscoliosis peptidase“ (*KY*), „secreted frizzled-related protein 4“ (*SFRP4*) und „solute carrier family 16, member 8“ (monocarboxylic acid transporter 3, *SLC16A8*).

Das Ziel dieser Arbeit war es, DNA-Methylierung quantitativ in einer Serie von Tumorproben zu untersuchen. Hierfür wurde die kalibrierte Combined Bisulfite Restriction Analysis (kCOBRA) entwickelt.

Pro Gen wurden jeweils drei Kalibrationsreihen (Abb. 11 und 12) erstellt. Aus diesen wurde eine Kalibrationsfunktion berechnet. Der Prädiktionsfehler einer Kalibrationsfunktion wurde durch Kreuzvalidierung in derselben Kalibrationsreihe und durch Vergleich der drei Kalibrationsreihen miteinander bestimmt (Abb. 12). Die Prädiktionsfehler der fünf Kalibrationsfunktionen reichen von 4,8% (*LPAR5*) bis 12,7% (*SFRP4*) in der 75%-Quantile (Tab. 8). Dies zeigt kritisch die Genauigkeit an, mit der die Methylierung angegeben wird.

In der kCOBRA-Auswertung wird die Methylierung zur Vereinfachung für die gesamten CpG-Inseln angegeben. Bei den fünf Genen wurden gemäß der Anzahl der Restriktionschnittstellen zwei CpG-Inseln untersucht. Dies könnte man in der Auswertung auch einzeln betrachten. Die Ergebnisse unterscheiden sich nicht wesentlich.

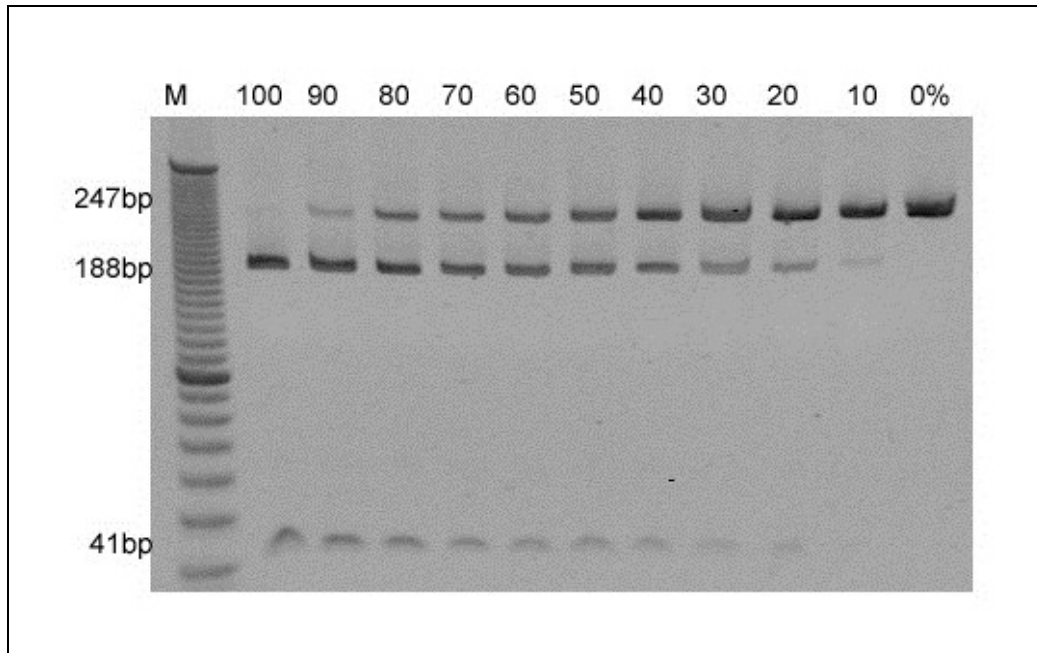


Abb. 11: COBRA-Kalibrationsreihe für *LPAR5*. Als repräsentatives Beispiel ist die COBRA-Kalibrationsreihe für die CpG-Insel von *LPAR5* dargestellt. In der BS-PCR wurde komplett methylierte Bisulfit-behandelte DNA (Methylierung 100%) und komplett unmethylierte Bisulfit-behandelte DNA (Methylierung 0%) eingesetzt. Desweiteren wurden die beiden Proben in einem bestimmten Mischungsverhältnis eingesetzt. So wurde eine Mischreihe in 10 Prozentpunkt-Schritten von 0 bis 100% Methylierung etabliert. Im Anschluß wurden die amplifizierten DNA-Fragmente im Restriktionsverdau geschnitten und auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Auf dem Polyacrylamid-Gel ist links der Größenmarker aufgetragen.

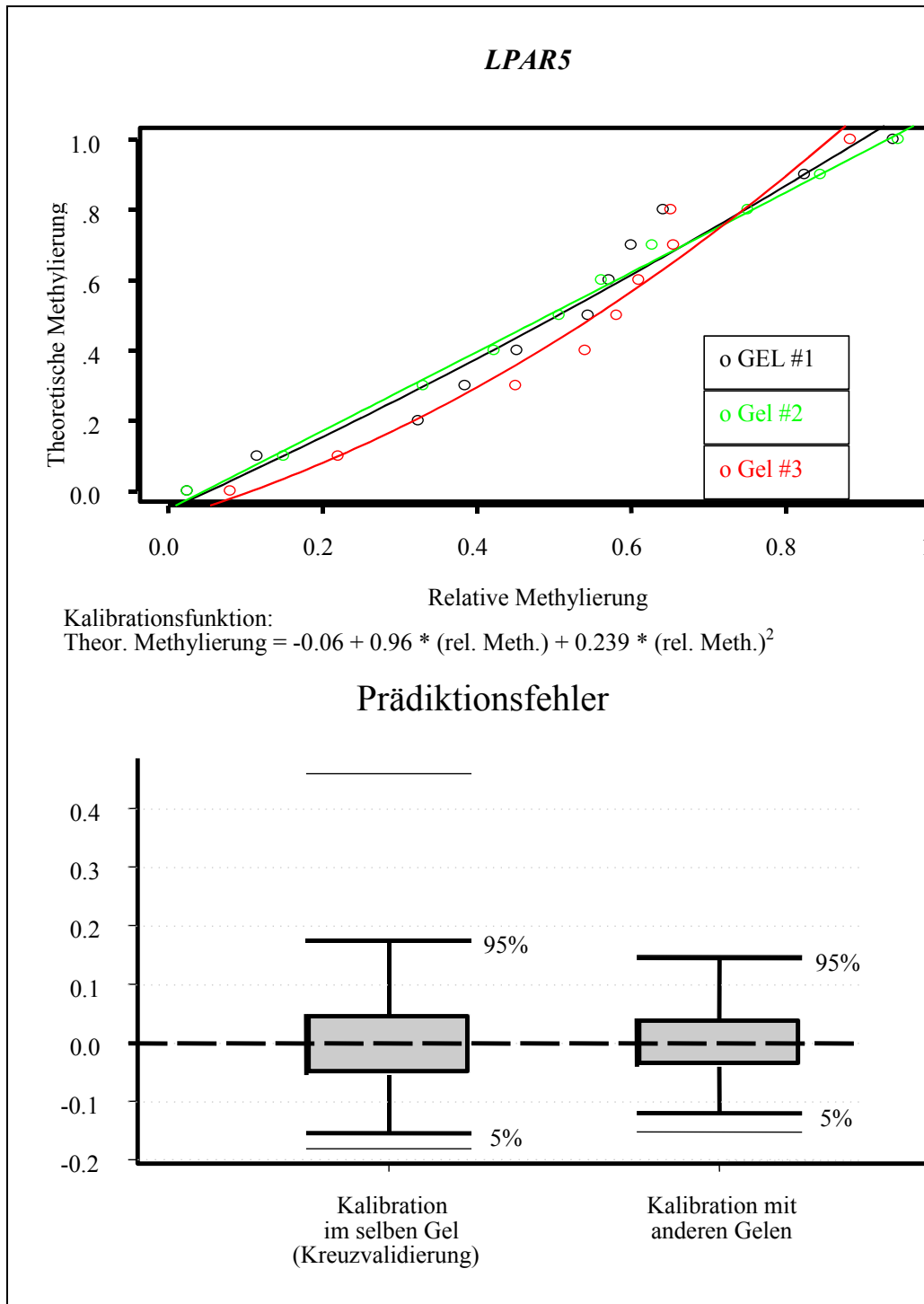


Abb. 12: Herleitung der Kalibrationsfunktion für LPAR5 und Prädiktionsfehler. Kalibration von drei Methylierungsmischreihen durch Kreuzvalidierung und Vergleich mit den anderen Reihen. Relative Methylierung bedeutet Methylierung gemessen in der COBRA. Theoretische Methylierung bedeutet die zu erwartende Methylierung abhängig vom Mischen methylierter und unmethylierter DNA-Fragmente. Die Ergebnisse sind graphisch dargestellt.

Gen	Prädiktionsfehler innerhalb 75%-Quantile [%] im selben Gel zw. drei Gelen		Kalibrationsfunktion kalibrierte Methylierung [*100%]
	im selben Gel	zw. drei Gelen	
<i>HoxC6</i>	5.1	3.7	= -0.043 + 0.687 * (mC) + 0.645 * (mC) ²
<i>KY</i>	8.7	14.6	= -0.078 + 1.081 * (mC) + (-0.026) * (mC) ²
<i>LPAR5</i>	4.8	4.0	= -0.06 + 0.96 * (mC) + 0.239 * (mC) ²
<i>SFRP4</i>	12.7	9.9	= -0.099 + 1.973 * (mC) + (-0.862) * (mC) ²
<i>SLC16A8</i>	5.1	6.0	= -0.058 + 1.256 * (mC) + 0.172 * (mC) ²

Tab. 7: Prädiktionsfehler und Kalibrationsfunktionen. Die Prädiktionsfehler innerhalb der 75%-Quantile sind abhängig von der Testung dargestellt. Mithilfe der Kalibrationsfunktion läßt sich für die COBRA Ergebnisse (mC, Methylierung in COBRA) ein kalibrierter Wert der Methylierung von 0% - 100% berechnen.

Die DNA-Methylierung der fünf Gene in Tumoren, Zelllinien und normalen Kontrollen sind übersichtlich zusammengefasst (Tab. 8):

Gen	CE + CM	PBL	ZL	MB	E + AE	ZNS-PNET
<i>HoxC6</i>						
DNA-Methylierung	3,9 ± 7,7	-4,3 ± 0	72,1 ± 45,1	21,1 ± 34,5	3,8 ± 10,1	
Anzahl der Proben	6	10	8	20	9	nb
<i>KY</i>						
DNA-Methylierung	2,1 ± 4,6	-5,3 ± 0	33,9 ± 28,9	57,0 ± 22,4	57,0 ± 13,5	
Anzahl der Proben	6	10	8	20	20	nb
<i>LPAR5</i>						
DNA-Methylierung	22,1 ± 9,5	45,8 ± 0	99,1 ± 11	75,0 ± 20	64,1 ± 12,9	
Anzahl der Proben	6	10	8	23	20	nb
<i>SFRP4</i>						
DNA-Methylierung	18,8 ± 5,5	62,6 ± 0	67,2 ± 21,4	36,2 ± 16,8	26,3 ± 22	
Anzahl der Proben	9	10	8	20	18	nb
<i>SLC16A8</i>						
DNA-Methylierung	21,2 ± 6,3	13,0 ± 0	93,3 ± 15,8	43,6 ± 29,3	41,3 ± 14,8	50,2 ± 24,4
Anzahl der Proben	6	10	7	24	22	10

Tab. 8: DNA-Methylierung der fünf Gene in Kontrollen und Tumoren. Die durchschnittliche DNA-Methylierung ist in Prozentzahlen ± Standardabweichung angegeben. nb = nicht bestimmt.

DNA von ZNS-PNET war nur im geringsten Maß verfügbar, daher wurden die Untersuchungen nur für SLC16A8 durchgeführt.

Betrachtet man die fünf Kandidatengene zusammen, so ist die DNA-Methylierung in den Tumoren und deren Zelllinien stärker als in den normalen Kontrollen (Abb. 13). Am höchsten ist die DNA-Methylierung in den Zelllinien. Dies zeigt, dass in Ependyomen, Medulloblastomen und ZNS-PNET die DNA-Hypermethylierung der CpG-Inseln eine tumorspezifische Veränderung darstellt und eine wichtige Rolle spielt.

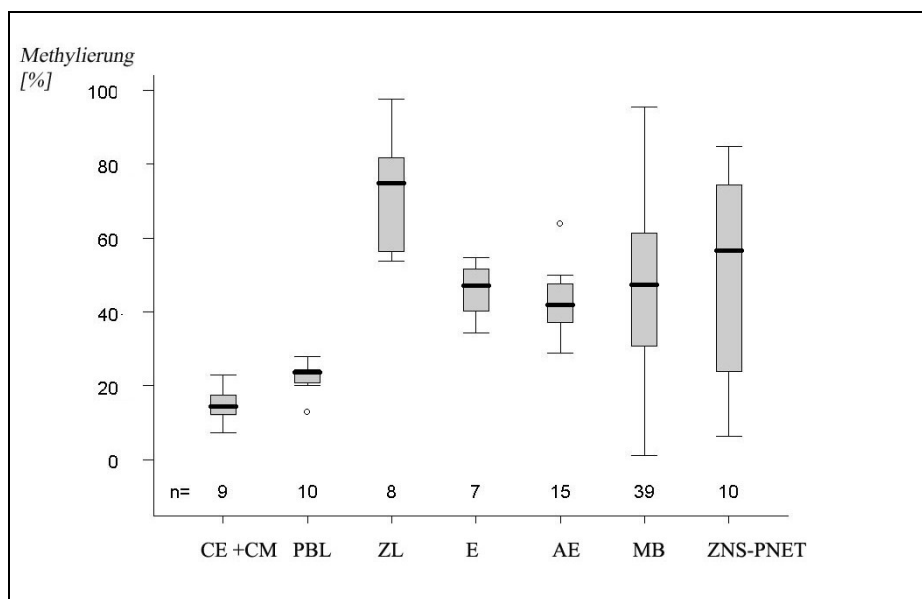


Abb. 13: DNA-Methylierung für alle fünf Kandidatengene zusammen in Kontrollen und Tumoren. Die kalibrierten COBRA-Ergebnisse sind mittels Box- und Whisker-Plots graphisch dargestellt. Mit den Box-Plots sind die Werte innerhalb der 75%-Quantile dargestellt, die fett gedruckten horizontalen Linien innerhalb des Box-Plots entsprechen den Mittelwert. Die Whiskers, welche die von der Box ausgehenden Striche sind, ziehen zu den größten Abweichungen innerhalb der Standardabweichung. Einzelne Punkte jenseits der Whiskers sind sehr große einzelne Abweichungen. Die Anzahl der insgesamt untersuchten Proben ist oberhalb der Abszisse (n = ..).

Die amplifizierte Region von *LPAR5* umfasst 247 Basenpaare und enthält zwei *TaqI*-Restriktionsschnittstellen. Der Verdau liefert somit Fragmentgrößen von 188, 41 und 18 Basenpaaren. *LPAR5* besteht aus zwei Exons, wobei nur das zweite Exon kodiert. Die untersuchte CpG-Insel liegt auf Höhe des Exon 2. *LPAR5* ist in Kleinhirnen durchschnittlich methyliert (22,1%), wogegen die Methylierung in peripheren Blutlymphozy-

ten gesunder Spender 46,3% beträgt (Abb. 14 und 15 sowie Tab. 8). Im Tumorgewebe ist die DNA-Methylierung signifikant höher als in den Kontrollen (Mann-Whitney Rangsummentest p-Wert < 0,001). Auch unter den Tumoren lassen sich signifikante Unterschiede finden. So ist die DNA-Methylierung in Medulloblastomen signifikant höher als in Ependymomen (p-Wert = 0,028). Unterscheidet man die Ependymome nach ihrer Dignität in anaplastische Ependymome WHO Grad III und Ependymome WHO Grad II, sieht man signifikant höhere DNA-Methylierung in den höhergradigen Ependymomen (68,7% DNA-Methylierung in AE vs. 54,1% DNA-Methylierung in E, p-Wert = 0,002).

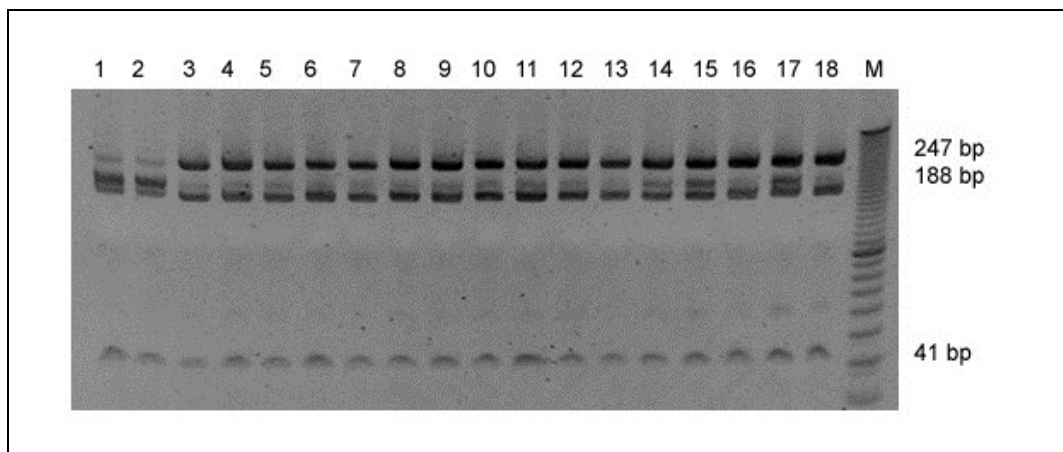


Abb. 14: Combined Bisulfite Restriction Analysis von *LPAR5* in Ependymom-Proben. Auf dem Polyacrylamid-Gel erkennt man in den 18 Ependymomen (1-18) anhand der 247 bp-Banden unmethylierte DNA und an den 188 und 41 bp-Banden methylierte DNA; M, Längenmarker. Die DNA-Fragmente mit 18 Basenpaaren sind zu klein, so dass sie auf dem Polyacrylamid-Gel nicht zu sehen sind.

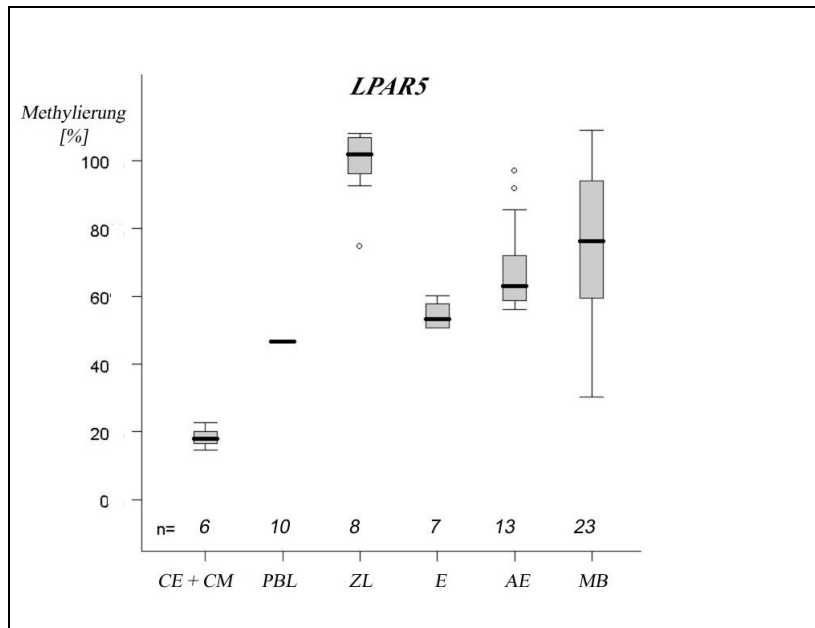


Abb. 15: DNA-Methylierung der CpG-Insel von LPAR5 in normalen Kontrollen und Tumoren. Ergebnisse der kalibrierten COBRA.

Im *SFRP4*-Gen wurde die Region + 470 bis + 769 analysiert (Startposition der Transskription ist auf den Wert 0 gesetzt. Benutzt wurde: <http://dbtss.hgc.jp/>). Diese Region enthält eine große CpG-Insel mit 25 CpG-Dinukleotiden. Das untersuchte Amplikon ist 296 bp lang und enthält zwei *TaqI*-Restriktionsschnittstellen. Nach dem Verdau ergeben sich DNA-Fragmentgrößen von 145, 112 und 36 Basenpaaren. *SFRP4* ist in normalen Klein- und Großhirnen nur wenig methyliert (18,8%, Abb. 16 und Tab. 8), wogegen die DNA-Methylierung in gesunden PBL hoch ist (64,5%). In Zelllinien ist *SFRP4* am stärksten methyliert (67,2%); in den Tumorproben (MB 36,2% und E 26,3%) ist die DNA-Methylierung weniger stark ausgeprägt, aber signifikant höher (p-Wert 0,005 für MB vs. CE + CM bzw. p = 0,036 für E vs. CE + CM) als in den normalen Gewebeproben. Innerhalb der Ependymomgruppe zeigt sich eine signifikant stärkere DNA-Methylierung (p-Wert 0,0375) in WHO Grad II Ependymomen (37,3%) als in anaplastischen Ependymomen (22,1%). Es ist jedoch anzumerken, dass drei der untersuchten anaplastischen Ependymome unmethyliert bzw. nur zu einem geringen Anteil methyliert sind (- 3,7%, -3,0% und 3,3%). Dies beeinflusst bei der insgesamt niedrigen Probenanzahl die statistische Auswertung erheblich.

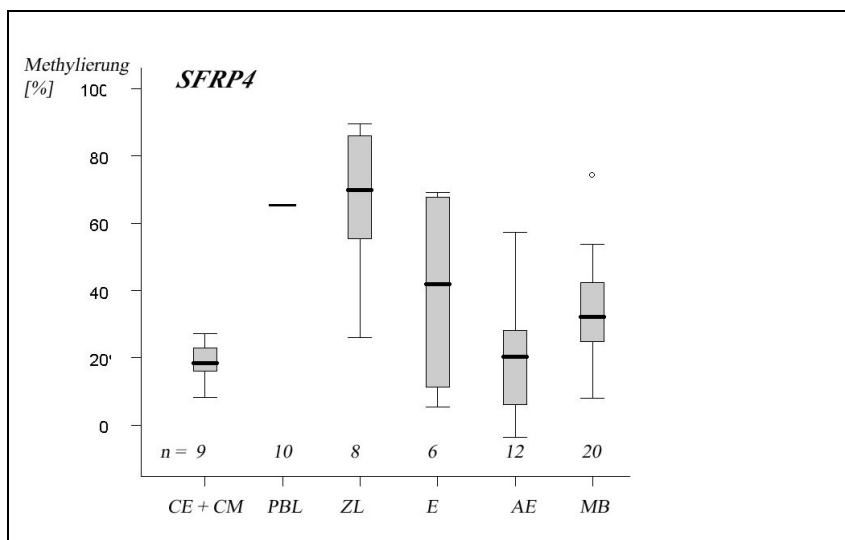


Abb. 16: DNA-Methylierung der CpG-Insel von *SFRP4* in normalen Kontrollen und Tumoren. Ergebnisse der kalibrierten COBRA.

Bei *KY* wurde die Region von + 240 bis + 427 untersucht. Das Amplikon ist 188 Basenpaare lang und enthält zwei *BstUI*-Restriktionsschnittstellen. Nach dem Verdau sind die DNA-Fragmentlängen 133, 37 und 18 Basenpaare lang. *KY* ist in den normalen Kontrollen nicht methyliert (CE + CM 2,1% und PBL – 5,3%), während es in den Tumoren und deren Zelllinien signifikant stärker methyliert ist (p-Wert < 0,001; Abb. 17 und Tab. 8). DNA-Methylierungsunterschiede in der Gruppe der Ependymome bestehen nicht (E 55,9% und AE 57,6%).

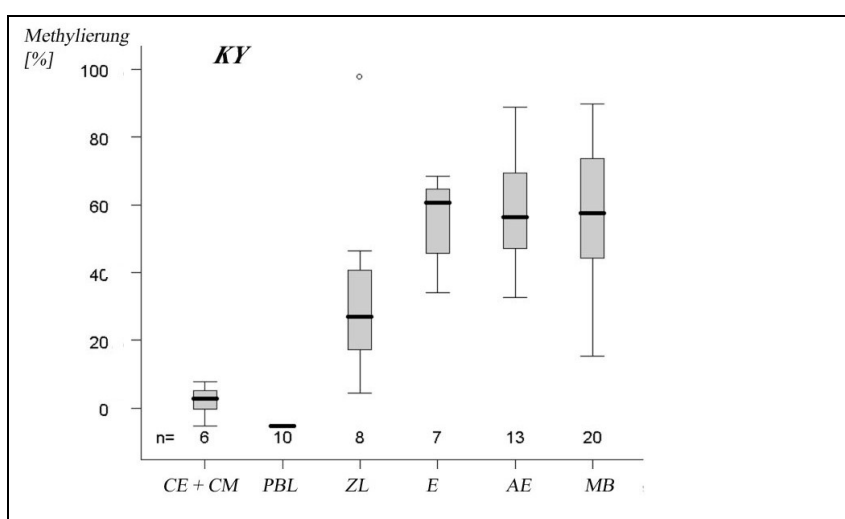


Abb. 17: DNA-Methylierung der CpG-Insel von *KY* in normalen Kontrollen und Tumoren. Ergebnisse der kalibrierten COBRA.

Im *HoxC6*-Gen wurde ein 253 bp langes Amplikon untersucht, welches im 3'-Exon des Gens lokalisiert ist. Das Amplikon enthält zwei *Bst*UI-Restriktionsschnittstellen. Nach dem Verdau erhält man die DNA-Fragmentgrößen von 188, 37 und 28 Basenpaaren. In den normalen Kontrollen und in Ependymomen ist *HoxC6* nicht methyliert (CE + CM 3,9%, E 3,8% und PBL -4,3%; Abb.18 und Tab. 8). In den Medulloblastomen und in den Zelllinien ist die Methylierung stärker (MB 21,1% und ZL 72,1%). Der Unterschied zwischen Medulloblastomen und normalen Kleinhirnen ist allerdings nicht signifikant (p-Wert 0,315). Das Methylierungsmuster innerhalb der Medulloblastomgruppe ist heterogen. So weisen 16 Proben einen Methylierungsgrad kleiner 10% auf, so dass sie als unmethyliert bezeichnet werden können, wohingegen vier Tumoren eine hohe DNA-Methylierung mit 97,7%, 46,2%, 37,1% und 108,6% besitzen. Histopathologisch handelt es sich um ein desmoplastisches und drei klassische Medulloblastomae. Alle Patienten sind männlich und das Alter bei Erstdiagnose oder der Krankheitsverlauf unterscheiden sich nicht von den unmethylierten Tumoren.

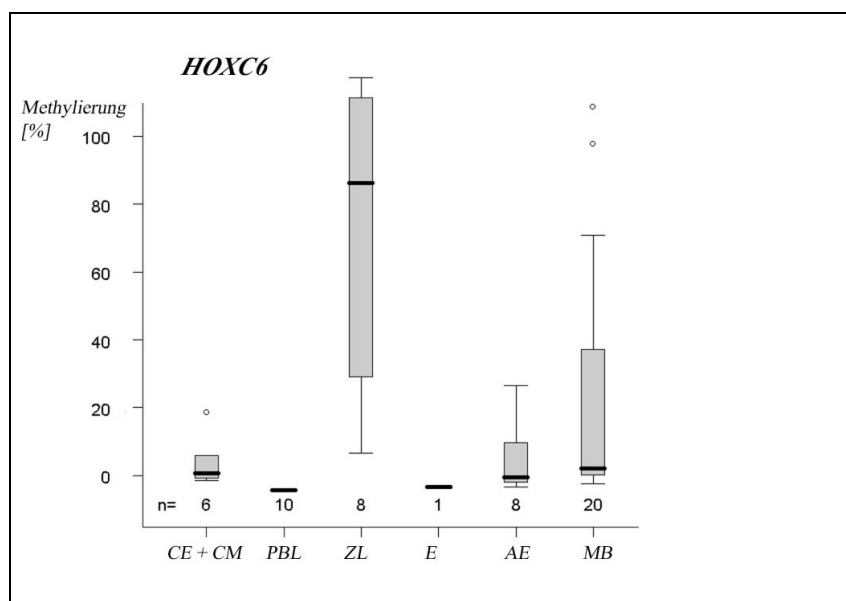


Abb. 18: DNA-Methylierung der CpG-Insel von *HoxC6* in normalen Kontrollen und Tumoren. Ergebnisse der kalibrierten COBRA.

Das Amplikon des *SLC16A8*-Gen liegt in der Region + 1077 bis + 1275 innerhalb des dritten Exons und umfasst 188 Basenpaare. Es besitzt zwei *Bst*UI-Restriktionsschnittstellen, welche nach Verdau DNA-Fragmentlängen von 110, 63 und 29 Basenpaaren liefern. Die untersuchte CpG-Insel von *SLC16A8* weist eine niedrige

DNA-Methylierung in normalen Geweben (CE + CM 21,2%) und in PBL (13,0%) auf (Abb. 19 und Tab. 8). Die DNA-Methylierung in den Tumoren ist deutlich stärker, jedoch unterscheiden sich nur Ependymome und ZNS-PNET signifikant von normalen Geweben (p-Wert 0,002, bzw. 0,026). Innerhalb der Ependymomgruppe zeigen sich keine von der Dignität abhängigen Unterschiede. Medulloblastome sind zwar stärker methyliert (43,6%) als normale Kontrollen aus Klein- und Großhirn, jedoch ist der Unterschied nicht signifikant (p-Wert 0,052).

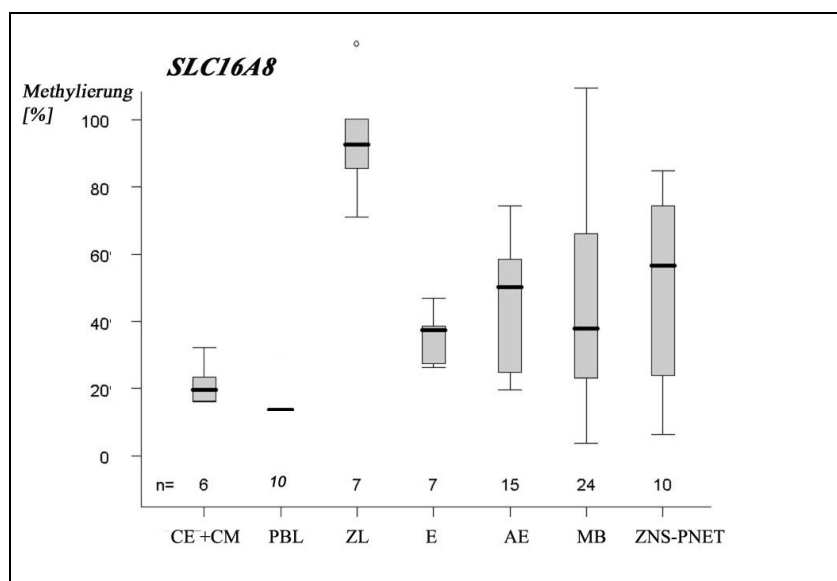


Abb. 19: DNA-Methylierung der CpG-Insel von *SLC16A8* in normalen Kontrollen und Tumoren. Ergebnisse der kalibrierten COBRA.

3.5 Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Alter bei Diagnose

Abschließend wurde geprüft, inwiefern eine statistische Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Methylierungsmustern sowie klinischen Daten besteht. Als Maß für die Stärke eines Zusammenhangs wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt. Im folgenden sind nur die relevanten Ergebnisse aufgeführt:

1. Die DNA-Methylierung unterscheidet sich nicht für die Dignität der Tumoren nach WHO Klassifikation WHO Grad II-IV (p-Wert 0,65).

2. Die DNA-Methylierung ist unabhängig vom Geschlecht (p-Wert 0,88).
3. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Alter bei Diagnose und DNA-Methylierung (p-Wert 0,0273): Je höher das Alter bei Diagnose, desto höher ist die gesamte DNA-Methylierung in den fünf untersuchten Kandidatengen zusammen (Abb. 20).

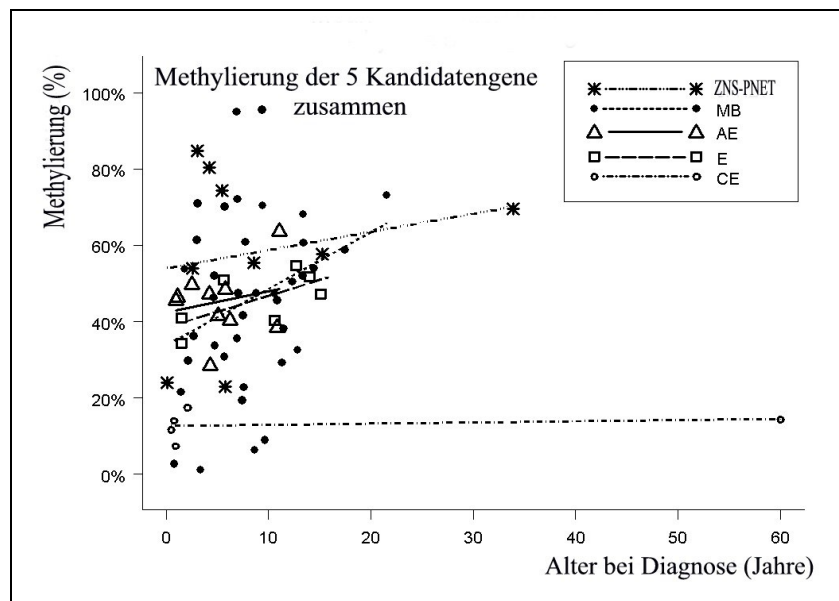


Abb. 20: Korrelation zwischen Alter bei Diagnose und Methylierung von den 5 Kandidatengen zusammen für normale Kontrollen und Hirntumoren.

Statistisch war es in Anbetracht der geringen Fallzahlen nicht möglich eine Testung mit multiplen Faktoren, wie zum Beispiel einen CART (Classification and Regression Tree), als Modell zu rechnen, welches erlauben würde, durch das Methylierungsmuster der fünf Kandidatengene eine Risikostratifizierung innerhalb der Tumorgruppen vorzunehmen.

3.6 Reexpression von epigenetisch inaktivierten Genen

Im Gegensatz zu den meisten genetischen Veränderungen, wie zum Beispiel der Insertion einer einzelnen Base, sind epigenetische Veränderungen reversibel [6]. 5-aza-2'-deoxycytidine (5AZA), ein starker Inhibitor der DNA-Methylierung, und Trichostatin A

(TSA), ein starker Inhibitor der Histondeazetylaseaktivität, werden beide in zahlreichen klinischen Studien zur epigenetischen Modulation eingesetzt [9].

6 Medulloblastom- und zwei PNET-Zelllinien wurden entweder mit 5AZA alleine oder in Kombination mit TSA behandelt. Die Expression wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR semiquantitativ getestet. Das Transkript von *HoxC6* wird in allen unbehandelten Zelllinien exprimiert, deshalb wurde es nicht in behandelten Zelllinien getestet. Die anderen vier Kandidatengene werden in unbehandelten Zelllinien nur teilweise exprimiert.

Die inaktivierte Expression der vier Kandidatengene wurde in behandelten Zelllinien wiederhergestellt (Tab. 9 und Abb. 21). Die Expression nahm zeit- und dosisabhängig zu. Für *SFRP4* wurde die Expression durch die alleinige 5AZA-Behandlung in 50% der Fälle wiederhergestellt; und durch die kombinierte Behandlung mit 5AZA und TSA sogar in 80% der Zelllinien. Die Kombinationsbehandlung zeigte einen synergistischen Effekt. Bei *SLC16A8* ist die alleinige Behandlung mit 5AZA nicht ausreichend, um eine Reexpression zu erreichen. Erst die Kombinationsbehandlung führt zur Reexpression in 25% der Zelllinien.

Gen	Expression in unbehandelten ZL	Reexpression durch 5AZA	Reexpression durch AZA/TSA
<i>HoxC6</i>	8/8	nb	nb
<i>KY</i>	3/8	1/5	1/5
<i>LPAR5</i>	4/8	2/4	3/4
<i>SFRP4</i>	2/8	3/6	4/5
<i>SLC16A8</i>	3/8	0/5	1/4

Tab. 9: Reexpression von 5 inaktivierten Kandidatengen nach Behandlung mit 5AZA +/- TSA. Die Reexpression wurde anhand der mRNA mittels RT-PCR bestimmt. ZL = Tumorzelllinien; nb = nicht bestimmt.

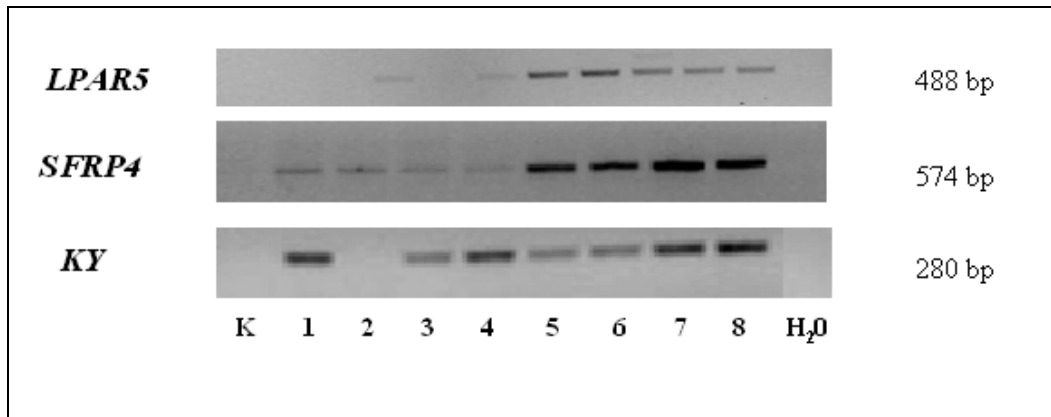


Abb. 21: Nachweis von mRNA von LPAR5, SFRP4 und KY nach Behandlung mit 5AZA über 24 Stunden oder kombiniert mit 5AZA und TSA über 72 Stunden. Spuren 1;2;3;4: 5μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM 5AZA; Spuren 5;6;7;8: 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM 5AZA und TSA; K = unbehandelte Zelllinie.

4 Diskussion und Ausblick

DNA-Methylierung ist eine häufige epigenetische Veränderung in menschlichen Tumoren, so auch in Hirntumoren des Kindes- und Jugendalters [33]. Auf der einen Seite findet man eine generelle DNA-Hypomethylierung im Tumorgenom [61], auf der anderen Seite tritt häufig eine DNA-Hypermethylierung von CpG-Inseln auf, die vor allem in Promoterregionen von Genen lokalisiert sind und durch epigenetische Mechanismen an der Inaktivierung von Genen beteiligt sind. Daher beinhalten die Identifizierung neuer Biomarker, wie zum Beispiel epigenetische Marker, und die Clusterbildung von Biomarkern eine großartige Chance für die Diagnose und Therapie von malignen Hirntumoren. Wie Lee und Kollegen in ihrer Studie zeigten, können mehrere Biomarker zusammen einen hohen prädiktiven Wert bezüglich Diagnose und Therapieansprechen für das Plattenepithelkarzinom im HNO-Bereich haben [64]. Belinsky et al. konnten zeigen, dass DNA-Methylierung im Promoterbereich von $p16^{INK4A}$ beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom sehr früh in der Tumorgenese auftritt. Sie schlagen daher das Screening von $p16^{INK4A}$ -Methylierung als Biomarker zur frühen Diagnosestellung und zum Monitoring eines Rezidivs vor [8].

Ein Ziel zur Verbesserung des Überlebens und der Therapiestrategien in ZNS-Tumoren des Kindes- und Jugendalters muss es sein, neue Subklassifikationen und Risikostratifizierungen zu finden. Der DNA-Methylierungsstatus spezifischer Kandidatengene könnte als Biomarker darin eine wichtige Rolle spielen.

In der vorliegenden Studie wurde zum genomweiten Screening von DNA-Methylierungsveränderungen die Methode des Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) mit der Kombination der Restriktionsenzyme *AscI-EcoRV* eingesetzt. RLGS ist eine hoch reproduzierbare Screeningmethode, um simultan den Methylierungsstatus von über 2000 Promoterregionen zu messen [107]. *AscI-EcoRV*-Fragmente sind besonders häufig im 5'-Bereich von Genen und in CpG-Inseln lokalisiert [19]. Darüberhinaus konnte in der vorliegenden Arbeit die Anzahl der identifizierbaren CpG-Inseln erhöht werden. Da die Klonbank-basierte Methode durch die Laufeigenschaften der RLGS Fragmente auf dem Gel begrenzt ist [98], wurde diese durch einen virtuellen Genomscan ergänzt.

Zunächst wurde bestätigt, dass DNA-Hypermethylierung von CpG-Inseln in pädiatrischen ZNS-Tumoren sehr häufig auftritt. Eine generelle DNA-Hypomethylierung, welche häufig in menschlichen Neoplasien vorkommt, konnte hingegen nicht festgestellt werden. Da sie durch die ausgewählte Screeningmethode der RLGS nicht repräsentativ erfasst wird [61].

Es ist methodisch wichtig, bei Methylierungsanalysen darauf zu achten, dass die untersuchten Tumorproben mit adäquaten normalen Kontrollen verglichen werden. Gerade bei der Analyse von Medulloblastomen wäre es wichtig, embryonale Hirngewebsproben als Vergleichsgruppe zu benutzen. Dies ist aus nachvollziehbaren Gründen nicht möglich, so dass in dieser Arbeit als Vergleichsgruppe Proben aus normalem Kleinhirn und Großhirn benutzt wurden. Desweiteren ist es wichtig, beim Vergleich von DNA-Methylierung Proben von Patienten gleichen Alters zu vergleichen. Denn mit steigendem Alter steigt kontinuierlich der Methylierungsgrad des menschlichen Genoms an [5]. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diesen Zusammenhang. Es konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche DNA-Methylierung aller fünf Kandidatengene linear mit dem steigenden Alter bei Diagnose ansteigt. Die in dieser Arbeit verwendeten normalen Kontrollen unterschieden sich nicht im Alter bei Diagnose von den Tumoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades die Methode Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) gewählt. COBRA ist ein sensitiver und quantitativer DNA-Methylierungstest. Der Amplifikationsschritt ist unabhängig vom Methylierungsstatus des Amplikons, denn die Bisulfite-PCR (BS-PCR) behält das originäre DNA-Methylierungsverhältnis bei und die DNA-Methylierung wird in einer enzymatischen Reaktion kenntlich gemacht [22]. Methoden, die auf BS-PCR basieren, unterschätzen eine niedrige DNA-Methylierung; und zwar durch einen Bias zugunsten von unmethylierten Signalen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Methylierungsspezifische-PCR (MSP) 10–100 Mal sensitiver ist als COBRA[80]. Zur Quantifizierung wurde COBRA in der vorliegenden Arbeit der MSP vorgezogen, da beabsichtigt war, quantitative Methylierungsdaten zu bestimmen. Dies ist nicht mittels

MSP möglich, bei der generell nur diskriminiert wird, ob DNA-Methylierung vorhanden ist oder nicht.

Um COBRA quantitativ objektiv für die einzelnen Proben auszuwerten, wurde für jedes untersuchte Kandidatengen eine Kalibrationsreihe aus methylierten und unmethylierten DNA-Fragmenten erstellt. Daraus wurde jeweils eine Kalibrationsfunktion berechnet. Durch Auswertung der Prädiktionsfehler wurde die Genauigkeit dieser Methode analysiert. Dabei erwies sich der Prädiktionsfehler für *SFRP4* mit 12,7% als grenzwertig hoch, was in der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Für die anderen Gene liegt der Prädiktionsfehler zwischen 4,8% und 8,7% und erlaubt so beim Anwenden der Kalibrationsfunktion eine präzise Angabe der Methylierungsstärke. Die Empfehlungen der US Food and Drug Administration für statistische Voraussetzungen bioanalytischer Methoden fordern einen Prädiktionsfehler kleiner 20% [118]. Dies wird von den fünf Kalibrationsfunktionen erfüllt.

In dieser Arbeit wurden zwei CG-Dinukleotide gleichzeitig analysiert, da die untersuchten DNA-Regionen jeweils zwei *TaqI*- bzw. *BstUI*-Restriktionsschnittstellen enthielten. Die densitometrische Auswertung wurde vereinfacht, indem beide CpG–Stellen zusammen ausgewertet wurden. Dies führt in einem sehr kleinen Anteil der gemessenen Proben zu Ungenauigkeiten durch DNA-Methylierungsunterschiede zwischen diesen beiden CpG–Stellen. Die größte Diskrepanz fand sich für das *LPAR5*-Gen in einem Ependymom mit einem Unterschied von 44% DNA-Methylierung. Generell sind die benachbarten CG–Dinukleotide in dieser Arbeit gleichmäßig methyliert (Daten nicht einzeln aufgeführt).

Eine andere Möglichkeit der Quantifizierung der gemessenen COBRA–Proben wurde von unserer Arbeitsgruppe später für den Dopaminrezeptor 4 (*DRD4*) durchgeführt [38]. Hier wurden die Proben in einer Kapillarelektrophorese gemessen und mit denen einer Gelelektrophorese verglichen. Die Messungen mittels Kapillarelektrophorese waren präziser.

In der vorliegenden Dissertation werden 18 neue verändert methylierte Kandidatengene in malignen pädiatrischen Hirntumoren präsentiert (Tab. 7). Manche der Kandidatengene, wie zum Beispiel *B4GALT7*, *H2AFV* oder *SIAH1*, wurden bisher nicht in methylierungsspezifischen Analysen gefunden oder speziell untersucht.

SIAH1-(Seven In Absentia Homolog 1) Protein fungiert als Tumorsuppressor durch Induktion von Apoptose und spielt eine Rolle in Zellzyklusvorgängen durch Interaktion mit p53 [120]. *SIAH1* scheint im Mammakarzinom eine wichtige Rolle zu spielen. In kindlichen ZNS-Tumoren ist es bisher nicht beschrieben. In hepatozellulären Karzinomen und Parkinson-Patienten wurden keine somatischen Mutationen gefunden [29, 75]. Eine Studie, die DNA-Methylierung in der Promoterregion von *SIAH1* als Mechanismus der Inaktivierung untersucht, gibt es bisher noch nicht. Die Homologie zu *SIAH1* wurde in der vorgelegten Arbeit spät identifiziert. Ansonsten wäre *SIAH1* ein sehr interessanter Kandidat für die weiteren Untersuchungen gewesen.

KDM2A ist eine Demethylase (H3K36me₂), welche an unmethylierte CpG-Inseln binden kann und dort die heterochromatische DNA-Struktur stabilisiert [12, 31]. Aufgrund dieser epigenetischen Mechanismen schreibt man *KDM2A* eine mögliche Rolle in der Tumorgenese des Prostatakarzinoms zu.

B4GALT7 kodiert für eine Galactosyltransferase (β 1,4-GalT7 (β 1,4-galactosyltransferase 7), die in der Synthese von Glycosaminoglykanen eine Rolle spielt. Diese sind Bestandteile vieler biologischer Makromoleküle; sie sind beteiligt an der Regulation von Proliferation und Zelldifferenzierung [88].

H2AVF ist eine Isoform von Histon 2. Histone sind in der Organisation von Nukleosomen und der Chromatinstruktur beteiligt. Gene, die für Histone kodieren, sind in verschiedenen menschlichen Tumoren beteiligt.

SCNN1B kodiert für einen Natriumkanal. Mutationen in diesem Gen sind vor allem verantwortlich für den Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 (PHA1) und das Liddle-Syndrom, eine spezielle Form der arteriellen Hypertonie. Dalgin et al. veröffentlichten

2008 eine Studie, in der sie zeigten, dass *SCNN1B* im klarzelligen Nierenkarzinom hypermethyliert und die Expression stillgelegt ist [20].

DRD4 kodiert für den Dopaminrezeptor D4. Dopamin und Dopaminrezeptoren sind embryonal bei der Hirnentwicklung beteiligt [30] und verantwortlich für neurologische Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis, Parkinson und das Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung im Jugendalter [3]. Schlosser et al. aus unserer Arbeitsgruppe konnten tumorspezifische Hypermethylierung in 18 von 24 Medulloblastoma zeigen [105].

KBTBD11 (kelch repeat and BTB domain-containing protein 11 oder auch KIA0711) wurde in einem Projekt von Nagase und Kollegen 1998 durch Analyse von cDNA Sequenzen einem bisher nicht identifiziertem Gen zugeordnet [82]. Bisher ist wenig darüber bekannt, zumindestens wird *KBTBD1* im menschlichen Gehirn exprimiert.

HNRPC kodiert für ein heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein C. Die hnRNPs sind RNA-bindende Proteine, welche mit prä-mRNA im Nukleus assoziiert sind. Sie beeinflussen die Prozessierung von mRNA und andere Aspekte des mRNA-Stoffwechsel und -Transports. *HNRPC* kann an ein regulatorisches *cis*-Element im kodierenden Bereich von p53 binden und somit Einfluß auf Apoptose- und Zellzyklusvorgänge nehmen [17].

APPBP2 kodiert für ein zytosolisches Protein, welches mit Mikrotubuli interagiert und im intrazellulären Transport von Amyloid-Präkursorprotein beteiligt und damit auch beim Morbus Alzheimer eine Rolle spielt [124]. Ehrbrecht und Kollegen (2006) untersuchten 22 sporadische desmoplastische Medulloblastoma mittels CGH (Comparative Genomic Hybridization). Sie fanden unter anderem in drei Tumoren Amplifikationen auf Chromosom 17q23, wo sie APPBP2 mit drei anderen Genen identifizieren konnten [24]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine Amplifikation für APPBP2, was in der RLGS gut erfasst wird. Es wurde dagegen DNA-Hypermethylierung im 5'-Bereich in 4 von 11 klassischen Medulloblastomen gefunden. Desmoplastische Medulloblastome wurden nicht in der RLGS untersucht. Eine Amplifikation von 17q23 mit Überexpressi-

on von APPBP2 konnte auch für andere Tumorarten wie das Mammakarzinom [79], Neuroblastome [102] und das Adenokarzinom des Ovars [45] gefunden werden.

Bei den folgenden fünf Kandidatengenomen wurden erweiterte DNA-Methylierungsanalysen und Reexpressionsstudien in Tumorzelllinien durchgeführt:

LPAR5 kodiert für einen G-Protein gekoppelten Transmembranrezeptor, welcher extrazelluläre Signale von Lysophosphatsäuren durch G-Protein Heterodimerisierung nach intrazellulär transmittiert. Lysophosphatsäuren als bioaktive Fette spielen bei der Steuerung von Synapsen eine Rolle [115]. *LPAR5* wurde 2001 auf Chromosom 12p13.31 lokalisiert [63]. In einer Studie von Lee et al. 2006 [62] wurde *LPAR5* den bisherigen 4 Lysophosphatsäure-Rezeptoren zugeordnet. Mittels Northern Blot und RT-PCR Untersuchungen wurde gezeigt, dass *LPAR5* in vielen Geweben, vor allem in embryonalen Gehirnen und embryonalen Stammzellen, exprimiert wird. Dies konnte von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt werden [60]. Das ist höchst interessant, denn Lysophosphatsäuren scheinen pluripotente extrazelluläre Transmitter mit mitogener Wirkung in beinahe allen Geweben zu sein. Lysophosphatsäuren beeinflussen verschiedenste biologische Prozesse, wie Gewebsumbau, Neurogenese und Myelinisierung.

In der RLGS-Analyse fehlte die CpG-Insel des *LPAR5*-Gens in 7 von 11 Medulloblastomen. Die Homologie zu *LPAR5* konnte durch die Klonbank-basierte Methode identifiziert werden. In der kalibrierten COBRA wurde gezeigt, dass die DNA-Methylierung von *LPAR5* in Medulloblastomen signifikant höher ist als in normalen Kleinhirnen (Tab. 9). Auch die DNA-Methylierung in Ependymomen ist deutlich stärker als in normalen Kontrollen. Interessanterweise waren anaplastische Ependymome stärker methyliert als die WHO Grad II Ependymome. Das lässt vermuten, dass die DNA-Methylierung in *LPAR5* in malignen Hirntumoren des Kindes- und Jugendalters eine wichtige Rolle spielt. Darüberhinaus konnte die inaktivierte Expression von *LPAR5* in 50 bzw. 75% der Tumorzelllinien durch Behandlung mit demethylierenden Substanzen wiederhergestellt werden (Tab. 9, Abb. 21).

Auch andere aktuelle Arbeiten beschäftigen sich mit der DNA-Methylierung im Promoterbereich von *LPAR5*. Tsujino und Mitarbeiter fanden in Zellen des Kolonkarzinoms einen Zusammenhang zwischen Methylierung und reduzierter Genexpression [116].

LPAR5 wurde auch bei der chronischen lymphatischen Leukämie und beim Mammakarzinom untersucht.

HoxC6 gehört zur Familie der Homeobox-Gene, welche für Hox-Transskriptionsfaktoren kodieren. Homeobox-Gene wurden erstmals 1978 in *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo ihre mutierten Formen zum Teil zu bizarren Störungen im strukturellen Aufbau der adulten Fliege führen [65]. Homeobox-Gene spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Zelldifferenzierung, wobei manche in embryonalen und andere in adulten Geweben exprimiert werden [89]. Besonders erwähnenswert ist die Beteiligung von HoxA2 an der frühen Entwicklung des cerebellären Primordiums [119]. Homeobox-Gene sind aufgrund der Struktur ihrer Homeodomäne in verschiedene Subgruppen und Familien unterteilt. Die Homeobox-Gene sind in vier Komplexen, den Hox-Loci A-D, organisiert. Jede Gruppe liegt auf einem anderen Chromosom; zum Beispiel liegt HoxC auf Chromosom 12q13. Über ein verändertes Genexpressionsmuster von Hox wurde in vielen Tumoren berichtet. Zusammenfassend kann man sagen, dass Hox-Gene, die in undifferenzierten Geweben exprimiert werden, in Tumoren überexprimiert sind und solche, die üblicherweise in ausdifferenzierten Geweben exprimiert sind, in Tumoren nicht exprimiert werden [1]. Eine erhöhte *HoxC6*-Expression wurde in Osteosarkomen, Medulloblastomen sowie Karzinomen von Brust, Lunge und Prostata [14] gefunden. Für *HoxC6* wurde dabei nachgewiesen, dass es in manchen Fällen die Transkription anderer Gene unterdrücken und in anderen Fällen aktivieren kann. Mit welchem Mechanismus *HoxC6* die Transkription anderer Gene beeinflusst, ist nicht gut verstanden [16]. Tao und Mitarbeiter zeigten in ihrer Studie, durch welche Mechanismen *HoxC6* mittels DNA-Methylierung inaktiviert wird [110]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DNA-Methylierung von *HoxC6* in Ependymomen keine Rolle spielt (Tab. 8). In Medulloblastomen sieht man ein sehr heterogenes Methylierungsmuster. Manche sind sehr stark methyliert, die meisten sind wenig oder gar nicht methyliert. In zwei von drei desmoplastischen Medulloblastomen ist die Methylierung mit 70,7% bzw. 37,3% hoch, so dass möglicherweise *HoxC6* in dieser histologischen Untergruppe der Medulloblastome eine entscheidende Rolle spielt. Dies müsste in einer größeren Serie von Tumoren untersucht werden. Die Ergebnisse in den Zelllinien sind widersprüchlich. Sie zeigen den höchsten Methylierungsgrad; die Ex-

pression von *HoxC6* ist aber nicht inaktiviert. Diese Daten sprechen dafür, dass in der vorliegenden Arbeit mit der CpG-Insel im 3'-Bereich des Gens nicht die Region untersucht wurde, die für die Transkriptionsregulation verantwortlich ist. Oder es spielen noch zusätzliche Mechanismen eine wichtige Rolle, wie die Interaktion von *HoxC4* und *HoxC5* mit *HoxC6*. Diese Hox-Gene teilen sich ein 5'-Exon, welches nicht kodiert. Weitere Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um die Rolle des wichtigen Transkriptionsfaktors *HoxC6* in pädiatrischen ZNS-Tumoren besser zu verstehen.

Im Mausmodell geht die Defizienz der **KY**-Peptidase phänotypisch mit einer primären Muskeldegeneration einher, die zu einer chronischen thorakolumbalen Kyphoskoliose führt. Die histopathologischen Befunde lassen vermuten, dass **KY**-Proteinaktivität notwendig ist für normales Muskelwachstum und Muskelfunktion sowie für die Reifung und Stabilisierung der neuromuskulären Funktion (OMIM *605739). Es gibt Hinweise, dass **KY** ein intrinsischer Teil des Proteinkomplexes an der Z-Scheibe im menschlichen Skelettmuskel ist und eine wichtige Rolle bei Muskeldystrophien spielt [4, 7]. Bisher sind nur genetische Veränderungen, jedoch keine epigenetischen Veränderungen für **KY** bekannt. Möglicherweise ist das aber noch nicht untersucht worden. In dieser Arbeit fehlte die CpG-Insel von **KY** in 5 von 11 Medulloblastomen und in 2 von 3 anaplastischen Ependymomen. Daher wurde eine detaillierte Methylierungsanalyse vorgenommen. Es wurde gezeigt, dass **KY** in Medulloblastomen und Ependymomen im Vergleich zu den normalen Kontrollen sehr stark hypermethyliert ist (Tab. 8). Zur Diskrimination zwischen Ependymomen WHO Grad II und anaplastischen Ependymomen kann **KY** nicht beitragen. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Expression ist in 37,5% der Tumorzelllinien inaktiviert. Eine Reexpression konnte nur in einer von fünf Zelllinien induziert werden (Tab. 9). Bis heute ist das Expressionsmuster von **KY** in menschlichen Geweben, insbesondere im Gehirn, nicht untersucht worden, so dass über eine Beteiligung von **KY** bei der Entstehung von Hirntumoren des Kindes- und Jugendalters zur Zeit nur spekuliert werden kann.

SFRP4 kodiert für das „secreted frizzled-related“ Protein 4 und ist ein negativer Regulator des Wnt-Signaltransduktionsweges. Der Wnt-Signaltransduktionsweg reguliert verschiedene Prozesse während der Embryonalentwicklung; er kann zur Tumorentstehung

beitragen. Wnt-Liganden bilden eine Familie von Glykoproteinen; sie binden an Rezeptoren der Frizzled-Familie. Intrazellulär blockiert die Wnt-Signalkaskade - hier spielt das Tumorsuppressor-Protein APC eine Rolle - den Abbau von β -Catenin in Proteasomen und bewirkt dadurch die Anreicherung von β -Catenin im Zytoplasma und im Zellkern, welches dort als Protein-Komplex mit TCF spezifische Gene aktiviert. Keimbahnmutationen von *APC* führen zum Turcot-Syndrom, einem autosomal-dominantem Syndrom mit Prädisposition für Medulloblastome und Kolonkarzinome. Sporadische somatische Mutationen von *APC* sind selten. 3 – 4% der Medulloblastome haben genetische Veränderungen im *APC*-Gen [57]. In weiteren 5 – 10% der sporadisch auftretenden Medulloblastome finden sich Mutationen im β -Catenin-Gen [49]. Dies deckt sich mit der Expressionsstudie von Thompson und Mitarbeitern, die 13% der Medulloblastome ätiologisch in die Wnt-Subgruppe einordneten [113]. Northcott et al. zeigten, dass man unter der histopathologischen Diagnose eines Medulloblastoms vier molekulare Varianten unterscheiden kann. 17,9% dieser Medulloblastome zählt sie zur Wnt-Variante [83]. Wobei in dieser Studie *SFRP4* spezifisch der SHH-Variante zugeordnet wird. Liu et al. identifizierten *SFRP4* bei Patienten mit CLL mittels RLGS - wie in der vorliegenden Arbeit - und zeigten, dass *SFRP4* häufig hypermethyliert ist [68]. *SFRP4* ist als Kandidatengen für einen embryonalen Tumor der neuronalen Linie höchst beachtenswert. Denn Otero und andere zeigten, dass der Wnt-Signaltransduktionsweg in embryonalen Stammzellen Neurogenese induzieren kann [84]. DNA-Hypermethylierung und konsekutive Inaktivierung von *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4* und *SFRP5* wurde für viele Tumoren gezeigt, wie zum Beispiel für das kolorektale Karzinom, Adenokarzinom des Ösophagus, Blasenkarzinom, Ovarialkarzinom und Mesotheliom [41, 74, 109, 125]. Kongkham und Mitarbeiter identifizierten *SFRP1*, *SFRP2* und *SFRP3* als mögliche Tumorsuppressorgene in Medulloblastomen [58]. Es konnte gezeigt werden, dass Reaktivierung von *SFRP1 in vivo* das Wachstum von Medulloblastomen deutlich hemmt.

In der vorliegenden Arbeit ist *SFRP4* in Medulloblastomen stärker methyliert als in normalen Klein- und Großhirnproben (Tab. 8). In Ependymomen spielt die DNA-Methylierung keine Rolle. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass *SFRP4* im Wnt-Signaltransduktionsweg eher eine Rolle in embryonalen Tumoren spielt. Interessanterweise ist die DNA-Methylierung in den peripheren Blutlymphozyten gesunder Spender

sehr hoch. Man könnte vermuten, dass die Methylierung im Promoterbereich von *SFRP4* in Medulloblastomen durch infiltrierende Lymphozyten [69] falsch hoch gemessen wurde. Dies mag man für andere solide Tumoren annehmen, nicht aber für Hirntumoren, die nur zu einem sehr geringen Anteil von Lymphozyten infiltriert sind. Die starke DNA-Methylierung von *SFRP4* in Tumorzelllinien bewirkt die Inaktivierung von 75% der Tumorzelllinien. Eine Reexpression wurde bei 50% und sogar bei 80% der Tumorzelllinien erreicht durch die alleinige 5AZA-Behandlung bzw. durch die Kombination mit TSA (Tab. 9). Damit wurde gezeigt, dass *SFRP4* in den untersuchten Medulloblastomen eine wichtige Rolle spielt. Durch Reaktivierung könnte *SFRP4* die abnormale Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges hemmen und somit Tumorstromwachstum verhindern. Inhalt weiterer Forschungsvorhaben sollte sein, dies bei Medulloblastomen *in vitro* und *in vivo* zu zeigen, wie es bereits beim kolorektalen Karzinom erfolgte [109].

SLC16A8 (Solute Carrier Family 16 Member 8) gehört zu den Monocarboxylat-Transportern 3. Das Gen wurde 1999 auf Chromosom 22q13.1 lokalisiert [122]. Es spielt in der basolateralen Membran der Retina beim Abtransport von Laktat eine wichtige Rolle [21]. *SLC16A8* wird auch in menschlichem Gehirn exprimiert. Andere Mitglieder der „SLC-Familie“ sind häufig an der Entstehung menschlicher Tumoren beteiligt. Zum Beispiel wurde für *SLC5A8* eine DNA-Hypermethylierung und konsekutive Inaktivierung in Oligodendrogliomen, Astrozytomen, Magentumoren und kolorektalen Karzinomen gefunden [47, 117]. In der vorliegenden Arbeit ist *SLC16A8* in ZNS-PNET und Ependymomen signifikant stärker methyliert als in Normalgeweben (Tab. 8). Die DNA-Methylierung in Medulloblastomen ist ebenfalls stärker als in normalen Klein- und Großhirngeweben, aber unterscheidet sich nicht signifikant (p-Wert 0,052). Interessanterweise kann die Genexpression in Zelllinien nur durch die Kombinationsbehandlung mit 5AZA und TSA wiederhergestellt werden (Tab. 9). Die demethylierende Wirkung von 5AZA alleine war nicht ausreichend.

Es sollte nun untersucht werden, ob *SLC16A8* ursächlich an der Tumorgenese von ZNS-Tumoren des Kindes- und Jugendalters beteiligt ist oder eine sekundäre Veränderung der Tumoren darstellt.

Forschungsarbeiten, die Veränderungen des Epigenom in Tumoren untersuchen, haben große Aussichten, Kandidatengene zu definieren, die durch ihre Reversibilität ein Ziel zukünftiger Therapien darstellen könnten. In der Einleitung wurde auf die schweren therapiebezogenen Nebenwirkungen für die betroffenen tumorkranken Kinder eingegangen. Neue epigenetische Medikamente könnten durch die gezielte epigenetische Beeinflussung eine neue Ära in der Krebsbehandlung einleiten.

Einen weiteren wichtigen Beitrag könnten epigenetische Biomarker als Surrogatmarker durch eine verbesserte Diagnostik oder eine verbesserte Risikostratifizierung liefern. Durch die genauere Definition von Risikogruppen könnten Behandlungen spezifischer konzipiert werden. So könnte bei ungünstiger Prognose eine Therapieintensivierung vorgenommen werden, um die Überlebenswahrscheinlichkeit zu verbessern. Andererseits könnten bei günstiger Prognose die Therapie reduziert und schwere therapiebezogene Langzeitnebenwirkungen verhindert werden.

5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AE	Anaplastisches Ependymom WHO Grad III
bp	Basenpaare
CE	Cerebellum
CM	Cortex cerebri
cDNA	zur messenger RNA komplementäre DNA
COBRA	Combined Bisulfite Restriction Analysis
ddH ₂ O	doppel destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dMB	desmoplastisches Medulloblastom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
FCS	Fetal Calf Serum
E	Ependymom WHO Grad II
EST	Expressed Sequence Taq
<i>GPI</i>	Glucosephosphatisomerase
HIT	Hirntumor
Kb	Kilobase
kCOBRA	kalibrierte Combined Bisulfite Restriction Analysis
LB-Medium	“Luria Broth“-Medium
nb	nicht bestimmt
MB	Medulloblastom, synonym für klassisches Medulloblastom
LOH	Loss of heterozygosity
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBL	Periphere Blutlymphozyten
RLGS	Restriktion Landmark Genomic Scanning
RNA	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome, plötzlicher Kindstod
ZNS-PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor des ZNS
Ta	Annealingtemperatur
TE	Tris-EDTA-Puffer
TSA	Trichostatin A
VGS	Virtueller Genomescan
VSD	Ventrikelseptumdefekt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZL	Zelllinie
ZNS	Zentrales Nervensystem
5AZA	5-aza-2'-deoxycytidine

6 Literaturverzeichnis

1. Abate-Shen, C., *Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence?* Nature Reviews Cancer, 2002. 2: 777-785.
2. Adesina, A.M., J. Nalbantoglu, and W.K. Cavenee, *p53 gene mutation and mdm2 gene amplification are uncommon in medulloblastoma.* Cancer Res, 1994. 54(21): 5649-51.
3. Asherson, P.J. and S. Curran, *Approaches to gene mapping in complex disorders and their application in child psychiatry and psychology.* Br J Psychiatry, 2001. 179: 122-8.
4. Baker, J., et al., *Identification of a Z-band associated protein complex involving KY, FLNC and IGFN1.* Exp Cell Res, 2010. 316(11): 1856-70.
5. Baylin, S. and J. Herman, *DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics.* Trends Genet, 2000. 16: 168-174.
6. Baylin, S.B., *DNA methylation and gene silencing in cancer.* Nature clinical practice oncology, 2005. 2(1): S4-S11.
7. Beatham, J., et al., *Filamin C interacts with the muscular dystrophy KY protein and is abnormally distributed in mouse KY deficient muscle fibres.* Human Molecular Genetics, 2004. 13(22): 2863-2874.
8. Belinsky, S.A., *Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer.* Nat Rev Cancer, 2004. 4(9): 707-17.
9. Bender, C., J. Zingg, and P. Jones, *DNA methylation as a target for drug design.* Pharm Res, 1998. 15: 175-187.
10. Biegel, J.A., *Cytogenetics and molecular genetics of childhood brain tumors.* Neuro Oncol, 1999. 1(2): 139-51.
11. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory.* Genes and Development, 2002. 16: 6-21.
12. Blackledge, N.P., et al., *CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase.* Mol Cell, 2010. 38(2): 179-90.
13. Blin, N. and D.W. Stafford, *A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes.* Nucleic Acids Res, 1976. 3(9): 2303-8.
14. Bodey B, et al., *Immunocytochemical detection of the homeobox B3, B4, and C6 gene products in childhood medulloblastomas/primitive neuroectodermal tumors.* Anticancer Research, 2000. 20(3a): 1769-1780.
15. Callinan, P.A. and A.P. Feinberg, *The emerging science of epigenomics.* Hum Mol Genet, 2006. 15 Spec No 1: R95-101.

16. Chariot, A., et al., *Cloning and expression of a new HOXC6 transcript encoding a repressing protein*. *Biochem J*, 1996. 319: 91-97.
17. Christian, K.J., M.A. Lang, and F. Raffalli-Mathieu, *Interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 with a novel cis-regulatory element within p53 mRNA as a response to cytostatic drug treatment*. *Mol Pharmacol*, 2008. 73(5): 1558-67.
18. Costello, J.F., et al., *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns*. *Nature Genetics*, 2000. 25: 132-138.
19. Dai, Z., et al., *An Ascl boundary library for the studies of genetic and epigenetic alterations in CpG islands*. *Genome Res*, 2002. 12(10): 1591-98.
20. Dalgin, G.S., et al., *Identification of novel epigenetic markers for clear cell renal cell carcinoma*. *J Urol*, 2008. 180(3): 1126-30.
21. Daniele, L.L., et al., *Altered visual function in monocarboxylate transporter 3 (Slc16a8) knockout mice*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. 295(2): C451-7.
22. Eads, C.A. and P.W. Laird, *Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)*, in *DNA methylation protocols*, M. KL and R. BH, Editors. 2004, Humana Press Inc.: Totowa NJ. 71-85.
23. Ebinger, M., et al., *Promoter Methylation pattern of Caspase-8, p16INK4A, MGMT, TIMP-3 and E-Cadherin in medulloblastoma*. *Pathology Oncology Research*, 2004. 10(1): 17-21.
24. Ehrbrecht, A., et al., *Comprehensive genomic analysis of desmoplastic medulloblastomas: identification of novel amplified genes and separate evaluation of the different histological components*. *J Pathol*, 2006. 208(4): 554-63.
25. Ellison, D.W., et al., *What's new in neuro-oncology? Recent advances in medulloblastoma*. *European Journal of Pediatric Neurology*, 2003. 7: 53-66.
26. Ellison, D.W., et al., *Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables*. *J Clin Oncol*, 2011. 29(11): 1400-7.
27. Fan, X., et al., *Notch1 and Notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth*. *Cancer Research*, 2004. 64: 7787-7793.
28. Fogarty, M., J. Kessler, and R. Wechsler-Reya, *Morphing into cancer: the role of developmental signaling pathways in brain tumor formation*. 2005: 458-474.
29. Franck, T., et al., *Mutation analysis of the seven in absentia homolog 1 (SIAH1) gene in Parkinson's disease*. *J Neural Transm*, 2006. 113(12): 1903-8.

30. Freed, W.J., et al., *Gene expression profile of neuronal progenitor cells derived from hESCs: activation of chromosome 11p15.5 and comparison to human dopaminergic neurons*. PLoS One, 2008. 3(1): e1422.
31. Frescas, D., et al., *KDM2A represses transcription of centromeric satellite repeats and maintains the heterochromatic state*. Cell Cycle, 2008. 7(22): 3539-47.
32. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(5): 1827-31.
33. Frühwald, M.C., *DNA methylation patterns in cancer- novel prognostic indicators?* Am J Pharmacogenomics, 2003. 3(4): 245-260.
34. Frühwald, M.C., et al., *Aberrant promoter methylation of previously unidentified target genes is a common abnormality in medulloblastomas - Implications for tumor biology and potential clinical utility*. Oncogene, 2001. 20: 5033-5042.
35. Furchert, S.E., et al., *Inhibitors of histone deacetylases as potential therapeutic tools for high-risk embryonal tumors of the nervous system of childhood*. Int J Cancer, 2007. 120(8): 1787-94.
36. Gilbertson, R.J., *Medulloblastoma: signaling a change in treatment*. The Lancet Oncology, 2004. 5: 209-18.
37. Gilbertson, R.J., et al., *ERBB receptor signaling promotes ependymoma cell proliferation and represents a potential novel therapeutic target for this disease*. Clinical Cancer Research, 2002. 8: 3054-3064.
38. Goedecke, S., et al., *Accurate quantification of DNA methylation of DRD4 applying capillary gel electrophoresis with LIF detection*. Electrophoresis, 2009. 30(8): 1412-7.
39. Hamilton, D., et al., *Epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in ependymoma*. Cancer Letter, 2005. 227: 75-81.
40. Harada, K., et al., *Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines*. Oncogene, 2002. 21: 4345-4349.
41. He, B., et al., *Secreted Frizzled-Related Protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in β -catenin-deficient human mesothelioma cells*. Cancer Research, 2005. 65(3): 743-748.
42. Heideman, R.L., et al., *Tumors of the Central Nervous System*, in *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, P.A. Pizzo and D.G. Poplack, Editors. 1997, Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia. 633-697.
43. Herman, A., H. Gowher, and A. Jeltsch, *Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004. 61: 2571-2587.

44. Herman, R., et al., *ERBB2 Up-Regulates S100A4 and Several other Prometastatic Genes in Medulloblastoma*. Cancer Research, 2003. 63: 140-148.
45. Hirasawa, A., et al., *Association of 17q21-q24 gain in ovarian clear cell adenocarcinomas with poor prognosis and identification of PPM1D and APPBP2 as likely amplification targets*. Clin Cancer Res, 2003. 9(6): 1995-2004.
46. Hirotsune, S., et al., *New approach for detection of amplification in cancer DNA using restriction landmark genomic scanning*. Cancer Res, 1992. 52(13): 3642-7.
47. Hong C, et al., *Shared epigenetic mechanisms in human and mouse gliomas inactivate expression of the growth suppressor SLC5A8*. Cancer Research, 2005. 65(9): 3617-3623.
48. Horiguchi, K., et al., *Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors*. Oncogene, 2003. 22: 7862-7865.
49. Huang, H., et al., *APC mutations in sporadic medulloblastomas*. Am J Pathol, 2000. 156(2): 433-7.
50. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nature Genetics suppl, 2003. 33: 245-254.
51. Jenkin, D., C. Danjoux, and M. Greenberg, *Subsequent quality of life for children irradiated for a brain tumor before age four years*. Med Pediatr Oncol, 1998. 31(6): 506-11.
52. Jones, P. and S. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nature Reviews Genetic, 2002. 3: 415-428.
53. Jones, P.A. and P.W. Laird, *Cancer epigenetics come of age*. Nature Genetics, 1999. 21: 163-167.
54. Kaatsch, P., et al., *Population-based Epidemiologic data on brain tumors in german children*. Cancer, 2001. 92(12): 3155-3164.
55. Kaatsch, P. and C. Spix, *Jahresbericht 2006/07 (1980 - 2006)*, ed. D.K. (DKKR). Vol. 1. 2008, Mainz: Druckerei Lindner OHG, Mainz. 1 - 95.
56. Kiltie, A.E., L.S. Lashford, and H.R. Gattamaneni, *Survival and late effects in medulloblastoma patients treated with craniospinal irradiation under three years old*. Med Pediatr Oncol, 1997. 28(5): 348-54.
57. Koch, A., et al., *Somatic mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors*. Int J Cancer, 2001. 93(3): 445-9.

58. Kongkham, P.N., et al., *The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma*. *Oncogene*, 2010. 29(20): 3017-24.
59. Kool, M., et al., *Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features*. *PLoS One*, 2008. 3(8): e3088.
60. Kotarsky K, et al., *Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes*. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 2006. 318(2): 619-628.
61. Laird, P.W., *Cancer epigenetics*. *Human Molecular Genetics*, 2005. 14(Review Issue 1): 65-76.
62. Lee, C., et al., *GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5*. *J Biol Chem*, 2006. 281(33): 23589-23597.
63. Lee, D.K., et al., *Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes*. *Gene*, 2001. 275: 83-91.
64. Lee, J.J., et al., *Predicting Cancer Development in Oral Leukoplakia: Ten Years of Translational Research*. *Clinical Cancer Research*, 2000. 6: 1702-1710.
65. Lewis, E.B., *A gene complex controlling segmentation in Drosophila*. *Nature*, 1978. 276(5688): 565-70.
66. Li, L.C. and R. Dahiya, *MethPrimer: designing primers for methylation PCRs*. *Bioinformatics*, 2002. 18(11): 1427-1431.
67. Lindsey, J.C., et al., *Identification of tumour-specific epigenetic events in medulloblastoma development by hypermethylation profiling*. *Carcinogenesis*, 2004. 25(5): 661-668.
68. Liu, T.-H., et al., *CpG Island Methylation and Expression of the Secreted Frizzled-Related Protein Gene Family in Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Cancer Research*, 2006. 66(2): 653-658.
69. Lombaerts, M., et al., *Infiltrating leukocytes confound the detection of E-cadherin promoter methylation in tumors*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004. 319: 697-704.
70. Louis, D.N., et al., *WHO classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4th Edition ed, ed. F.T. Bosman, et al. 2007, Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 69008 Lyon, France. 1 - 309.
71. Lusher, M.E., et al., *Biallelic epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in medulloblastoma development*. *Cancer Research*, 2002. 62: 5906-5911.

72. MacDonald, T.J., et al., *Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease*. Nature Genetics, 2001. 29: 143-152.
73. Maddrey, A.M., et al., *Neuropsychological performance and quality of life of 10 year survivor of childhood medulloblastoma*. Journal of Neuro-Oncology, 2005. 72: 245-253.
74. Marsit, C.J., et al., *Epigenetic Inactivation of SFRP Genes and TP53 Alteration Act Jointly as Markers of Invasive Bladder Cancer*. Cancer Research, 2005. 65: 7081-7085.
75. Matsuo, K., et al., *SLAH1 inactivation correlates with tumor progression in hepatocellular carcinomas*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. 36(3): 283-91.
76. McCabe, M.G., et al., *High-resolution array-based comparative genomic hybridization of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. 65(6): 549-61.
77. Melean, G., et al., *Genetic insights into familial tumors of the nervous system*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2004. 129C(1): 74-84.
78. Merchant, T. and M. Fouladi, *Ependymoma: new therapeutic approaches including radiation and chemotherapy*. Journal of Neuro-Oncology, 2005. 75(3): 287-299.
79. Monni, O., et al., *Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(10): 5711-6.
80. Mühlisch, J., et al., *Frequent but borderline methylation of p16INK4a and TIMP3 in medulloblastoma and sPNET revealed by quantitative analyses*. Journal Neurooncology, 2007. 83(1): 17-29.
81. Mühlisch, J., et al., *Epigenetic repression of RASSF1A but not CASP8 in supratentorial PNET (sPNET) and atypical teratoid/rhabdoid tumors (AT/RT) of childhood*. Oncogene, 2006. 25(7): 1111-1117.
82. Nagase, T., et al., *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XI. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro*. DNA Res, 1998. 5(5): 277-86.
83. Northcott, P.A., et al., *Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants*. J Clin Oncol, 2011. 29(11): 1408-14.
84. Otero, J., et al., *β -Catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells*. Development, 2004. 131: 3545-3557.
85. Packer, R.J., B.R. Rood, and T.J. MacDonald, *Medulloblastoma: present concepts of stratification into risk groups*. Pediatr Neurosurg, 2003. 39: 60-67.

86. Pfister, S., et al., *Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci*. J Clin Oncol, 2009. 27(10): 1627-36.
87. Pietsch, T., M.D. Taylor, and J.T. Rutka, *Molecular pathogenesis of childhood brain tumors*. Journal of Neuro-Oncology, 2004. 70: 203-215.
88. Rahuel-Clermont, S., et al., *Biochemical and thermodynamic characterization of mutated beta1,4-galactosyltransferase 7 involved in the progeroid form of the Ehlers-Danlos syndrome*. Biochem J, 2010. 432(2): 303-11.
89. Ramachandran Sumathi, et al., *Loss of HOXC6 expression induces apoptosis in prostate cancer cells*. Oncogene, 2005. 24: 188-198.
90. Reddy, A.T., et al., *Outcome for children with supratentorial primitive neuroectodermal tumors treated with surgery, radiation, and chemotherapy*. Cancer, 2000. 88(9): 2189-93.
91. Ribi, K., et al., *Outcome of Medulloblastoma in Children: Long-Term Complications and Quality of Life*. Neuropediatrics, 2006: 357-365.
92. Rickert, C. and W. Paulus, *Epidemiology of central nervous system tumors in childhood and adolescence based on the new WHO classification*. Childs Nerv Syst., 2001. 17(9): 503-11.
93. Roberts, R.O., et al., *Medulloblastoma: a population-based study of 532 cases*. J Neuropathol Exp Neurol, 1991. 50(2): 134-44.
94. Robertson PL, et al., *Survival and prognostic factors following radiation therapy and chemotherapy for ependymomas in children: a report of the Children's Cancer Group*. J Neurosurg, 1998. 88(4): 695-703.
95. Rodriguez-Paredes, M. and M. Esteller, *Cancer epigenetics reaches mainstream oncology*. Nat Med, 2011. 17(3): 330-9.
96. Rood, B., et al., *Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma*. Cancer Research, 2002. 62: 3794-3797.
97. Rorke, L.B., et al., *Primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. Brain Pathology, 1997. 7: 765-784.
98. Rouillard, J.-M., et al., *Virtual Genome Scan: A tool for restriction landmark-based scanning of the human genome*. Genome Research, 2001. 11: 1453-1459.
99. Russo, C., et al., *Comparative genomic hybridization in patients with supratentorial and infratentorial primitive neuroectodermal tumors*. Cancer, 1999. 86(2): 331-339.

100. Rutkowski, S., et al., *Treatment of early childhood Medulloblastoma by postoperative Chemotherapy alone*. New England Journal of Medicine, 2005. 352: 978-986.
101. Rutkowski, S., et al., *Prognostic relevance of clinical and biological risk factors in childhood medulloblastoma: results of patients treated in the prospective multicenter trial HIT'91*. Clin Cancer Res, 2007. 13(9): 2651-7.
102. Saito-Ohara, F., et al., *PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma*. Cancer Res, 2003. 63(8): 1876-83.
103. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd Edition ed. 1989, New York: Cold Spring Harbor Press.
104. Scheurlen, W.G., et al., *Molecular analysis of childhood primitive neuroectodermal tumors defines markers associated with poor outcome*. J Clin Oncol, 1998. 16(7): 2478-85.
105. Schlosser, S., et al., *Genome wide methylation analysis reveals epigenetic deregulation of the dopamine receptor D4 in pediatric tumors of the central nervous system*. Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht, 2011.
106. Schumann, H., et al., *Expression of secreted frizzled related proteins 3 and 4 in human ventricular myocardium correlates with apoptosis related gene expression*. Cardiovascular Research, 2000. 45: 720-728.
107. Smiraglia, D. and C. Plass, *The study of aberrant methylation in cancer via restriction landmark genomic scanning*. Oncogene, 2002. 21: 5414-5426.
108. Solecki, D.J., et al., *Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation*. Neuron, 2001. 31: 557-568.
109. Suzuki, H., et al., *Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer*. Nature genetics, 2004. 36(4): 417-422.
110. Tao, Y., et al., *Lsh mediated RNA polymerase II stalling at HoxC6 and HoxC8 involves DNA methylation*. PLoS One, 2010. 5(2): e9163.
111. Taylor, M.D., et al., *Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma*. Cancer Cell, 2005. 8: 323-335.
112. Taylor, M.D., et al., *Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma*. Nat Genet, 2002. 31(3): 306-10.
113. Thompson, M.C., et al., *Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations*. J Clin Oncol, 2006. 24(12): 1924-31.

114. Timmermann, B., et al., *Role of radiotherapy in anaplastic ependymoma in children under age of 3 years: Results of the prospective German brain tumor trials HIT-SKK 87 and 92**. *Radiotherapy and Oncology*, 2005. 77(3): 278-285.
115. Trimbuch, T., et al., *Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling*. *Cell*, 2009. 138(6): 1222-35.
116. Tsujino, M., et al., *Differential expressions and DNA methylation patterns of lysophosphatidic acid receptor genes in human colon cancer cells*. *Virchows Arch*, 2010. 457(6): 669-76.
117. Ueno, M., et al., *Aberrant methylation and histone deacetylation associated with silencing of SLC5A8 in gastric cancer*. *Tumor Biology*, 2004. 25: 134-140.
118. US, *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*. 2001, US Food and Drug Administration: Rockville, MD. 1-25.
119. Wang, V.Y. and H.Y. Zoghbi, *Genetic regulation of cerebellar development*. *Nature, Review Neuroscience*, 2001. 2: 484-491.
120. Wen, Y.Y., et al., *SIAH1 induced apoptosis by activation of the JNK pathway and inhibited invasion by inactivation of the ERK pathway in breast cancer cells*. *Cancer Sci*, 2009. 101(1): 73-9.
121. Witt, O., et al., *Valproic acid treatment of glioblastoma multiforme in a child*. *Pediatr Blood Cancer*, 2004. 43(2): 181.
122. Yoon, H., L.A. Donoso, and N.J. Philp, *Cloning of the human monocarboxylate transporter MCT3 gene: localization to chromosome 22q12.3-q13.2*. *Genomics*, 1999. 60(3): 366-70.
123. Zardo, G., et al., *Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic inactivation in tumors*. *Nature Genetics*, 2002. 32: 453-458.
124. Zheng, P., et al., *PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(25): 14745-50.
125. Zou, H., et al., *Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus*. *Int. J. Cancer*, 2005. 116: 584-591.
126. Zurawel, R.H., et al., *Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000. 27(1): 44-51.

7 Anhang mit detaillierten klinischen Angaben der Proben

Probe [interne Be- zeichnung]	Diagnosealter [Jahre]	Geschlecht	Verlauf	Todesursache
Cerebellum				
PNO038	2,08	männlich	tot	VSD
PNO063	60	männlich	tot	Aortenaneurysma
PNO174	67	männlich	tot	Kongestive Herzerkrankung
PNO186	0,5	weiblich	tot	SIDS
PNO192	2	weiblich	tot	unbekannt
PNO225	0,91	weiblich	tot	SIDS
PNO226	0,75	männlich	tot	SIDS
9708P600	17	männlich	tot	Lymphoblastisches Lymphom
9609P315	4	weiblich	tot	Kongenitale Herzerkrankung
9609P322	unbekannt	unbekannt	tot	unbekannt
9609P325	11	weiblich	tot	Kongenitale Herzerkrankung
9709P309	9	weiblich	tot	Herzstillstand bei chron. Glomerulo- nephritis mit Hypertonus
9704P318	1	männlich	tot	Leberverfettung
Cortex cerebelli				
PNO062	60	männlich	tot	Aortenaneurysma
PNO227	0,25	weiblich	tot	SIDS
PNO229	6	weiblich	tot	Trauma
Humane Lymphozy- ten aus Venenblut				
PNO240	24	weiblich	gesund	
PNO241	25	männlich	gesund	
PNO242	37	weiblich	gesund	
PNO243	25	weiblich	gesund	
PNO244	27	männlich	gesund	
PNO245	39	männlich	gesund	
PNO246	30	weiblich	gesund	
PNO247	25	weiblich	gesund	
PNO249	30	männlich	gesund	
PNO250	29	männlich	gesund	
Klassisches Medulloblastom				
PNO1 ^R	7,76	männlich	tot	Tod bei OP 03/1999 (Alter 7,8)
PNO2 ^R	5	weiblich	komplette klin. Remissi-	stabil bis 08/2005 (Alter 11,4)

			on	
PNO3	7,04	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 09/2005 (Alter 13,1)
PNO4	1,82	männlich	tot	tumorbedingter Tod 2001 (Alter 2,9)
PNO5	unbekannt	männlich	tot	tumorbedingter Tod 08/2000 (Alter 2,3)
PNO179 ^R	3,03	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 08/2005 (Alter 7,7)
PNO182 ^R	5,72	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 09/2005 (Alter 9,8)
PNO184 ^R	6	weiblich	tot	tumorbedingter Tod 03/2005 (Alter 9,4)
PNO187 ^R	9,42	weiblich	komplette klin. Remission	stabil bis 09/2005 (Alter 13)
PNO201	2,92	männlich	tot	tumorbedingter Tod 06/2005 (Alter 4,7)
PNO216	1,75	weiblich	unbekannt	unbekannt
PNO217	4,08	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO218	0,42	weiblich	unbekannt	unbekannt
PNO219	6,08	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO220	1,92	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO221	4,58	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO222	5,75	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO223	6,08	weiblich	unbekannt	unbekannt
PNO224	16,17	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO232	6,17	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO237	15,75	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO239	5,25	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO251	7,17	weiblich	unbekannt	unbekannt
PNO255	2,42	weiblich	unbekannt	unbekannt
1	14,43	weiblich	unbekannt	unbekannt
2	9,37	männlich	unbekannt	unbekannt
3	7,52	männlich	unbekannt	unbekannt
4	5,72	männlich	unbekannt	unbekannt
5	6,91	männlich	tot	tumorbedingter Tod 06/1994 (Alter 7,6)
6	13,44	männlich	unbekannt	unbekannt
7	11,32	männlich	tot	tumorbedingter Tod 12/1994 (Alter

				12,2)
8	2,71	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 09/2005 (Alter 14,3)
9	4,76	männlich	tot	tumorbedingter Tod 03/1996 (Alter 6,6)
10	13,36	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 09/2005 (Alter 18,3)
20	12,84	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 08/2005 (Alter 19,8)
21	21,57	männlich	tot	tumorbedingter Tod 07/2002 (Alter 25,3)
22	17,48	männlich	tot	tumorbedingter Tod 06/1995 (Alter 17,5)
25	10,88	männlich	unbekannt	unbekannt
28	10,6	männlich	unbekannt	unbekannt
29	11,5	männlich	unbekannt	unbekannt
32	12,33	weiblich	unbekannt	unbekannt
33	4,74	weiblich	komplette klin. Remission	stabil bis 09/2003 (Alter 17)
38	2,17	weiblich	unbekannt	unbekannt
39	3,1	männlich	unbekannt	unbekannt
41	9,65	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 04/2005 (Alter 15,4)
43	8,65	männlich	tot	tumorbedingter Tod 01/2000 (Alter 8,8)
48	1,5	weiblich	komplette klin. Remission	stabil bis 03/2005 (Alter 13,1)
51	4,62	männlich	unbekannt	unbekannt
52	3,38	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 09/2005 (Alter 9,9)
53	0,82	weiblich	tot	tumorbedingter Tod 1998
desmoplastisches Medulloblastom				
27	13,4	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 02/2005 (Alter 22,1)

			on	
35	7,46	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 08/1994 (Alter 7,6)
36	8,82	männlich	unbekannt	unbekannt
42	7,62	männlich	unbekannt	unbekannt
46	6,95	weiblich	komplette klin. Remission	stabil bis 04/2005 (Alter 14,5)
Ependymom WHO Grad II				
18	unbekannt	weiblich	unbekannt	unbekannt
112	1,5	männlich	unbekannt	unbekannt
117	15,08	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 09/2002 (Alter 22,3)
119	1,5	männlich	unbekannt	unbekannt
121	5,65	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 08/2005 (Alter 10,9)
126	14,03	männlich	unbekannt	unbekannt
127	10,57	männlich	unbekannt	unbekannt
128	12,7	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 08/2005 (Alter 14,2)
PNO202	5,44	weiblich	unbekannt	unbekannt
PNO203	3,5	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO204	1,44	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO205	3,76	weiblich	unbekannt	unbekannt
PNO206	15,85	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO207	2,13	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO208	1,43	weiblich	unbekannt	unbekannt
Anaplastisches Ependymom WHO Grad III				
12	unbekannt	männlich	unbekannt	unbekannt
110	2,48	weiblich	komplette klin. Remission	stabil bis 09/2005 (Alter 3,6)
111	4,25	weiblich	komplette klin. Remission	stabil bis 09/2005 (Alter 5,3)

113	10,87	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 01/1997 (Alter 17,6)
114	unbekannt	weiblich	unbekannt	unbekannt
115	4,33	weiblich	unbekannt	unbekannt
116	unbekannt	männlich	tot	tumorbedingter Tod 01/2000 (Alter 5,6)
118	unbekannt	weiblich	tot	tumorbedingter Tod 01/2001 (Alter 19,3)
120	unbekannt	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 08/2005 (Alter 11,8)
123	11,08	weiblich	unbekannt	unbekannt
124	1,09	weiblich	tot	tumorbedingter Tod 02/2004 (Alter 3,1)
125	0,98	männlich	tot	Tod bei OP 01/2003 (Alter 1,3)
PNO014 ^k	6,27	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 08/2005 (Alter 11,8)
PNO181 ^k	5,76	weiblich	komplette klin. Remission	stabil bis 08/2005
PNO195	unbekannt	männlich	tot	Tod bei OP 01/2003 (Alter 1,3)
ZNS-PNET				
59	3,09	männlich	komplette klin. Remission	stabil bis 04/2005 (Alter 10,2)
63	2,58	weiblich	komplette klin. Remission	stabil bis 05/2003 (Alter 4,4)
64	33,89	weiblich	komplette klin. Remission	stabil bis 08/2003 (Alter 35,9)
PNO006	4,18	männlich	tot	tumorbedingter Tod 01/2002 (Alter 6,4)
PNO121 ^k	5,74	männlich	tot	tumorbedingter Tod 10/2003 (Alter 8,5)
PNO209	5,5	weiblich	tot	tumorbedingter Tod 01/2001 (Alter 6,7)
PNO210	unbekannt	weiblich	unbekannt	unbekannt
PNO211	8,59	männlich	tot	tumorbedingter Tod 12/2002 (Alter 11,3)

PNO212	15,22	männlich	unbekannt	unbekannt
PNO213	0,1	weiblich	unbekannt	unbekannt
PNO215	3	männlich	unbekannt	unbekannt
9211NN03	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt
9402I05	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt
9408P004	3	weiblich	unbekannt	unbekannt
9602P366	4	männlich	unbekannt	unbekannt

Tabelle 10: Übersicht über die klinischen Angaben der Kontrollproben und Tumorproben, die mittels kalibrierter Combined Bisulfite Restriction Analysis (kCOBRA) untersucht wurden. Proben mit ^R markiert wurden per Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) untersucht

Danksagung

Mein besonderer und herausgehobener Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Dr. Michael Frühwald, für die Überlassung des anspruchsvollen und überaus spannenden Themas. Er mich nicht nur fachlich und wissenschaftlich in die Welt der Epigenetik und in wissenschaftlich-experimentelles Arbeiten und Denken eingeführt, sondern mich durch seine vorgelebte Begeisterungsfähigkeit zur Wissenschaft sehr motiviert. Ich bin sehr dankbar, weil er mir ein großes Vorbild als Wissenschaftler, Arzt und Mensch ist. Im Mittelpunkt allen Handelns stehen für ihn die Kinder; ihnen gilt es zu helfen.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Dr. rer. nat. Jörg Mühlisch. Mit seiner nordischen Ruhe war er jederzeit bereit, sich stundenlang um das Lösen von Problemen zu bemühen und Hilfestellungen zu geben.

Weiterhin gilt es, Frau Anne Schwering großen Dank zu sagen. Sie zeigte mir die Griffe und Kniffe der Laborarbeit. Ohne Dich, liebe Anne, hätte ich so vieles Praktische nicht erlernt und mir die Laborarbeit nicht soviel Freude bereitet.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Sabrina Schlosser, die „mein“ Projekt der *AscI*-RLGS fortführte und Frau Birgit Kallinger für die Einarbeitung in die Zellkulturen.

Bei Herrn Dr. J. Gerß, Institut für Biometrie und klinische Forschung, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, bedanke ich mich für die Hilfe bei der Statistik.

Bei meiner Freundin Anna bedanke ich mich für die Geduld und Unterstützung beim Verfassen der deutschen Dissertationsschrift.

Den allergrößten Dank verdienen meine lieben Eltern. Ihr habt die Voraussetzungen geschaffen, diesen Lebensweg privat und beruflich einzuschlagen. Eure Unterstützung und Begleitung sind für mich besonders wichtig und ich bin dafür sehr dankbar.

Lebenslauf