

AUS DER CHIRURGISCHEN KLINIK
DES AKADEMISCHEN LEHRKRANKENHAUSES
MARIENHOSPITAL EUSKIRCHEN
CHEFARZT: PROF. DR. MED. HANS SCHWERING

**DER EFFEKT DER BESTRAHLUNG AUF HUMANE
TUMORZELLINIEN**

INAUGURAL – DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOCTOR MEDICINAE
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER WESTFÄLISCHEN WILHELMS-UNIVERSITÄT ZU MÜNSTER

VORGELEGT VON
SUZAN HOFMAIER
AUS WERNE AN DER LIPPE

2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Preusser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Schwering

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2004

Für meinen Papa

AUS DER CHIRURGISCHEN ABTEILUNG
DES AKADEMISCHEN LEHRKRANKENHAUSES MARIENHOSPITAL
EUSKIRCHEN

Chefarzt: Prof. Dr. med. H. Schwering

Referent: Prof. Dr. med. H. Schwering

Koreferent: Prof. Dr. med. P. Preusser

Zusammenfassung

Der Effekt der Bestrahlung auf humane Tumorzelllinien

Suzan Hofmaier

Die in Tumorzellen häufig veränderten Regulationsmechanismen mit der Folge von funktionellen Ausfällen im Sinne von epigenetischen Veränderungen wurden in den letzten Jahren im Gegensatz zu mutagenetischen Ansätzen vermehrt diskutiert.

Das epigenetische Phänomen der DNA-Methylierung als Regulator der Genexpression wurde in vielen Tumoren als verändert nachgewiesen und verantwortlich für den funktionellen Ausfall z.B. von Tumorsuppressorgenen, bzw. der abnormen Aktivierung von Protoonkogenen gemacht.

Alterationen der DNA-Methylierung können neben ihrer tumorbiologischen Bedeutung auch für die Therapie von Karzinomen relevant sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden über eine Fingerabdruckmethode 25 gliale Tumoren auf Methylierungsveränderungen untersucht und eine globale Hypomethylierung sowie eine positive Korrelation mit Zunahme der Malignität festgestellt.

Der klinisch vielfach beobachteter Aktivierungszustand und erhöhter Metabolismus von Tumorzellen könnte darüber erklärt werden.

Es konnte durch Bestrahlung der Zelllinien eine allgemeine Hypomethylierung, in Abhängigkeit des TP53 Status neben lokalen Hypermethylierungen nachgewiesen werden.

Die Hypomethylierung könnte eine Aktivierung, z.B. der zuvor stillgelegten Tumorsuppressorgene bzw. Reparatursysteme, beinhalten, wohingegen die lokale Hypermethylierung des MYCC-Gens, eine verminderte Expression des Protoonkogenes zur Folge hat.

Beide Aspekte könnten ein molekulargenetische Korrelat zur klinisch beobachtet verlängerten Überlebensdauer sein.

Somit zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass eine in Hirntumoren vorliegende Dymethylierung durch die Anwendung der Strahlentherapie veränderlich ist und damit die Grundlage neuer Therapieansätze manifester Tumoren darstellen, neben der Möglichkeit eine Tumorprogression beeinflussen zu können.

1. INHALTSVERZEICHNIS

1. Inhaltsverzeichnis.....	2
2. Abkürzungsverzeichnis	4
3. Einleitung	6
3.1 Klassifikation glialer Tumoren	7
3.1.1 Pathologie der glialen Tumoren	7
3.1.2 Klinische Subkategorien	8
3.1.3 <i>EGFR</i> und <i>TP53</i> in glialen Tumoren.....	8
3.2 Physiologische Funktionen der Methylierung	10
3.2.1 Lokalisation von Methylierung im Genom	11
3.2.2 Die DNA-Methyltransferase und -demethylase.....	14
3.2.3 Die Regulationsmechanismen der Methylierung.....	15
3.2.4 Die Methylierung als Regulationsmechanismus	16
3.2.5 Mutagenetische und epigenetische Funktionsweisen der Methylierung von Cytosin	17
3.2.6 Methylierungsphänomene	18
3.2.6.1 Das parentale Imprinting.....	18
3.2.6.2 Die X-Chromosom-Inaktivierung.....	20
3.2.6.3 Das Zellgedächtnis und seine Verknüpfung mit der Methylierung ...	20
3.2.6.4 Die Rolle der Methylierung im Alterungsprozeß	21
3.3 Die Rolle der Methylierung in der Karzinogenese	22
3.4 Physiologische Aufgaben und Funktionen von <i>MYCC</i>	24
4. Ziel der Arbeit	27
5. Material und Methoden.....	28
5.1 Materialien.....	28
5.1.1 Chemikalien und Geräte	28
5.1.2 Untersuchte Tumoren	28
5.1.3 Zelllinien	30
5.1.4 Polymerase-Kettenreaktionsoligonukleotide (PCR-Primer)	31
5.1.5 Puffer und Lösungen	31
5.2 Methoden	32
5.2.1 Zellkultur	32

5.2.2	Bestrahlung der Zelllinien	32
5.2.3	Isolierung der DNA	33
5.2.4	Restriktionsverdau	33
5.2.5	Methoden der Polymerasekettenreaktion	34
5.2.5.1	Arbitrarily-primed-Polymerasekettenreaktion	34
5.2.5.2	Methylierungssensitive Polymerasekettenreaktion	34
5.2.5.3	Methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion an MYCC Exon 1	35
5.2.6	Gelelektrophorese und Silberfärbung	37
5.2.6.1	Polyacrylamidgelelektrophorese	37
5.2.6.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	37
5.2.6.3	Silberfärbung	37
5.2.7	Auswertung der Ergebnisse	38
6.	Ergebnisse	39
6.1	Ergebnisse im Überblick	39
6.2	Methylierungsabhängige Arbitrary-Primed-Polymerasekettenreaktion	40
6.3	Methylierungsabhängige AP-PCR von Zelllinien nach Bestrahlung	46
6.4	Methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion des Exon 1 von MYCC nach Bestrahlung	50
7.	Diskussion	56
7.1	Zusammenfassende und wertende Darstellung der Ergebnisse	57
7.2	Kritische und wertende Darstellung der Methoden	60
7.3	Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur	63
7.4	Therapeutische Aussichten	67
8.	Zusammenfassung	69
9.	Literaturverzeichnis	71
10.	Lebenslauf	88
11.	Danksagung	89

2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5´mC	5`methyliertes Cytosin
A	Adenin
A	Astrozytom
AA	Anaplastisches Astrozytom
AP (PCR)	Arbitrarily Primed (PCR)
AS	Angelman-Syndrom
B/ HLH/ Z	Basale Helix- Loop- Helix- Zipper
C	Cytosin
CpG	Cytosin-Guanin-Abfolge
CTD	C-terminale Domäne
DNA MT	DNA-Methyltransferase
DNTPs	2`Deoxynukleotide-5`Triphosphat
EGF	Epidermal Growth factor Epidermaler Wachstumsfaktor
Ep	Ependymom
FCS	Fetal Calfserum/ fötale Kälberserum
G	Guanin
GBM	Glioblastoma Multiforme
Gy	Gray
Hpa II	Hämophilus parainfluenza II (Restriktionsenzym)
IGF	Insulin–Like-Growth-Factor Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor
IGFR	Insulin-Like-Growth-Factor-Receptor Insulin ähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor

LN	Zelllinie aus Lousanne
MS-PCR	Methylierungssensitive PCR
Msp I	Moraxella Spezies, Acinetobacter Iwoffi I(Restriktionsenzym)
MYCC	Protoonkogen c-myc
NTD	N- terminale Domäne
OA	Oligodendrogliom
PA	Pilozytisches Astrozytom
PAA	Polyacrylamid
PBS	Puffer (Phosphate buffered saline s. Seite 31)
PCR	Polymerasechainreaction (Polymerasekettenreaktion)
Pten	Phosphatase and Tensin homolog deletion on chromosome ten/ Phosphatase und tensin homologe Deletion auf Chromosome 10
PWA	Prader-Willi-Syndrom
Rb	Retinoblastom-Gen
RFLP	Restrictionsfragmentlengthpolymorphism Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
T	Thymin
TNE	Tris-NaCl-EDTA-Puffer
TP53	Tumorsuppressorgen p53
TSG	Tumorsuppressorgen
U	Uracil
VHL Gen	Von-Hippel-Lindau-Gen
WHO	World's Health Organisation/ Weltgesundheitsorganisation

3. EINLEITUNG

Die glialen Tumoren bilden die größte Gruppe innerhalb der primären Hirntumoren und umfassen rund die Hälfte aller neuroepithelialen Tumoren. Mit einem Anteil von rund 20% aller intrakraniellen Tumoren ist das Glioblastom (Glioblastoma Multiforme, GBM) der häufigste gliale Tumor und gleichzeitig der mit der höchsten Malignität (VandenBerg '92, Debinski et al. '03). Eine operative Intervention verbessert die infauste Prognose, obwohl innovative bildgebende Verfahren und funktionelle Untersuchungsmethoden zeigen, daß trotz radikaler Resektion oft und schnell Rezidive entstehen (Giese et al. '03). Die etablierte adjuvante Therapieform mit eindeutigem Benefit für den Patienten ist die Radiotherapie (Yao et al. '03) da sie eine Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit um im Mittel 7 Monate (2-12 Monaten) erzielt (Holland et al. '00). Der Einsatz von Chemotherapeutika hingegen konnte bisher keine Verlängerung der Überlebenszeit bewirken (Reni et al. '00). Im Mittelpunkt des therapeutischen Interesses stehen zur Zeit Verfahren, die die Pathogenese der Tumoren an spezifischen Punkten beeinflussen können. So sind z.B. molekulare pharmakotherapeutische Ansätze, wie Antisense-Oligonukleotid-Therapie, Immunotherapie und die Gentherapie zu nennen (Tremont-Lukats und Gilbert '03).

Für die Gentherapie ist das epigenetische Phänomen der Methylierung von ausgesprochen großer Bedeutung, da es verantwortlich gemacht wird für die Regulation der Genexpression. So sind Dysregulationen vieler Gene über Methylierungsveränderungen begründbar. Im Gegensatz zu Mutationen und Deletionen lassen sich Methylierungsveränderungen jedoch beeinflussen, z.B. durch demethylierende Agenzien oder Bestrahlung (Costello und Cavenee'00, Laird '03). Durch das häufige Vorkommen abnormer Methylierungszustände in manifesten Tumoren, aber auch in Präkanzerosen und Tumorstufen zeichnet sich eine großes Interesse bezüglich der therapeutischen Beeinflussbarkeit von Methylierungsveränderungen ab (Klump et al. '03, Kondo et al. '03).

Ziel dieser Arbeit ist es einen Überblick über die vorliegenden Methylierungsveränderungen in glialen Tumoren zu gewinnen und eine Beeinflussung des Methylierungsstatus durch Bestrahlung nachzuweisen.

3.1 Klassifikation glialer Tumoren

3.1.1 Pathologie der glialen Tumoren

Die histopathologische Klassifikation der WHO teilt die glialen Tumoren bezüglich der Malignität in vier Grade ein (Kleihus und Cavenee `00). Für die Astrozytome unterscheidet man zusätzlich zwei Kategorien (VandenBerg `92).

Die erste Kategorie umfaßt die gut differenzierten, umschrieben wachsenden Tumoren (WHO Grad I), wie das pilozytische Astrozytom, das pleomorphe Xanthoastrozytom und das subependymale Riesenzellastrozytom.

Die zweite Kategorie beinhaltet die diffus infiltrativ wachsenden Astrozytome, die 75% aller gliösen Tumoren ausmachen. Diese Kategorie setzt sich aus Astrozytomen (WHO II), anaplastischen Astrozytomen (WHO III) und dem Glioblastoma Multiforme (WHO IV) zusammen (Kleihus und Cavenee `00).

Klinisch werden die Astrozytome in niedrigmaligne Astrozytome (Grad II) und hochmaligne Formen (Grad III und IV) eingeteilt. Das pilozytische Astrozytom (WHO I) wird jedoch von einigen Autoren trotz seiner differenten biologischen Ableitung zu den niedrigmalignen Astrozytomen gezählt (Fischer et al. `01, Rickman et al. `01).

Das Glioblastoma Multiforme als Form maximaler Malignität und Endglied der Tumorprogression fällt bereits makroskopisch durch seine Heterogenität auf, welche oft als "buntes Bild" bezeichnet wird. Dieses beruht auf dem Nebeneinander von endothelialen Proliferationen, Zellpolymorphien und Nekrosen.

Es befällt typischerweise Erwachsene zwischen dem 45. und dem 70. Lebensjahr und ist häufig in den Hemisphären lokalisiert. Glioblastome entstehen entweder über eine Tumorprogression bei zuvor manifestem Astrozytom Grad II oder III (*sekundäres GBM*) oder spontan bzw. *de novo* (*primäres GBM*).

Die durchschnittliche Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt für die GBM bis zu einem Jahr nach Diagnose, für anaplastische Grad-III-Astrozytome zwei bis fünf Jahre und für Grad-II-Astrozytome über fünf Jahre (Kleihues und Cavenee `00).

3.1.2 Klinische Subkategorien

60% der GBM treten primär auf, nur 40 % sind sekundär über eine Tumorprogression entstanden (Besson und Yong `03).

Der Häufigkeitsgipfel der *primären* GBM liegt zwischen der fünften und sechsten Lebensdekade, das der *sekundären* GBM zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr (Tremont-Lukats und Gilbert`03). Die Prognose des *de novo* entstandenen GBM ist tendenziell etwas schlechter als beim *sekundären* GBM. Als Subgruppe sind die pädiatrischen Fälle des GBM zu sehen, die sich vor dem zwanzigsten Lebensjahr manifestieren (Sure et al. `97), und eine den adulten Formen vergleichbare Prognose aufweisen (Packer `96).

3.1.3 *EGFR* und *TP53* in glialen Tumoren

In der Pathogenese der Astrozytome ist oft ein Verlust von Tumorsuppressorgenen (TSG) zu finden, der entscheidend für das abnormes Zellwachstum, die ausbleibende Differenzierung oder eine Dysregulation bzw. Dysfunktion der Zelle ist. Häufig betroffene Gene sind *TP53*, *Rb* (Retinoblastomgen), *INK4a* (inhibitor of cyclin-dependent kinase 4) und *Pten* (*phosphatase and tensin homolog deletion on chromosome ten*) (Tremont-Lukats und Gilbert`03).

In ca. einem Drittel der niedrig-malignen Astrozytome (low-grade GBM) sind bereits Ausfälle von *TP53* durch Mutation oder Deletion nachweisbar (Komine et al. `03).

Die Tumorprogression von niedrig-malignen zu anaplastischen Astrozytomen oder GBM ist begleitet von *Rb*- und *Pten*-Mutationen mit Zellaneuploidie und Überexpression von *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*) (Besson und Yong `03).

Die genetischen Veränderungen der *primären* GBM, in 30-40% Überexpressionen von *EGFR* (Schlegel et al. `94) unterscheiden sich von denen der *sekundären*, weisen jedoch final einen identischen Phänotyp auf.

In Abbildung 1, S.6, werden die genetischen Veränderungen der GBM dargestellt.

Abbildung 3.1: Evolution der de novo und sekundären Glioblastome (modifiziert nach Kleihues und Cavenee '97)

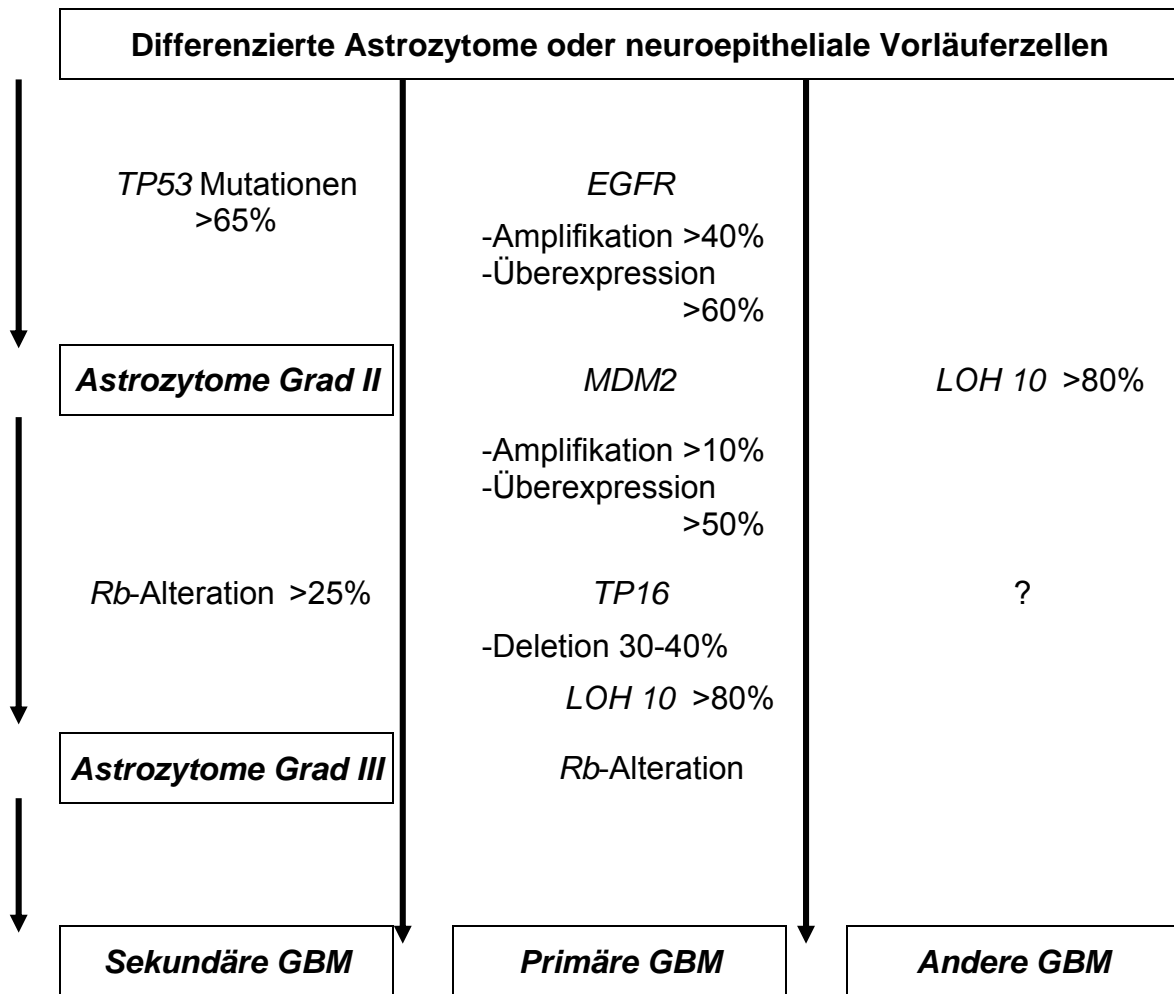


Abbildung 3.1 zeigt charakteristische genetische Merkmale der GBM aufgeteilt in drei Gruppen. Als erstes sind die *sekundären* GBM dargestellt, in denen die typische *TP53*-Mutation, neben *Rb*-Alterationen, nachweisbar ist. Die *primären* GBM mit dem Charakteristikum einer *EGFR*-Amplifikation oder Überexpression und der *LOH 10* mit der nachfolgenden Inaktivierung von *Pten* stellen die zweite Gruppe dar. In der heterogenen dritten Gruppe sind alle anderen GBM zusammengefasst. Hier finden sich häufig (bis zu 80%) ebenfalls eine *LOH* von Chromosom 10, jedoch fehlen die restlichen spezifischen Merkmale der primären oder sekundären GBM (s.o.). Es bleibt eine interessante Fragestellung, ob die letzte Gruppe überwiegend epigenetische Veränderungen wie abnorme Methylierungsmuster aufweist, an Stelle von genetischen oder mutationellen Alterationen. Diese v.a. deshalb, da Costello et al. die Methylierungsveränderungen als Charakteristikum für sekundäre GBM beschrieben hat (Costello et al. '00).

In glialen Tumoren sind, ergänzend zu den genannten, genetische Veränderungen an folgenden Loci bekannt (Besson und Yong '03):

- PDGFR (platelet derived growth factor)
- Mdm2 (mouse double minute-2)
- CDK4/CDK6 (cyclin-dependent kinase 4,6)
- INK4a/p16, INK4b/p15, ARF/p14
- Ras und PKC (Proteinase C)

Von Interesse sind unter anderem die *TP53*-Mutationen, da man eine protektive Funktion von *TP53* bei genotoxischem Stress diskutiert. So soll *TP53* den Zellzyklus zur Initiierung von Reparaturmechanismen unterbrechen, DNA-Schäden beheben, und/oder die Zellen einer Apoptose zuführen (Moreno et al. '01). In vielen malignen Tumoren, so auch in malignen Gliomen (Cadwell und Zambetti '01), unterbleibt jedoch sowohl die Reparatur wie auch die Apoptose, *TP53*-Mutation oder -Deletionen sind aber nur teilweise nachweisbar. Zunehmend wird über eine Hypermethylierung des *TP53*-Promotors und damit Inaktivierung des Gens diskutiert (Moreno et al. '01).

Auch unter Strahleneinwirkung scheint *TP53* für Reparatur und Apoptoseeinleitung eine wichtige Rolle zu spielen, so daß unterschiedliches Ansprechen auf Radiotherapie bzw. Bestrahlungsresistenzen u.a. in Zusammenhang mit dem *TP53*-Status z.B. sekundärer Glioblastome diskutiert wird (Danielson et al. '99).

In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle der Methylierung in Abhängigkeit vom *TP53*-Status humaner Glioblastomzelllinien nach Bestrahlung untersucht werden, da Veränderungen des Methylierungsstatus durch ionisierte Strahlen beschrieben sind (Moreno et al. '01), und dies zum Einen einen möglichen therapeutischen Ansatz darstellt und zum Anderen den Benefit von GBM-Patienten nach Strahlentherapie erklären könnte.

3.2 Physiologische Funktionen der Methylierung

Abnorme oder tumorös veränderte Gene oder Signalwege sind oftmals gut untersucht, während auf die physiologischen Funktionsweisen meist aus den Ergebnissen der pathologischen Veränderungen rückgeschlossen wird.

Für die physiologischen Funktionen der Methylierung gilt ähnliches, wobei einzelne Aspekte, wie das parentale Imprinting (s. S. 16), die Aufgaben der DNA-Methyltransferase bzw. -Demethylase und die X-Chromosom-Inaktivierung besser untersucht sind als andere, wie z.B. die Modifikations- und Regulationsmechanismen, oder der Kompartimentalisierungsfunktion. Einige der genannten Funktionen werden nachfolgend näher erläutert.

Auch die Rolle der Methylierung bzw. der Methylierungsetablierung während der Entwicklung ist bisher nur wenig erforscht, obwohl die verschiedenen embryonalen Entwicklungsschritte durch stark wechselnde *de novo*-Methylierungs- und Demethylierungsvorgänge gekennzeichnet sind (Moreno et al. '01).

Eine zentrale Funktion der Methylierung steht jedoch im Mittelpunkt des Interesses, denn sie wurde als eine häufige Veränderung in Karzinomen detektiert. So wird die Methylierung als eine der Regulatoren der Genexpression angesehen. Lokalisiert in den Promotoren der Genen besteht eine Korrelation von

Hypermethylierung des Promotors mit verminderter Genexpression und **Hypomethylierung** mit gesteigerter Expression.

Man fand Veränderungen des Methylierungszustandes lokalen begrenzt bis global vorkommend, von zu differenter Ausprägung bis zum kompletten Ausfall. Interessant ist, das nebeneinander physiologische und pathologische Methylierungsveränderungen vorkommen und es sich dabei grundsätzlich um einen dynamischen Vorgang handelt. So handelt es sich bei den pathologischen Veränderungen um Faktoren der Karzinogenese die beeinflussbar, möglicherweise reversibel sind.

So bieten sich diagnostische Aspekte über die mögliche Assoziation von Malignitätsgrad und Methylierungszustand und therapeutische Ansätze über mögliche Intervention von *in vitro* und *in vivo* an (Laird '03).

3.2.1 Lokalisation von Methylierung im Genom

Bei Eukaryonten tritt eine Methylierung ausschließlich als mCytosin in 5'-Position zu Guanin (CpG) auf, im Gegensatz zu Prokaryonten, die auch Adenin methylieren können (Baylin '91).

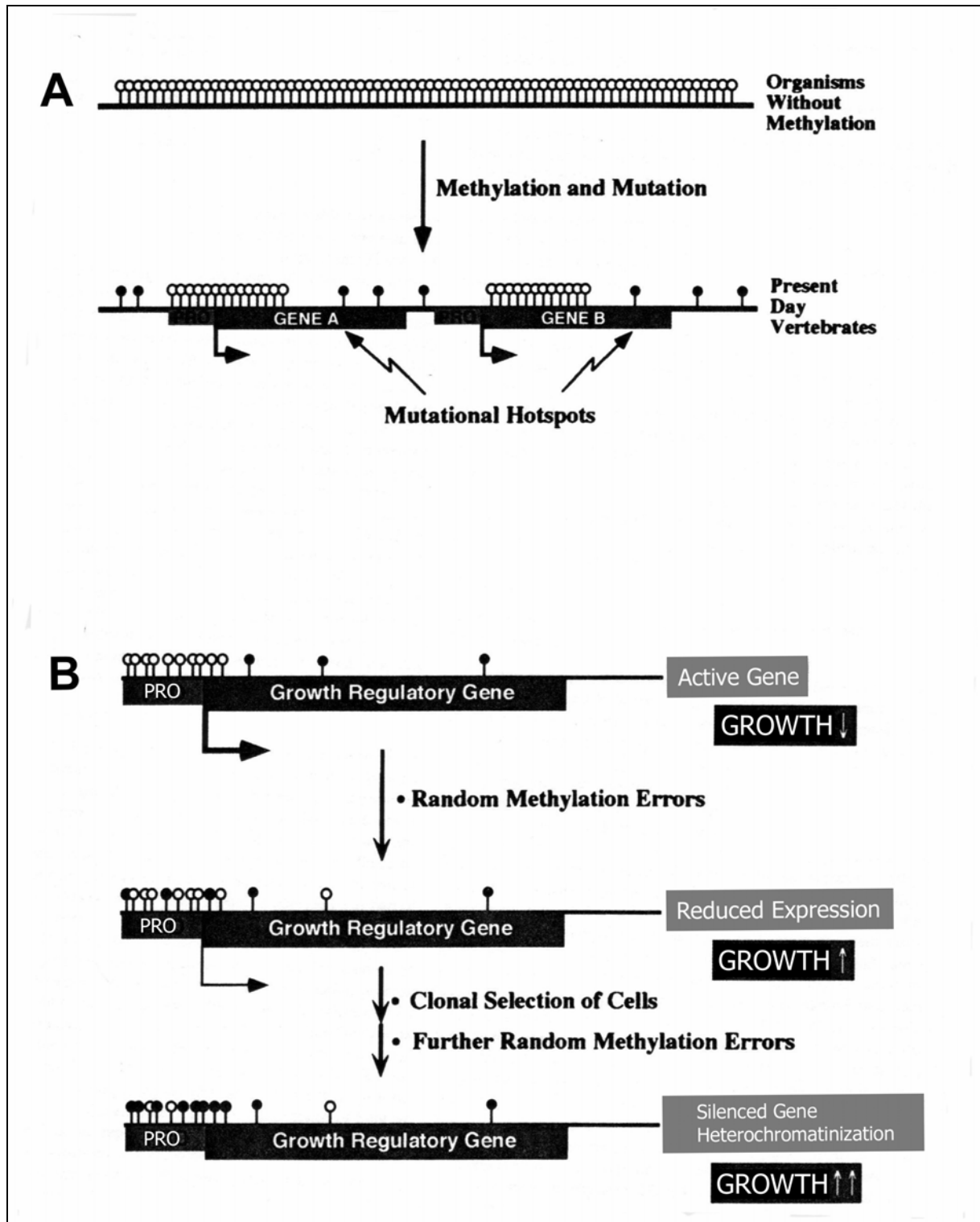
Die Methylierung der Säugetier-DNA an CpG-Dinukleotiden kommt zu 98% gleichmäßig über das Genom verteilt vor, durchschnittlich alle 50-100 Basenpaare (Bp) (Cross et al. '94), in 2% jedoch finden sich kleine Inseln von CpG-Dinukleotiden (*CpG-islands*). Diese Inseln sind im Durchschnitt 1 Kb lange Palindrome (0,5-2,0 Kb, Herman et al. '96) mit sehr hohem Gehalt an 5'CpG'3 (Bird'86, Counts and Goodman'95).

Die CpG-Inseln sind oft assoziiert mit dem 5`Ende von Genen bzw. der dort lokalisierten Promotorregion und man nimmt eine Funktion als Expressionsregulator an, indem eine **Hypermethylierung** des Promotors eine Inaktivierung und eine **Hypomethylierung** und eine Aktivierung des nachfolgenden Genes bewirkt (Bird et al.`87, Myöhänen et al. `98, Smiraglia et al. `01, Saito et al.`03).

Ungefähr 60% aller Gene im menschlichen Genom enthalten CpG-Inseln in ihren Promotoren, alle bisher bekannten „Housekeeping-Gene“, d.h. gleichmäßig exprimierende Strukturgene, wie z.B. β - Aktin oder GAPDH und 40% der Gewebespezifischen-Gene eingeschlossen (Gardiner-Garden und Frommer`87).

Die nachfolgenden Abbildung 3.2 zeigt die Evolution der CpG-Inseln und das Auftreten einer erhöhten Mutabilität durch die Methylierung der CpG-Inseln.

Abbildung 3.2: Evolution der CpG Islands (nach Jones et al. '96)



● = methyliertes CpG ○ = nicht methyliertes CpG PRO = Promotor des Gens

Abbildung 3.2 zeigt in **A** die evolutionär unveränderten CpGs ohne Methylierung des Cytosins. Darunter ist die erhöhte Mutabilität von CpGs (*mutational hot spots*) dargestellt. **B** stellt die Folgen der zufälligen Methylierungsveränderungen z.B. an wachstumsregulierenden Genen dar. So ist möglicherweise das charakteristisch unkontrollierte Wachstum von Tumorzellen über eine Hypomethylierung mit abnorm gesteigerter Expression begründbar.

3.2.2 Die DNA-Methyltransferase und -demethylase

Die DNA-Methyltransferase (DNA-MT) spielt eine Schlüsselrolle in der Methylierung des Säugetiergenoms.

Die enzymatische Reaktion kann jedoch nur stattfinden, wenn die zu methylierende Base Cytosin in der Doppelhelix nicht fest gebunden vorliegt (Jeltsch `02). So nimmt man eine dynamische Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Basen an, die von der DNA-Methyltransferase überwunden werden kann, um Cytosin aus der Doppelhelix „auszuklappen“ und zu methylieren (Jeltsch `02).

Die Methylierung ist ein rein postreplikativer Prozeß, bei dem drei unterschiedliche Muster von DNA-Methylierungsveränderungen vorliegen, **1.** eine *de novo* Methylierung, **2.** eine Erhaltung bereits vorhandener Methylierung und **3.** eine Demethylierung (Hsieh et al. `00). Diese drei Muster werden jeweils von 3 Isoformen der DNA-Methyltransferase erstellt.

Die *de novo* DNA-MT verlangt ein unmethyliertes Substrat und methyliert Cytosin auf nur einem der Stränge, obwohl auf dem komplementären Strang keine Methylierung vorliegt. Im Gegensatz dazu benötigt die sogenannte *erhaltende* DNA-MT ein hemimethyliertes Substrat und ist nur in der Lage eine Methylierung vorzunehmen, wenn auf dem komplementären Strang ein 5-Methylcytosin vorhanden ist (Bestor`94). Die Demethylase setzt unter Einsatz eines Moleküls Wasser Methanol frei und hinterläßt eine unmethyliertes CpG (Bhattacharyya et al. `99).

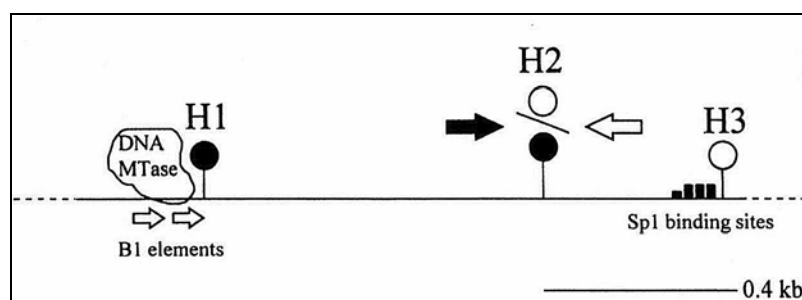
Ob es neben diesen drei DNA-MT Typen noch weitere gibt, ist zum derzeitigen Stand der Forschung noch offen.

Das Vorliegen einer global wirksamen Demethylase eröffnet die Möglichkeit, ein voll etabliertes Methylierungsmuster an eine veränderte Situation bzw. Anforderung der Zelle zu adaptieren. So ist eine physiologische Adaption denkbar, gleichzeitig bieten sich auch therapeutische Einsätze der Demethylase *in vivo* an, denn z. B. der *in vitro* wirksame Methylierungsantagonist 5`aza`2cytidin ist auf Grund vieler Anwendungsbeschränkungen, wie z.B. seiner eingeschränkten Löslichkeit in Wasser, *in vivo* nicht einsetzbar (Momparler und Bovenzi `00, Veliescu et al.`02). Konkrete Versuche mit der enzymatischen Demethylierung stehen jedoch noch aus.

3.2.3 Die Regulationsmechanismen der Methylierung

Bereits früh entdeckte man, daß sich die Methylierungsmuster von Genen in unterschiedlichen Entwicklungsphasen, von autosomalen und gonosomalen Zellen und selbst bei homologen Allelen unterscheiden (Silva und White '88, Moreno et al. '01). Man fand aber auch übereinstimmende Methylierungsmuster in gleichen Gewebearten unterschiedlicher Individuen (Eng et al. '00). Obwohl die eigentlichen Initiatoren der Methylierung unklar bleiben, entdeckte man Start- und Stoppsignale und entwickelte ein Ausbreitungsmodell. Als Startsignal werden CpG-reiche und stark methylierte Cis-ständige Sequenzen mit 500-700 Bp Länge, die gehäuft Retrotransposonsequenzen (B1, B2) oder repetitive Elemente (Alu) enthalten, verantwortlich gemacht (Turker et al. '97, Liu et al. '93). Bezeichnet wurden diese Elemente als Methylierungszentrum (*methylation centre*) (Mummaneni et al. '93, '95). Ausgehend vom Methylierungszentrum methyliert die DNA-MT die nachfolgenden Abschnitte, bis sie ein Stoppsignal erhält. Als Stoppsignal konnten Sp1-Bindungsstellen unterhalb (*downstream*) des Methylierungszentrums ausgemacht werden (Mummaneni et al. '95). Dieses Ausbreitungsmodell beschreibt einen kontinuierlich fortschreitenden Prozeß über viele Zellzyklen hinweg (*spreading model*) (Curradi et al. '02). Abbildung 3 zeigt das Zusammenspiel vom Methylierungszentrum und Stoppsignal.

Abbildung 3.3: Methylierungsmuster der aprt-Genregion (nach Turker et al. '97)



- = methyliertes CpG ⇒ = Erhalt einer unmethylierten Stelle
- = unmethyliertes CpG → = spreitende Methylierung

Der Promotor ist CpG-reich und besitzt vier *Sp1*-Bindungsstellen. Durch einem Verlust von zwei *Sp1*-Bindungsstellen kommt es zu einem Ausbleiben des Stoppsignals und einer nachfolgenden Hypermethylierung des Promotors und Inaktivierung des Gens (Brandeis et al. '94).

3.2.4 Die Methylierung als Regulationsmechanismus

Verschiedene Studien belegen die inverse Korrelation zwischen der Methylierung der Promotorregion eines Gens und dessen transkriptioneller Aktivität (Klump et al. '03).

Wie jedoch die Methylierung funktionell die Expression reguliert, ist unklar. Möglicherweise sind neben unbekanntem Wirkungsmechanismen als Regulatoren auch sterische Behinderungen von Transkriptionsfaktoren durch die Methylierung zu berücksichtigen. So wird die Möglichkeit einer direkten Inhibition von Transkriptionsfaktoren durch eine Methylierung ihrer Bindungsstellen diskutiert. Oder aber Transkriptionsfaktoren werden indirekt von anderen methylierungsspezifisch gebundenen Proteinen blockiert (Bakker und Nelson '02).

Als indirekte Inhibitoren der Transkription werden methylierungsspezifische Proteine wie *MeCp-1* und *2* (Methyl-CpG-bindendes Protein) genannt (Yung et al. '01). Verschiedene Autoren beschreiben *MeCp-1* und *MeCp-2* auch als Mediatoren für bestimmte Effekte der Methylierung, wie Transkriptionsregulation oder Veränderungen der Chromatinstruktur (Boys und Bird '92, Yung et al. '01).

Die Möglichkeit der direkten Inhibition der Transkriptionsfaktoren wird dadurch untermauert, daß bestimmte Transkriptionsfaktoren nicht an eine methylierte Sequenz binden können (z.B. *Ap-2*, Comb und Goodman '90), also nur unmethylierte Bindungsstellen erkennen. Andere wiederum sind nicht methylierungssensitiv, das heißt, sie sind in ihrem Bindungsverhalten unabhängig von einer Methylierung der Bindungsstelle (*Sp-1*, Brandeis et al. '94). Eine dritte Gruppe der Transkriptionsfaktoren besitzt keine CpGs in ihrer Bindungssequenz, und sind damit unbeeinflusst von einer möglichen Methylierung.

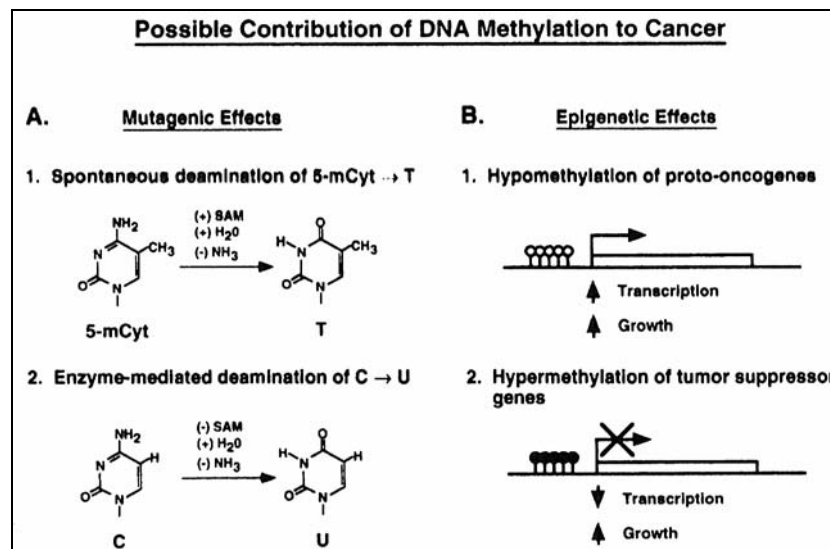
Neben der direkten und der indirekten Inhibition der Genexpression, werden eine veränderte Chromatinstruktur und die Histonazetylierung, bei der die Methylierung nur eine Mediatorfunktion inne hat, kontrovers diskutiert (Rountree et al. '01, Kondo et al. '03).

3.2.5 Mutagenetische und epigenetische Funktionsweisen der Methylierung von Cytosin

Die Alteration des Methylierungsstatus der DNA ist eine der häufigsten Veränderungen in menschlichen Tumoren (Feinberg und Vogelstein `83, Gama-Sosa et al. `83). Da das Interesse an epigenetischen Veränderungen von Karzinomen in den letzten Jahren zunimmt (Laird `03), und die Methylierung die Karzinogenese sowohl über eine epigenetische Veränderung der Expressionsregulation als auch durch eine erhöhte Mutabilität der CpGs beeinflusst, kommt der DNA-Methylierung besondere Bedeutung zu.

Die untenstehende Abbildung verdeutlicht beide Komponenten:

Abbildung 3.4: Die Rolle der DNA Methylierung in der Tumorgnese (aus Gonzalzo et al. `97)



2A zeigt die mutagenetischen Effekte der Methylierung durch spontane oder enzymatische Deaminierung, denn insbesondere methylierte CpG-Dinukleotide gelten als mutationelle Brennpunkte (*hot spots*). Ein gehäuftes Auftreten von Transitionsmutationen an diesen Stellen ist belegt (s. Abb. **2A**). Diese werden entweder spontan von methyliertem Cytosin zu Thymin (mC → T) deaminiert oder von mCytosin mittels Methyltransferase zu Uracil (mC → U). Durch die erhöhte Mutabilität dieser CpG-Inseln hat sich der Gesamtgehalt der CpG-Dinukleotide im Genom im Laufe der Evolution auf ein Fünftel der ursprünglich vorhandenen Menge verringert (Yang et al. `96).

In **2B** ist die epigenetische Beeinflussung der Expression dargestellt. Eine Hypermethylierung des Promotors bewirkt eine Inaktivierung des zugehörigen Gens, die Hypomethylierung hingegen führt zu einer Genaktivierung (Watson und Goodman `02).

Dies wird oft als ursächlich für die abnorme Aktivierung von Protoonkogenen wie z.B. *MYCC*, oder auch für die irreguläre Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie z.B. *TP53*, *TP16*, *TP14* gesehen (Esteller et al. `00, Baylin et al. `00, `01, Kondo et al. `03).

Neben diesen zwei bekannten Komponenten der Tumorentstehung, in Form von epigenetischen und mutagenetischen Veränderungen, reguliert die Methylierung eine Vielzahl anderer zellulärer Abläufe, deren Dysregulation möglicherweise differente Schritte in der Karzinogenese darstellen könnten.

3.2.6 Methylierungsphänomene

3.2.6.1 Das parentale Imprinting

Für eine normale Embryonalentwicklung von Säugetieren ist es nötig, daß sowohl väterliches wie mütterliches Erbmaterial gleichermaßen vorhanden ist. Formen, die durch frühe Fehlverteilungen ausschließlich mütterliche oder väterliche Chromosomen aufweisen, sind z.B. als Blasenmole (46 väterliche Chromosomen) zu keinem Zeitpunkt lebensfähig.

Die Mendelsche Vererbungslehre basiert auf dem Grundprinzip, daß väterliche und mütterlich ererbte Informationen gleichwertig sind. Das Imprinting und die X-Chromosom–Inaktivierung belegen jedoch, daß nicht zwangsläufig beide elterliche Allele exprimiert werden und auch nicht willkürlich ist, welches Allel abgelesen wird (Tyko '97, Scelfo et al. '02). Abweichungen der festgelegten Verteilung können zu Entwicklungsstörungen und/oder zu Tumoren führen. Gene, für die ein solches Verteilungsmuster von Bedeutung ist, nennt man *imprinted* Gene, den Mechanismus selbst *Imprinting*.

Ausschließlich Säugetiere weisen ein Imprinting auf, und mittlerweile sind ca. 20 Gene bekannt, die diesem Mechanismus unterliegen, darunter *H19* (Kanduri et al. '02), *IGF 2* (Insulin-Like-Growth-Factor 2) (Hofmann et al. '02) und *IGF 2R* (Insulin-Like-Growth-Factor-2-Rezeptor) (Lucifero et al. '02). Verschiedene Autoren nehmen an, daß es sich beim Imprinting um ein epigenetisches Phänomen handelt, und dieses zu den physiologischen Funktionen der Methylierung gehört (Lee '03).

Ein bedeutende Rolle in der Erhaltung von parentalem Imprinting kommt der DNA-Methyltransferase zu, denn ein normales Level des Enzyms ist erforderlich, um unterschiedliche Expression von väterlichen und mütterlichen Allelen von Genen zu kontrollieren (Li et al. '93).

Das transkriptionell inaktivierte Allel gilt gewöhnlich als *imprinted*, jedoch kann auch das aktive Allel in einigen Fällen ein Imprinting-Signal tragen. Beispiel für ein fehlerhaftes Imprinting sind z. B. das Prader-Willi-Syndrom und das Angelman-Syndrom (PWS und AS), hauptsächlich gekennzeichnet durch die mentale Retardierung der Betroffenen. Die Ursache liegt, soweit bisher bekannt, entweder in einer Deletion der DNA des Chromosoms 15q11-13, die beim PWS immer auf dem väterlichen Chromosom, beim AS jedoch auf dem mütterlichen Homologen (Tyko '97), oder aber in einer uniparentalen Disomie des mütterlichen Chromosoms 15q11-12 (Dietz et al. '03).

Auch das Beckwith-Wiedemann-Syndrom, das durch gehäuftes Auftreten von kindlichen Tumoren, wie z.B. Wilms-Tumoren, Hepatoblastomen oder Rhabdomyosarkomen gekennzeichnet ist, weist eine uniparentale Disomie der väterlichen Region 11p15.5 bei einigen Patienten auf, bei anderen konnte eine Deletion des mütterlichen Chromosoms nachgewiesen werden (Tyko '97).

Daneben scheinen auch Erkrankungen mit bekannten Vererbungsmechanismen, wie z.B. die Chorea Huntington und das fragile X-Syndrom, die durch eine variable Penetranz gekennzeichnet sind, dem Imprinting unterworfen zu sein, da es auch bei diesen Erkrankungen ausschlaggebend ist, welcher Elternteil Träger der Krankheit ist. Es handelt sich zwar nicht um ein Imprinting im herkömmlichen Sinne, da eine unterschiedliche Expression des Allels nicht bekannt ist, jedoch ist die Expansion der tripplerepeats eindeutig korreliert mit dem Elternteil, der es vererbt, so daß auch hier eine Verbindung zum Imprinting anzunehmen ist.

Weiterhin wird dem Imprinting eine Rolle in der Vererblichkeit und Penetranz von allergischen Phänotypen zugeschrieben (Seifart und von Wichert '01).

3.2.6.2 Die X-Chromosom-Inaktivierung

1967 machte Susumo Ohno die sensationelle Entdeckung, daß ein X-Chromosom der Frau inaktiviert vorliegt.

During the course of evolution, an ancestor to placental mammals must have escaped a peril resulting from hemizygous existence of all the X-linked genes. Once this step was accomplished, the female no longer needed two Xs in her somatic cells. Hence, the dosage compensation mechanism by random inactivation of one or the other X evolved. (Ohno '67).

In weiblichen Zellen findet mit dem Zeitpunkt der uterinen Implantation eine Inaktivierung der meisten Gene auf einem der beiden X-Chromosomen statt, wobei das inaktivierte Chromosom als zytologisch identifizierbares heterochromatin-ähnliches Körperchen (Barr-Körperchen) zur Darstellung kommt (Lyon '88).

Die Inaktivierung erfolgt unabhängig von der elterlichen Abstammung.

Wurde bis vor kurzem von einer fast vollständigen Inaktivierung der Gene des zweiten X-Chromosoms der Frau ausgegangen, so sind bis heute über 20 Gene bekannt, die entweder partiell oder komplett aktiviert auf dem inaktiven Allel vorliegen (Lyon '02).

Da methylierungssensitive Restriktionsanalysen auf dem X-Chromosom Hypomethylierung in aktiven Genen und Methylierung in inaktiven Genen gefunden haben, geht man davon aus, daß die Inaktivierung des X-Chromosoms, bzw. der Gene über eine Methylierung der Promotoren erfolgt (Anderson und Brown '02).

Als Beleg dafür, daß es sich um einen methylierungsmedierten Prozeß handelt, sah man an, daß eine Aktivierung der Gene nach Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-aza-2-cytidin erfolgte (Riggs und Pfeiffer '97). Auch die Ausbreitung der Inaktivierung erinnert an das *spreading model* der Methylierung, ebenso ähnelt das X-Inaktivierungszentrum (*X-inactivation center*) dem *methylation centre* (Carrel and Willard '98, Clerc und Avner '03).

3.2.6.3 Das Zellgedächtnis und seine Verknüpfung mit der Methylierung

Das zelluläre Gedächtnis spielt eine wichtige Rolle für viele Phänomene, in denen bestimmte Aktivierungszustände nach der Replikation bzw. während dieser beibehalten oder wiederhergestellt werden müssen, wie z.B. beim Imprinting.

Studien lassen erkennen, daß die DNA-Methylierung eine Möglichkeit des Erhaltes von Informationen über die Replikation hinweg darstellen könnte.

Der Zeitpunkt der DNA-Replikation ist ebenfalls ein Aspekt des Zellgedächtnisses, da für viele Gene eine frühe Replikation mit einer genetischen Aktivität, eine späte Replikation dagegen mit Inaktivität gekoppelt ist.

Die Trennung der beiden Chromatinzustände ist methylierungsmediert (Riggs und Pfeiffer '97, Rountree et al. '01), im Zusammenspiel mit Methyl-bindenden Proteinen (methyl-binding domain containing proteins, MBD) und der Histonazetylierung (Billard et al. '02).

Als ein Beleg für die methylierungsabhängige Kompartimentierung wurden Versuche mit 5'-aza-2-cytidin durchgeführt, die eine Aktivierung der betreffenden Gene in Verbindung mit einer Vorverlegung der Replikation von der späten auf die frühe S-Phase zeigen (Rountree et al. '01).

3.2.6.4 Die Rolle der Methylierung im Alterungsprozeß

Inmitten der Vielzahl an Alterstheorien haben Forschergruppen auch eine mögliche Beteiligung der Methylierung am Altersprozeß untersucht (Ono et al. '93). So verändert sich der Methylierungsstatus bestimmter Gewebearten, wie z.B. der Gonaden, parallel zum Funktionsverlust im Alter (Oakes et al.'03). Andererseits gleichen sich auch physiologische Methylierungsveränderungen im Alter und in bestimmten Tumoren, z.B. dem Kolonkarzinom (Oakes et al. '03). Diese parallelen Veränderung der Methylierung treffen wiederum nur für bestimmte Gene wie z.B. MYCC und FOSC zu (Yung et al. '01).

Fraglich bleibt daher, ob der Karzinogeneseprozeß in einigen Fällen eine Beschleunigung des Alterungsprozesses darstellt (Ahuja und Issa '00).

Ob sich die Analogien zwischen der Zellaalterung und den Methylierungsveränderungen auf die bloße Gemeinsamkeit einer Selektion von zufällig *de novo* methylierten Zellen beschränken, oder ob es sich um einen der Karzinogenese zwar ähnlichen, aber physiologischen Alterungsprozeß handelt oder ob die Veränderung des Methylierungsmusters einen kontinuierlichen, für die Karzinogenese ätiologischen Prozeß darstellt, bleibt von Interesse.

3.3 Die Rolle der Methylierung in der Karzinogenese

Aus genetischer Sicht stellen Neoplasien eine Unterbrechung und/oder Dysfunktion der physiologisch regulierten Entwicklung und Vermehrung von Zellen dar.

Der Verlust von Tumorsuppressorgenen (TSG) und die Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen werden als zwei Grundpfeiler der Karzinogenese diskutiert (Brown und Strathdee `02). Mutation, Amplifikation, Deregulation oder epigenetische Veränderungen setzen die physiologischen Kontrollmechanismen außer Kraft.

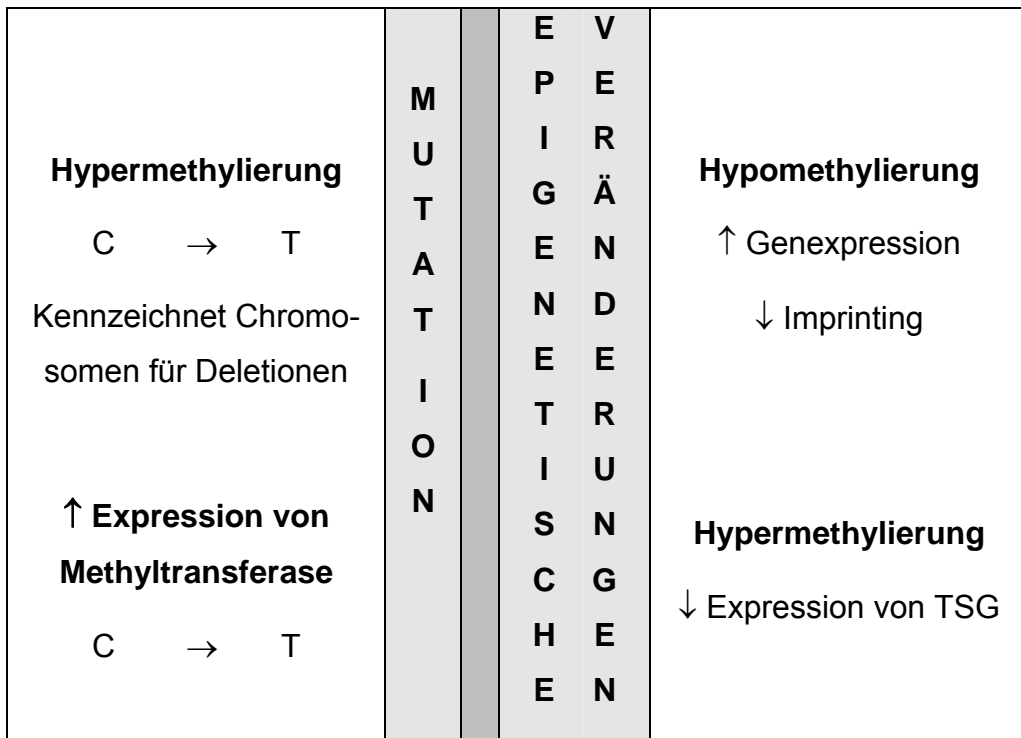
Abnormitäten der DNA-Methylierung sind ebenfalls charakteristische Erscheinungen in menschlichen Karzinomen. So kommen Hypomethylierungen mit nachfolgender Aktivierung von Genen neben Hypermethylierung mit Inaktivierung von Genen vor (Kang et al. `03). In einer Vielzahl von Studien wurden Methylierungsveränderungen in Tumoren für eine Reihe von TSG, Onkogenen und Genen mit Zellregulationsfunktionen wie z.B. Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose, DNA-Reparatur und Zell-Zell- sowie Zell-Substrat-Interaktionen gefunden, mit der Konsequenz des Verlustes der jeweiligen tumorprotektiven Funktion (Esteller et al. `00, Shannon et al. `01, Rountree et al. `01, Saito et al. `03). Auffällig zeigt sich v.a. ein Nebeneinander von genetischen Veränderungen, wie z.B. Mutationen und epigenetischen Veränderungen, wie Methylierungsabnormitäten.

Veränderungen der physiologischen DNA-Methylierung sind eindeutig mit dem vielschrittigen Prozeß der Karzinogenese verknüpft (Laird et al. `95, `03). Eine Korrelation zwischen den Methylierungsveränderungen von Tumoren und deren Malignitätsgrad konnte für einige Tumorarten, wie z.B. für das Kolonkarzinom, hergestellt werden (Shen et al. `03). So sehen einige Autoren die Methylierungsveränderung als Grenzmarkierung für den Übertritt von benignen in malignen Veränderungen oder auch von präkanzerogenen zu eindeutig atypischen Zellen an (Baylin et al. `01, Esteller et al. `01, Laird `03, Saito et al. `03).

Andere sehen TSG-spezifische Methylierungsprofile innerhalb der Karzinogenese bestimmter Tumorarten (Kang et al. `03).

Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht Methylierungsveränderungen bedingt durch genetische oder epigenetische Veränderungen wie Hypo- oder Hypermethylierungen mit der Folge von Expressionsveränderungen.

**Abbildung 3.5: Methylierungsveränderungen und ihre Folgen
(modifiziert nach Counts and Goodman `95)**



In Abbildung 3.5 werden rechts epigenetische Veränderungen der Methylierung mit Hypermethylierung und Hypomethylierung sowie deren Folgen beschrieben, links alternativ dazu z.B. durch Mutation bedingt Methylierungsveränderungen beziehungsweise Veränderungen der Methyltransferase oder deren Substrat mit folgendem Altertion der Methylierung.

Rechts im Bild sind die vielfach in Tumoren belegten Hypermethylierungen von Promotoren mit Geninaktivierung dargestellt, neben Hypomethylierungen, die ein vermindertes Imprinting und eine Genaktivierung zur Folge haben.

Neben der Ansicht, daß die Methylierung epigenetisch reguliert ist, gibt es vielerlei Ansätze, die andere genetische Erklärungen für eine veränderte Methylierung geben.

Links werden zwei nicht-epigenetische Erklärungsmodelle für eine veränderte Methylierung gezeigt. Zum einen wird die intrinsische Hypermutabilität von methyliertem Cytosin aufgeführt, die evolutionär bereits eine Transition von Cytosin zu Thymin zur Folge hatte. Darunter wird die Möglichkeit genannt, daß im Falle einer niedrigen Konzentrationen von SAM (S-Adenosylmethionin) eine Aktivierung der Methyltransferase stattfindet, um durch eine Deamination von Cytosin zu Thymin die verfügbare Menge an Methylendonatoren zu steigern (Laird et al. `95, Butler et al. `00).

Neben den in Abbildung 5 genannten Erklärungen wird ebenfalls eine ausbleibende oder verminderte Reparatur nach DNA-Schäden durch die Methylierung diskutiert, eine direkte Regulation des Mismatch-Repair-Systems durch die Methylierung konnte jedoch nicht bestätigt werden (Drummond et al. `01). Einzelne Faktoren des Mismatch-Repair-Systems, wie z.B. MLH1, unterliegen jedoch nachgewiesenermaßen einer Regulation durch Methylierung (Kondo et al. `03).

Möglicherweise ist auch eine veränderte Regulation der Demethylase für eine abnorme Hypomethylierung als ursächlich zu sehen (Ramchandani et al. `99,

Bhattachary et al. '99). Daneben wird eine direkte Methylierung durch über Nahrungsmittel zugeführte Stoffe wie Fumonisin B1, ein Mykotoxin, diskutiert, da Fumonisin B1 u.a. für die hohe Rate an Ösophaguskarzinomen in China und Südafrika verantwortlich gemacht wird (Mobio et al. '00).

Ob eine kausale Korrelation von Methylierungsveränderungen und dem Malignitätsgrad von Tumoren besteht oder ob es sich um eine Akkumulation von zufälligen Methylierungsfehlern innerhalb einer *multistep* Karzinogenese handeln könnte, steht zur Diskussion (Kang et al. '03, Shen et al. '03).

3.4 Physiologische Aufgaben und Funktionen von *MYCC*

Das Protoonkogen *MYCC* ist bekannt dafür, ein entscheidender Regulator von Wachstum, programmiertem Zelltod, Zellteilung, Proliferation und Differenzierung in normalen und neoplastischen Zellen zu sein (Evan and Littlewood '93, O'Hagan et al. '00). Unter anderem wird *MYCC* auch als Transkriptionsfaktor angesehen (Prendergast '97, Wood et al '00).

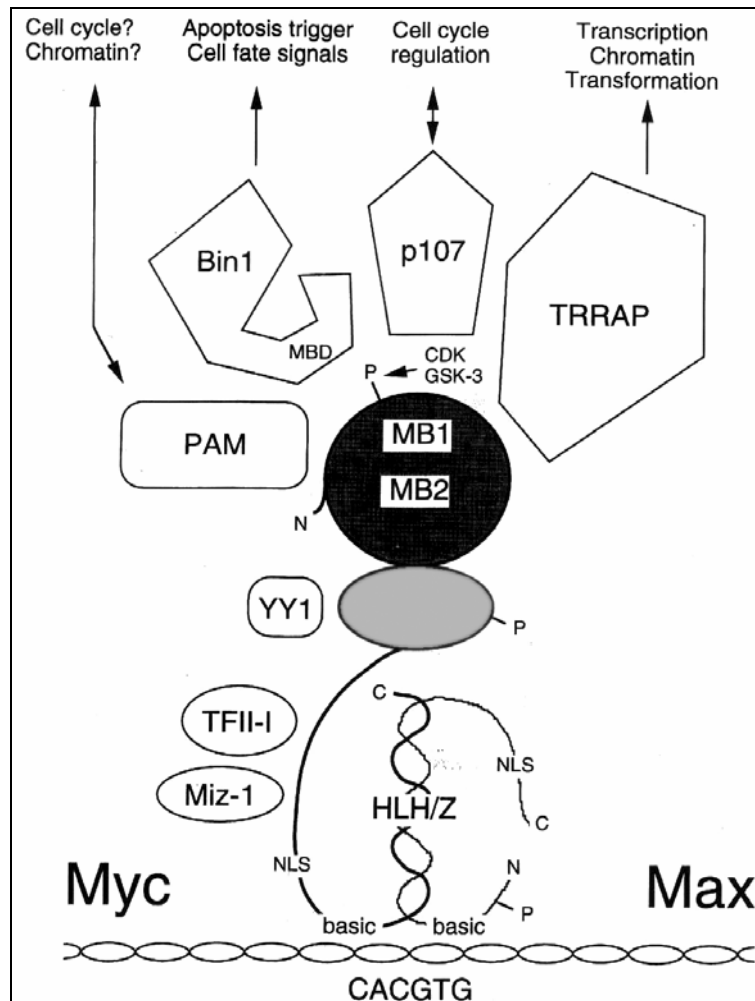
Die Expression des *MYCC*-Proteins ist in fast einem Drittel aller humanen Neoplasien dereguliert (Cole et al. '99). Eine Überexpression von *MYCC* kommt insbesondere in fortgeschrittenen Karzinomen vor, wobei die Überexpression mit Proliferation und fehlender Differenzierung der Zellen und damit einer ungünstigen Prognose einhergeht.

Nachdem bewiesen werden konnte, daß eine Deregulation von *MYCC* bereits für eine onkogenetische Aktivierung ausreichend sein kann, nimmt man an, daß eine Beteiligung des *MYCC*-Gens in Karzinomen eher häufiger auftritt als bisher angenommen (Prendergast '99).

MYCC ist Mitglied einer Familie von *MYC*-Proteinen (*MYCC*, *MYCN*, *MYCL*, *MYCS*, *MYCB*) und besteht aus einer Einheit mit dreifacher Funktionalität, bei der die Domänen für Proliferation, Apoptose und transkriptionelle Aktivität an beiden terminalen Enden lokalisiert sind (s. Abbildung 6). Die C-terminale Domäne (CTD) enthält eine basale Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Domäne (b/HLH/Z), die eine spezifische DNA-Erkennungssequenz des CACGTG-E-Box-Motivs in allen Zielgenen an der basalen Domäne erkennt (Prendergast und Ziff '91, O'Hagan et al. '00). Die N-terminale Domäne umfaßt die Region der transkriptionellen Aktivitäten von *MYC* und daneben höchstwahrscheinlich noch weitere Funktionen. Die physiologische

DNA-Bindung und die biologische Aktivität hängen von der Hetero-Oligodimerisation mit *MAX*, einem kleinen Protein, ab, das die b/HLH/Z-Domäne umfaßt (Wood et al. '00). Interessanterweise wird der Zugang zu der CACGTG-Bindungsstelle in den Zielgenen höchstwahrscheinlich über eine CpG-Methylierung reguliert (Prendergast '99). Dabei kommt der Methylierung indirekt eine höchst interessante Schalterstellung in der Mediierung vieler Signalwege zu.

Abbildung 3.6: MYC-Struktur und bindende Proteine (aus Prendergast '99)



- MAX* physiologischer Partner von *MYCC*, bindet an die CTD und mediiert die DNA Bindung
- MB1* Ziel der Phosphorylierung
- Miz-1, TFII-I* mit CTD assoziierte Proteine
- Bin1, TRAP* NTD assoziierte Proteine
- P107* Ko-kordiniert die *MYCC*-Aktivität innerhalb des Zellzyklus

Wie in Abbildung 3.6 skizziert, besitzt *MYCC* eine Schalterfunktion für die Regulation von Zellwachstum mit normaler Wachstumsdauer (Mateyak et al. '97), Zellteilung und Zelltod (Gallant et al. '96). *MYCC*-Zielgene regulieren Prozesse, wie unter anderem die rRNA-Transkription und das Processing, die ribosomale Proteintranskription und -translation sowie die Translationsinitiierung (Schmidt '99). Zudem konnte belegt werden, daß eine Inhibition von *MYCC* mitogenetische Signale und Proliferation blockiert und die Differenzierung von Zellen erleichtern kann (Cole and McMahon '99). Daneben führt die Reduktion der *MYCC*-Expression z.B. zu einer Verlängerung der G1- und G2-Phase des Zellzyklus, während die S-Phase unbeeinflusst bleibt (Mateyak et al. '97).

Einige Autoren gehen davon aus, daß *MYCC*, sowohl in Abhängigkeit von *TP53* als auch durch *TP53*-unabhängige Mechanismen Apoptose induzieren kann (Amanullah et al `00).

Dabei scheinen *TP53* und *MYCC* wechselseitig Zellen zu sensibilisieren bzw. anderen proapoptotischen Triggern zuzuspielen (Evan und Littlewood `92).

Eingriffsmöglichkeiten in die Apoptose könnten möglicherweise neue effiziente Therapieoptionen in der Behandlung der Karzinome eröffnen (Prendergast `99). Da kanzerogene Zellen häufig die Kontrolle über ihre Interaktionsfähigkeit mit der Umwelt und ihr Zellwachstum verlieren, macht sie das angreifbar für Manipulationen und therapeutische Optionen.

Die epigenetische Regulation von *MYCC* bleibt ein wichtiges Objekt für weitere Studien zur Zellzykluskontrolle und zum Zellwachstum.

4. ZIEL DER ARBEIT

Bei den Überlegungen der Karzinogenese hat man in den letzten Jahren neben rein mutagenetischen Aspekten auch epigenetische Erklärungsmodelle in die Untersuchungen mit einbezogen. Als eines dieser epigenetischen Phänomene ist die DNA-Methylierung sehr intensiv analysiert worden, wobei jedoch die Ergebnisse kontrovers diskutiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Veränderungen der Methylierung an humanen glialen Tumoren *in vitro* zu untersuchen.

Folgende Fragen standen im Mittelpunkt der Arbeit:

1. Besteht bezüglich der Methylierung ein Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe von Patienten mit glialen Tumoren?
2. Korreliert der Umfang der Methylierungsveränderungen bei glialen Tumoren mit deren Malignitätsgrad?
3. Führt die Strahlenbehandlung glialer Tumoren zu Veränderungen des genomischen Methylierungsmusters?
4. Führt die Strahlenbehandlung glialer Tumoren zu Veränderungen der Methylierung im Exon 1 des MYCC-Gens?

Mithilfe einer methylierungssensitiven DNA-Fingerprintmethode (MS-PCR) wurden DNA-Proben glialer Tumoren und des korrespondierenden Normalgewebes auf globale Methylierungsunterschiede untersucht.

Zudem wurden gliale Tumoren verschiedener Malignitätsgrade auf Methylierungsveränderungen getestet.

Um strahleninduzierte Veränderungen im Methylierungsmuster nachzuweisen, wurden etablierte Glioblastomzelllinien sowie Zelllinien niedriger Passagezahlen vor und nach Bestrahlung auf Methylierungsveränderungen untersucht. Neben globalen Methylierungsveränderungen wurden die Abweichungen des Methylierungslevels exemplarisch am Exon 1 des MYCC-Gens bestimmt. Dazu wurde eine methylierungssensitive semiquantitative PCR angewandt.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien und Geräte

Die Restriktionsenzyme *Hpa II* und *Msp I*, deren Puffer, der DNA-Größenmarker, die taq-DNA-Polymerase und die Proteinase K wurden von Boehringer Mannheim GmbH bezogen, die 2'-Deoxynukleotid 5'-Triphosphate (dNTPs) von Gibco BRL, Karlsruhe. Glutamin, fötales Kälberserum, Penicillin und Streptomycin stammen von Seromed Biochrom KG, Berlin. Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Roth, Karlsruhe bezogen. Sämtliche sterilen Plastikwaren für Zellkultur wurden bei Falcon, New Jersey, NJ, USA bestellt, beide Medien (DMEM und RPMI 1860) nebst Trypsin bei Gibco BRL, Karlsruhe.

Folgende Geräte kamen zum Einsatz:

Als PCR-Maschine wurde ein PTC-100 Thermocycler mit beheizbarem Deckel der Firma MJ-Reserch Inc., Watertown, Mass., USA, verwendet, zur Gelelektrophorese wurden vertikale Elektrophorese-Kammern von Biorad, Hercules, CA, USA, und Spannungsquellen der Firma Pharmacia LKB, Freiburg, benutzt.

Die Kultivierung der Zelllinien fand im Sterikult-200-Incubator statt (95% H_2O , 37°C, 5% CO_2).

5.1.2 Untersuchte Tumoren

Untersucht wurde DNA, gewonnen aus Tumorgewebe (T) glialer Tumoren und Normalgewebe (N) aus Blut desselben Patienten. Die DNA-Proben wurden aus der DNA-Bank der neuropathologischen Abteilung des Institutes für Pathologie, Klinikum der Philippsuniversität Marburg entnommen.

Dabei handelte es sich um die DNA von 12 Glioblastoma Multiforme (GBM), WHO-Grad IV, 5 Anaplastische Astrozytome (AA III), WHO-Grad III, 6 Astrozytome (A II), WHO-Grad II, und 2 Pilozytische Astrozytome (PA), WHO-Grad I, sowie 2 Oligodendrogliome, ein Ependymom und ein Meningeom (s. Tabelle 5.1, S. 47).

Die Patientenliste umfaßt Alter und Geschlecht der Patienten sowie die Diagnose nach WHO-Grad. Zusätzlich die Bezeichnung der Tumorprobe.

Tabelle 5.1: Liste der Patientendaten

Nummer	Diagnose	Alter (Jahre)	Geschlecht
A1	A II	14	w
A2	GBM	32	w
A3	AA III	62	m
B1	GBM	69	w
B2	AA III	35	m
B3	GBM	59	m
B4	GBM	46	w
C1	A II	29	m
C4	A II	9	w
C5	GBM	65	w
D2	GBM	53	m
D3	GBM	67	w
E1	A II	6	m
E2	AA III	69	m
E3	A II	52	w
E4	A II	36	w
E5	GBM	42	m
F1	A II	38	w
F3	AA III	52	m
F4	GBM	54	m
F5	GBM	61	w
G1	Pa	12	w
G3	Pa	14	m
G4	GBM	41	m
S1	GBM	51	m
C2	EP II	61	m
D1	O I	36	w
C3	O I	59	w
D4	Men	42	m

A1-S1= Bezeichnung der Tumorprobe

m = männlich

Pa = Pilozytisches Astrozytom

A III = Anaplastisches Astrozytom (Grad III)

EP = Ependymom

Men = Meningeom

w = weiblich

A II = Astrozytom (Grad II)

GBM = Glioblastoma multiforme (Grad IV)

O = Oligodendrogliom

Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 43,7 Jahre, mit einer Spannweite von 6 bis 69 Jahren, 48% der Patienten waren weiblichen Geschlechts und insgesamt wurden 8 Low-Grade Tumoren (Grad I und II) und 17 High-Grade-Tumoren (Grad III und IV) untersucht.

Die DNA-Proben sind mit einem kombinierten Klassifikationsschlüssel gekennzeichnet, der einerseits durch seinen alphanumerischen Teil die Zusammenfassung ähnlicher Tumoren ermöglicht, andererseits jedoch ein unbeeinflusstes Umgehen mit den Proben erlaubt, da der Malignitätsgrad aus dem Schlüssel nicht erkennbar ist.

5.1.3 Zelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden sowohl etablierte Zelllinien, als auch Zelllinien niedriger Passagezahlen humaner Glioblastome verwendet.

Bei den etablierten Zelllinien handelt es sich um die humanen Glioblastomlinien LN 18, LN 229 und LN 308 (Van Meir et al. '95). Die drei Zelllinien unterscheiden sich in ihrem *TP53*-Status, so weist LN 229 einen Wildtyp *TP53* auf, LN18 eine mutierte Form von *TP53*, wobei eine Punktmutation im Codon 238 des Exon 7 vorliegt, wodurch TGT zu TCT mutiert ist und Cystein durch Serin substituiert wird. LN 308 schließlich exprimiert kein *TP53*-Protein, hier liegt ein Rearrangement in *TP53* vor, so daß auf RNA-Ebene nur geringe Mengen eines stark verkürzten Transkripts nachweisbar sind.

Im Weiteren wurden vier humane Glioblastoma Multiforme-Zelllinien verwendet, die von Primärkulturen abgeleitet sind, und in der neurochirurgischen Abteilung der Universität Heidelberg etabliert wurden. Für diese Arbeit wurden zwei Zelllinien mit Wildtyp *TP53* (G122 und G100) sowie zwei Linien mit mutiertem *TP53* (G109 und G150) ausgewählt (s. Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Liste der Zelllinien niedriger Passagen

Tumor	Diagnose	Alter (Jahre)	Geschlecht
G 109	sekundäres GBM	57	männlich
G 150	sekundäres GBM	63	weiblich
G 100	de novo GBM	46	männlich
G 122	de novo GBM	49	männlich

5.1.4 Polymerase-Kettenreaktionsoligonukleotide (PCR-Primer)

Die untenstehenden PCR-Primer wurden für spezielle PCR-Programme (s. Kapitel 4.2) benutzt. Alle Primer wurden von MWG-Biotech, Ebersberg bezogen.

Tabelle 5.3: Liste der verwendeten Primer

Primer-name	Locus	Länge in Bp	Sequenz (5' → 3')
ApHpa	arbiträrer Primer, beinhaltet die Methylierungsstelle für Hpa (CCGG)	11	GGG ATT CCG GT
HsMyc Hpa for	MYCC	22	TGC GCT GCG GGC GTC CTG GGA A
HsMyc Hpa rev	MYCC	23	GCA AGG AGA GCC TTT CAG AGA AG
HsMyc Hpa del	MYCC	39	GCT GCG GGC GTC CTG GGA AGC CCT CCC GCT GAT CCC CCA

Es handelt sich im Fall des ApHpa-Primers um einen arbiträren Primer für die Schnittstelle der *Hpa II*-Sequenz. Für die *Hpa II*-Schnittstelle in MYCC Exon I werden drei verschiedene Primer im Mix eingesetzt.

Der Mix setzt sich zusammen aus einem Vorwärtsprimer (forward), einem Rückwärtsprimer (reverse) und einem Primer, der eine nicht-bindende Sequenz besitzt, also ähnlich einer Deletion, hier als Deletionsprimer bezeichnet. Zur Funktion und zum Einsatz der Primer s. Kapitel 4.2.

5.1.5 Puffer und Lösungen

Folgenden Standardpuffer und Standardlösungen wurden eingesetzt:

TE (pH 8)	10mM Tris (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)
TAE (pH 8,5)	40mM Tris-Acetat, 2mM EDTA (pH 8,5)
TBE	89mM Tris, 89mM Borsäure, 0,2mM EDTA (pH 8)
TNE (pH 7,5)	50mM Tris-Cl, 140mM NaCl, 5mM EDTA (pH 7)
PBS (pH 7,4)	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4mM KH ₂ PO ₄
SDS	10% Natriumduodecylsulphatlösung
Ladepuffer	95% Formamid, 10mM NaOH, 0,5% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien LN 18, LN 229 und LN 308 wurden als Monolayer in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS), 2mM L-Glutamin, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) kultiviert. Die vier anderen Zelllinien befanden sich zwischen Passage 4 (G109) und Passage 7 (G100) und wurden ebenfalls als Monolayer in RPMI-Medium gehalten, ebenfalls mit 10% fötalem Kälberserum, 2mM L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin, in der oben angegebenen Dosierung.

Die Zellen wuchsen bei 5% CO₂, 95% H₂O und 37°C. Sobald die Zellen 80% Konfluenz erreichten, wurden sie trypsinisiert und auf weiteren Platten subkultiviert.

5.2.2 Bestrahlung der Zelllinien

Die Bestrahlung der Zellen wurde in der Abteilung für Radiotherapie der Universität Marburg, Direktorin: Frau Professor Dr.med. R. Engelhart-Cabillic durchgeführt. Die Bedingungen unter denen die Bestrahlung vorgenommen wurde, wurden standardisiert. Alle Zellen befanden sich zum Bestrahlungszeitpunkt auf Petrischalen mit 6cm Durchmesser und waren mit 3ml Medium bedeckt. 24 Stunden vor der Bestrahlung wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Konfluenz der Zellen betrug 70 bis 80%.

Die Zellen wurden mit Strahlen von 1,3MeV Stärke aus einem Cobalt-60-Bestrahlungsgerät behandelt. Die kalibrierte Dosisleistung der Bestrahlung betrug 1,470Gy/Min.

Das Dosimeter wurde direkt vor der Strahlenbehandlung kalibriert und auf einen Abstand von 80cm zwischen Quelle und Zellen eingestellt. Die Gesamtdosis belief sich auf 10Gy (Kraus et al. '98). Aus den Zelllinien wurde DNA vor der Bestrahlung sowie 2, 8, 24, und 96 Stunden danach extrahiert.

5.2.3 Isolierung der DNA

Die DNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion nach Standardprotokoll isoliert (Sambrook et al. '89). 4ml TNE wurden nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS auf die Zellen gegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37° C wurden die Zellen mit einem Zellschaber mechanisch vom Boden der Petrischale gelöst und in ein Zellröhrchen überführt. Unter Zugabe von Proteinase K (100g/ml und 0,5% SDS) wurde die trübe Lösung über Nacht bei 56°C inkubiert, was zu einer Kernlyse führte.

Anschließend folgten mehrmalige DNA-Extraktionen mit Hilfe eines Phenol-Chloroform-Isomylalkoholgemisches im Verhältnis von 25:24:1. Abschließend wurde die DNA in eiskaltem Ethanol ausgefällt. Aufbewahrt wurde sie in TE gelöst bei +4°C.

5.2.4 Restriktionsverdau

Die DNA-Proben aus Tumor- und Normalgewebe sowie die DNA aus den bestrahlten und unbestrahlten Zelllinien und Primärkulturen wurden mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen, den DNA-Endonuklasen *Msp I* und *Hpa II* verdaut. Die Isoschizomere *Msp I* und *Hpa II* sind auf Grund ihres differenten Verhaltens gegenüber einer Methylierung derselben Schnittstelle zur Detektion von Methylierungsunterschieden sehr geeignet. *Hpa II* hingegen schneidet nur C`CGG, C^mCGG, also ein methyliertes Cytosin nicht. *Hpa II* ist somit methylierungssensitiv. *Msp I* dagegen schneidet C`CGG unabhängig von der Methylierung. Beide Enzyme schneiden jedoch ^mCCGG nicht.

Somit ist eine Unterscheidung des Methylierungszustandes bestimmter Abschnitte der DNA durch den Vergleich der Schnittmuster beider Endonukleasen möglich. Es sei jedoch darauf verwiesen (s. Kapitel 2.2.3.), daß auf Grund sterischer Veränderungen kein 100% Verdau der DNA durch Restriktionsenzyme erfolgt (Lewis and Bird '91, Antequera et al '89).

Für den Verdau wurden in 20µl Endvolumen 200ng DNA mit 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl und 1mM Dithioerythrit bei einem pH von 7,5 bei 37°C mit 10U *Hpa II* bzw. *Msp I* im Überschuß versetzt. Inkubiert wurde im Wasserbad bei 37°C für 16 Stunden.

5.2.5 Methoden der Polymerasekettenreaktion

Es wurden zwei verschiedene PCR-Ansätze angewandt, die MS-PCR, eine methylierungssensitive PCR, basierend auf dem Mechanismus der AP-PCR, (arbitrary primed PCR), als Screeningmethode auf Methylierungsunterschiede. Daneben wurde eine MYCC-PCR benutzt zum Nachweis einer differentiellen Methylierung im Exon 1 des humanen MYCC-Gens. Die MS-PCR wurde angewandt auf alle Tumor/Normalgewebe-Proben sowie GBM-Zelllinien vor und nach der Bestrahlung. Sie erlaubt einen Überblick über die gesamte DNA eines Individuums im Vergleich zwischen Tumor- zu Normalgewebe. Die MYCC-PCR wurde für die primären und etablierten Zelllinien vor und nach Bestrahlung verwendet.

5.2.5.1 Arbitrarily-primed-Polymerasekettenreaktion

Die arbitrarily-primed-Polymerasekettenreaktion (AP-PCR) benutzt einzelne Primer von 10 bis 34 Bp Länge, die an willkürlich gewählte Sequenzen binden und mit Hilfe einer hohen MgCl₂-Konzentration und einigen initialen unspezifischen PCR-Zyklen eine DNA-Fingerabdruck-Technik darstellt (Welsh`90, Welsh und McClelland `90, `91, `94, Davies`02). Sie beruht darauf, daß eine selektive Amplifikation von Gensequenzen stattfindet, die durch Zufall an die ebenfalls willkürlich gewählten Primersequenzen passen. Anschließend werden in weiteren Zyklen von hoher Spezifität nur die am besten passenden Sequenzen amplifiziert.

Die Primerbindung an multiplen Stellen des Genoms läßt eine Vielzahl an PCR Produkten entstehen, die dann einen DNA-Fingerabdruck spezifisch für jede Primer-DNA-Template Kombination darstellt.

Malkhosyan identifizierte mittels dieser AP-PCR-Technik somatische Mutationen im Vergleich von Tumor- und Normalgewebe (Malkhosyan et al. `98). Der quantitative Aspekt des AP-PCR-Fingerabdrucks erlaubt ebenfalls eine Detektion von allelischen Verlusten und Gewinnen in Tumorzellen durch Zu- oder Abnahme der Intensität der Banden des tumorspezifischen Fingerabdrucks (Peinardo et al. `92, Schlegel et al. `95).

5.2.5.2 Methylierungssensitive Polymerasekettenreaktion

Für die MS-PCR wurden 2µl DNA mit 1µl Restriktionsenzym, 2µl spezifischer Restriktionsenzym-puffer und 15µl DPEC Wasser versetzt und für 16-18 Stunden bei

37° inkubiert. Anschließend wurden 5µl 10fach PCR-Puffer, 1µl MgCl₂ (25mM), 4µl dNTPs (10mM), 1µl Primer (Ap Hpa) 0,4µl taq Polymerase und 18,6µl DEPC Wasser hinzugefügt. So entstand ein Gesamtvolumen von 50µl. Die Proben wurden im Thermocycler bei 95°C über 5 Minuten denaturiert, anschließend folgten fünf unspezifische Zyklen, die jeweils 40 Sekunden bei 94°C, 2 Minuten bei 35°C und 1 Minute bei 72°C dauerten. Darauf folgten 35 spezifische Zyklen, die 30 Sekunden bei 94°C, zwei Minuten bei 42°C, 1 Minute bei 72°C und abschließend 10 Minuten bei 72°C umfaßten.

Der ApHpa-Primer, dessen Bindungssequenz GGG ATT CCG GT teilweise mit der Erkennungssequenz des *Hpa II* Restriktionsenzym übereinstimmt, bindet nur an die DNA, wenn das Restriktionsenzym *Hpa II* die Bindungssequenz nicht zerschnitten hat. Somit bildet sich ein PCR-Produkt nur dann, wenn die Schnittstelle methyliert ist (Singer-Sam '90).

Da das Restriktionsenzym *Msp I* die Erkennungssequenz unabhängig, ob sie methyliert oder nicht methyliert vorliegt, schneidet, sollte sich an der vergleichbaren Stelle für *Msp I*-vorverdaute DNA kein PCR-Produkt ergeben. *Msp I* stellt deshalb eine Kontrolle für die Effektivität MS-PCR. Eine weitere Kontrolle stellt eine PCR mit unverdauten Proben dar.

In dieser Arbeit sind Polymorphismen von PCR-Produkten von Normal- und Tumorgewebe Hinweise für eine veränderte Methylierung. Mit kleinen Veränderungen haben verschiedene Autoren diese Technik an verschiedenen Tumorgeweben wie Kolon- und Mammakarzinomen, und auch an den Tumorsuppressorgenen *TP16*, *TP15*, *E-Cadherin* und *VHL* etabliert (Herman et al. '96, Huang et al. '97 und Gonzalgo et al. '97).

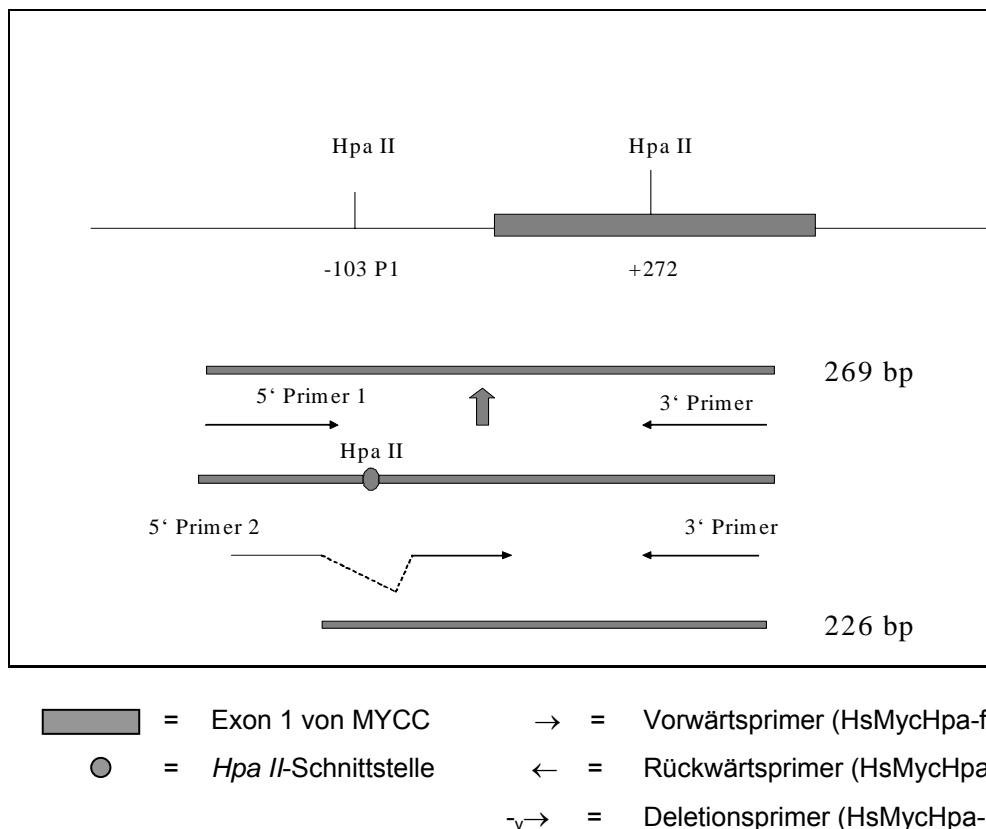
5.2.5.3 Methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion an *MYCC* Exon 1

Tumor- und Kontroll-DNA sowie die genomische DNA aus den Zelllinien wurde mit den Restriktionsenzymen *Hpa II* und *Msp I* verdaut (37°C, 16h). Anschließend wurde die PCR in einem Endvolumen von 50µl (0,2mM dNTPs, 1x PCR-Puffer mit MgCl₂ (15mM), 1,5U *taq*-Polymerase, 15pmol *HsMycHpa-for*, 15pmol *HsMycHpa-rev*, 75fmol *HsMycHpa-del*, 17,75l DEPC-Wasser) für 25 Zyklen (95°C 1Minute, 66°C 1,5Minuten, 73°C 1Minute, 2°C 5 Minuten) durchgeführt. Es wurde ein *Hot Start*

vorgenommen, was bedeutet, daß die *taq*-Polymerase erst nach fünfminütiger Denaturierung zugegeben wurde.

Die Methylierung des *MYCC*-Promotors wurde mit der PCR-Methode von Okada getestet (Okada et al. '96). Die Methode basiert auf der Anwesenheit einer *Hpa II*-Schnittstelle im Exon I des *MYCC*-Gens (+272Bp).

Abbildung 5.1: Lokalisation der *Hpa II*-Schnittstellen (nach Okada et al. '96)



Zu einem Antisense-Primer (*HsMycHpa-rev*) wurden zwei konkurrierende Sense-Primer gewählt. Die Hybridisierung des einen Oligonukleotids (*HsMycHpa-for*) war 5' der *Hpa II*-Schnittstelle lokalisiert, die Sequenz des anderen Primers war 5' und 3' der *Hpa II*-Schnittstelle angesiedelt und überbrückte so die Sequenzlücke dazwischen (*HsMycHpa-del*). Bei einer von *Hpa II* geschnittener DNA (Schnittstelle unmethyliert) kann vom Vorwärtsprimer (*HsMycHpa-for*) ausgehend kein PCR-Produkt gebildet werden, da die Bindungssequenz des Primers unterbrochen ist. Der Deletionsprimer (*HsMycHpa-del*) ist in diesem Fall jedoch in der Lage mit dem Rückwärtsprimer (*HsMycHpa-rev*) ein PCR-Produkt von 226Bp Länge auszubilden. Bei ungeschnittener DNA (Schnittstelle methyliert) hingegen entsteht vornehmlich ein Produkt von Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit der Länge von 269 Bp

Ermittelt man den Quotienten aus der Bandenintensität (in Pixel) der methylierten und der nicht methylierten Schnittstelle, lassen sich Veränderungen im Methylierungslevel quantifizieren. Das ermöglicht eine Unterscheidung der verschiedenen Methylierungszustände. Für diese Untersuchung wurde der Ansatz von Okada modifiziert. Die Zykluszahl wurde von 30 auf 25 Zyklen verkürzt.

5.2.6 Gelelektrophorese und Silberfärbung

5.2.6.1 Polyacrylamidgelelektrophorese

Das nicht-denaturierende Polyacrylamidgel (PAA-Gel) setzte sich aus 5ml 10fach TBE-Puffer, 6,25ml Acryl-Amid/Bis (19:1), 250 μ l 10% APS und 38,75ml Aqua bidest mit TEMED als Katalysator bei einem Gesamtvolumen von 50ml zusammen. 10 μ l PCR Produkt wurden zusammen mit 2 μ l Ladepuffer auf das nicht denaturierende Polyacrylamidgel aufgetragen und einer Spannung von 125V über eine Stunde ausgesetzt. Die Größe der Fragmente konnte durch den mitgelaufenen Standardgrößenmarker bestimmt werden.

5.2.6.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Das denaturierende Polyacrylamidgel (5% Gel) setzte sich aus 113,4g Urea, 27ml 10fach TBE, 54ml Acryl-Amid/Bis, 1,4ml APS und 300 μ l TEMED und 71,2ml Aqua bidest zusammen. 2,5 μ l PCR-Produkt wurden mit 1,5 μ l Ladepuffer für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde zentrifugiert und eiskalt auf das denaturierende Gel in einer vertikalen Elektrophoresekammer aufgetragen. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde ein 1fach TBE-Puffer verwendet und eine Spannung von 1650V über 3,5 Stunden angelegt. Die Fragmentgröße wurde durch den mitgelaufenen Standardgrößenmarker bestimmt.

5.2.6.3 Silberfärbung

Das Gel wurde nach der Elektrophorese einer Silberfärbung unterzogen. Zunächst wurde es mit 10% Ethanol für fünf Minuten fixiert, anschließend mit 1% Salpetersäure drei Minuten lang oxidiert, danach für 20 Minuten in 12mM Silbernitrat im Dunkeln inkubiert. Danach folgte eine Reduktionsreaktion in einer 0,28M Natriumkarbonatlösung mit 0,019% Formalinzusatz.

Sobald die Banden gut sichtbar waren, wurde die Reaktion mit 10% Eisessig gestoppt. Die Lösung wurde zum Fixieren weitere zwei Minuten auf dem Gel belassen und anschließend zwei Minuten lang mit destilliertem Wasser abgespült.

Im Anschluß daran wurde das Gel zum Trocknen auf Whatman-Papier aufgezogen und heißluftgetrocknet. Die Länge der Fragmente wurde mit Hilfe des mitgeführten Standardgrößenmarkers ermittelt.

5.2.7 Auswertung der Ergebnisse

Zur Auswertung des veränderten Bandenmusters von Normal- zu Tumorgewebe wurden die Gele semiquantitativ beurteilt und die Anzahl der jeweiligen Veränderungen in Tabelle 4 Seite 57 zusammengefaßt und in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

Die Intensitätsveränderungen der einzelnen Banden der *MYCC*-Gele wurden densitometrisch mit Hilfe eines NIH-Image (Scion-Image) erfaßt und die Veränderungen an Hand der integrierten Grauwerte quantifiziert. Die ermittelten Zahlenwerte wurden für *Msp I* als Basalwert und *Hpa II* als methylierter Wert ins Verhältnis zueinander gesetzt.

Ausgehend von dem Wert der unbestrahlten Probe wurde die Abweichung der anderen Proben prozentual berechnet und die relative Veränderung in den Abbildungen 21-25 graphisch verdeutlicht. Die Veränderung des Quotienten in Abhängigkeit von der Dauer nach Bestrahlung wurde als veränderter Methylierungszustand im Exon 1 von *MYCC* gesehen.

6. ERGEBNISSE

6.1 Ergebnisse im Überblick

Insgesamt wurden 25 gliale Tumoren mit einer methylierungssensitiven PCR-Methode untersucht. Dabei wurden qualitative und quantitative Unterschiede im Bandenmuster von Tumor- und Normalgewebe festgestellt, die als Hinweis auf Methylierungsunterschiede gewertet werden können (s. Abb. 7, S.37). Es wurden neben unterschiedlicher (Färbe-) Intensität der Banden auch das Neuauftreten bzw. der Ausfall ganzer Banden registriert. Diese Polymorphismen sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

In den Tumoren zeigte sich eine Korrelation zwischen der Anzahl der Polymorphismen in *Hpa II*-verdauten Proben und dem Malignitätsgrad glialer Tumoren (s. Tabelle 4-6).

Verglichen damit, waren bei den *Msp I* verdauten Proben nur in geringem Umfang qualitative und quantitative Unterschiede des Bandenmusters erkennbar. Die minimalen qualitativen und quantitativen Veränderungen in den unverdauten Proben sind vermutlich auf die allgemeine Varianz in Tumoren zurückzuführen.

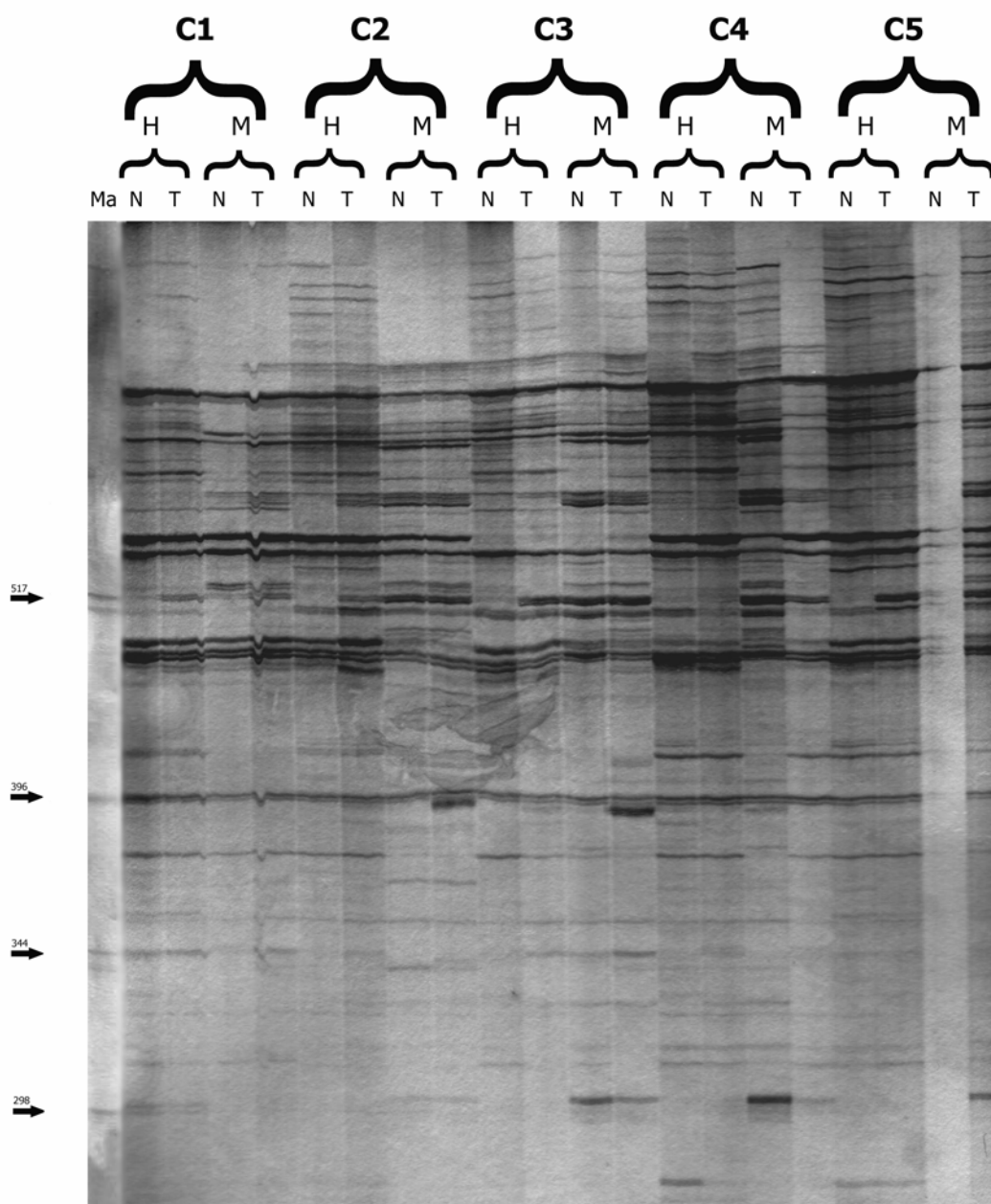
Bei einer Vielzahl von Tumoren ließ sich eine auffällige Konstellation feststellen: während das PCR-Fragment, das im Gel mit dem Größenmarker für 517Bp korrelierte im Normalgewebe des *Hpa II*-Verdau nicht nachweisbar war, trat sie in allen anderen Proben auf, d.h. dem Tumorgewebe der *Hpa II* verdauten Proben sowie in Normal- und Tumorgewebe nach *Msp I*-Verdau (s. Abb. 10).

Ferner wurden drei humane Glioblastomzelllinien höherer Passagen und vier Linien niedriger Passagen bestrahlt und nach 2 bis 96 Stunden auf Methylierungsunterschiede untersucht. Im Vergleich zum Bandenmuster der unbestrahlten Proben ließ sich für zwei der etablierten Zelllinien, LN 229 und LN 18, eine deutliche Veränderung des Bandenmusters und insgesamt eine Zunahme der Polymorphismen nach Bestrahlung verzeichnen (s. Abb. 11).

6.2 Methylierungsabhängige Arbitrary-Primed-Polymerasekettenreaktion

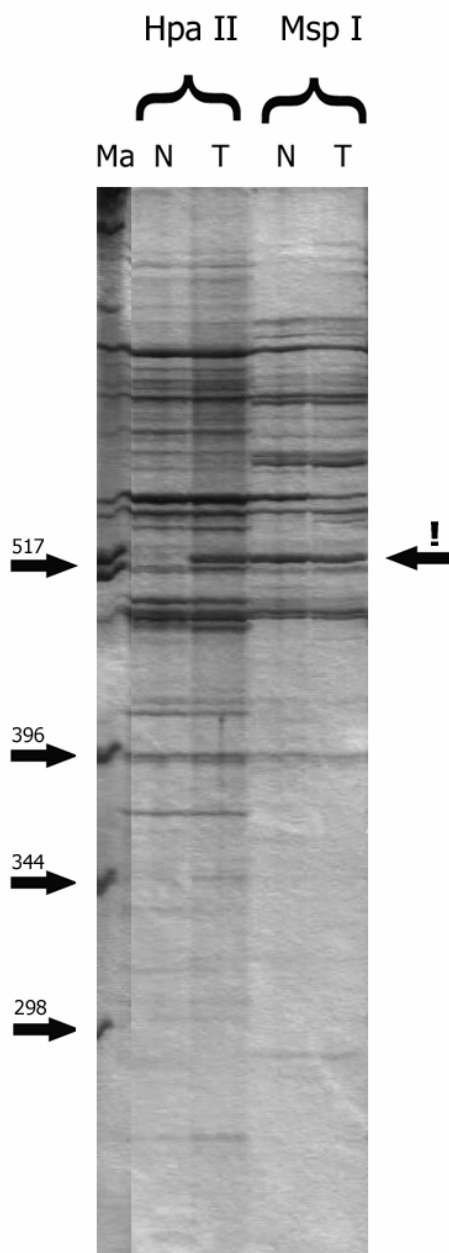
Das folgende Gel in Abbildung 8 zeigt repräsentativ für alle untersuchten Tumoren qualitative und quantitative Polymorphismen. Die Varianz der Banden ist Ausdruck einer veränderten PCR-Kinetik, die unter anderem durch die veränderte Hybridisierung der Oligonukleotide-Primer an die methylierungsabhängigen *Hpa II*-Schnittstellen entstehen kann. Ein weiteres Gel in Abbildung 9 veranschaulicht die Konstellation der 517Bp Banden. Anschließend folgt die tabellarische Auswertung aller untersuchten Tumoren und die graphische Darstellung der Ergebnisse.

Gel 6.1: Gliöse Tumoren im Vergleich von Normal- und Tumorgewebe



H	Hpa II-verdaute Probe	N	Normalgewebe
M	Msp I-verdaute Probe	T	Tumorgewebe
Ma	Standardmarker		
C1, C2, C3, C4, C5 Kodierungsnummern			

Gel 6.2



Gel 6.2 zeigt das genannte AP-PCR-Fragment von ca. 517Bp Länge (s. Pfeil).

Es zeigt sich eine deutliche Bande nur für *Hpa-II*-verdautes Tumorgewebe sowie Normal- und Tumorgewebe des *Msp I*-Verdaus.

Im Normalgewebe des *Hpa II*-Verdaus ist die Bande nicht vorhanden.

Das Auftreten dieser speziellen Bandenkonstellation konnte unabhängig vom Malignitätsgrad, Alter oder Geschlecht der Patienten festgestellt werden.

Tendenziell zeigt sich jedoch ein verstärktes Auftreten dieses Restriktionsfragments mit Zunahme des Malignitätsgrad (s. Tabelle 4).

Die Tabelle 4 fasst die gesamten Veränderungen der 25 untersuchten glialen Tumoren, neben 4 zusätzlich untersuchten intrakraniellen Tumoren (Meningeom, Oligoastrozytom Grad I, Ependymom) im Vergleich von Normal- und Tumorgewebe tabellarisch zusammen.

Tabelle 6.1: Veränderungen des Bandenmusters von Normal- zu Tumorgewebe

Tumor- entität	Nr.	Hpa II				Msp I				Unverd.				Total			
		+	-	↑	↓	+	-	↑	↓	+	-	↑	↓	517	Hpa II	Msp I	Unv.
PA	G1	2	3			1					2			∅	5	1	2
	G3	1				1				2				✓	1	1	2
A II	A1		1	1			1			1				✓	2	1	1
	C1	1		2	1			1						✓	4	1	0
	C4		3		2	4				8				∅	5	4	8
	E1	2				1	1							✓	2	2	0
	E3	5				1	2			3	1			∅	5	3	4
	E4	5				1	1			1	1			✓	5	2	2
	F1		2			3	1			1				✓	2	4	1
AA III	A3			1				1	1	2				*	1	2	3
	B2	2	1		4		1							✓	7	1	0
	E2	2	3			2	1							∅	5	3	0
	F3	3	1			1	4							✓	4	5	0
GBM	A2	1				1		1	1					✓	1	3	0
	B1		1	1	4		2			1	1			✓	6	2	2
	B3		1	2	1	1	1					1	1	∅	4	2	2
	B4	1	1					2		2	3			∅	2	2	5
	C5	2		2	1									✓	5	0	0
	D2	3				2					1			✓	3	2	1
	D3	3		2		1			1					✓	5	2	0
	E5	4				4								✓	4	4	0
	F4	2	2			2	1			1	1			✓	4	3	2
	F5	3	3			2	1			1				∅	6	4	1
	G4	7	4											✓	11	0	0
	Schn		4			3	2			1	4			∅	4	5	5
Men	D4	4	2			2	4			3	1			∅	6	6	4
O I	C3	2				3	1			3	3		1	✓	2	4	7
O II	D1	2				2								∅	2	2	0
EP II	C2	3				1				2				✓	3	1	2
Gesamt		60	32	11	13	39	24	5	3	40	18	32	18	17	116	71	51

+ neu aufgetretene Bande
 - weggefallene Bande
 ↑ Bandenintensität erhöht
 ↓ Bandenintensität erniedrigt

✓ 517-Phänomen aufgetreten
 ∅ 517-Phänomen nicht beobachtet
 * nicht auswertbar

Die Daten aus Tabelle 6.1 sind in Tabelle 6.2 und Tabelle 6.3 für die einzelnen Malignitätsgrade zusammengefaßt und in Abbildung 10 graphisch veranschaulicht.

Tabelle 6.2: Anzahl der Polymorphismen in Tumoren der unterschiedlichen Malignitätsgrade

Tumorentität	Anzahl	Hpa II-Poly.	Msp I-Poly.	Unverd.-Poly.	517-Phänom.
PA	2	3,00	1,00	2,00	0,50
A II	6	3,33	2,50	2,33	0,66
AA III	5	4,40	2,60	1,00	0,60
GBM	12	4,55	2,64	1,64	0,73

Es zeigt sich eine Korrelation zwischen dem Malignitätsgrad der Tumoren und der Anzahl der Methylierungsabhängigen Polymorphismen.

Die unverdauten Proben wurden als Kontrolle neben dem *Msp I*-Verdau mitgeführt. Es wurde davon abgesehen, die Polymorphismen der unverdauten Proben von den *Hpa II*- und *Msp I*-verdauten Polymorphismen desselben Tumors zu subtrahieren, da die arbitrarily-primed-PCR für unverdaute DNA und verdaute DNA-Fragmente nicht von gleicher Effektivität ist.

Ein Vergleich der Polymorphismen der unverdauten Proben bzw. der verdauten DNA untereinander ist allerdings zulässig.

Die Rubrik *Polymorphismen gesamt* umfaßt die im Tumorgewebe verstärkt ausgebildeten Banden und die neu aufgetretenen Banden. Die Werte in Klammern geben die Anzahl der neu aufgetretenen Banden an.

Tabelle 6.3: Polymorphismen in Abhängigkeit von der Malignität der Tumoren

Tumorentität	Polymorphismen		Anzahl der Tumoren	Mittelwert der Polymorphismen	
	gesamt	()		pro Tumor	()
PA	3	(3)	2	1,50	(1,50)
AA II	16	(13)	7	2,29	(1,86)
AA III	8	(7)	4	2,00	(1,75)
GBM	33	(26)	12	2,75	(2,17)

In Tabelle 6.3 sind nun speziell die verstärkt und neu aufgetretenen Polymorphismen zusammengefaßt und den Malignitätsgraden zugeordnet.

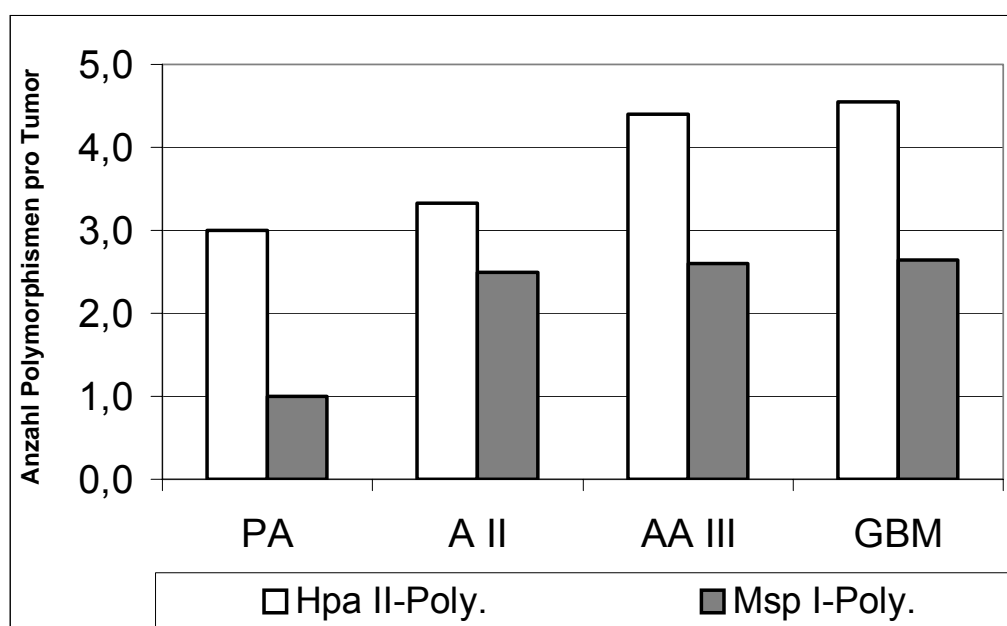
Eine tendenzielle Richtung der Polymorphismen ohne den Anspruch einer linearen Zunahme, zeichnet sich ab.

Ein Vergleich der hier detektierten Anzahl der Polymorphismen oder deren Fragmentlänge mit gesamtgenomischen Vorkommen der *Hpa II* bzw. *Msp I* Schnittstellen C^(m)CGG kann nicht vorgenommen werden, da seitens der Literatur und verschiedener Hersteller der Restriktionsenzyme *Hpa II* und *Msp I* (Boehringer-Mannheim, Roche, NEB, Promega) keine Angaben über die Häufigkeit der Schnittstellen bzw. die Fragmentlänge im humanen Genom gemacht werden kann.

Darüber hinaus ist eine solcher Vergleich von fraglicher Aussagekraft, da durch eine Störanfälligkeit der Enzyme z.B. durch sterische oder chromatinstrukturbedingte Veränderungen von einer nicht vollständigen Restriktion ausgegangen wird (s. S. 65, Antequera et al. '90, Herman et al. '96).

In der Literatur wird eine Verteilung der CpG-Dinukleotide von durchschnittlich alle 50-100 Bp angegeben (Cross et al. '94), das Vorkommen von CpG-Inseln im Genom wird im Durchschnitt auf alle 100 Kb geschätzt, allerdings mit großer Varianz, bedingt durch die Assoziation der CpG-Inseln in den Promotoren von Genen (s.2.2.1., Bird '86, '87).

Abbildung 6.1: Polymorphismen der verschiedenen Malignitätsgrade



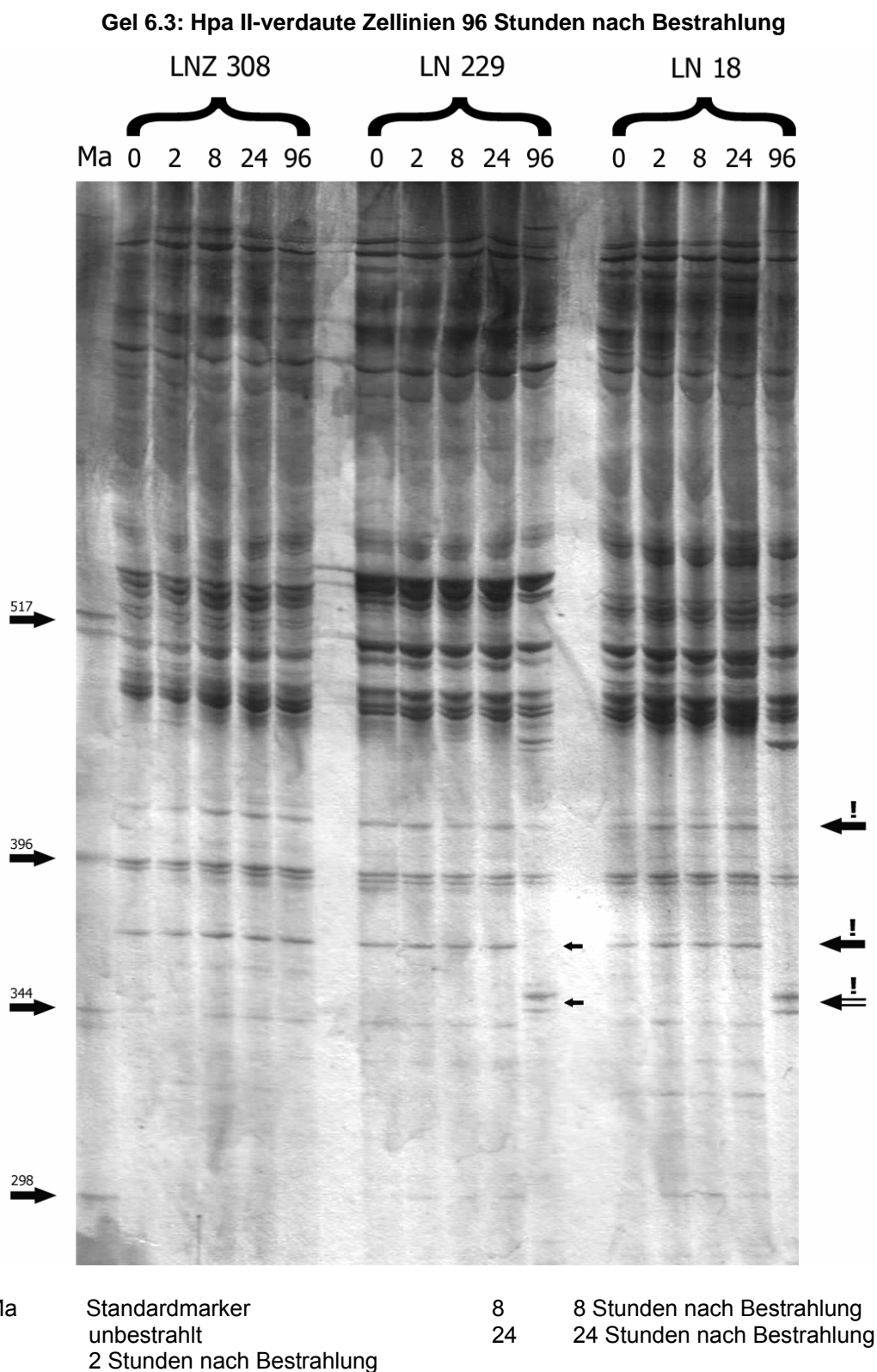
In Abbildung 6.1 zeichnet sich eine Zunahme der Polymorphismen in den *Hpa II*-verdauten Proben in Korrelation mit dem ansteigenden Malignitätsgrad der untersuchten Tumoren ab. Die Veränderungen der *Msp I*-verdauten Proben bleiben annähernd gleich. Das 517-Phänomen (s. Gel 6.2) tritt tendenziell ebenfalls mit steigender Malignität der untersuchten Tumoren vermehrt auf.

Wie in Abbildung 10 an den Gesamtwerten abzulesen ist, zeigt sich insgesamt eine Zunahme der Methylierungsabhängigen Polymorphismen in Tumoren im Gegensatz zum Normalgewebe.

6.3 Methylierungsabhängige AP-PCR von Zelllinien nach Bestrahlung

In dieser Arbeit wurden die humanen Glioblastomzelllinien LN 229, LN 18 und LN 308 sowie die Zelllinien G100, G109, G122 und G150 auf eine induzierbare Methylierungsveränderung durch Bestrahlung mit 10 Gray Kobaltbestrahlung untersucht. Nach 96 Stunden zeigten sich deutliche Veränderungen des Bandenmusters in den Zelllinien LN 18 und LN 229 (s. Pfeile in Abbildung 11).

Diese beiden Zelllinien wiesen im Vergleich zu früheren Meßzeitpunkten zahlreiche qualitative Polymorphismen auf. Die Zelllinie LN 308 hingegen zeigte auch nach 96 Stunden keine Polymorphismen. Die Zelllinien niedriger Passagen zeigten im untersuchten Intervall ausgeprägte Methylierungsveränderungen, jedoch keine gerichtete Veränderung des Bandenmusters nach Bestrahlung.

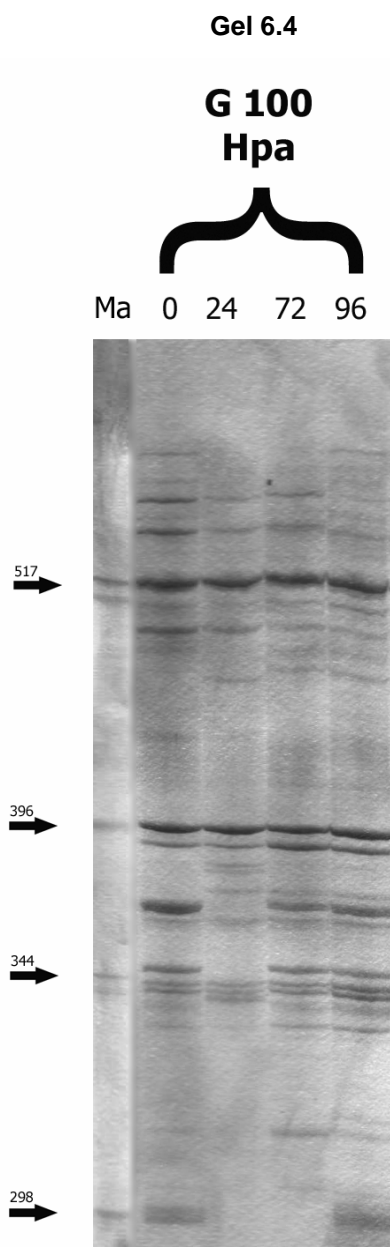


Als Kontrolle konnte für alle drei Zelllinien übereinstimmend im *Msp I*-Verdau auch nach 96 Stunden keine Veränderungen des Bandenmusters beobachtet werden.

Neben der Veränderung des Bandenmusters zeigten sich auch morphologische Veränderungen der Zelllinien in Kultur.

Nach ca. 72 Stunden konnte eine Ausbildung von Zellfortsätzen festgestellt werden, die an Differenzierungsfortsätze erinnern. Die Aussprossungen waren in allen Zelllinien nachweisbar, allerdings am stärksten ausgeprägt in der Zelllinie LN 18. Für die Zelllinie LN 18 wurde nach Bestrahlung zudem eine enorme Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit verzeichnet (Subkultivierung 10.04.98, sowie 12.04.98 jeweils 1:6 vor Bestrahlung, nach Bestrahlung keine Subkultivierung bis 96 Stunden nach Bestrahlung mehr notwendig). Die Linien LN 229 und LN 308 zeigten vergleichbare Veränderungen, jedoch waren diese nicht so ausgeprägt wie bei der Linie LN18. Die G100, G109, G122 und G150 wiesen diese Zellausläufer ebenfalls auf.

Da sich eine große Anzahl von Zellen der Zelllinie LN 18 nach 96 Stunden vom Boden lösten und abschwammen, erfolgte eine gesonderte DNA-Isolierung der abschwimmenden Zellen, um die Frage zu klären, ob eine veränderte Methylierung im Rahmen der Apoptose eine Rolle spielt. Es konnte jedoch keine Veränderung des Bandenmusters im Vergleich mit dem 96-Stundenwert der Zelllinie LN 18 festgestellt werden.

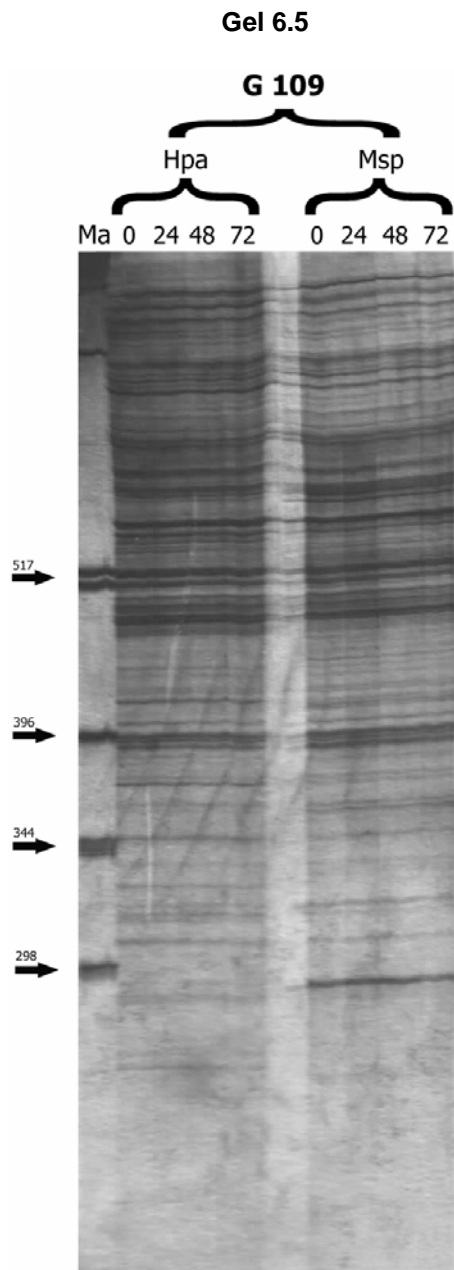


Gel 6.4 zeigt die Zelllinie G 100. Im Gegensatz zu den Zelllinien LN 18, 229 und 308 (s. Gel 6.3) stellt sich hier keine abrupte Veränderung des Bandenmusters nach 96 Stunden dar.

Es zeigen sich vielmehr frühe, jedoch fluktuierende Variationen des Bandenmusters bereits nach 24 Stunden.

Während es sich bei der Zelllinie G100 um ein *de novo* entstandenes Glioblastoma Multiforme mit Wildtyp *TP53* handelt, ist in Abbildung 13 die Zelllinie G109, ein *sekundär* entstandenes Glioblastom mit mutiertem *TP53* dargestellt.

Ein *Msp I*-Verdau wurde als Kontrolle bei allen Zelllinien durchgeführt, diese war, wenn nicht erwähnt, unauffällig.



Gel 6.5 zeigt die Zelllinie G109.

Für diese Zelllinie existiert technisch bedingt (kein Zellwachstum mehr nach 72 Stunden) kein 96 Stundenwert.

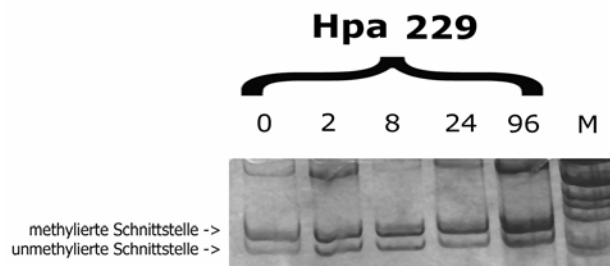
Im Gegensatz zur vorher dargestellten Zelllinie G100 sind hier jedoch insgesamt weniger Polymorphismen zu sehen.

6.4 Methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion des Exon 1 von MYCC nach Bestrahlung

Zur Detektion von Methylierungsabhängigen Unterschieden im Exon 1 des *MYCC*-Gens nach Bestrahlung wurde eine methylierungsspezifische PCR nach der Methode von Okada verwendet (Okada et al `96). In den nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen werden zwei Banden sichtbar (vergl. S.52, Material und Methoden).

Es folgen beispielhaft einige Gele, nachfolgend die Gesamtauswertung und die graphische Übersicht.

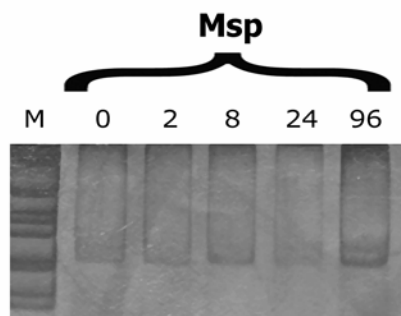
Gel 6.6



In Gel 6.6 - Gel 6.8 ist die Zelllinie LN 229, exemplarisch für alle Zelllinien, die mit der Methode untersucht wurden, dargestellt.

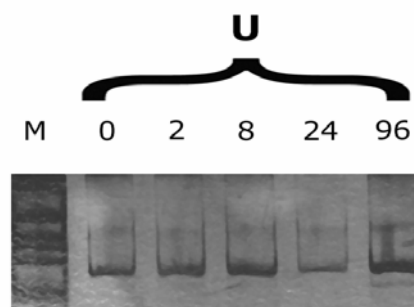
Für den *Hpa II* Verdau kommen beide Banden zur Darstellung.

Gel 6.7



Im *Msp I*-Verdau zeigt sich vornehmlich die geschnittene kleinere (untere) Bande, da *Msp I* methylierungsinsensitiv ist, also unabhängig von einer Methylierung der Schnittstelle schneidet.

Gel 6.8



Gel 6.8 zeigt die PCR mit unverdauten Proben. Erkennbar ist nur die ungeschnittene größere (obere) Bande.

Die folgenden Tabellen geben für die einzelnen Gele die Intensität der Banden, dargestellt in integrierten Grauwerten, wieder. Der Quotient aus der methylierten zur unmethylierten Bande wurde errechnet.

Entsprechend der Aussage der Banden wird die obere Bande im Weiteren als methyliert gekennzeichnet, die untere Bande als nicht methyliert.

Tabelle 6.4: Methylierung des Exon I von MYCC der Zelllinien LN 229, LN 308 und LN 18

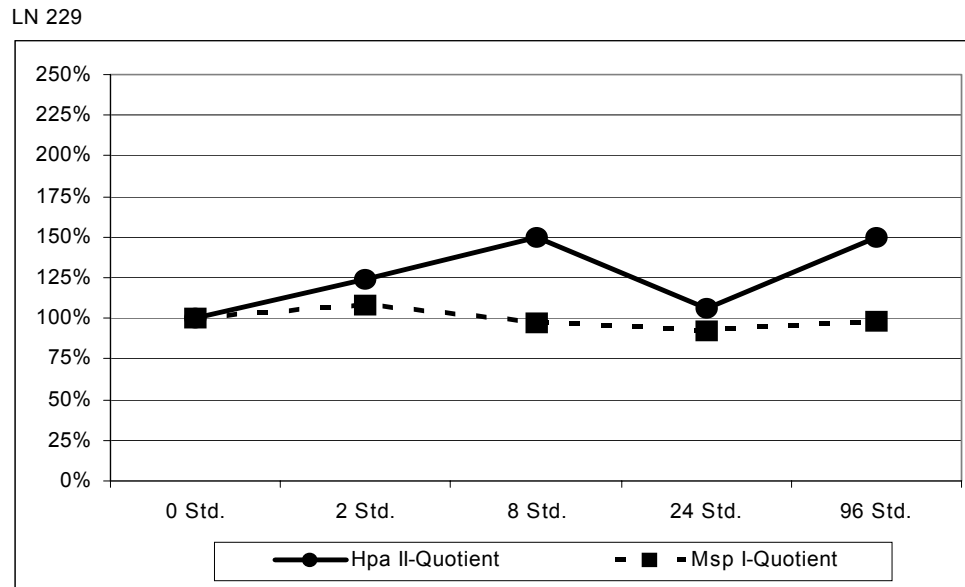
Zelllinie	Verdau	0 Std.	2 Std.	8 Std.	24 Std.	96 Std.
LN 229	Hpa II	0,64	0,80	0,96	0,68	0,97
	Msp I	1,09	1,17	1,05	1,01	1,06
	Quotient	0,59	0,68	0,91	0,68	0,92
	In %	100%	116%	154%	115%	156%
LN 308	Hpa II	2,00	2,01	1,27	1,04	2,41
	Msp I	0,17	0,12	0,08	0,14	
	Quotient	11,76	16,75	15,88	7,43	
	In %	100%	142%	135%	63%	
LN 18	Hpa II	0,71	0,37	0,43	1,57	1,20
	Msp I	0,91	0,92	1,01	1,00	1,08
	Quotient	0,78	0,40	0,43	1,57	1,11
	In %	100%	51%	55%	201%	142%

Tabelle 6.5: Methylierung des Exon I von MYCC für die Zelllinie G109

Zelllinie	Verdau	0 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.
G 109	Hpa II	0,50	0,46	0,65	0,86
	Msp I	0,88	0,85	0,85	0,88
	Quotient	0,57	0,54	0,76	0,75
	In %	100%	94%	133%	132%

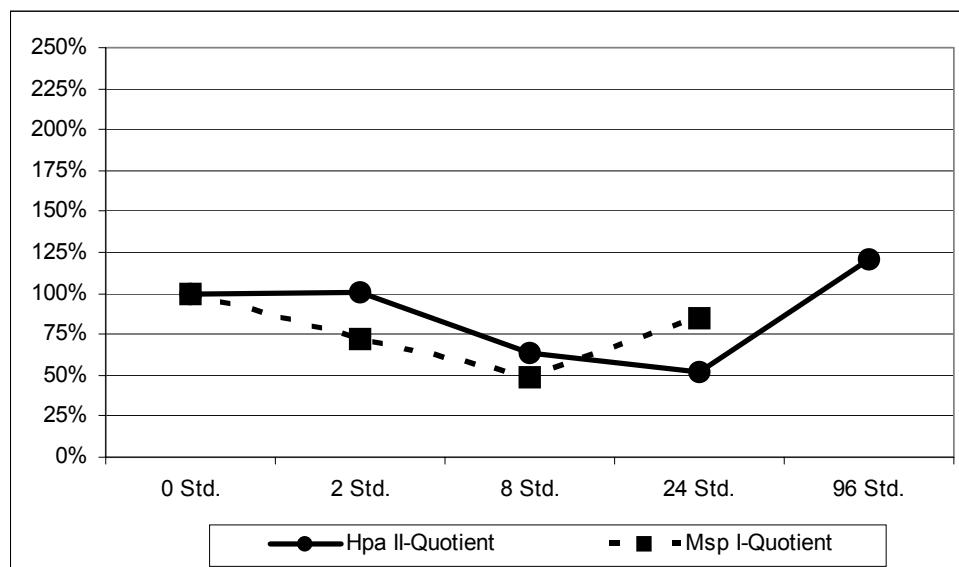
Die nachfolgenden Graphiken (Abbildung 17-21) veranschaulichen die Daten aus den vorangegangenen Tabellen.

Abbildung 6.2: Entwicklung der Methylierung von MYCC Exon I in LN 229 nach Bestrahlung

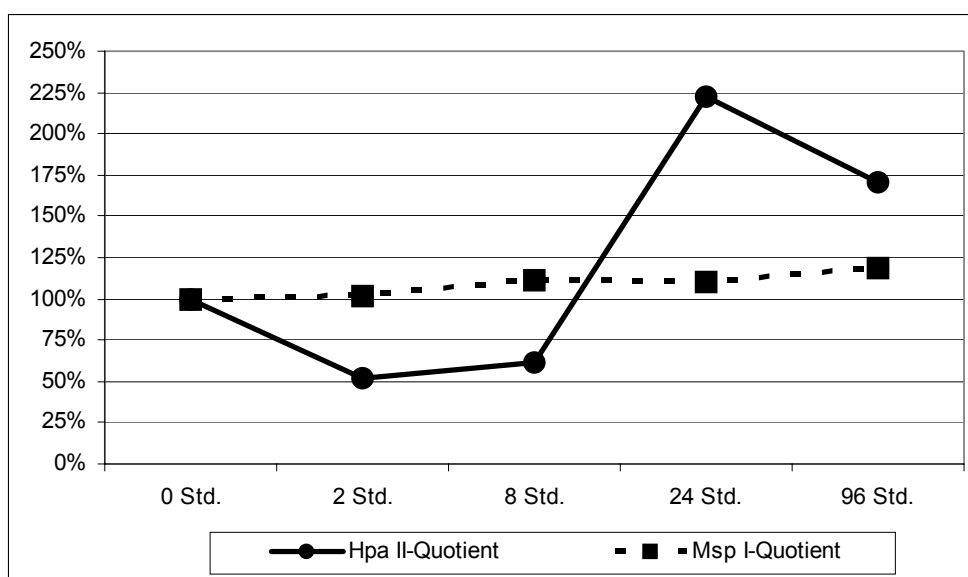


Für die Zelllinie LN 229 zeigt sich bei gleichbleibender Kontrolle (*Msp I*-Verlauf) eine deutliche Hypermethylierung durchgängig für alle untersuchten Stundenwerte nach Bestrahlung.

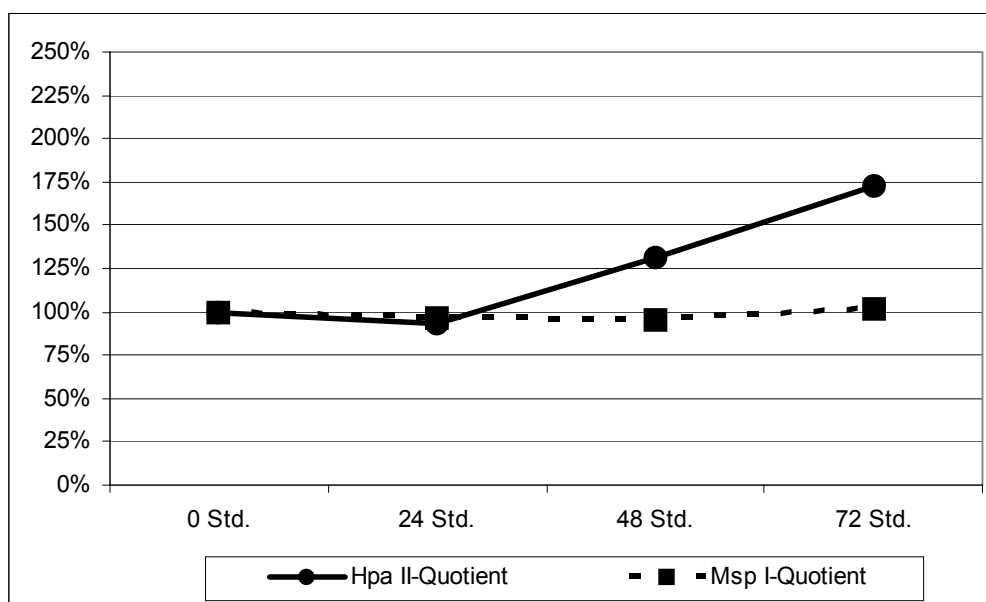
Abbildung 6.3: Entwicklung der Methylierung in MYCC Exon I nach Bestrahlung für LN 308



Für die Zelllinie LN 308 zeigt sich ebenfalls eine Hypermethylierung 96 Stunden nach Bestrahlung. Zuvor ist bis zum 24 Stundenwert eine Hypomethylierung im Vergleich mit der nicht bestrahlten Probe zu beobachten. Die Kontrolle zeigt insgesamt eine gewisse Fluktuation.

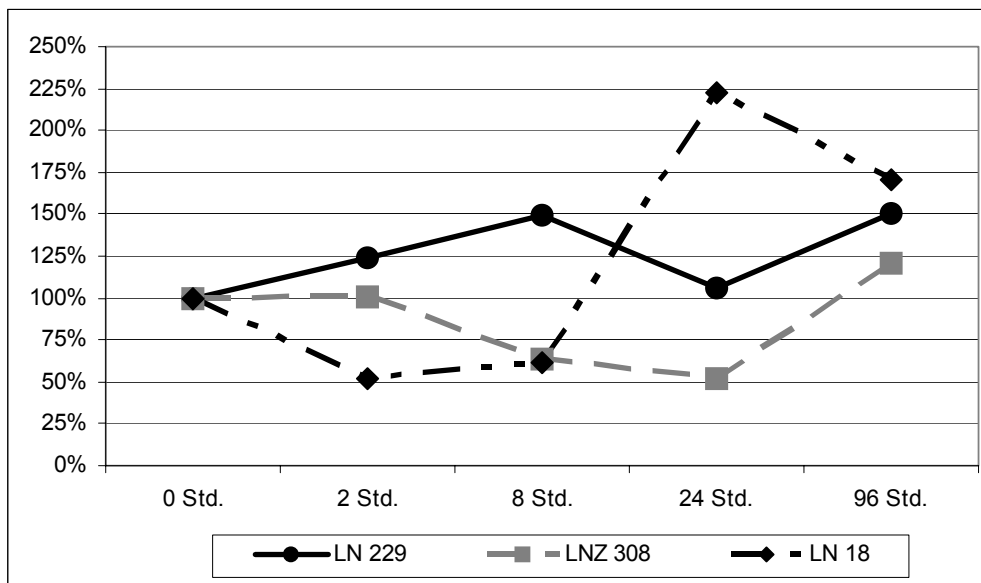
Abbildung 6.4: Entwicklung der Methylierung von MYCC Exon I nach Bestrahlung für LN 18

Für die Zelllinie LN 18 zeigt sich eine Hypermethylierung des 96 und 24-Stundenwertes. Die Kontrolle steigt im Vergleich nur geringfügig an. Die Werte 2 und 8 Stunden nach Bestrahlung stellen jedoch eine Hypomethylierung dar.

Abbildung 6.5: Entwicklung der Methylierung für MYCC Exon I nach Bestrahlung für die Zelllinie G 109

Für die Zelllinie G 109 mit mutiertem *TP53*, zeigt der *Hpa II*-Quotient zunächst ebenfalls eine leichte Hypomethylierung bis zum 24 Stundenwert, dann jedoch eine eindeutige Hypermethylierung, verglichen mit der unbestrahlte Probe. Da technisch bedingt nur ein 72 Stundenwert existiert, erfolgt ein Vergleich mit den etablierten Zelllinien unter Vorbehalt.

Abbildung 6.6: Entwicklung des Hpa II-Quotienten der etablierten Zelllinien im Vergleich



Auf Grund der unterschiedlichen Zeitintervalle, die für die etablierten und die Zelllinie niedriger Passagezahlen (G 109) gewählt wurden, ist die Zelllinien G 109 nicht mit in die vergleichende Abbildung 21 aufgenommen worden.

Trotz der unterschiedlichen Zeitintervalle und des uneinheitlichen Verlaufs der Zelllinien kann in allen vier Zelllinien eine Zunahme der Polymorphismen nach 96 Stunden (72 Stunden für G109) festgestellt werden. Der Methylierungsquotient steigt in allen Linien auf 125 bis 175% des unbestrahlten Ausgangswerts an.

Die Zelllinie LN 229 mit dem Wildtyp *TP53* zeichnet einen prototypischen Verlauf mit konstanter Zunahme der Polymorphismen auf.

Die Zelllinien LN 18 und G109 mit der mutierten Form von *TP53* sowie LN 308, ohne nachweisbares *TP53*, zeigen zunächst eine Hypomethylierung, und erst nach 8 bzw. 24 Stunden eine eindeutige Hypermethylierung.

7. DISKUSSION

Häufig liegen in tumorösen Zellen epigenetische Inaktivierungen von Genen vor, die für die Kontrolle von normalem Zellwachstum essentiell sind. Einer dieser epigenetischen Mechanismen ist die DNA-Methylierung, die neben anderen Komponenten die Genexpression reguliert. Die Re-Expression dieser inaktivierten Gene könnte in der Suppression von Tumorwachstum oder Sensibilisierung für andere Tumorthérapien resultieren.

Von Interesse ist dabei sowohl die Analyse von eben solchen Veränderungen, z.B. der DNA-Methylierung oder der Histonazetylierung in Tumoren, als auch der therapeutische Einsatz von Agenzien bzw. Therapieformen (Radiotherapie), die epigenetische Angriffspunkte haben (Brown und Strathdee`03, Laird`03).

Neben einer physiologischen Variation kommen Veränderungen der Methylierung in manifesten Tumoren oder in Präkanzerosen vor. Globale Hypomethylierungen (Gaudet et al. `03) finden sich u.a. neben speziellen Veränderungen an wichtigen Kontrollgenen der Tumorgenese (Butler et al. `00). So finden sich u.a. Hypermethylierungen bei Tumorsuppressorgenen wie *TP53* und *INKA4a* (Klump et al. `03) neben Hypomethylierungen von Protoonkogenen, wie z.B. *MYCC* (Kroger et al. `03). Beide Variationen bewirken den Verlust der primär tumorpräventiven Funktion dieser Gene.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Methylierungsveränderungen in humanen glialen Tumoren *in vitro* zu untersuchen. Es sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Malignität und Methylierungsveränderungen hergestellt, sowie die Veränderungen der Methylierungsstatus durch Bestrahlung auf das gesamte Genom und am Exon 1 von *MYCC* qualitativ und quantitativ erfaßt werden.

7.1 Zusammenfassende und wertende Darstellung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnten Veränderungen des physiologischen Methylierungszustands in glialen Tumoren festgestellt werden. Mit Hilfe der verwendeten PCR-Methode konnten die Alterationen des Methylierungszustandes als Polymorphismen des Bandenmusters dargestellt und insgesamt eine Zunahme der Polymorphismen des Tumorgewebes im Vergleich zum Normalgewebe detektiert werden.

Diese Zunahme der Polymorphismen wird von uns als Hypomethylierung des Tumorgewebes gewertet.

Da Polymorphismen als Resultat einer veränderten PCR-Kinetik bzw. einer vermehrten Zugänglichkeit von Schnittstellen anzusehen ist, läßt sich eine eindeutige Zunahme von Polymorphismen nicht allein durch eine zufällig veränderte PCR-Kinetik erklären. Viel eher ist neben der zufälligen Variation von einer gerichteten Veränderung, wie z.B. von einer Hypo- bzw. Hypermethylierung der Schnittstellen auszugehen. Da vermehrte Schnittstellen von *Hpa II* zu einer höheren Anzahl von PCR-Produkten und damit Polymorphismen führen, ist eine Hypomethylierung der entsprechenden Sequenzen und damit der *Hpa II*-Schnittstellen anzunehmen. Dies auch dann, wenn eine solche Zuordnung aufgrund der PCR-Kinetik nicht linear sein kann.

Auf Grund der Zunahme der Polymorphismen ist daher eine Hypomethylierung der Schnittstellen anzunehmen, da vermehrt zugängliche Schnittstellen mit einer höheren Anzahl an PCR-Produkten korreliert sind, auch wenn eine solche Zuordnung auf Grund des PCR-Prinzips nicht linear sein kann.

Die vorliegende Hypomethylierung kann als globaler Aktivierungszustand angesehen werden, was die Annahme eines erhöhten Metabolismus der Tumorzellen nahe legt (Esteller et al. '01). Ein veränderter Methylierungsstatus ist neben den glialen Tumoren auch für andere Tumorarten belegt (Herman et al. '94 und '96, Baylin et al. '01, Klump et al. '03), die globale Hypomethylierung in Tumoren nachgewiesen (Gaudet et al. '03).

Zudem konnte eine positive Korrelation des WHO-Grades, bzw. der Malignität glialer Tumoren mit der Zahl der Methylierungspolymorphismen gezeigt werden. Neben dem u.a. auf Grund der Hypomethylierung gesteigerten Aktivierungszustandes, zeichnet sich eine malignitätsabhängige, kontinuierliche Zunahme der Aktivierung der Tumorzellen ab. Dieser graduelle Aktivierungsprozeß ist mit der gesteigerten Invasivität, Angiogenese und Wachstumsgeschwindigkeit höhergradiger Tumoren korreliert (Hwang et al. '01).

Als Ausdruck einer lokalen Hypermethylierung ist ein Fragment mit ca. 517 Bp Länge anzusehen, das ausschließlich im Tumorgewebe des *Hpa II*-Verdaus auftrat (s. z.B. Abb. 8, S.42).

Das Auftreten der Bande im *Hpa II*-verdauten Tumorgewebe läßt auf eine methylierte Schnittstelle schließen, da im Normalgewebe hingegen kein PCR Produkt entstand, folglich ist hier eine unmethylierte Schnittstelle.

Somit ist von einer im Tumorgewebe methylierten Schnittstelle auszugehen.

Ein Auftreten der Bande war für unsere Proben weder mit dem Alter noch mit einem Geschlecht der Patienten korreliert. Es handelte sich dabei um ein häufiges auftretendes Phänomen (17 von 28 DNA-Proben), das ein zunehmendes Auftreten bei steigender Malignität erkennen ließ.

Da die adjuvante Radiotherapie bei GBM *in vivo* als Therapie der Wahl gilt (Yao et al. '03), wurden in humanen Glioblastomzelllinien Methylierungsveränderungen nach Bestrahlung untersucht. Für zwei der drei untersuchten Zelllinien zeigte sich eine Zunahme der Polymorphismen 96 Stunden nach Bestrahlung. Daher könnte, analog zu den Ausführungen S.61 bzgl. der globalen Hypomethylierung, die gerichtete Veränderung der Polymorphismen als bestrahlungsinduzierte Hypomethylierung gewertet werden.

Die zunehmende Hypomethylierung kann sowohl zu gesteigerter transkriptioneller Aktivierung der Tumorzellen mit der möglichen Konsequenz einer nachfolgender Radioresistenz (Moreno et al. '01), als auch zu einer Aktivierung zuvor inaktiver Systeme führen, wie z. B. des in Tumoren oft inaktivierten Mismatch-Repair-Systems (Drummond und Bellacosa '01, Shen et al. '03).

Das unterschiedliche Ansprechen der Zelllinien auf Bestrahlung könnte auch durch den unterschiedlichen *TP53*-Status begründet sein, denn auf Grund der unterschiedlichen Reaktion der Zelllinien nach Bestrahlung läßt sich ein Zusammenhang zwischen funktionellem *TP53* und bestrahlungsinduzierter Methylierungsveränderung herstellen;

Denn die Zelllinie LNZ 308, die eine homozygote Deletion des *TP53*-Gens aufweist und kein *TP53*-Protein exprimiert, zeigte keinerlei Methylierungsveränderung nach Bestrahlung, wohingegen sich das Methylierungslevel der beiden anderen Zelllinien mit Wildtyp *TP53* und mutiertem *TP53* gleichsinnig veränderte.

Daraus ließe sich schließen, daß erst ein bestrahlungsinduzierter *TP53*-abhängiger Zellzyklusstop eine Methylierungsveränderung ermöglicht. Dieser erfolgt jedoch erst nach zwei durchlaufenen Zellzyklen (Zhukovskaya et al. '94) und korreliert daher gut mit dem erst 96 Stunden (2 Generationszeiten) nach Bestrahlung nachweisbaren Bandenpolymorphismus (s. Abb. 11).

Insgesamt zeigte sich damit eine Hypomethylierung nach Bestrahlung, die mit dem vorliegenden *TP53*-Status der etablierten Zelllinie korreliert.

Da die fehlende Apoptosefähigkeit von Tumorzellen oft als Aspekt der Immortalität, bzw. Therapieresistenz (Yao et al. '03) von Tumorzellen gesehen wird (Kanamori et al. '00), sollten Methylierungsveränderungen am Beispiel des *MYCC*-Promotors nachgewiesen werden.

Als Ergebnis zeigte sich eine Veränderung des Methylierungszustandes von *MYCC* nach Bestrahlung im Sinne einer Hypermethylierung und folglich veränderte Funktion bezüglich der Apoptose- und Proliferationsinduktion.

Allen Zelllinien gemeinsam war eine Hypermethylierung des Locus 96 Stunden nach Bestrahlung. Zuvor zeigten die Zelllinien ein unterschiedliches Methylierungsverhalten abhängig von ihrem *TP53*-Status.

Für die Zelllinie mit dem Wildtyp *TP53* (LN 229) zeichnet sich eine direkte und durchgängige Hypermethylierung des Exon 1 ab. Bei einer Hypermethylierung des Promotors ist von einer verminderten Expression des *MYCC*-Gens nach Bestrahlung auszugehen.

Für die anderen Zelllinien zeigte sich ein differentieller Verlauf: für die Intervalle von 2 bis 8 Stunden (LN 18) bzw. 2 bis 24 Stunden nach Bestrahlung (LNZ 308, G109) war zunächst eine Hypomethylierung nachweisbar, die auf eine erhöhte Expression von *MYCC* schließen ließ. Anschließend zeigt sich eine Hypermethylierung des Promotors mit folglich verminderter Expression.

Insgesamt sprechen die vorliegenden Ergebnisse dafür, daß gliale Tumoren auf Bestrahlung mit differentiellen Methylierungsveränderungen reagieren, möglicherweise in Abhängigkeit von ihrem *TP53*-Status der Tumoren.

So sind globale Hypomethylierungen neben lokalen Hypermethylierungen nachweisbar.

Somit ist neben chemischen Agenzien ein therapeutischer Ansatz gefunden, um den Methylierungsstatus beeinflussen zu können. Denn möglicherweise ist über eine Hypomethylierung eine Aktivierung von TSG und des Mismatch-Repair-Systems zu erzielen und über eine Hypermethylierung von *MYCC* ein veränderter Zugang zu programmiertem Zelltod oder Therapieresistenzen zu sehen.

Zudem könnte der Therapieerfolg bzw. die verlängerte Überlebenszeit nach Radiotherapie auf eine Beeinflussung des Methylierungsstatus zurückzuführen sein

Inwiefern sich aus diesen Ergebnissen eine prädiktive Aussage über den Therapieerfolg einer Bestrahlung in Abhängigkeit vom *TP53* Status der Glioblastoma Multiforme ableiten läßt, bleibt weiteren Untersuchungen mit größeren Fallzahlen überlassen.

7.2 Kritische und wertende Darstellung der Methoden

Um Alterationen der Methylierung zu untersuchen, werden oft PCR-basierte Ansätze verwendet, die auf die Arbeit von Singer-Sam zurückgehen, neben Sequenzierungstechniken wie z.B. Southern-Blot-Verfahren oder (Singer-Sam '90). In dieser Arbeit wurde eine Screeningmethode zur Detektion eines sogenannten genetischen Fingerabdrucks für die Methylierung verwendet. Eingesetzt wurde eine methylierungsspezifische PCR-Methode (MS-PCR) auf der Grundlage einer AP-PCR Technik nach Welsh und McClelland (Welsh und McClelland '90). Die Vorteile der AP-PCR-Technik sind in der einfachen und schnellen, aber dennoch sensitiven und

effizienten Methode, sowie deren gut reproduzierbaren Durchführbarkeit begründet (Choi et al. '96, Yamada et al. '00, Ueki et al. '02). In den letzten Jahren wurde sie wiederholt als Screeningmethode für genetische Veränderungen in Tumorzellen eingesetzt, sowohl auf DNA- (Ueki et al. '02) wie auf RNA-Basis (Tortolla et al. '98). Für speziellere Fragestellungen kann die AP-PCR-Technik mit anderen Nachweisverfahren gekoppelt werden und ist in den letzten Jahren zahlreich als methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) zur Entdeckung molekulargenetischer Veränderungen, in vielen verschiedenen Tumorgeweben, z. B. in kolorektalen Tumoren, angewendet worden (Peinado et al. '92, Gonzalzo et al. '96, '97, Esteller et al. '00, Evron et al. '01, Sato et al. '02, Komine et al. '03).

In der hier angewandten MS-PCR wurden die isoschizomeren Restriktionsenzyme *Hpa II* und *Msp I* verwendet, um Unterschiede der Methylierung festzustellen (Gonzalzo et al. '97). Die Restriktionsenzyme wurden bisher mit den verschiedensten Methoden gekoppelt, (Herman et al. '95, '96, Nakamura et al. '01, Davies '02). Der in dieser Arbeit gewählte Einsatz von Restriktionsenzymen ist ebenfalls in der Literatur gut belegt (Gonzalzo et al. '97, Yamada et al. '00).

Der Vorteil der Screeningmethode ist, daß man einen Überblick über die Gesamtheit aller Veränderungen im Genom und deren Richtung gewinnen kann. Ein weiterer Vorteil, den die Fingerprint-Methode liefert, ist die Identifikation und Isolation von Expressionsunterschieden, also von Sequenzen, die über- oder unterrepräsentiert bzw. -exprimiert vorliegen.

Das sogenannte *Fine Tuning* der Expression wird also mit detektiert.

In der Auswertung der MS-PCR muß jedoch berücksichtigt werden, daß durch eine sterische Abstoßung und eine veränderte Chromatinstruktur des methylierten CpGs nicht 100% aller möglichen Schnittstellen von einem Restriktionsenzym geschnitten werden. Somit kann **nicht** davon ausgegangen werden, daß mit der MS-PCR alle Schnittstellen hinsichtlich ihrer Methylierung erfaßt werden (Antequera et al. '90, Herman et al. '96). Auf Grund dieser Tatsache ist in der Auswertung die Anzahl der Polymorphismen der unverdauten DNA **nicht** von der Anzahl der Polymorphismen der *Hpa II* oder *Msp I*-verdauten Proben subtrahiert worden. Es ist zu vermuten, daß eine sterische Abstoßung in einer unverdauten DNA stärker und andersartig auftritt, als in einer vorverdauten Probe. Zudem konnte festgestellt werden, daß PCR-Proben mit einem hohen Anteil an methylierten Sequenzen eine abnorm hohe Beweglichkeit

und Verformung in nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen aufweisen. So kann der Grad der Methylierung zusätzlich zur Größe des Fragments die Wanderungsgeschwindigkeit in Polyacrylamidgelen mit beeinflussen. In Agarosegelen hingegen ist diese Beeinflussung nicht festzustellen (Xydas et al. '96).

Zur Ermittlung der bestrahlungsinduzierten Methylierungsveränderungen wurden ausschließlich Zelllinien verwendet, obwohl eine direkte Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo*-Verhältnisse nicht möglich ist. Allerdings lässt sich diese Art der Versuche aus ethischen Gründen nur an diesen artifiziellen Systemen durchführen.

Eine Abweichung wurde in den Bestrahlungsversuchen zu den *in vivo*-Verhältnisse insofern vorgenommen, daß experimentell nur eine Dosis von 10 Gray Kobalt-Gammastrahlung verwendet wurde, wohingegen bei perkutaner Bestrahlung eines Patienten mit einem GBM Dosen von 60 Gray angewendet werden, wobei die unterschiedliche Eindringtiefe bzw. das notwendige Durchdringen der zwischengeschalteten Knochen *in vivo* zu berücksichtigen gilt (Barker et al. '01, Del Rowe et al. '00, Fisher et al. '01). In der Literatur sind für Bestrahlung von Zelllinien Gray-Dosen von 1-9 bzw. 10 Gray belegt (Matsui et al. '01, Moreno et al. '01, Kalinich et al. '89, '90, '91).

Alternativ zur hier gewählten Methode, die Gesamtdosis auf einmal zu applizieren, hätte auch eine fraktionierter bzw. hyperfraktionierte Bestrahlungsweise erfolgen können, da diese *in praxi* ein häufig gewählter Ansatz ist (Wenz et al.'01). Auch die Wirkung einer postradiären Chemotherapie im Vergleich mit einer präradiären Chemotherapie sollte in einem weiteren Ansatz überprüft werden (Reni et al. '00, Shibamoto et al. '03).

Zusätzlich zum Nachweis globaler Methylierungsveränderungen im gesamten Genom wurden die Methylierungsveränderungen im *MYCC*-Promotor untersucht. Dies v.a. deshalb, da man *MYCC*-Methylierungsveränderungen als relevant für die Tumorgenese ansieht (Obaya et al. '99, s. Einleitung 2.3.).

Verwendet wurde hierfür eine PCR-Methode nach Okada zur speziellen Detektion der Alterationen im Exon 1 von *MYCC*. Diese PCR musste durch eine Reduktion der Zykluszahl modifiziert werden, was zu einer Verringerung der Plateauphase führte, den Ablauf der PCR jedoch nicht beeinflusste.

7.3 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur

Wie bereits zuvor berichtet, konnten in dieser Arbeit Methylierungsveränderungen am Genom von Tumor- im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt werden. So wurden globale Hypomethylierungen neben lokale Hypermethylierungen nachgewiesen. In der Literatur wird die Richtung der Methylierungsveränderungen in Tumoren sehr kontrovers diskutiert. Allen Studien gemeinsam ist, daß Belege für eine Dismethylierung von Tumoren gefunden werden konnten.

Verbreitet ist die Erklärung, daß das Nebeneinander von Hyper- und Hypomethylierungen entweder durch das charakteristische Vorkommen einer der Veränderung in bestimmten Stufen der Tumorgenese zu begründen ist, z.B. der Hypermethylierung in frühen Stadien der Karzinogenese bzw. Präkanzerosen (Kang et al. '03), oder aber eine typische Veränderung von bestimmten Genen ist, wie u.a. eine Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen (Sato et al. '02) bzw. eine Hypomethylierung von Protoonkogenen (Scelfo et al. '02) bzw. globaler Hypomethylierungen (Gaudet et al. '03). Eine Zuordnung der Veränderung zur Malignität oder Art des Tumors bzw. Gens ist ebenfalls beschrieben (Kang et al '03). Globale Hypomethylierungen in Tumoren alter Menschen scheinen parallel zu physiologischen Methylierungsveränderungen im Alter zu existieren (Yung et al. '01, Oakes et al. '03).

Dieses epigenetische Erklärungsmodell der Dismethylierung erweitert das mutagenetische Modell zur Tumorgenese sowohl für die glialen Tumoren (s. Abb.1) als auch für alle anderen Tumorarten nicht nur um einen Faktor, sondern um eine systemische Variante.

Obwohl die adjuvante Radiotherapie, oft in Kombination mit der chirurgischen Resektion der GBM, aktuell als Therapie der Wahl gilt, sind gliöse Tumoren als radioresistent anzusehen (Barker et al. '01, Yao et al. '03). Verantwortlich dafür werden u.a. Veränderungen im Mismatch-Repair-System (Drummond und Bellacosa '01), Alterationen methylbindender Proteine (Schlegel et al. '02) und Methylierungsveränderungen, neben Alterationen von *TP53* (Kim et al. '01), *EGFR*-Amplifikationen (Lammering et al. '01) oder Veränderungen des G1/G2-Checkpoints (Matsui et al. '01) gemacht.

Durch Bestrahlung ausgelöste Methylierungsveränderungen könnten somit Ausdruck von Zellzyklusarresten und von wiederaufgenommenen Reparaturvorgängen sein, eine ausbleibende Veränderung der Methylierung hingegen ein Zeichen von ausbleibenden Arrest und Radioresistenz (Yao et al. '03).

Allerdings werden bestrahlungsinduzierte Methylierungsveränderungen in der Literatur kontrovers diskutiert. Kalinich postulierte, daß Bestrahlung eine Hypomethylierung induziere (Kalinich et al. '91), was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Er belegte zusätzlich, daß eine Hypomethylierung auch mit einer verlängerten Überlebensrate der Zellen nach Bestrahlung einhergehe. Ausgehend von diesen Ergebnissen, könnte der Schluß gezogen werden, daß eine durch Bestrahlung induzierte Hypomethylierung das Tumorgewebe in einen aktivierten Zustand versetzt, der möglicherweise Reparaturgene, TSG oder andere protektive Faktoren reaktivieren könnte. Denn die Beobachtung, daß bestrahlte Zellen eine verlängerte Überlebensrate aufweisen, korreliert mit der verlängerten Überlebensrate von Tumorpatienten mit Radiotherapie (2 bis 12 Monate), auch wenn diese nur gering ist (Holland '00). Neben der verlängerten Überlebensrate der Zellen nach Bestrahlung konnte ein bestrahlungsinduzierter Wachstumsstopp der Zellen, eine einsetzende Differenzierung, sowie eine Demethylierung, vergleichbar den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, nachgewiesen werden (Kalinich et al. '90, '91). Auch eine von der Dosis der Bestrahlung abhängige Abnahme der Proliferationsrate wurde beobachtet (Yao et al. '03).

Ein großer Anteil der Hirntumoren weist *TP53*-Mutationen auf. Es handelt sich dabei häufig um Transitionsmutation in CpG-Stellen des Promotors (Kim et al. '01). Da CpG-Inseln Hauptorte der epigenetischen Expressionsregulation durch Methylierung sind, könnte eine Korrelation von *TP53*-Mutationen und aberranter Methylierung abgeleitet werden. Ein Wildtyp von *TP53* zeigt häufig eine fehlende Expression, für die in einigen Fällen eine Hypermethylierung des Promotors verantwortlich gemacht wird. Denn durch demethylierende Agenzien konnte teilweise eine Expression induziert werden (Komine et al. '03). In diesem Falle könnte eine Veränderung der Methylierung, z.B. durch eine Bestrahlung, ausschlaggebender Faktor zur Re-Expression von *TP53*-und einem dadurch induzierten Zellzyklusarrest, mit Apoptose

oder Reparatur der beschädigten DNA sein. Passend dazu belegen verschiedene Autoren, daß nach Bestrahlung eine erhöhte Expression von *TP53* vorliegt, um die strahleninduzierten Schäden zu beheben (Moreno et al. '01, Stavridi et al. '01).

Eine Aktivierung der *TP53*-Expression nach Bestrahlung mit der beschriebenen Wiederaufnahme der zellulären Funktion wäre auch mit der allgemeinen Hypomethylierung nach Bestrahlung vereinbar.

Um eine Kontrolle und gegebenenfalls eine Reparatur von DNA-Schäden zu ermöglichen, ist ein Zellzyklusarrest nötig. Die Stoppsignale, die Zellen an zwei Punkten im Zellzyklus anhalten lassen, an der G1/S-Phasen-Grenze vor der DNA-Replikation oder der G2/M-Phasen-Grenze vor der Mitose, leiten geschädigte Zellen entweder dem Reparatursystem oder dem Apoptoseweg zu (Matsui et al. '01). Ein ausschlaggebender Regulator der G1/S-Phase-Stopstelle ist das Tumorsuppressorgen *TP53* (Kraus et al. '00, Matsui et al. '01). Ist *TP53* mutiert oder zumindest epigenetisch verändert, kommen die Zellen nicht zu einem Replikationsstopp und vermehren sich in beschädigter Form weiter.

Betrachtet man nun die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, so zeigten sich bei zwei von drei Zelllinien nach 96 Stunden Methylierungsveränderungen nach Bestrahlung. Bei diesen beiden Zelllinien mit Wildtyp *TP53* und mutiertem *TP53* konnte man einen Zyklusarrest annehmen. Dies wird in einem veränderten Methylierungsmuster deutlich, bedingt durch Reparatur- oder Apoptoseinduktion in den Zellen. Bei der dritten Zelllinie ohne exprimiertes Protein p53 könnte aus der fehlenden Methylierungsveränderung ein nicht erfolgter Arrest ohne Modifikation der Zellen oder aber eine Radioresistenz angenommen werden.

Daneben lösen Mutationen von *TP53*, der häufigsten genetische Alteration in Tumoren überhaupt, in manchen Fällen eine sogenannte *tumor-promoting function* aus, eine Aktivierung der transkriptionellen Aktivität und gleichzeitig der Verlust der eigentlichen Tumorsuppressor-Aktivität. Einige Zellen mit *TP53*-Mutationen zeigen parallel dazu ein gesteigertes tumorgenetisches Potential auch mit deutlicher Resistenz gegenüber einer Chemotherapie oder einer Bestrahlungstherapie (Cadwell und Zambetti '01). Möglicherweise ist die starke Wachstumsrate der Zelllinie LN 18, mit mutiertem *TP53*, auf eine solche *promoting function* zurückzuführen. Eine

gesteigerte Radioresistenz, verglichen mit dem Wildtyp *TP53* ließ sich jedoch in unseren Untersuchungen nicht nachzuweisen.

Da eine direkte Korrelation *in vivo* zwischen der Effektivität von ionisierter Bestrahlungstechnik und der apoptotischen Sensibilität von Tumorzellen bestehen soll, wurde und wird das Protoonkogen *MYCC*, das eine Schalterstelle zwischen Apoptose, Differenzierung und Wachstum darstellt, vielfach auf seine Rolle in der Tumorgenese und sein Verhalten bei Therapieerfolgen untersucht (Evan et al. '92, Prendergast '99). Doch obwohl das Protoonkogen gut untersucht ist, stellen sich die Ergebnisse der Untersuchungen in der Literatur sehr kontrovers dar (s. Kap. 1).

Nachgewiesen ist jedoch, daß in vielen tumorös veränderten Zellen die Regulationsfunktion von *MYCC* verändert vorliegt, und Tumorzellen nicht den Apoptoseweg beschreiten, während eine verminderte Expression von *MYCC* mit einer gesteigerten Apoptose in Verbindung gebracht wird (Malkhosyan et al. '98, Peltenburg '00, Queva et al. '01). Starkes und unkontrolliertes Wachstum von Tumorzellen und ein gesteigerter Metabolismus wäre durch einen hypomethylierter Promotor von *MYCC* zu erklären (Hwang et al. '01, Kroger et al. '01).

Eine Hypermethylierung von *MYCC* würde eher die fehlende Fähigkeit zur Differenzierung und gerichteten Proliferation bedingen. Die epigenetischen Veränderungen von *MYCC* könnten eine mögliche Erklärung für die Malignität mit erhöhter Wachstums- und Therapieresistenz, Invasivität und Metastasierung von entdifferenziertem Gewebe sein, wie es häufig bei hochmalignen Tumoren vorkommt (Ge et al. '01, Peltenburg et al. '01, Shen et al. '01). Weitere Studien postulieren ein Nebeneinander von Hypo- und Hypermethylierungen innerhalb eines Tumors (Crossen et al. '01).

Da die Radiotherapie oftmals einen Therapieerfolg mit Lebensverlängerung mit sich bringt, stellt sich die Frage, ob eine Bestrahlung in die Apoptoseregulation eingreift, und wenn ja, ob dies auf der Ebene des *MYCC*-Gens stattfindet. In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, daß eine Hypermethylierung des *MYCC*-Promotors durch Gammastrahlung ausgelöst werden kann. Eine verminderte Expression von *MYCC* könnte den Wachstumsstopp und die Differenzierung der Zellen nach Bestrahlung erklären, besonders deutlich bei der Zelllinien LN 18

(Magnet et al. '01). Es steht damit eine Hypermethylierung des *MYCC*-Gens im Gegensatz bzw. in Ergänzung zu einer globalen Hypomethylierung nach Radiatio. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Ergebnisse von Okada (Okada et al '96).

Die Zelllinie LN 229 ist als Prototyp der bestrahlungsabhängigen Methylierungsveränderung nach Radiatio angesehen worden, da hier ein Wildtyp *TP53* vorliegt, der eine Interferenz von *MYCC*-Veränderungen und gestörtem Zellzyklus durch Veränderungen von *TP53* weitgehend ausschließt, da in der Literatur eine gegenseitige Beeinflussung von *TP53* und *MYCC* diskutiert wird (Annullah et al. '00, Bell et al. '01, Magnet et al. '01, Danielsen et al.'01, Kennedy et al. '01).

Zu berücksichtigen ist jedoch, daß von Tumorgewebe als Basalwert ausgegangen worden ist. Ein Vergleich der Methylierung des *MYCC*-Promotors von Tumor- zu Normalgewebe unabhängig von einer Bestrahlung wurde nicht erstellt. Im Weiteren bleibt zu berücksichtigen, daß eine Expression von *MYCC in vivo* nicht allein durch die Methylierung des Promotors reguliert wird, sondern daß auch eine Bindung des *MYC/MAX*-Komplexes durch die Methylierung der DNA verhindert werden kann.

7.4 Therapeutische Aussichten

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit leiten sich mehrere Ansätze für weiterführende Untersuchung und Therapie ab.

So ist die epigenetische Rolle der Methylierung in der Tumorgenese neben den glialen auch in anderen Tumoren auf Häufigkeit und Relevanz zu untersuchen und die generelle Hypomethylierung der glialen Tumoren miteinander und mit anderen Tumorarten zu vergleichen. Neben *MYCC* stehen noch viele weitere Gene zur Analyse von Methylierungsveränderungen in Tumoren an, um eine Aussage über die Verbreitung und daraus ggf. auch Therapieoptionen abzuleiten. Auch wenn die momentanen Möglichkeiten, die Methylierung zu beeinflussen noch in den Anfängen stecken, da z.B. 5'-aza-2'-cytidin oder auch Zebularine (Cheng et al '03) bezüglich der eigenen Karzinogenität und Mutabilität an einen systemischen Einsatz *in vivo* trotz des Potentials nicht zu denken ist, stellt die prinzipielle Möglichkeit der Reversibilität der Veränderungen im Gegensatz zur Mutation oder Deletion einen sehr interessanten und viel versprechenden Therapieansatz dar. Denn wenn eine Methylierungsveränderung sich analog zum Tumorstadium entwickelt, ist eine

Veränderung des Methylierungsstatus nicht nur als Therapie der Tumoren zu sehen sondern auch als Unterbrechung der Tumorprogression und damit präventiv wirksam.

Die Beeinflussung der Methylierung durch Radiatio scheint zwar von vielen weiteren Faktoren, wie z.B. dem *TP53*-Status abhängig zu sein, die Wirksamkeit ist jedoch auf epigenetischer Ebene bewiesen und eröffnet gleichzeitig eine Vielzahl neuartiger Therapieansätze. Insgesamt leitet sich die Notwendigkeit ab, diagnostische Assays zur Klassifikation der GBM vor einer Therapie einzuführen, um subgruppenspezifisch gezielter therapieren zu können.

Möglicherweise leiten sich aus den epigenetischen Untersuchungen auch unterschiedliche Therapieoptionen für niedrig- und hochmalignen Gliome ab (Watanabe et al. '03). Oder es werden epigenetische Veränderungen als prognostische Faktoren einbezogen, wie es bereits in einer Untersuchung bei Rauchern mit und ohne Lungenkarzinom versucht wurde (Kersting et al. '00).

Dabei bietet die weitere Analyse und Beeinflussung von Methylierungsveränderungen zahlreiche spezifische Therapieoptionen.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Neben mutagenetischen Ansätzen wurden in den letzten Jahren auch vermehrt epigenetische Ansätze in den Entwicklungsmodellen der Tumorgenese und Tumorprogression glialer Tumoren diskutiert. Dabei spielt die Kontrolle der transkriptionellen Aktivität durch DNA-Methylierung die größte Rolle. Diese Veränderungen könnten neben ihrer tumorbiologischen Bedeutung auch für die Therapie der malignen Gliome relevant sein, denn insbesondere als Reaktion auf adjuvante Therapien konnten Veränderungen der DNA-Methylierung nachgewiesen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Ausmaß und die Bedeutung der DNA-Methylierung in humanen glialen Tumoren *in vivo* und *in vitro* zu erfassen. Dazu wurden zwei methodische Ansätze gewählt:

1. Mit einem methylierungssensitiven DNA-Fingerabdruck als Screeningverfahren sollten genomische Veränderungen der Gesamtmethylierung im Vergleich der DNA glialer Tumoren unterschiedlicher Malignitätsgrade mit der Kontroll-DNA aus dem peripheren Blut des jeweils gleichen Patienten ermittelt werden.
2. Mit derselben Methode wurde die DNA von Glioblastomzelllinien nach experimenteller Bestrahlung auf Methylierungsveränderungen im Vergleich zur nicht-bestrahlten DNA untersucht.
3. Am Beispiel eines tumorbiologisch relevanten Genes, des MYCC-Gens, sollten Veränderungen der Methylierung nach einer experimentellen Strahlenbehandlung in etablierten Glioblastomzellen erfaßt werden.

Mit Hilfe der Fingerabdruck-Methode konnte in den hier untersuchten Tumoren eine generelle Hypomethylierung nachgewiesen werden, die in Übereinstimmung mit dem Ergebnissen der Literatur als Hinweis auf eine transkriptionelle Aktivierung gewertet werden kann. Daraus könnten typische Veränderungen von Tumorzellen, wie abnormes Wachstum, Zellpolymorphismen, Angiogenese und Metastasierung abgeleitet werden. Die Ergebnisse zeigen aber auch, daß grundsätzlich einzelne Loci erfaßt wurden, deren Veränderungen als Hypermethylierung und damit transkriptionelle Herunterregulation angesehen werden muß. Hypermethylierungen

für Tumorsuppressorgene oder zellzyklusregulierende Genen sind vielfach beschrieben.

Daraus ergibt sich ein komplexer Befund, der im Rahmen einer generellen Hypomethylierung im Tumorgenom einzelne hypermethylierte Gene annehmen läßt. Aufgrund dieser Daten ist von einer Dismethylierung in humanen Gliomen zu sprechen.

Dieser Befund zeigt in den hier untersuchten Tumoren eine Zunahme mit dem Grad der Malignität, was darauf hinweist, daß in den hochmalignen Gliomen Methylierungsveränderungen eine größerer Rolle zu spielen scheinen.

In den experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit fand sich eine Hypermethylierung des *MYCC*-Promotors 96 Stunden nach einer einmaligen Bestrahlung mit 10Gray, was etwa zwei Zellzyklen entspricht und damit der bekannten Zellzyklus-Arretierung humaner Gliome nach Bestrahlung einherging. Diese Veränderung schien *TP53*-abhängig zu sein, da sie nur in Zelllinien mit dem Wildtyp *TP53* auftrat, die erst nach 96 Stunden in eine Hypermethylierung wechselte.

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit, daß eine Bestrahlung differenzielle Methylierungsveränderungen zur Folge hat, die in die Genregulation eingreifen, könnten die Veränderungen nach Strahlentherapie darüber hinaus ein Hinweis auf eine Mitbeteiligung der DNA-Methylierung bei der Weiterentwicklung der gerade in malignen Gliomen bedeutenden Therapieansätze sein.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahuja, N., Issa, JP. Aging, methylation and cancer, *Histo Histopathol.* 15: 835-842, 2000.
2. Amanullah, A., Liebermann, D., and Hoffman, B. P53 independent apoptosis associated with c-Myc mediated block in myeloid cell differentiation, *Oncogene.* 15: 2967-2977, 2000.
3. Anderson, C. and Brown, C. Variability of X-chromosome inactivation: effect on levels of TIMP1 RNA and role of DNA methylation, *Hum Genet.* 110: 271-278, 2002.
4. Antequera, F. and Boyes, J. High Levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG Islands in cell lines, *Cell.* 62: 503-514, 1990.
5. Bakker, J., Lin, X. and Nelson, W. Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated p-class glutathione S-transferase gene promoters in hepato cellular carcinoma cells, *J Biol Chem.* 17:, 2002.
6. Barker, FN., Simmons, M., Chang, S., Prados, M., Larson, D., Sneed, P., Wara, W., Berger, M., Chen, P., Israel, M. and Aldape, K. EGFR overexpression and radiation in glioblastoma multiforme, *Int J Radiat Oncol.* 1: 410-418, 2001.
7. Baylin, S., Makos, M., Wu, J., Yen, R., de Bustros, A., Vertino, P. and Nelkin, B. Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression, *Cancer Cells.* 3: 383-390, 1991.
8. Baylin, S., Blinsky, S. and Herman, J. Aberrant methylation of gene promoters in cancer-concepts, misconcepts, and promise, *J Natl Cancer Inst.* 92: 1460-1461, 2000.
9. Baylin, S., Esteller, M., Routree, M., Bachman, K., Schuebel, K. and Herman, J. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer, *Hum Mol Genet.* 10: 687-692, 2001.

10. Bell, H., Whittle, I., Walker, M., Leaver, H. and Wharton, S. The development of necrosis and apoptosis in glioma : experimental findings using spheroid cultur systems, *Neuropathol Appl Neurobiol.* 27: 291-304, 2001.
11. Besson, A. and Yong, V. Mitogenetic signaling and the relationship to cell cycle regulation in astrozytomas, *J Neurooncol.* 51: 245-264, 2001.
12. Bestor, T. and Verdine, G. DNA methyltransferase, *Curr Opin Cell Biol.* 6: 380-389, 1994.
13. Bhattacharya, S., Ramchandani, S., Cervoni, N. and Styf, M. Mammalian protein with specific demethylase activity for CpG DNA, *Nature.* 397: 579-583, 1999.
14. Bird, A., Tsggart, M., Nicholls, R. and Higgs, D. Non-methylated CpG-rich islands at the human α -globin locus: implications for evolution of the α -globin pseudogen, *EMBO J.* 6: 999-1004, 1987.
15. Bird, A. CpG-rich islands and the function of DNA methylation, *Nature.* 321: 209-213, 1986.
16. Boys, J. and Bird, A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein, *EMBO J.* 11: 327-333, 1992.
17. Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A. and Cedar, H. Sp1 elements protect a CpG-Island from de novo methylation, *Nature.* 371: 435-438, 1994.
18. Brown, R. and Strathee, G. Epigenetics and epigenetic therapy of cancer, *Trends Mol Med.* 8: 43-48, 2002.
19. Butler, T., Kay, P. and Jacobsen, P. Hypomethylation of cytosin 5-methyltransferase in human neoplasms, *Anticancer Res.* 20: 1435-1438, 2000.
20. Cadwell, C. and Zambetti, G. The effect of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth, *Gene.* 17: 15-30, 2001.
21. Carrel, L. and Willard, H. Counting on Xist, *Nature Genetics.* 19: 211-212, 1998.

22. Cheng, J., Matsen, C., Gonzales, F., Ye, W., Greer, S., Marquez, V., Jones, P. and Selker, E. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine, *J Natl Cancer Inst.* 95: 399-409, 2003.
23. Clerc, P. and Avner, P. Multiple elements within the Xic regulate random X inactivation in mice, *Semin Cell Dev Biol.* 14: 85-92, 2003.
24. Cole, M. and McMahon, S. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation, *Oncogene.* 18: 2916-2924, 1999.
25. Comb, M. and Goodman, H. CpG methylation inhibits proencephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2, *Nucl Acid Res.* 18: 3975-3982, 1990.
26. Costello, J., Futscher, B., RA., K. and Pieper, R. Methylation-related chromatin structure is associated with excision of transcriptional factors from suppressed expression of the O-6-Methylguanine DNA Methyltransferase gene in human glioma cell lines, *Mol Cell Biol.* 14: 6515-6521, 1994.
27. Costello, J., Berger, M., Huang, H. and Cavenee, W. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation, *Cancer Res.* 56: 2405-2410, 1996.
28. Costello, J., Fruhwald, M., Smiraglia, D., Rush, L., Robertson, G., Gao, X., Wright, F., Feramisco, J., Peltomaki, P., Lang, J., Schuller, D., Yu, L., Bloomfield, C., Caligiuri, M., Yates, A., Nishikawa, R., SuHuang, H., Petrelli, N., Zhang, X., O'Dorisio, M., Held, W., Cavenee, W. and Plass, C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns, *Nat Genet.* 24: 132-138, 2000.
29. Costello, J., Plass, C. and Cavenee, W. Aberrant methylation of genes in low-grade astrocytomas, *Brain Tumor Pathol.* 17: 49-56, 2000.
30. Counts, J. and Goodman, J. Alteration in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis, *Cell.* 83: 13-15, 1995.
31. Cross, S. H., Charlton, J. A., Nan, X. and Bird, A. Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column, *Nature Genetics.* 6: 236-244, 1994.
32. Crossen, P. and Morrison, M. Methylation status of the 3rd exon of the c-myc oncogene in B-Cell malignancies, *Leuk Res.* 23: 251-253, 1999.

33. Curradi, M., Issa, A., Badaracco, G. and Landsberger, N. Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation, *Mol Cell Biol.* 22: 3157-3173, 2002.
34. Danielson, T., Smith, S., B., Gronlund, H., Hvidsten, M., Borresen-Dale, A. and Rofstad, E. No association between radiosensitivity and TP53 status, G1 arrest or protein levels of p53, myc, ras or raf in human melanoma lines, In *J Radiat Biol.* 75: 1149-1160, 1999.
35. Davies, C. Methylation-sensitive restriction fingerprinting, *Methods Mol Biol.* 200: 43-51, 2002.
36. Debinski, W., Gibo, D. and Mintz, A. Epigenetics in high-grade astrocytomas: opportunities for prevention and detection of brain tumors, *Ann N Y Acad Sci.* 983: 232-242, 2003.
37. Del Rowe, J., Scott, C., Werner-Wasik, M., Bahary, J., Curran, W., Urtasun, R. and Fisher, B. Single-arm, open-label phase II study of intravenously administered tirazamind and radiation therapy for glioblastoma multiforme, *J Clin Oncol.* 18: 1254-1259, 2000.
38. Dietz, L., Wylie, A., Rauen, K., Jirtle, R. and Cotter, P. Exclusion of maternal uniparental disomy of chromosome 14 in patients referred for Prader-Willi syndrome using a multiplex methylation polymerase chain assay, *J Med Genet.* 40: 46, 2003.
39. Drummond, J. and Bellacosa, A. Human DNA mismatch repair in vitro operates independently of methylation status at CpG sites, *Nucl Acid Res.* 29: 2234-2243, 2001.
40. Eng, C., Herman, J. and Baylin, S. A bird's eye view of global methylation, *Nat Genet.* 24: 101-102, 2000.
41. Esteller, M., Tortola, S., Toyota, M., Capella, G., Peinado, M., Baylin, S. and JG., H. Hypermethylation-associated inactivation of p14 (ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status, *Cancer Res.* 60: 129-133, 2000.
42. Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Goodman, S., Hidalgo, O., Vanaclocha, V., Baylin, S. and Herman, J. Inactivation of the DNA-repair MGMT and the

-
- clinical response of the gliomas to alkylating agents, *Nat Engl J Med.* 343: 1350-1354, 2000.
43. Esteller, M., Corn, P., Baylin, S. and Herman, J. A gene hypermethylation profile of human cancer, *Cancer Res.* 61: 3225-3229, 2001.
 44. Evan, G., Wyllie, A., Gilbert, C., Littlewood, T., Land, H., Brooks, M., Waters, C., Penn, L. and Hancock, D. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein, *Cell.* 69: 119-128, 1992.
 45. Evron, E., Dooley, W., Umbricht, C., Rosenthal, D., Sacchi, N., Gabrielson, E., Soito, A., Hung, D., Lijung, B., Davidson, N. and Sukumar, S. Detection of breast cancer cell in ductal cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR, *The Lancet.* 357: 1335-1336, 2001.
 46. Evron, E., Umbricht, C., Korz, D., Raman, V., Loeb, D., Niranjan, B., Buluwela, L., Weizman, S., Marks, J. and Sukumar, S. Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation, *Cancer Res.* 61: 2782-2787, 2001.
 47. Fearon, E. and Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell.* 61: 759-767, 1990.
 48. Feinberg, A. and Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes gene of some human cancers from their normal counterparts, *Nature.* 301: 89-92, 1983.
 49. Fisher, B., Leighton, C., Vujovic, O., Macdonald, D. and Sitt, L. Results of a policy of surveillance alone after surgical management of pediatric low grade gliomas, *In J Radiat Oncol Biol Phys.* 51: 704-710, 2001.
 50. Gallant, P., Yuzuru, S., Cheng, P., Parkhurst, S. and Eisenman, R. Myc and Max homologs in *Drosophila*, *Science.* 274: 1523-1527, 1996.
 51. Gama-Sosa, M., Slagel, V., Trewyn, R., Oxenhandler, R., Kuo, K., Gehrke, C. and Ehrlich, M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors, *Nucl Acid Res.* 11: 6883-6894, 1983.
 52. Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. CpG islands in vertebrates genomes, *J Mol Biol.* 196: 261-282, 1987.
-

-
53. Gaudet, F., Hodgson, J., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausmann, J., Ge, J., Leonhardt, H. and Jaenisch, R. Inductions of tumors in mice by genomic hypomethylation, *Science*. 300: 489-492, 2003.
 54. Ge, R., Wang, W., Kramer, P., Yang, S., Tao, L. and Pereira, M. Wy-14,643-induced hypomethylation of the c-myc gene in mouse liver, *Toxicol Scien*. 62: 28-35, 2001.
 55. Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M. and Westphal, M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment, *J Clin oncol*. 21: 1624-1636, 2003.
 56. Gonzalgo, M. and Jones, P. Mutagenetic and epigenetic effects of DNA methylation, *Mutation Res*. 386: 107-118, 1997.
 57. Grant, S. and Chapman, V. Mechanismes of X-Chromosome regulation, *Annu Rev Genet*. 22: 199-233, 1988.
 58. Herman, J., Latif, F., Weg, Y., Lerman, M., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D., Gnarr, J., Linehan, W. and Baylin, S. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma, *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 9700-9704, 1994.
 59. Herman, J. G., Merlo, A., Mao, L., Lapidus, R., Issa, J., Davidson, N., Sidransky, D. and Baylin, S. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers, *Cancer Res*. 55: 425-4530, 1995.
 60. Herman, J., Graff, J., Myöhänen, S., Nelkin, B. and Baylin, S. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG Islands, *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 9821-9826,, 1996.
 61. Homann, W., Takeuchi, S., Frantzen, M., Hoeltzer, D. and Koeffler, H. Loss of genomic imprinting of insulin-like growth factor 2 is strongly associated with cellular proliferation in normal hematopoietic, *Exp Hematol*. 2002: 318-323, 2002.
 62. Holland, E. Glioblastoma multiforme, *PNAS*. 6: 6242-6244, 2000.
 63. Hsieh, C. Dynamics of DNA methylation pattern, *Curr Opinion Dev*. 10: 224-228, 2000.

-
64. Hwang, J., Lim, S., Kim, Y., Park, K., Ahn, S. and Chung, W. Apoptosis and bcl-2 expression as predictors of survival in radiation-treated non-small lung cancer, In *J Radiat Oncol Biol Phys.* 50: 13-18, 2001.
 65. Jeltsch, A. Beyond watson and crick. DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferase, *ChemBiochem.* 3: 274-293, 2002.
 66. Jones, P. DNA methylation errors and cancer, *Cancer Res.* 56: 2463-2467, 1996.
 67. Kalinich, J., Catravas, G. and Snyder, S. The effect of radiation on DNA methylation, *Rad Res.* 117: 185-197, 1989.
 68. Kalinich, J., Catravas, G. and Snyder, S. Radioprotective properties of DNA methylation-disruption agents, *Int J Radiat Biol.* 59: 1217-1226, 1991.
 69. Kanduri, M., Kanduri, C., Maiano, P., Vostov, A., Quintsche, W., Lobanenkov, V. and Ohlsson, R. Multiple nucleosome positioning sites regulate the CTCF-mediated insulator funktion of the H19 imprinting control region, *Mol Cell Biol.* 22: 3339-3344, 2002.
 70. Kang, G., Lee, S., Kim, J. and Jyng, H. Profile of aberrant CpG island methylation along multistep gastric carcinogenesis, *Lab Invest.* 83: 519-526, 2003.
 71. Kanomori, M., Kon, H., Nobukuni, S., Sugano, K., Mashiyama, S., Kumabe, T., Yoshimoto, T., Meuth, M., Sekiya, T. and Murakami, Y. Microsatellite instability and the PTEN 1 gene mutation in a subset of early onset gliomas carrying germline mutation or promotor methylation of the hMLH1 gene, *Oncogene.* 19: 1564-1571, 2000.
 72. Kennedy, A., Harrison, G., Mansfield, C., Zhou, X., Xu, J. and Balcer-Kubiczek, E. Survival of colorectal cancer cell lines treated with paclitaxal, radiation, and 5-FU: effect of TP53 of hMLH1 deficiency, *Int J Cancer,* 2000.
 73. Kersting, M., Friedl, C., Kraus, A., Behn, M., Pankow, W. and Schuermann, M. Differential frequencies of p16 (INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers, *J Clin Oncol.* 18: 3221-3229, 2000.

74. Kim, I., Yang, Y., Yoon, S., Choi, I., Kay, C., Kwon, H., Kim, C., Joe, Y., Kang, J. and Hong, Y. Potential of adenoviral p53 gene therapy and irradiation for treatment of malignant gliomas, In *J Oncol.* 19: 1041-1047, 2001.
75. Kleihues, P., Burger, P. and Scheithauer, B. Histological typing of tumors of the central nervous system, Berlin: Springer-Verlag. *2nd edition*., 1994.
76. Kleihues, P. and Cavenee, W. Pathology and genetics of tumours of the nervous system, Lyon: International Agency for Research on Cancer. *1st edition*., 1997.
77. Kleihues, P. and Ohgaki, H. Primary and secondary glioblastoma: from concept to clinical diagnosis, *Neuro Oncol.* 1: 44-51, 1999.
78. Klump, B., Hsieh, C., Nehls, O., Dette, S., Holzmann, K., Kiesslich, R., Jung, M., Sinn, U., Ortner, M., Porschen, R. and Gregor, M. Methylation status of p14ARF and p16INK4a as detected in pancreatic secretions, *Br J Cancer.* 88: 217-222, 2003.
79. Komine, C., Watanabe, T., Katayama, Y., Yoshino, A., Yokoyama, T. and Fukushima, T. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase is an independent predictor of shortend progression free survival in patients with low-grade diffuse astrocytomas, *Brain Pathol.* 13: 176-184, 2003.
80. Kondo, Y., Schen, L. and Issa, P. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer, *Mol Cell Biol.* 23: 206-215, 2003.
81. Kovalchuk, O., Burke, P., Arkhipov, A., Kuchma, N., James, S., Kovalchuk, I. and Pogribny, I. Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl-mechanism for radiation adaptation? *Mutat Res.* 529: 13-20, 2003.
82. Kraus, A. Functional analysis of the molecular response to ionising radiation in malignant human glial tumors in vitro, Dissertation, 1998.
83. Kraus, A. and Schuermann, M. Molecular detection of gene mutations and methylation abnormalities: application in solid tumor diagnosis, *Expert Rev Mol Diagn.* 2: 97-108, 2002.

-
84. Kroger, L., DeNardo, G., Gumerlock, P., Xiong, C., Winthrop, M., Shi, X., Mack, P., Leshchinsky, T. and DeNardo, S. Apoptosis-related gene and protein expression in human lymphoma xenografts (Raji) after low dose rate radiation using ^{67}Cu -21T-Bat-Lym-1 radioimmunotherapy, *Cancer Biother Radiopharm.* 16: 213-225, 2001.
 85. Laird, P., Jackson-Grusby, L., Fazeli, A., Dickinson, S., Jung, W., Li, E., Weinberg, R. and Jaenisch, R. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation, *Cell.* 81: 197-205, 1995.
 86. Laird, P. The power and the promise of DNA methylation markers, *Nat Rev Cancer.* 3: 253-266, 2003.
 87. Lammering, G., Hawkins, W., Contessa, J., Reardon, D., Lin, P., Valerie, K., Dent, P., Mikkelsen, R. and Schmidt-Ullrich, R. Epidermal growth factor receptor as a genetic therapy target for carcinoma cell radiosensitization, *J Natl Cancer Inst.* 93: 921-929, 2001.
 88. Lee, J. Molecular links between X-Inactivation and autosomal imprinting: X-Inactivation as a driving force for the evolution of imprinting, *Curr Biol.* 13: R242-254, 2003.
 89. Lewis, J. and Bird, A. DNA methylation and chromatin structure, *FEBS.* 285: 155-159, 1991.
 90. Li, E., Beard, C. and Jaenisch, R. Role for methylation in genomic imprinting, *Nature.* 366: 362-365, 1993.
 91. Lucifero, D., Mertineit, C., Clarke, H., Bestor, T. and Trasler, J. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells, *Genomics.* 79: 530-539, 2002.
 92. Lyon, M. The William Allan memorial award address: X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes, *Am J Hum Genet.* 42: 8-16, 1988.
 93. Lyon, M. X-chromosome inactivation and human genetic disease, *Acta Paedtr Suppl.* 91: 107-112, 2002.
 94. Magnet, K., Orr, M., Cleveland, J., C., R.-G., Yan, H., Yang, C., Di, Y., Jan, P. and Gewirtz, D. Suppression of c-myc expression and c-myc function in

-
- response to sustaine DNA damage in MCF-7 breast tumor cells, *Biochem Pharmacol.* 62: 593-602, 2001.
95. Malkhosyan, S., Yasuda, J., Soto, J., Sekiya, T., Yokota, J. and Perucho, M. Molekular karyotype (amplotype) of metastatic colorectal cancer by unibased arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting, *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 10270-10175, 1998.
96. Mateyak, M., Obaya, A., Adachi, S.,and Sedivy, J. Phenotypes of c-myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination, *Cell Growth Differentiation.* 8: 1039-1048, 1997.
97. Matsui, Y., Tsuchida, Y. and Keng, P. Effects of p53 Mutation on cellular sensitivity to ionizing radiation, *Am J Oncol.* 24: 486-490, 2001.
98. McClelland, M. and Welsh, J. DNA Fingerprinting by arbitrarily primed PCR, *PCR Methods and Applications.* 4: 559-565, 1994.
99. Mobio, T., Anane, R., Baudrimont, I., Carratu, MR., Shier, TW., Dano, SD., Ueno, Y. and Creppy, EE. Epigenetic properties of funisin B1. cell cycle arrest and DNA base modifiaction in C6 glioma cells, *Toxicol Appl Pharmacol.* 164: 91-96, 2000.
100. Momparler, R. and Bovenzi, V. DNA methylation and cancer, *J Cell Physiol.* 183: 145-154, 2000.
101. Moreno, S., Dutrillaux, B. and Coffigny, H. Status of p53, p21, mdm2, pRb proteins, and DNA methylation in gonozytes of control and gamma-irradiated rats during testicular development, *Biol Reprod.* 64: 1422-1431, 2001.
102. Mummanemi, P., Walker, K., Bishop, P. and Turker, M. Epigenetic gene inactivation induced by a cis-acting methylation centre, *J Biol Chem.* 270: 788-792, 1995.
103. Mummaneni, P., Bishop, P. and Turker, M. A cis-acting element accounts for a conserved methylation pattern upstream of the mouse adenine phosphoribosyltransferase gene, *J Biol Chem.* 268: 552-558, 1993.
104. Myöhänen, S., Baylin, S. and Herman, J. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia, *Cancer Res.* 58: 591-593, 1998.
-

-
105. Nakamura, M., Watanabe, T., Klangby, U., Asker, C., Wiman, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P. and Ohgaki, H. P14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastoma, *Brain pathol.* 11: 159-168, 2001.
 106. Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleihues, P. and Ohgaki, H. Promoter methylation of DNA repair genes MGMT in astocytomas ist frequently associated with G:C-->A.T mutations of the TP53 tumor suppressor gene, *Carcinogenesis.* 22: 1715-1719, 2001.
 107. Nakamura, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P. and Ohgaki, H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastoma, *Lab Invest.* 81: 77-82, 2001.
 108. Oakes, C., Smiraglia, D., Plass, C., Trasler, J. and Robaire, B. Aging results in hypermethylation of ribosomal DNA in sperm and liver of male rats, *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 1775-1780, 2003.
 109. Obaya, A., Meteyak, M. and Sedivy, J. Mysterious liasons: the relationship between c-Myc and the cell cycle, *Oncogene.* 18: 2934-2941, 1999.
 110. Ohgaki, H., Schauble, B., zur Hausen, A. von Ammon, K., and Kleihues, P. Genetic alterations associated with evolution and progression of astrocytic brain tumors, *Virchows Arch.* 427: 113-118, 1995.
 111. Ohno, S. Springer Verlag, 1967.
 112. Okada, G., Ryoyama, K., Nomura, T., Momoi, T., Tsuchiya, H., Kameyama, T. and Yamaguchi, K. Carcinogen-induced de novo methylation in c-myc exon 1, *Jpn J Med Sci Biol.* 49: 209-218, 1996.
 113. Okazaki, Y., Okuizumi, H., Sasaki, N., Ohsumi, T., Kuromitus, J., Hirota, N., Muramatsu, M. and Hayashizaki, Y. An expanded system of restriciton landmark genomic scanning (RLGA Verl.1.8), *Electrophoresis.* 16: 197-202, 1995.
 114. Ono, T., Uehara, Y., Kurishita, A., Tawa, R. and Sakurai, H. Biological significance of DNA methylation in the aging process, *Age and Ageing.* 22: 34-43, 1993.
 115. O'Hagan, R., Schreiber-Agus, N., Chen, K., David, G., Engelmann, J., Schwab, R., Alland, L., Thomson, C., Ronning, D., Sachettini, J., Meltzer, P.

-
- and De Pinho, R. Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis, *Nat Genet.* 24: 113-119, 2000.
116. Packer, R. Brain tumors in children, *Curr Opin Ped.* 8: 549-555, 1996.
117. Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Velazquez, A. and Perucho, M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerases chain reaktion, *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 10065-10069, 1992.
118. Pelteburg, L. Radiosensitivity of tumor cells. Oncogenes and apoptosis, *Q J Nucl Med.* 44: 355-364, 2000.
119. Prendergast, C., D., L. and Ziff, E. Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation- sensitive DNA binding and ras cotransformation, *Cell.* 65: 395-407, 1991.
120. Prendergast, G. Mechanisms of apoptosis by c-Myc, *Oncogene.* 18: 2967-2987, 1999.
121. Queva, C., McArthur, G., Iritani, B. and Eisenman, R. Targed deletion of the S-phase-specific Myc antagonist MAD3 sensitizes neuronal and lymphoid cells to radiation-induced apoptosis, *Mol Cell Biol.* 21: 703-712, 2001.
122. Ramchandani, S., Bhattacharya, S., Cervoni, N. and Szyf, M. DNA methylation is a reversible biological signal, *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 6107-6112, 1999.
123. Reni, M., Cozzarini, C., Ferreri, A., Ceresoli, G., Galli, L., Bianchi, A. and Villa, E. A retrospective analysis of postradiation chemotheray in 133 patients with glioblastoma multiforme, *Cancer Invest.* 18: 510-515, 2000.
124. Rickman, D., Bobeck, M., Misek, D., Kuick, R., Blaivas, M., Kurnit, D., Taylor, J. and Harnash, S. Distinctive molecular profile of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis, *Cancer Res.* 61: 6885-6891, 2001.
125. Riggs, A. and Pfeiffer, G. X-chromosome inactivation and cell memory, *Trends in Genetic.* 8: 169-174, 1992.
126. Rountree, M., Bachman, K., Herman, J. and Baylin, S. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer, *Oncogene.* 20: 3156-3165, 2001.
-

-
127. Roy, D., Calaf, G. and Hei, T. Profiling of differentially expressed genes induced by high linear energy transfer radiation in breast epithelial cells, *Mol Carcinogen.* 31: 192-203, 2001.
 128. Royuela, M., de Miguel, M., Ruiz, A., Fraile, B., Arenas, M., Romo, E. and Paniagua, R. Interferon-gamma and its functional receptors overexpression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma: parallelism with c-myc and p53 expression, *Eur Cytokine Netw.* 11: 119-127, 2000.
 129. Saito, T., Nishimura, M., Yamasaki, H. and Kudo, R. Hypermethylation in promoter region of E-cadherin gene is associated with tumor dedifferentiation and myometrial invasion in endometrial carcinoma, *Cancer.* 97: 1002-1009, 2003.
 130. Sambrook, J., Frisch, E. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd Edition, 1989.
 131. Scelfo, R., Schwienbacher, C., Veronese, A., Gramantieri, L., Bolondi, L., Querzoli, P., Nenci, I., Calin, G., Angioni, A., Barbanti-Brodano, G. and Negrini, M. Loss of methylation at chromosom 11p15.5 is common in human adult tumors, *Oncogene.* 21: 2564-2572, 2002.
 132. Schlegel, J., Merdes, A., Stumm, G., Albert, F., Forsting, M. and Hynes, N. Amplifikation of the Epidermal-Growth-Factor-Receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma, *Int J Cancer.* 56: 72-77, 1994.
 133. Schlegel, J., Stumm, G., Scherthan, H., Bocker, T., Zirngibl, H., Rüschoff, J. and Hofstätter, F. Comparative genoms in situ hybridization of colon carcinomas with replication error, *Cancer Res.* 55: 6002-6005, 1995.
 134. Schlegel, J., Gueneysu, S. and Mennel, HD. Expression of the genes of methyl-binding domain proteins in human gliomas, *Oncol Rep.* 9: 393-395, 2002.
 135. Seifart, C. and von Wichert, P. Genetik des Asthmas- aus klinischer Sicht, *Der Internist.* 8: 1082-1086, 2001.

-
136. Shannon, B. and Iacopetta, B. Methylation of the hMLH1, p16, and MDR1 genes in colorectal carcinoma: associations with clinicopathological features, *Cancer Letters*. 167: 91-97, 2001.
 137. Shen, L., Kondo, Y., Hamilton, S., Rashid, A. and Issa, JP. P14 methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53, *Gastroenterology*. 124: 626-633, 2003.
 138. Shibamoto, Y., Tomita, N., Kono, T., Tsuji, H., Nankoh, S. and Taniguchi, H. Evidence-based radiation therapy for primary brain tumor, *Gan To Kagaku Ryoho*. 30: 348-353, 2003.
 139. Silva, A. and White, R. Inheritance of allelic blueprints for methylation patterns, *Cell*. 54: 145-152, 1988.
 140. Singer-Sam, J., LeBon, J., Tanguay, R. and Riggs, A. A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA from a small number of cells, *Nucl Acid Res*. 18: 687, 1990.
 141. Smiraglia, D., Rush, L., Fruhwald, M., Dai, Z., Held, W., Costello, J., Lang, J., Eng, C., Li, B., Wright, F., Califuri, M. and Plass, C. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies, *Hum Mol Genet*. 10: 1413-1419, 2001.
 142. Stavridi, E., Chehab, N., Malikzay, A. and Halazonetis, T. Substitutions that compromise the ionizing radiation-induced association of p53 with 14-3-3 proteins also compromise the ability of p53 to induce cell cycle arrest, *Cancer Res*. 19: 7030-7033, 2001.
 143. Sure, U., Ruedi, D., Tachibana, O., Yonekawa, Y., Ohgaki, H., Kleihues, P. and Hegi, M. Determination of p53 mutation, EGFR overexpression, and loss of p16 expression in pediatric glioblastoma, *J Neuropathol Exp Neurol*. 56: 782-789, 1997.
 144. Thomas, G. and Williams, E. Production of thyroid tumors in mice by demethylating agents, *Carcinogenesis*. 13: 1039-1042, 1992.
 145. Tortola, S., Capella, G., Marcuello, E., Günther, K., Aiza, G., Mazramon, L., Reymond, M. and MA., R. Analysis of differential gene expression in human colorectal tumor tissues by RNA arbitrarily primed PCR: A technical assessment, *Laboratory Investigation*. 78: 1-9, 1998.

146. Tremonts-Lukats, I. and Gilbert, M. Advances in molecular therapies in patient with brain tumors, *Cancer Control*. 10: 125-137, 2003.
147. Turker, M. S. and Bestor, T. H. Formation of methylation patterns in the mammalian genome, *Mutation Reserch*. 386: 214-217, 1997.
148. Ueki, T., Walter, K., Skinner, H., Jaffe, E., Hruban, R. and GogginsM. Aberrant CpG island methylation in cancer cell lines arises in the primary cancers from witch they were derived, *Oncogene*. 27: 2114-2117, 2002.
149. Van Meir, E., Roemer, K., Diserens, A., Kikuchi, T., Rempel, S., Haas, M., Huang, H., Friedmann, T., Tribolet, N. and Cavanee, W. Single cell monitoring of growth arrest and morphological changes induced by transfer of wild-type p53 alleles to glioblastoma cells, *Proc Natl Acad Sci*. 92: 1008-1012, 1995.
150. VandenBerg, S. Current diagnostics of astrozytic tumors, *J Neuropath Exp Neurol*, 1992.
151. Verlicescu, M., Weisenberger, D., Gonzales, F., Tsai, Y., Nguyen, C. and Jones, P. Cell division is required for de novo methylation of CpG islands in bladder cancer cells, *Cancer Res*. 62: 2378-2384, 2002.
152. Watanabe, T., Katayman, Y., Yoshino, A., Komin, C., Yokoyman, T. and Fukushima, T. Treatment of low-grade diffuse astrocytomas by surgery and human fibroblast interferon without radiation therapy, *J Neurooncol*. 61: 171-176, 2003.
153. Watson, R. and Goodman, J. Epigenetics and DNA methylation come of age in toxicology, *Toxicol Sci* 11-16, 2002.
154. Welsh, J. and McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucl Acid Res*. 18: 7213, 1990.
155. Welsh, J., Petersen, C. and McClelland, M. Polymorphisms genetrated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping, *Nucl Acid Res*. 19: 303-306, 1990.
156. Welsh, J. and McClelland, M. Genomic fingerprints produced by PCR with consensus DNA gene primers, *Nucl Acid Res*. 19: 861, 1990.
157. Welsh, J. and McClelland, M. Fingerprinting genoms using PCR with arbitrary primers, *Nucl Acid Res*. 18: 7213, 1990.

158. Welsh, J. and McClelland, M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combination of primers, *Nucl Acid Res.* 19: 5275-5279, 1991.
159. Wenz, F., Tiefenbacher, U., Willeke, F. and Weber, K. The search for therapeutic gain in radiation oncology, *Onkologie.* 24: 51-55, 2001.
160. Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J. and Tingey, S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucl Acid Res.* 18: 6531-6535, 1990.
161. Wood, L., Dolde, C., Mukherjee, M., Maher, J., Bunton, T., Williams, J. and Resar, L. HMG-I/Y, a new c-Myc target gene and potential oncogene, *Mol Cell Biol.* 20: 5490-5502, 2000.
162. Xydas, S., Lange, C. and Neimark, D. H. Effects of methylation on the electrophoretic mobility of chromosomal DNA in pulsed-field agarose gels, *Applied Theo Electr.* 6: 43-47, 1996.
163. Yamada, T., Kohno, T., Navarro, J., Ohwada, S., Perucho, M. and Yokota, J. Frequent chromosome 8q gains in human small cell lung carcinoma detected by arbitrarily primed-PCR genomic fingerprinting, *Cancer Genet Cytogenet.* 120: 11-17, 2000.
164. Yang, L. and Sasaki, M. Tans-regulated silencing and reactivation of tp53 tumor suppressor gene in malignant transformation and its reversion, *Jpn J Cancer Res.* 91: 1111-1118, 2000.
165. Yao, K., Komata, T., Kondo, Y. and Germano, IM. Molecular response of human glioblastoma multiforme cells ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy, *J Neurosurg.* 98: 378-384, 2003.
166. Yung, R., Ray, D., Eisenbraun, J., Deng, C., Attwood, J., Eisenbraun, M., Johnson, K., Miler, R., Hanash, S. and Richardson, B. Unexpected effects of a heterozygous dnmt 1 null mutation on age-mutation on age-dependent DNA hypomethylation and autoimmunity, *J Geront A Biol Sci Med Sci.* 56: B268-276, 2001.

167. Zikovskaya, N., Branch, P., Aquilina, G. and Karran, P. DNA replication arrest and tolerance to DNA methylation damage, *Carcinogenesis*. 15: 2189-2194, 1994.

10. LEBENS LAUF

Name.	Suzan Hofmaier, geborene Güneysu
Geburtsdatum	29.09.1974
Geburtsort	Werne an der Lippe
Familienstand.	verheiratet
Adresse:	Normannenstr.72, 42277 Wuppertal
Telefon	0202/7478595
Ehemann	Armin Hofmaier, Arzt
Vater	Ahmet Güneysu, Studienrat, † 2002
Mutter	Maria Elisabeth Güneysu, geb Pölker, Studienrätin, † 1983
	Ludgera Güneysu, geb. Terhorst, Realschullehrerin
1981-1985	Schule in der Mark, Grundschule Kamen- Heeren -Werve
1985-1994	Geschwister-Scholl Gymnasium Unna
1994	Abitur
1994-2000	Studium der Humanmedizin an der Philippsuniversität Marburg
2000-2001	Praktisches Jahr an den Kliniken St. Antonius in Wuppertal, Lehrkrankenhaus der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
2002-2003	AIP in der Akutgeriatrie Prof. Dr. med. I. Füsgen der Kliniken St. Antonius Wuppertal
Seit 2003	Assistenzärztin in der Geriatrie Prof. Dr. med. I. Füsgen der Kliniken St. Antonius Wuppertal
1999-2003	Ausbildung in „Arbeit am Tonfeld“ bei Prof. H. Deuser, Hinterzarten
2002-2004	Lehrtätigkeit in Innerer Medizin und Geriatrie für Krankenpfleger und Ergotherapeuten

(Suzan Hofmaier)

11. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Hans Schwering, außerplanmäßiger Professor für Chirurgie an der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster und Chefarzt der chirurgischen Abteilung des akademischen Lehrkrankenhauses Marienhospital Euskirchen danke ich herzlich für die freundliche Hilfestellung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Frau PD. Dr. med. Dorothee Decker, Oberärztin der Klinik und Politik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn bin ich für die stets freundliche und fachkompetente Beratung zu großem Dank verpflichtet.

Meinem Ehemann, Armin Hofmaier, danke ich ganz besonders für die liebevolle Unterstützung und Korrektur dieser Arbeit.

Ebenfalls danken möchte ich meiner lieben Familie für die Unterstützung, insbesondere meinen lieben Bruders Tim für die Formatierung und technische Fertigstellung.