

Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Innere Medizin

Klinik Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Hartmut Döhner

**Verminderte Expression von
O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase bei
Gliomen durch Promotormethylierung**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von

Carla Nickolay

Göppingen

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Mathias Schmid

2. Berichterstatter: PD Dr. Ansgar Schulz

Tag der Promotion: 23.10.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Gehirntumoren	1
1.2 Myelodysplastische Syndrome	8
1.3 Methylierung	14
1.4 Epigenetic Gene Silencing durch Hypermethylierung der Promotorregion	16
1.5 MGMT	18
1.6 Epigenetic Gene Silencing von MGMT in Gliomen	21
1.7 Das alkylierende Chemotherapeutikum Temozolomid	23
1.8 Zielsetzung der Doktorarbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.2 Patienten	30
2.3 DNA	34
2.4 Proteine	43
2.5 Kultivierung von Zelllinien	45
2.6 Statistik	46
3 Ergebnisse	47
3.1 Hirntumorpatienten	47
3.2 MDS-Patienten	62
4 Diskussion	68
4.1 MGMT-Promotormethylierung bei Hirntumoren	68
4.2 MGMT-Promotormethylierung bei myelodysplastischem Syndrom . . .	79
5 Zusammenfassung	82

Inhaltsverzeichnis

6 Literaturverzeichnis	84
Danksagung	96

Abkürzungsverzeichnis

5-Aza	5-Azacytidin
A	Adenin
A5PS	Adenosin-5'-phosphosulfat
AA	Anaplastisches Astrozytom
A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AOA	Anaplastisches Oligoastrozytom
AOD	Anaplastisches Oligodendrogliom
ATP	Adenosin-triphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca	Karzinom
CD	Cluster of differentiation
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myelo-monozytäre Leukämie
CpG	Cytosine preceding Guanine
dATP	Desoxy-adenosin-triphosphat
dl	Deziliter

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ECL	Enhanced Chemoluminescence
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
F	forward
FAB	French-American-British Cooperative Group (Klassifikation)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration der USA
G	Guanin
GBM	Glioblastoma multiforme
GRE	Glucocorticoid responsive element
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HRP	Horse radish peroxidase
hTERT	humane Telomerase reverse Transkriptase
IgG	Immunglobulin G
IPI	International Prognostic Index
IPSS	International Prognostic Scoring System
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
m	Meter
M	molar

Abkürzungsverzeichnis

mA	Milliampere
MBD	Methyl-CpG-binding domain
m ⁵ C	5-Methylcytosin
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MeCP	Methyl-CpG-binding protein
meth.	methyliert
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-morpholino) propansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSP	Methylspezifische PCR
NaOH	Natriumhydroxid
NHA	Normale humane Astrozyten
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
O ⁶ mG	O ⁶ -Methylguanin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
PPi	Pyrophosphat

Abkürzungsverzeichnis

PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	reverse
RA	Refraktäre Anämie
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RAEB	Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten
RAEB-T	Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten in Transformation
PBSCT	Peripheres Blutstammzelltransplantat
RCDM	Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RS	Ringsideroblasten
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	sekundär
SV40ER	Simian Virus 40 early region
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
U	Unit
um	Mikrometer
unmeth.	unmethyliert
UV	ultraviolett
WB	Westernblot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WPSS	WHO Classification-Based Prognostic Scoring System
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Gehirntumoren

Unter Gehirntumoren versteht man Tumoren, die sich im Schädelinneren entwickeln und das Gehirn und den betroffenen Patienten in unterschiedlicher Weise beeinträchtigen können. Gehirntumoren zählen zu den selteneren Tumorenarten und liegen in ihrer Häufigkeit deutlich hinter Mamma-Karzinomen, Bronchial-Karzinomen und gastrointestinalen Karzinomen. Nur ca. 1,6%-2% aller neu diagnostizierten Krebserkrankungen entfallen auf Hirntumoren. Man unterscheidet zwischen primären und sekundären Hirntumoren, wobei sekundäre Hirntumore ausserhalb des Gehirns entstandene Tumoren mit zerebralen Metastasen darstellen. Als primäre Hirntumoren werden Tumore bezeichnet, die sich aus verschiedenen Zellen des Gehirns entwickeln können. Die häufigsten primären Hirntumoren sind Gliome, die aus Zellen des Stützgewebes des Gehirns, der zerebralen Glia, entstehen. Dabei können verschiedene Gliome anhand ihrer Ursprungszellen unterschieden werden: Astrozytome entstehen aus den sternförmigen Stützzellen des Gehirns (Astrozyten), Oligodendrogliome aus den Markscheiden der Nervenzellen (Oligodendrozyten) und Ependymome aus Zellen, die die Ventrikel und den Zentralkanal des Rückenmarks auskleiden (Ependymzellen).

1.1.1 Epidemiologie

Gehirntumoren können in jedem Lebensalter entstehen, am häufigsten jedoch jenseits des 60. Lebensjahres. Ein weiterer Altersgipfel liegt im Kindesalter. Die Inzidenz für primäre Hirntumore, die mit steigendem Lebensalter zunimmt, beträgt 8 bis 12 pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Weltweit werden ca. 130 000 primäre intrakranielle Tumoren pro Jahr neu diagnostiziert (Parkin et al. 1999), in 50% der Fälle handelt es sich dabei um Gliome. An zweiter Stelle sind Meningeome mit 24%. Seltener sind Hypophysenadenome, Schwannome und primäre ZNS-Lymphome. In Deutschland erkranken ca. 8000 Menschen pro Jahr an einem primären Gehirntumor. Unterteilt man Hirntumore in gut- und bösartige Tumore anhand ihres WHO-Gradings, so machen Gliome 80% der bösartigen primären Hirntumoren aus (Schwartzbaum et al. 2006). Gliome werden anhand ihrer Ursprungszellen unterschieden. Astrozytome stellen mit 75% die größte Gruppe dar, wobei das Glioblastoma multiforme (oder Glioblastom) über 50% aller astrozytären Gliome ausmacht.

Die Langzeit-Überlebensraten für primäre Hirntumoren, insbesondere bösartige Hirntumoren (WHO-Grad III und IV), sind schlecht. Durch die Verbesserung von Therapiemaßnahmen in Neurochirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie konnte die 5-Jahresüberlebensrate für primäre Hirntumoren von 22,3% (1976) auf 33,3% (2001) gesteigert werden (Ries et al. 2003). Die Überlebensrate ist stark von Subtyp und WHO-Grad des Tumors abhängig, so liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit Astrozytomen WHO-Grad II zwischen 50% und 60%. Eine sehr schlechte 5-Jahres-Überlebensrate von unter 2% zeigen Glioblastome, mit einer mittleren Überlebenszeit von ca. 1 Jahr (14,6 Monate nach multimodaler Therapie) nach Diagnosestellung (Stupp et al. 2005). Auch die Altersverteilung für die einzelnen Subtypen ist unterschiedlich. Für Astrozytome mit WHO-Grad II liegt das mediane Alter bei Erstdiagnose zwischen 30 und 40 Jahren, für Glioblastome beträgt das mediane Alter 53 Jahre. Hirntumoren sind für 2-3% der krebsbedingten Todesfälle verantwortlich (Parkin et al.

1 Einleitung

1999, Kleihues et al. 2002).

1.1.2 Ätiologie

Für die Entstehung von primären Gehirntumoren konnten bislang nur wenige auslösende Faktoren identifiziert werden. Ein gehäuftes Auftreten von Gehirntumoren wurde nach vorhergehender Schädelbestrahlung, z.B. bei Kindern mit ALL nach prophylaktischer Schädelbestrahlung, nach Bestrahlung von anderen intrazerebralen Tumorerkrankungen, z.B. Hypophysenadenomen, Kraniopharyngeomen, Pinealistumoren, Germinomen, Gliomen, sowie nach niedrigdosierter Bestrahlung bei Tinea capitis nachgewiesen. Zusätzlich kann es neben einer familiären Häufung auch im Rahmen von vererbten Tumorsyndromen z.B. Li-Fraumeni-Syndrom, tuberöse Sklerose, Neurofibromatose, Turcot-Syndrom oder M. Ollier (multiple Enchondromatose) zum Auftreten von Hirntumoren kommen. Als auslösende chemische Noxen gelten Vinylchlorid, petrochemische Produkte und fraglich eine Pestizid-/Herbizid-Exposition. Auch der Einfluss elektromagnetischer Strahlung, z.B. von Hochspannungsmasten und Funktelefonen, ist fraglich. Andere auslösende Faktoren sind bis heute nicht bekannt.

1.1.3 Klassifikation

Anhand der 5 Kriterien Kernatypien, mitotische Aktivität des Tumors, Zelldichte, Gefäßproliferation und Nekrosen werden primäre Hirntumoren mit Hilfe der WHO-Klassifikation in 4 Grade unterteilt.

Zur Veranschaulichung ist hier die WHO-Klassifikation der Astrozytome mit den jeweiligen mittleren Überlebenszeiten dargestellt:

WHO-Grad I:

Pilozytisches Astrozytom Überlebenszeit: > 10 Jahre

1 Einleitung

WHO-Grad II (1/5 Kriterien: meist Kernatypien):

Diffuses Astrozytom Überlebenszeit: > 5 Jahre

WHO-Grad III (2/5 Kriterien: meist Kernatypien und mitotische Aktivität):

Anaplastisches Astrozytom (AA) Überlebenszeit: 2-5 Jahre

WHO-Grad IV (3/5 Kriterien: Kernatypien, mitot. Aktivität, Gefäßprolif. +/- Nekrose):

Glioblastoma multiforme (GBM) Überlebenszeit: < 1 Jahr

Der WHO-Grad der Tumoren korreliert mit der Aggressivität des Tumors und lässt Aussagen über die Prognose zu.

1 Einleitung

WHO Classification of Tumours of the Nervous System

TUMOURS OF NEUROEPITHELIAL TISSUE

Astrocytic tumours

Diffuse astrocytoma	9400/3 ¹
Fibrillary astrocytoma	9420/3
Protoplasmic astrocytoma	9410/3
Gemistocytic astrocytoma	9411/3
Anaplastic astrocytoma	9401/3
Glioblastoma	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
Pilocytic astrocytoma	9421/1
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1

Oligodendroglial tumours

Oligodendroglioma	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma	9451/3

Mixed gliomas

Oligoastrocytoma	9382/3
Anaplastic oligoastrocytoma	9382/3 ²

Ependymal tumours

Ependymoma	9391/3
Cellular	9391/3
Papillary	9393/3
Clear cell	9391/3
Tanycytic	9391/3
Anaplastic ependymoma	9392/3
Myxopapillary ependymoma	9394/1
Subependymoma	9383/1

Choroid plexus tumours

Choroid plexus papilloma	9390/0
Choroid plexus carcinoma	9390/3

Glial tumours of uncertain origin

Astroblastoma	9430/3
Gliomatosis cerebri	9381/3
Chordoid glioma of the 3 rd ventricle	9444/1

Neuronal and mixed neuronal-glia tumours

Gangliocytoma	9492/0
Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	9493/0
Desmoplastic infantile astrocytoma / ganglioglioma	9412/1
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Ganglioglioma	9505/1
Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Central neurocytoma	9506/1
Cerebellar liponeurocytoma	9506/1
Paraganglioma of the filum terminale	8680/1

Neuroblastic tumours

Olfactory neuroblastoma (Aesthesioneuroblastoma)	9522/3
Olfactory neuroepithelioma	9523/3
Neuroblastomas of the adrenal gland and sympathetic nervous system	9500/3

Pineal parenchymal tumours

Pineocytoma	9361/1
Pineoblastoma	9362/3
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3

Embryonal tumours

Medulloepithelioma	9501/3
Ependymoblastoma	9392/3
Medulloblastoma	9470/3
Desmoplastic medulloblastoma	9471/3
Large cell medulloblastoma	9474/3
Medullomyoblastoma	9472/3
Melanotic medulloblastoma	9470/3
Supratentorial primitive neuroectodermal tumour (PNET)	9473/3
Neuroblastoma	9500/3
Ganglioneuroblastoma	9490/3
Atypical teratoid/rhabdoid tumour	9508/3

TUMOURS OF PERIPHERAL NERVES

Schwannoma

(Neurilemmoma, Neurinoma)	9560/0
Cellular	9560/0
Plexiform	9560/0
Melanotic	9560/0

¹ Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) and the Systematized Nomenclature of Medicine (SNOMED). Behaviour is coded /0 for benign tumours, /1 for low or uncertain malignant potential or borderline malignancy, /2 for *in situ lesions* and /3 for malignant tumours.

² The italicised numbers are provisional codes proposed for the third edition of ICD-O. They should, for the most part, be incorporated into the next edition of ICD-O, but they are subject to change.

Abbildung 1: Klassifikation der Gehirntumoren nach WHO (World Health Organisation) Teil 1

1 Einleitung

Neurofibroma	9540/0	Chondrosarcoma	9220/3
Plexiform	9550/0	Osteoma	9180/0
Perineurioma	9571/0	Osteosarcoma	9180/3
Intraneural perineurioma	9571/0	Osteochondroma	9210/0
Soft tissue perineurioma	9571/0	Haemangioma	9120/0
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	9540/3	Epithelioid haemangioendothelioma	9133/1
Epithelioid	9540/3	Haemangiopericytoma	9150/1
MPNST with divergent mesenchymal and / or epithelial differentiation	9540/3	Angiosarcoma	9120/3
Melanotic	9540/3	Kaposi sarcoma	9140/3
Melanotic psammomatous	9540/3	Primary melanocytic lesions	
		Diffuse melanocytosis	8728/0
		Melanocytoma	8728/1
		Malignant melanoma	8720/3
		Meningeal melanomatosis	8728/3
TUMOURS OF THE MENINGES		Tumours of uncertain histogenesis	
Tumours of meningotheial cells		Haemangioblastoma	9161/1
Meningioma	9530/0	LYMPHOMAS AND HAEMOPOIETIC NEOPLASMS	
Meningothelial	9531/0	Malignant lymphomas	9590/3
Fibrous (fibroblastic)	9532/0	Plasmacytoma	9731/3
Transitional (mixed)	9537/0	Granulocytic sarcoma	9930/3
Psammomatous	9533/0	GERM CELL TUMOURS	
Angiomatous	9534/0	Germinoma	9064/3
Microcystic	9530/0	Embryonal carcinoma	9070/3
Secretory	9530/0	Yolk sac tumour	9071/3
Lymphoplasmacyte-rich	9530/0	Choriocarcinoma	9100/3
Metaplastic	9530/0	Teratoma	9080/1
Clear cell	9538/1	Mature	9080/0
Chordoid	9538/1	Immature	9080/3
Atypical	9539/1	Teratoma with malignant transformation	9084/3
Papillary	9538/3	Mixed germ cell tumours	9085/3
Rhabdoid	9538/3	TUMOURS OF THE SELLAR REGION	
Anaplastic meningioma	9530/3	Craniopharyngioma	9350/1
Mesenchymal, non-meningothelial tumours		Adamantinomatous	9351/1
Lipoma	8850/0	Papillary	9352/1
Angiolipoma	8861/0	Granular cell tumour	9582/0
Hibernoma	8880/0	METASTATIC TUMOURS	
Liposarcoma (intracranial)	8850/3		
Solitary fibrous tumour	8815/0		
Fibrosarcoma	8810/3		
Malignant fibrous histiocytoma	8830/3		
Leiomyoma	8890/0		
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyoma	8900/0		
Rhabdomyosarcoma	8900/3		
Chondroma	9220/0		

Abbildung 2: Klassifikation der Gehirntumoren nach WHO (World Health Organisation) Teil 2

1.1.4 Klinik

Je nach Geschwindigkeit des Tumorwachstums können sich Symptome sehr langsam oder aber extrem rasch, innerhalb von Tagen bis wenigen Stunden, entwickeln. Symp-

1 Einleitung

tome können mitunter charakteristisch für eine bestimmte Gehirnregion, aber auch vieldeutig und unspezifisch sein.

Allgemeine Symptome als Zeichen eines erhöhten Hirndrucks, die bei etwa 50% der Patienten auftreten, sind Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Typisch für Kopfschmerzen im Rahmen eines gesteigerten intrazerebralen Drucks ist ihr Auftreten während der Nacht und in den frühen Morgenstunden mit einer spontanen Besserung im Laufe des Tages. Bei etwa 20% der Patienten führt das Auftreten eines ersten epileptischen Anfalls im Rahmen der weiteren Abklärung zur Diagnosestellung. Je nach Lage des Tumors können bereits bei Diagnosestellung oder im Verlauf der Erkrankung fokalneurologische Ausfälle auftreten. Je nach betroffenem Gebiet kann es sich dabei um Sprach- und Sprechstörungen, motorische Störungen mit Hemiparesen oder Hemiplegien, sensible Störungen mit Parästhesien oder Dysästhesien, Koordinationsstörungen, mnestiche Störungen oder Sehstörungen handeln. Durch Angehörige und Patienten häufig als sehr beunruhigend und bedrohlich wahrgenommen werden Veränderungen der Persönlichkeit in unterschiedlicher Ausprägung.

1.1.5 Prognosefaktoren

Als wichtige Prognosefaktoren für Gliome konnten folgende Faktoren identifiziert werden: Alter bei Erstdiagnose, Ausmaß der Tumorresektion, Karnofsky-Index und Folstein mini-mental Status, WHO-Grad des Tumors, sowie Tumorhistologie und fraglich eine Kontrastmittelanreicherung in der Bildgebung (Buckner 2003, Lacroix et al. 2001). Ein besonders relevanter Einfluss auf die Prognose wurde für das Ausmaß der Tumorresektion bestätigt. Eine Resektion von mehr als 98% der Tumormasse führt bei Glioblastomen zu einem signifikant längeren Überleben (Ammirati et al. 1987). Die mediane Überlebenszeit lag in einer Studie von Lacroix et al. bei 13 Monaten verglichen mit 8,8 Monaten bei Tumorresektionen von weniger als 98% der Tumormasse (Lacroix et al. 2001). Außerdem spielen genetische Faktoren eine wichtige Rolle. Bei anaplastischen

1 Einleitung

Oligodendrogliomen verbessert die gleichzeitige Deletion von 1p und 19q die Chemosensitivität und führt so zu einer längeren Überlebenszeit (Cairncross et al. 1998, Smith et al. 2000). Für maligne Astrozytome (WHO-Grad III und IV) konnte ein besseres Ansprechen auf eine Therapie mit Nitrosoharnstoffen oder Temozolomid bei Nachweis einer Hypermethylierung des MGMT-Promotors gezeigt werden (Hegi et al. 2004, Brell et al. 2005, Watanabe et al. 2005, Kamiryo et al. 2004, Tanaka et al. 2003).

1.2 Myelodysplastische Syndrome

Bei dem myelodysplastischen Syndrom, MDS, handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von hämatologischen Erkrankungen mit Veränderungen des Knochenmarks und des Blutbildes. Ursächlich liegt eine klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen zugrunde, die mit einer erhöhten Zelldichte im Knochenmark und Reifungsstörungen in einer oder mehreren Zellreihen einhergeht. Im peripheren Blut zeigen sich typischerweise Zytopenien. Das myelodysplastische Syndrom geht häufig in eine akute myeloische Leukämie, AML, über.

Man unterteilt das myelodysplastische Syndrom in ein primäres MDS, dessen auslösende Noxe bisher unbekannt ist, und das sekundäre MDS. Dieses kann z.B. nach einer vorangegangenen Chemotherapie aufgrund einer anderen Erkrankung oder durch eine Exposition gegenüber Benzolen oder organischen Lösungsmitteln auftreten. Das sekundäre MDS macht < 5% der Fälle aus.

1.2.1 Epidemiologie

Die Inzidenz des myelodysplastischen Syndroms beträgt 4 pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Sie steigt mit zunehmendem Alter an und beträgt in der Altersgruppe über 70 Jahre 20 pro 100 000 Einwohner pro Jahr (Williamson et al. 1994, Aul et al. 1992). Für Männer konnte in einigen Studien eine höhere Inzidenz (4,5 pro 100 000 im Vergleich

1 Einleitung

zu 2,7 pro 100 000 pro Jahr für Frauen) gezeigt werden (Rollison et al. 2006, Aul et al. 1992). Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt bei ca. 70 Jahren.

1.2.2 Klassifikation

Myelodysplastische Syndrome wurden bis 2001 nach der FAB-Klassifikation eingeteilt, die teilweise im klinischen Alltag weiterhin verwendet wird. Seit 2001 erfolgt die Einteilung der myelodysplastischen Syndrome jedoch nach der WHO-Klassifikation.

Zur Veranschaulichung werden hier beide Klassifikationen dargestellt.

Die FAB-Klassifikation unterteilt die myelodysplastischen Syndrome in fünf unterschiedliche Gruppen:

1. RA: Refraktäre Anämie
2. RARS: Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
3. RAEB: Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten (10-20% Blasten im Knochenmark)
4. RAEB-T: Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten in Transformation (20-30% Blasten im Knochenmark)
5. CMML: Chronisch myelo-monozytäre Leukämie

Im Gegensatz zur FAB-Klassifikation berücksichtigt die WHO-Klassifikation, s. Tab. 1, zusätzlich genetische Veränderungen, unilineäre und multilineäre Dysplasien (Vardiman 2006). Die CMML gehört nun zu den myeloproliferativen Syndromen. Eine akute Leukämie wird bei $>20\%$ Blasten im Knochenmark definiert.

1 Einleitung

Tabelle 1: WHO Klassifikation des myelodysplastischen Syndroms (MDS)

Modifiziert nach H.-J. Fricke, K.-O. Kliche, C. Kunert, K. Höffken

KM = Knochenmark; WHO = World Health Organisation

WHO-Subtyp	Blasten im peri- pheren Blut	Blasten im KM	Weitere Veränderungen
Refraktäre Anämie (RA)	$\leq 1\%$	$< 5\%$	Unilineäres MDS erythropoetische Dysplasie
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	$\leq 1\%$	$< 5\%$	Unilineäres MDS, erythro- poetische Dysplasie, $> 15\%$ Ringsideroblasten im KM
Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien (RCDM)	$\leq 1\%$	$< 5\%$	Multilineäre Dysplasien
Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien und Ringsideroblasten (RCMD-RS)	$\leq 1\%$	$< 5\%$	Multilineäre Dysplasien, $> 15\%$ Ringsideroblasten im KM
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss 1 (RAEB-1)	$< 5\%$	5-9%	Uni- od. Multilineäres MDS keine Auer-Stäbchen
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss 2 (RAEB-2)	5-19%	10-19%	Uni- od. Multilineäres MDS evtl. Auer-Stäbchen
5q-Anomalie	$< 20\%$	$< 20\%$	Isolierter 5q-Defekt
Unklassifiziertes MDS (MDS-U)	$\leq 1\%$	$< 5\%$	ausgeprägte Myelofibrose, hypozelluläre MDS, MDS im Kindesalter, therapieassoziierte MDS

1.2.3 Klinik

Zur Diagnostik des myelodysplastischen Syndroms existiert kein typisches klinisches Bild. Mehr als ein Drittel der Diagnosen werden zufällig gestellt. Mögliche Symptome können jedoch durch den Schweregrad der Anämie und ggf. durch eine Verschlechterung dieser Anämie auftreten. Dazu gehören insbesondere unspezifische Anämiesymptome wie Müdigkeit, Kältegefühl, Tachykardie, Inappetenz, Rückgang der körperlichen Leistungsfähigkeit oder Tremor. Außerdem kann es in Abhängigkeit von der Ausprägung des MDS aufgrund einer Leukozytopenie zu rezidivierenden Infekten, insbesondere Pneumonien, Sinusitiden und anderen respiratorischen Infekten, kommen. Im Routine-Blutbild kann sich neben einer Anämie in unterschiedlich starker Ausprägung eine Leukozytopenie und Thrombozytopenie zeigen. Klinisch relevante Blutungen aufgrund der Thrombozytopenie treten jedoch erst in fortgeschrittenen Stadien mit stark erniedrigten Thrombozytenzahlen oder bei Übergang in eine akute Leukämie auf. Zur Diagnosestellung müssen andere auslösende Faktoren und Diagnosen ausgeschlossen werden. Somit ist die Diagnose des MDS eine Ausschlussdiagnose und beruht sowohl auf Veränderungen in Blutbild und Knochenmark, als auch auf bestimmten genetischen Veränderungen.

1.2.4 Pathogenese

Der Pathomechanismus des primären MDS ist nur teilweise geklärt. Eine wichtige Rolle spielen Veränderungen in der Regulation der Apoptose. Zu Beginn der Erkrankung scheint die Apoptose gesteigert zu sein. Erst in fortgeschrittenen Stadien werden Signale für eine gesteigerte Proliferation und eine verminderte Apoptose gefunden (Parker and Mufti 2004).

Ein myelodysplastisches Syndrom geht in ca. 50% der Fälle mit Chromosomenaberrationen einher. Es kommen sowohl einzelne numerische Aberrationen, wie Deletionen

1 Einleitung

von 5q, 7q, 20q, sowie Monosomie 7, Trisomie 8, als auch Veränderungen an mehreren Chromosomen gleichzeitig, sogenannte komplexe Karyotypen, vor (Fenaux 2001, Chen et al. 2004). Diese unterschiedlichen genetischen Veränderungen können zu einer veränderten Aktivität von Tumorsuppressorgenen führen (Hirai 2002). Unter anderem wurde eine vermehrte Methylierung von Tumorsuppressorgenen wie p15 und SOCS1 insbesondere bei Hochrisikopatienten beschrieben (Quesnel et al. 1998).

Außerdem können Störungen von Kontrollmechanismen durch Genmutationen oder epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierung ein MDS begünstigen. Hierbei spielen die Familien der „Checkpointgene“ bzw. der „Mismatchreparogene“ wie CHK2 und das Mismatchreparagen O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, MGMT, eine wichtige Rolle (Hofmann et al. 2001, Hofmann et al. 2006, Herman and Baylin 2003).

1.2.5 Prognosefaktoren

Die Prognose eines MDS-Patienten kann mithilfe des International Prognostic Scoring Systems (IPSS) eingeschätzt werden. Dieser Prognosescore berücksichtigt sowohl den Blastenanteil im Knochenmark als auch die Ausprägung der Zytopenie und zytogenetische Faktoren (Greenberg et al. 1997).

Zytopenie im Rahmen dieses Prognosescores ist definiert als Granulozytopenie mit Granulozyten $<1500/\mu\text{l}$, Anämie mit einem Hb $<10\text{g/dl}$ und Thrombozytopenie mit Thrombozyten $<100\ 000/\mu\text{l}$.

Die zytogenetischen Faktoren im Rahmen des Scores werden in 3 verschiedene Gruppen eingeteilt: Die prognostisch gute Gruppe zeigt entweder keine chromosomalen Abnormalitäten oder eine isolierte Deletion von 5q, 20q oder des Y-Chromosoms. In die zytogenetisch schlechte Prognosegruppe gehören Patienten mit einer Deletion 7 oder mehr als 3 chromosomalen Veränderungen, also einem komplexen Karyotyp. Alle anderen genetischen Veränderungen gehören zur intermediären Prognosegruppe. Zur Veranschaulichung wird der Prognosescore anhand der folgenden Tabelle dargestellt.

1 Einleitung

Tabelle 2: MDS Prognosescore

MDS = Myelodysplastisches Syndrom; KM = Knochenmark

Scoring Wert	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Blasten im KM	<5%	5-10%		11-20%	21-30%
Karyotyp	Good	Intermediate	Poor		
Zytopenien	0/1	2/3			

Anhand des Prognosescores werden 4 Risikogruppen unterschieden:

Eine Niedrig-Risiko-Gruppe mit einem Scoring Wert von 0, eine Intermediär-Risiko-Gruppe 1 mit einem Scoring Wert von 0,5-1,0, eine Intermediär-Risiko-Gruppe 2 mit einem Scoring Wert von 1,5-2,0, sowie eine Hoch-Risiko-Gruppe mit einem Scoring Wert von $\geq 2,5$.

Die mittlere Überlebenszeit für Patienten der „Niedrig-Risiko-Gruppe“ beträgt 5,7 Jahre, wobei Patienten unter 60 Jahren durchschnittlich 11,8 Jahre überleben, während die Überlebenszeit für Patienten über 70 Jahren bei 3,9 Jahren liegt. Für Patienten der „Intermediär-Risiko-Gruppe 1“ beträgt das mediane Überleben 3,5 Jahre über alle Altersgruppen gemittelt, für die „Intermediär-Risiko-Gruppe 2“ 1,2 Jahre und für die „Hoch-Risiko-Gruppe“ 0,4 Jahre (Greenberg et al. 1997). Die Daten basieren auf einem natürlichen Verlauf der Erkrankung und berücksichtigen keine veränderten Überlebenszeiten unter Therapie.

Basierend auf der neuen WHO-Klassifikation wird die Prognose auch nach dem WPSS (WHO Classification-Based Prognostic Scoring System) angegeben.

1.2.6 Komplikationen

Mehr als die Hälfte der Patienten verstirbt an den Komplikationen des MDS. Hierzu zählen vor allem Infekte, schwere Blutungen und der Übergang des MDS in eine

1 Einleitung

akute myeloische Leukämie (AML). 20% der Patienten aus der Niedrig-Risiko-Gruppe entwickeln innerhalb von 10 Jahren eine AML. In den Intermediär-Risiko-Gruppen und in der Hoch-Risiko-Gruppe sind es bis zu 70% der Patienten, die nach spätestens 3 Jahren eine sekundäre AML entwickeln (Greenberg et al. 1997). Ein zusätzliches Problem für MDS-Patienten stellt eine Eisen-Überladung dar, die sekundäre Hämochromatose, mit Folgekomplikationen wie z.B. Kardiomegalie und Leberinsuffizienz. Sie wird durch die notwendigen, häufigen Transfusionen von Erythrozytenkonzentrat verursacht. Durch subkutane Gabe von Eisenchelatoren (z.B. Desferoxamin) ab einem Serum-Ferritinspiegel von ca. 1000ng/ml kann diese Eisenüberladung behandelt werden.

1.3 Methylierung

Unter Epigenetik werden stabile, vererbare Veränderungen der Genexpression verstanden, die während der Entwicklung der Zelle und der Zellproliferation stattfinden. Die Gensequenz bleibt dabei unverändert. Im Gegensatz zu Mutationen können epigenetische Veränderungen reversibel sein (Das and Singal 2004).

Die häufigste epigenetische Veränderung ist eine Methylierung der DNA. Dabei wird eine Methylgruppe (CH₃) an den Kohlenstoff 5 eines Cytosinrings kovalent gebunden. Die Methylierung erfolgt nur an Cytosinen, die in der Sequenz einem Guanin vorausgehen, 5'CG 3' (Herman and Baylin 2003, Baylin et al. 1998). Diese Kombination wird CpG-Dinukleotid genannt (C preceding G). Die CpG-Dinukleotide sind unsymmetrisch über das Genom verteilt. Neben relativ CpG-armen Bereichen finden sich auch größere CpG-reiche Gruppen, so genannte CpG-Inseln, die besonders häufig in der Promotorregion von Genen zu finden sind. Sie sind meistens unmethyliert. Im Gegensatz dazu sind ca. 80% der nicht in CpG-Inseln vorkommenden CpG-Dinukleotide methyliert (Antequera and Bird 1993). Der höchste Anteil methylierter DNA findet

1 Einleitung

sich im Bereich nicht-kodierender Gen-Abschnitte. Da stark methylierte DNA später repliziert wird als unmethylierte DNA, wird sichergestellt, dass der Großteil des nicht-kodierenden Genoms spät repliziert wird (Herman and Baylin 2003, Baylin et al. 1998).

Die Methylierung des Cytosins wird von Enzymen aus der Gruppe der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. S-Adenosyl-methionin dient dabei als Methylgruppendonor. In Säugetieren sind drei verschiedene biologisch aktive DNMTs bekannt, DNMT1, DNMT3a und DNMT3b (Bestor and Verdine 1994). Diese Enzyme sind lebensnotwendig während der embryonalen Entwicklung. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen DNMTs inaktiviert werden, in ihrem embryonalen Wachstum beeinträchtigt sind, schwere Neuralrohrdefekte entwickeln und nicht lebensfähig sind (Okano et al. 1999, Li et al. 1992). In neoplastischen Zellen scheinen DNMT1 und DNMT3b eine wichtige Rolle zu spielen, da beide für die DNA-Methylierung verantwortlich sind (Rhee et al. 2002, Jair et al. 2006). Die Inaktivierung von DNMT1 und DNMT3b führt zu einem beinahe vollständigen Verlust der Methyltransferase-Aktivität und reduziert DNA-Methylierung um mehr als 95% (Rhee et al. 2002). Bei fehlender Methyltransferase-Aktivität kann z.B. ein Gene Silencing des Tumorsuppressorgens p16INK4a aufgehoben werden, der Insulin-like Growth Factor II vermindert exprimiert werden und zusätzlich das Tumorstadium unterdrückt werden (Rhee et al. 2002).

Demethylierende Substanzen wie 5-Aza-2-deoxycytidin oder 5-Azacytidin können das Ausmaß der DNA-Methylierung verringern und teilweise revidieren. 5-Aza-2-deoxycytidin wird statt Deoxycytidin in die DNA eingebaut. An der Stelle des Kohlenstoffs 5 im Cytosinring wird durch dieses Stickstoffatom eine Methylierung verhindert. Aktiv demethyliert wird die DNA durch das Enzym 5-Methylcytosin-glycosylase. Es entfernt das methylierte Cytosin ohne dabei die Desoxyribose zu entfernen. DNA-Reparaturenzyme können dann das fehlende Cytosin ersetzen (Kress et al. 2001).

In Untersuchungen zur Tumorgenese konnten bisher sowohl Hyper- als auch Hypome-

1 Einleitung

thylierung im Genom nachgewiesen werden (Ehrlich 2002, Nakagawachi et al. 2003, Herman and Baylin 2003, Esteller et al. 2001, Baylin et al. 1998), jedoch überwiegen Berichte über Hypermethylierung in Tumoren und dadurch bedingter Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Esteller et al. 2001, Esteller et al. 2002, Das and Singal 2004).

1.4 Epigenetic Gene Silencing durch Hypermethylierung der Promotorregion

Übermäßige Methylierung der Promotorregion eines Gens führt über verschiedene Mechanismen zur Inaktivierung dieses Gens, dem so genannten Epigenetic Gene Silencing (Herman and Baylin 2003).

Durch die Methylierung von CpG-Dinukleotiden wird direkt die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA blockiert. Hiervon betroffen sind Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-2, c-Myc, cAMP-dependent activator CREB und NF κ B. Ihre Bindung an die DNA wird durch die Methylgruppe am Cytosinring verhindert.

Weiterhin wird die Transkription durch so genannte Methyl-cytosin-bindende Proteine gehemmt. Diese Methyl-cytosin-bindenden Proteine erkennen die methylierte CpG-Sequenz, binden daran und hemmen so die für die Transkription der DNA notwendigen Enzyme. Zur Gruppe der Methyl-cytosin-bindenden Proteine gehören MeCP1, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD4 und Kaiso (Bird and Wolffe 1999, Prokhortchouk et al. 2001). Methyl-cytosin-bindende Proteine liegen häufig in Komplexen mit Histondeacetylasen vor (Bird 2002, Fuks et al. 2001). Histone sind Kernproteine, um die sich DNA-Abschnitte wickeln können. Dadurch entstehen so genannte Nukleosomen mit stark kondensierter DNA. Die starke Kondensierung verhindert die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA. Der stark kondensierte Zustand der DNA wird durch Deacetylierung der Histonproteine zusätzlich begünstigt. Sind Histone dagegen acetyliert,

1 Einleitung

stoßen sich die negativen Ladungen der Acylgruppen und der DNA gegenseitig ab, es erfolgt keine Kondensierung der DNA zu Nukleosomen, wodurch diese der Transkription zugänglich ist. In aktiven Genen mit unmethylierten CpG-Inseln und in Abwesenheit von Histondeacetylasen liegen Nukleosomen daher unregelmäßig verteilt und weit auseinander vor, so dass die jeweiligen Gene transkribiert werden können (Herman and Baylin 2003). In Genen mit methylierten CpG-Inseln dagegen sind durch die Bindung von Methyl-cytosin-bindenden Proteinen und Histondeacetylasen die Nukleosomen kompakt, regelmäßig und sehr nahe beieinander (Bhakat and Mitra 2003). Dadurch werden Transkriptionsfaktoren daran gehindert an entsprechende DNA-Abschnitte zu binden und eine Transkription des betroffenen Gens verhindert s. Abb. 3 (Herman and Baylin 2003).

Auf diese Weise kann die Hypermethylierung der Promotorregion eines Gens zu dessen Inaktivierung führen. Die Methylierung eines Tumorsuppressorgens kann so zur onkogenen Transformation der Zelle beitragen.

1 Einleitung

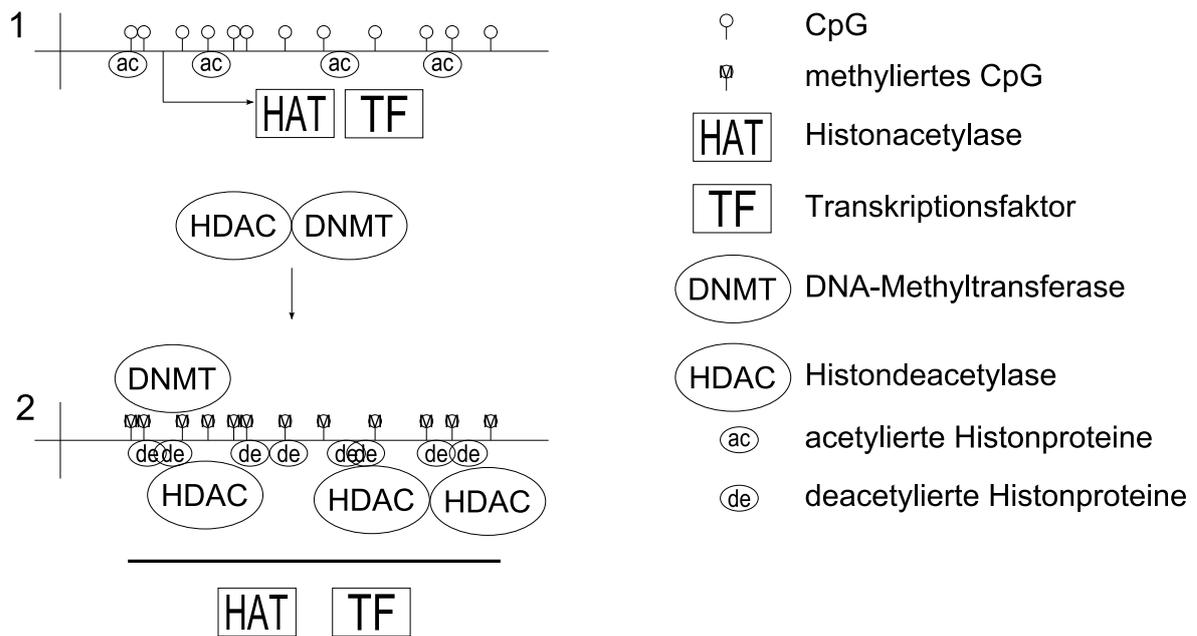


Abbildung 3: Verminderte Expression durch CpG-Methylierung

Methylierung der CpG's durch DNA-Methyltransferasen verhindert durch vermehrte Assoziation der Methyltransferasen mit Histondeacetylasen eine Transkription des entsprechenden Abschnittes.

Zu 1: normale Transkription bei unmethylierten CpG's möglich.

Zu 2: Deacetylierte Histonproteine liegen kompakt beieinander und verhindern so die Transkription des Genabschnittes.

CpG = Cytosine preceding Guanine

1.5 MGMT

O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, MGMT, ist ein DNA-Reparaturenzym und kommt in allen gesunden menschlichen Zellen vor. Das für MGMT kodierende Gen ist ein Housekeeping-Gen und liegt auf Chromosom 10q26. Zellen der Leber enthalten

1 Einleitung

am meisten MGMT, im Gehirn und in den Blutstammzellen ist der MGMT-Gehalt am geringsten (Gerson et al. 1986). Das MGMT-Enzym bewirkt als Katalysator die Entfernung von Alkylgruppen von der O⁶-Position des Guanins. Dadurch wirkt es als DNA-Reparaturenzym für Schäden, die durch Alkylierung entstehen.

DNA-Alkylierung ist ein wichtiger Schritt zur Entstehung von Malignomen. Sie kann als Folge von UV-Bestrahlung der DNA auftreten oder iatrogen durch Chemotherapeutika verursacht werden. Alkylierung der DNA-Basen zerstört die normale DNA-Struktur durch Bildung von Kreuzverbindungen zwischen den Doppelsträngen.

Eine weitere Wirkung ist der Austausch von Guanin gegen Adenin. Methylierung von Guanin verändert die Wasserstoffbrückenbindungen und führt so zu Fehlablesungen und -paarungen. Bei der Bildung von DNA-Doppelsträngen paart Guanin mit Cytosin. Nach Methylierung des Guanins an der Position O⁶ zu O⁶-Methylguanin (O⁶mG) bildet es aber Wasserstoffbrücken mit Thymin. Thymin wiederum paart bei der nächsten Teilung mit Adenin, so dass aus einem ursprünglichen Cytosin-Guanin-Paar ein Adenin-Thymin-Paar wird. Diese Basenfehlpaarung von O⁶mG mit Thymin kann vom Mismatch-Reparatursystem der Zelle erkannt, aber nicht revidiert werden. Durch erfolglose Reparaturversuche entstehen dann weitere DNA-Schäden und Strangbrüche. Unter Beteiligung weiterer Enzymsysteme können solche Strangbrüche zur Apoptose, also zum programmierten Zelltod, führen. Der Mechanismus der Fehlpaarung soll in der folgenden Abbildung 4 vereinfacht dargestellt werden.

1 Einleitung

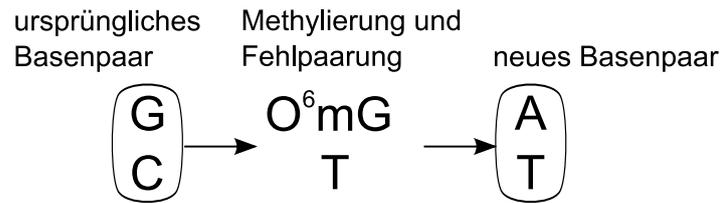


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Basenfehlpaarung nach Methylierung des Guanins

G = Guanin, C = Cytosin, O⁶mG = O⁶-Methylguanin, T = Thymin, A = Adenin

Das DNA-Reparaturenzym MGMT repariert den ursprünglichen Schaden, indem es die Methylgruppe des Guanins auf einen Cysteinrest im aktiven Zentrum des MGMT-Moleküls überträgt. Dabei kommt es zum Verbrauch des Enzyms, das dann ersetzt werden muss (Olsson and Lindahl 1980). Man spricht hierbei von einem Suizidenzym. Die Enzym-Aktivität von MGMT wird unter anderem über den Phosphorylierungsstatus des Proteins, die Bindung des E6 Papillomavirus Onkoproteins (Srivenugopal et al. 2000, Srivenugopal and Ali-Osman 2002), über p53 (Harris et al. 1996), Glukokortikoidhormone (Biswas et al. 1999) und andere Transkriptionsfaktoren reguliert. Phosphorylierung an Tyrosin-, Serin- und Threonin-Resten des Enzyms mittels Serin/Threoninkinasen und Proteinkinase A und C führt zu einer verminderten MGMT-Proteinaktivität. Dephosphorylierung dagegen steigert die Proteinaktivität (Srivenugopal et al. 2000).

Die Aktivität des MGMT-Promoters kann durch Transfektion mit Wildtyp-p53 oder mit humanem Papillomavirus E6 Protein mithilfe eines adenoviralen Vektors unterdrückt und so die Transkription des MGMT-Gens vermindert werden (Srivenugopal and Ali-Osman 2002). Im Bereich des MGMT-Promoters konnten so genannte Glucocorticoid responsive elements, GRE, gefunden werden. Es handelt sich dabei um Bindungsstellen für Glukokortikoide, die die Genexpression beeinflussen. Analysen zeigen,

1 Einleitung

dass durch die Gabe von Dexamethason, das an GRE binden kann, die Transkription von MGMT hochreguliert wird. Die Glukokortikoid-vermittelte Induktion des MGMT-Gens führt zu einer höheren Expression des MGMT-Proteins (Biswas et al. 1999).

1.6 Epigenetic Gene Silencing von MGMT in Gliomen

Zu epigenetischem Gene Silencing des MGMT-Gens kann es durch Hypermethylierung der Promotorregion kommen. Bei unterschiedlichen Tumoren, wie z.B. Gliomen, Lymphomen, Colon-Karzinomen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, wurde eine Inaktivierung des MGMT-Gens nachgewiesen (Esteller et al. 2001, Esteller et al. 2002). Bei etwa 34% der Gliome konnte eine Methylierung der MGMT-Promotorregion auf Chromosom 10q26 gezeigt werden (Esteller et al. 2001). Möllemann et al. zeigte, dass eine Hypermethylierung des MGMT-Promoters mit einem signifikant niedrigeren Level der MGMT-Proteinaktivität korreliert (Möllemann et al. 2005).

Zur Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen können viele unterschiedliche Faktoren beitragen. Sowohl endogene als auch exogene Faktoren führen zu DNA-Schäden mit Deletionen, Insertionen oder Transitionen und folglich zur DNA-Mutation. Die Inaktivierung des MGMT-Gens durch Methylierung ist ein wichtiger Faktor in der Entstehung von Mutationen, da die Reparatur von O⁶-Methylguanin zu Guanin fehlt (s. Kap. 1.5). Dies führt zu Transitionen von Guanin zu Adenin. Passiert dies etwa im Bereich des Onkogens K-ras kann es zu einer Aktivierung des Gens kommen.

Viele der bei Tumoren eingesetzten Chemotherapeutika wirken über Alkylierung der O⁶-Position des Guanins und den unter Kap. 1.5 beschriebenen Folgen. Hierzu gehören

1 Einleitung

Nitrosoharnstoffe, Temozolomid, Cisplatin, Cyclophosphamid, Carmustin, Lomustin und andere. Das MGMT-Reparaturenzym stellt einen wichtigen Resistenzmechanismus der Zelle gegenüber alkylierenden Substanzen dar. Es konnte gezeigt werden, dass Tumoren von Patienten mit methylierter MGMT-Promotorregion sensibler auf das alkylierende Chemotherapeutikum Temozolomid reagieren, als solche mit unmethylierter Sequenz (Hegi et al. 2005). Somit kann eine fehlende Aktivität des MGMT-Enzyms Tumorzellen für alkylierende Chemotherapeutika sensibilisieren.

Dies legt die Hypothese nahe, dass sich mithilfe des Methylierungsstatus eines Patienten Vorhersagen über das Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Alkylanzien machen lassen. Eine Studie mit B-Zell-Lymphomen zeigt, dass MGMT-Hypermethylierung ein starker prädiktiver Faktor bezüglich Überlebenszeit und Tumorprogression ist und anderen klinischen Faktoren wie dem International Prognostic Index (IPI) überlegen ist (Esteller et al. 2002).

Erste Studien konnten außerdem die Wirksamkeit des Alkylanz Temozolomid bei bisher therapierefraktären akuten myeloischen Leukämien nachweisen. Temozolomid wurde dabei gut vertragen und zeigte signifikante antileukämische Wirkung. 9 von 20 Patienten erreichten einen signifikanten Rückgang der Blasten im Knochenmark (Seiter et al. 2002). Bei MDS-Patienten konnte bisher für Temozolomid keine Wirksamkeit nachgewiesen werden (Seiter et al. 2004). Dagegen wurden demethylierende Substanzen wie 5-Azacytidin (Vidaza) und 5-Aza-2-deoxycytidin (Decitabine) bei MDS-Patienten erfolgreich eingesetzt. Ca. 30% der Patienten mit verändertem Karyotyp erreichten eine Normalisierung des Karyotyps nach der Gabe von 5-Azacytidin (Müller et al. 2006).

1.7 Das alkylierende Chemotherapeutikum

Temozolomid

Die moderne Behandlung von malignen Gliomen schließt Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie ein. Ein immer häufiger eingesetztes Chemotherapeutikum ist Temozolomid. Hierbei handelt es sich um ein neues lipophiles, alkylierendes Pharmakon. Es überwindet die Bluthirnschranke, erhöht die Strahlensensibilität von Tumoren bei simultaner Radiotherapie und ist gut verträglich. Es wird bei neu diagnostizierten Glioblastomen eingesetzt (DeAngelis 2005). Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Temozolomid das 2-Jahres-Überleben der Patienten mit malignen Gliomen WHO-Grad III und IV signifikant verlängert kann, von ca. 12% auf etwa 24% (Stupp et al. 2005). Alkylierende Pharmaka wie Temozolomid und Nitrosoharnstoff verursachen Zelltod durch Alkylierung der O⁶-Position des Guanins mit den unter Kap. 1.5 beschriebenen Mechanismen. Zellen mit vermindertem MGMT-Gehalt reagieren empfindlicher auf alkylierende Pharmaka, da dieser Mechanismus zur Reparatur der verursachten DNA-Schäden fehlt (Esteller et al. 2000).

Bei Temozolomid handelt es sich um ein Imidazotetrazin, das oral gegeben wird, mit guter oraler Bioverfügbarkeit von 100% und fehlender Kumulation bei wiederholter Gabe. Nach Resorption wird es spontan zu Monomethyl-Triazenoimidazol-Carboxamid umgewandelt. Dieser Metabolit wird über 5-Amino-Imidazol-4-Carboxamid zur eigentlich wirksamen Substanz, einem Methyldiazoniumion, umgesetzt. In der Primärtherapie der Gliome (WHO-Grad III und IV) wird Temozolomid täglich über 42 Tage mit 75 mg/m² oral begleitend zur Strahlentherapie gegeben. Anschließend folgen 6 Zyklen mit 150-200 mg/m² Temozolomid an Tag 1-5 alle 28 Tage (EORTC-Studie 26981/22981). Dosislimitierend sind Thrombozytopenien und Neutropenien. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe.

1.8 Zielsetzung der Doktorarbeit

Gezeigt werden sollen eine gehäufte Methylierung der Promotorregion des MGMT-Gens und eine dadurch bedingte verminderte Proteinkonzentration bei Patienten mit primären Hirntumoren. Es werden Gewebeproben aus primärem Tumormaterial von 30 Patienten mittels methylspezifischer PCR auf ihren Methylierungsstatus untersucht. Außerdem wird mittels Westernblotanalyse das MGMT-Protein untersucht. Die Proteinkonzentration wird mit dem Methylierungsstatus verglichen. Des Weiteren wird eine Sequenzierung des MGMT-Gens durchgeführt.

Da auch eine gute Wirksamkeit von Temozolomid bei älteren Patienten mit akuter myeloischer Leukämie in ersten Studien gezeigt werden konnte, soll in dieser Arbeit auch der Methylierungsstatus von Blutproben von Patienten mit MDS, das häufig in eine akute myeloische Leukämie übergeht, untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien stammen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.

Bezeichnung	Eigenschaften
K562	CML, MGMT-Promotorregion methyliert
HL60	AML, MGMT-Promotorregion unmethyliert
HeLa	Cervix-Ca, MGMT-Promotorregion unmethyliert

2.1.2 Chemikalien

Produkt	Hersteller
AE Puffer	Qiagen, Hilden
Agarose NEE0	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
AmpliTaQ Gold	Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA
Antibiotic-Antimycotic Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Big Dye Terminator v1.1 Cycle	Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	BioChrom, Berlin

2 Material und Methoden

BIO-RAD Protein Assay	BIO-RAD, München
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Riedel-de Haen, Seelze
Complete Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTP Stocklösungen	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gene Amp PCR Gold Buffer + MgCl ₂	Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA
Isopropanol	Riedel-de Haen, Seelze
L-Glutamin	BioWhittaker, Walkersville, MD, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NuPAGE LDS Sample Buffer 4x	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
PBS Duplecco 1x	Biochrom, Berlin
PCR Low Ladder Set	Sigma Aldrich, Steinheim
Precision Plus Protein All Blue Standards	BIO-RAD, München
RPMI (Seromed)	Biochrom, Berlin
TAE Puffer	Qiagen, Hilden
Tris	USB, Cleveland, OH, USA
TRIzol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Angaben zur Herstellung der verwendeten Lösungen und Puffer

PBS = phosphatgepufferte Salzlösung; HCl = Salzsäure; NaCl = Natriumchlorid; EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure; RPMI = Roswell Park Memorial Institute Medium; FCS = fetal calf serum

Lösung	Herstellung
Blocking-Lösung	5% Milchpulver; 0,05% Tween; 1xPBS;
Lysispuffer 1x	0,5% Triton 100x; 20 mM Tris HCl (pH 0,8); 137 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 mM Orthovanadat
Nährlösung für Zellkultur	RPMI 1x; 10% FCS; 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco); 1% L-Glutamin 200 mM
TBE-Puffer 5x	5,4% Tris base; 2,75% Borsäure; 2% EDTA (pH 8);
Transferpuffer: Kathode	25 mM Tris base (pH 9,7); 24,7 mM 6-Aminohexansäure; 20% Methanol
Anode I	30 mM Tris base (pH 10,4); 20% Methanol
Anode II	300 mM Tris base (pH 10,4); 20% Methanol
Waschpuffer 0,05%	0,05% Tween; 10% PBS in Aqua bidest
Waschpuffer 0,1%	0,1% Tween; 10% PBS in Aqua bidest

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Akt 1 (goat)	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
Aktin (goat)	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-goat IgG HRP	1:5000	Dako Cytomation, Hamburg
ECL Anti-mouse IgG HRP	1:5000	Amersham Biosciences, Freiburg
MGMT (mouse)	1:500	Chemicon International, Millipore, Bedford, MA, USA

2.1.5 Primer

Hersteller: Thermo Electron, Ulm

Bezeichnung	Sequenz
MGMT unmethyliert F	5'-TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT-3'
MGMT unmethyliert R	5'-AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A-3'
MGMT methyliert F	5'-TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC-3'
MGMT methyliert R	5'-GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G-3'

2.1.6 Kits

Kit	Hersteller
CpGenome DNA Modification Kit	Chemicon International, Bedford, MA, USA
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

2.1.7 Spezielle Materialien

Produkt	Hersteller
Hyperfilm	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Immobilon-P Transfer-Membran, 0,45 μm	Millipore, Bedford, MA, USA
NuPAGE 12% Bis-Tris-Gel, 1 mm x 12 well	Invitrogen, Karlsruhe
Precellys-Keramik-Kit 2,8 mm, 2 mL Tubes	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

Verbrauchsmaterialien und Einwegartikel stammen von den Firmen Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK), Invitrogen (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Millipore (Bedford, MA, USA), Roth (Karlsruhe), Falcon (Oxnard, CA, USA), PEQLAB (Erlangen) und Whatman, Schleicher und Schuell (Dassel).

2.1.8 Spezielle Geräte

Gerät	Firma
Bio Photometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Eagle Eye II Still Video System	Stratagene, Cedar Creek, TX, USA
Entwickler Curix 60	AGFA, Köln
Fastblot B43	Biometra, Göttingen
Gene Amp PCR System 2400	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Homogenisator FastPrep FP120	Qbiogene, Carlsbad, CA, USA
Horizon 11.14	Horizontal Electrophoresis System Gibco, Gathersburg, MD, USA
Magnetrührer Ikamag RET	Janke & Kunkel, Staufen i. Br.
Misch- und Schüttelgerät Polymax 2040	Heidolph, Nürnberg
Novex Mini-Cell Electrophoresis System	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Power Pack P25 Biotron	Biometra, Göttingen
Printer Thermal DPU-414-30B	Seiko Instruments, Neu-Isenburg
Roller Mixer SRT2	Stuart Scientific, Stone, Staffordshire, UK
Test-Tube-Rotator 34528	Snijders, Tilburg, NL
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Heraeus Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Waage U4600 P+	Sartorius Universal, Göttingen

2.2 Patienten

Es werden primäre Hirntumorproben von 30 Patienten untersucht. Die Patienten sind mit der Verwendung des Materials zu Studienzwecken einverstanden. Die Proben wurden in der Neurochirurgie des Klinikums Günzburg entnommen. Von den 30 Proben

2 Material und Methoden

sind 17 Glioblastome WHO Grad IV, 8 Gliome WHO Grad III, 1 Gliom WHO Grad II, 1 Gliosarkom, 3 Metastasen. Das Patientenalter beträgt durchschnittlich 56,3 Jahre, der jüngste Patient ist 32, der älteste 79 Jahre alt. Das chirurgisch entfernte Material wird in Formalin fixiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C eingefroren.

Außerdem wird peripheres Blut von 18 Patienten mit myelodysplastischem Syndrom untersucht. Das Patientenalter bei Erstdiagnose beträgt durchschnittlich 63,8 Jahre, dabei ist der jüngste Patient 51, der älteste 75 Jahre alt. Das Blut wird in EDTA-beschichteten Röhrchen abgenommen, die kernhaltigen Zellen werden zeitnah durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Reagenz gewonnen und bei -80°C eingefroren.

Die Charakteristika der Patienten sind in den folgenden zwei Tabellen 4 und 5 dargestellt.

Tabelle 4: Angaben zu den Hirntumorpatienten

Pat. = Patient; Histol. = histologisch; w = weiblich; m = männlich; GBM = Glioblastoma multiforme; Ca = Carcinom; AA = anaplastische Astrozytom; diff. = differenziert; AOD = anaplastisches Oligodendrogliom; AOA = anaplastisches Oligoastrozytom

Pat-Nr.	Alter	Geschlecht	Histol. Diagnose	Rezidiv
Pat. 1	65	w	GBM	
Pat. 2	79	m	Adeno-Ca-Metastase	
Pat. 3	67	m	GBM	
Pat. 4	56	w	AA III	
Pat. 5	56	w	niedrig-diff. Ca-Metastase	
Pat. 6	53	w	gemistozytisches A II	
Pat. 7	32	m	Sarkom	
Pat. 8	55	m	GBM	Ja

2 Material und Methoden

Pat. 9	73	w	GBM	
Pat. 10	73	m	GBM	
Pat. 11	37	w	AOD III	Ja
Pat. 12	61	m	AOA III	Ja
Pat. 13	38	m	GBM	
Pat. 14	73	w	GBM	
Pat. 15	66	m	GBM	
Pat. 16	71	w	GBM	Ja
Pat. 17	41	m	AA III	
Pat. 18	53	w	GBM	
Pat. 19	68	w	GBM	
Pat. 20	73	w	GBM	
Pat. 21	41	m	GBM	
Pat. 22	35	w	GBM	
Pat. 23	43	w	AA III	
Pat. 24	36	w	AA III	Ja
Pat. 25	57	w	Gliosarkom	
Pat. 26	63	m	GBM	Ja
Pat. 27	43	w	AA III	
Pat. 28	47	m	AOD III	
Pat. 29	66	m	GBM	
Pat. 30	68	m	GBM	

2 Material und Methoden

Tabelle 5: Angaben zu den MDS-Patienten

Pat. = Patient; w = weiblich; m = männlich; MDS = myelodysplastisches Syndrom; RA = Refraktäre Anämie; RAEB = Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten; AML = akute myeloische Leukämie; ED = Erstdiagnose; PNH = Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

Pat-Nr.	Alter	Geschlecht	WHO Klass.	Karyotyp	sek AML
Pat. 1	63	w	RAEB I	normal	2 Monate nach ED
Pat. 2	73	w	RAEB II	komplex	14 Monate nach ED
Pat. 3	67	m	RA	5q-	
Pat. 4	56	m	RA	normal	
Pat. 5	64	m	RA	normal	
Pat. 6	70	m	RAEB II	normal	9 Monate nach ED
Pat. 7	63	w	RAEB I	normal	2 Monate nach ED
Pat. 8	60	m	sek. AML	20q-	bei Diagnose MDS
Pat. 9	70	m	RAEB II	normal	9 Monate nach ED
Pat. 10	57	m	RAEB I nach AML M1/2	Trisomie 8	AML-Rezidiv nach 9 Monaten
Pat. 11	60	m	RA	normal	
Pat. 12	70	m	RAEB II	normal	9 Monate nach ED
Pat. 13	75	w	RA	normal	
Pat. 14	48	m	RA	20q-	
Pat. 15	67	m	RAEB II	normal	16 Monate nach ED
Pat. 16	75	m	MDS	normal	
Pat. 17	60	w	RA mit PNH-Klon	normal	3 Monate nach ED
Pat. 18	51	m	MDS	normal	

2.3 DNA

2.3.1 DNA-Isolierung aus primärem Hirntumormaterial

Das Probenmaterial wird im gefrorenen Zustand auf Trockeneis mit Einmalskalpellen in 2-3 mm große Stücke geschnitten. Diese werden mit 1 ml Trizol-Reagenz in Precelly-Tubes mit Keramikkügelchen (PEQLAB Biotechnologies, Erlangen) im Homogenisator bei 4°C mit 6-facher Geschwindigkeit 3-5 mal für 45 s geschüttelt, bis keine festen Gewebebestandteile mehr erkennbar sind.

200 μ l Chloroform wird zugegeben, bei Raumtemperatur für 3 min gemischt und anschließend für 15 min bei 13000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Nach Verwerfen der wässrigen Phase werden 1 ml 100% Ethanol zugegeben, 3 min bei RT inkubiert und weitere 15 min bei 13000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert. Der Vorgang wird wiederholt und anschließend das Ethanol vorsichtig abgenommen. Das DNA-Pellet wird 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Dem getrockneten Pellet wird 200 μ l Aqua dest. zugegeben, für 1 h bei 37°C inkubiert und das Pellet dadurch gelöst. Die isolierte DNA wird bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3.2 DNA-Isolierung aus peripherem Blut und Zellpellets

Für die Gewinnung von kernhaltigen Zellen aus peripherem Blut wird eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. In einem Falcon werden 15 ml Ficoll-Reagenz (Biochrom, Berlin) vorgelegt. Darüber werden vorsichtig 15 ml peripheres Patientenblut aus EDTA-Röhrchen geschichtet. Der Falcon wird 20 min bei 1910 Umdrehungen/min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befinden sich die Leukozyten in einem Ring zwischen den Erythrozyten und dem Serum, dem sogenannten Buffy Coat. Der Leukozytenring wird abgenommen. In einem neuen Falcon werden die Zellen insgesamt zweimal mit PBS gewaschen und bei 1200 Umdrehungen/min zentrifugiert. Das

2 Material und Methoden

entstandene Zellpellet mit ca. 5×10^6 Zellen wird bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Aus den Zellpellets der Patienten und der Zelllinien wird die DNA mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert, in $200 \mu\text{l}$ AE-Puffer gelöst und anschließend bei -20°C gelagert.

2.3.3 Messung der DNA-Konzentration

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgt nach 1:50-Verdünnung mit Aqua dest. auf insgesamt $100 \mu\text{l}$ im Bio Photometer (Eppendorf, Hamburg) bei 260 nm .

2.3.4 Bisulfit-Modifikation

Für die Natrium-Bisulfit-Modifikation wird jeweils $1 \mu\text{g}$ DNA in $100 \mu\text{l}$ Aqua dest. eingesetzt. Die Modifikation erfolgt mit Hilfe des CpGenome DNA Modification Kits (Chemicon International) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wird dabei mit 3 M NaOH-Lösung bei 50°C denaturiert und anschließend mit Natrium-Bisulfit über Nacht (ca. 16 h) bei 50°C inkubiert. Alle weiteren Reaktionsschritte und Zentrifugationen erfolgen bei Raumtemperatur. Die denaturierte DNA wird durch Zugabe des entsprechenden Reagenzes des Modification Kits an einen Trägerstoff gebunden. Sie wird dreimal mit 70% Alkohol gewaschen und anschließend mit 20 mM NaOH/ 90% Ethanol-Lösung entsalzt. Es folgt zweimaliges Waschen mit 100% Alkohol. Die modifizierte DNA wird in einer methylspezifischen PCR, s. Kap. 2.3.5 weiterverarbeitet. Da sich die modifizierte DNA bei längerer Lagerung (über mehrere Wochen) bei -20°C als instabil erweist, erfolgt ein Einfrieren bei -20°C nur in Ausnahmefällen und nur für wenige Tage.

2.3.5 Methylspezifische PCR

Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgt mittels methylspezifischer Polymerase-Kettenreaktion (MSP). Dazu wird jede Probe mit je zwei Primersets, einem methylierten und einem unmethylierten Primerset, amplifiziert. Es werden bei jedem Ansatz eine methylierte (K562) und eine unmethylierte Kontrolle (HL-60), sowie zwei PCR-Negativkontrollen (Aqua dest.) mitgeführt. Ein PCR-Ansatz mit 50 μl enthält die in der folgenden Tabelle dargestellten Konzentrationen und Volumina.

Tabelle 6: Der PCR-Ansatz

PCR = Polymerase-Kettenreaktion; MgCl_2 = Magnesiumchlorid; dNTP = Desoxynukleotidtriphosphat; Aqua dest. = destilliertes Wasser

Substanz	Konzentration	eingesetztes Volumen
Primer	10 pmol/ μl	1 μl
AmpliTaq Gold	5 U/ μl	0,5 μl
Gold Puffer	10x	5 μl
MgCl_2	25 mM	6 μl
dNTP Mix	10 mM	0,5 μl
Aqua dest.		32 μl
Probe	40 ng/ μl	5 μl

Alle Reaktionen erfolgen in einem GeneAmp PCR System (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Überlingen). Das Programm für sämtliche Amplifikationen setzt sich wie in folgender Tabelle dargestellt zusammen.

2 Material und Methoden

Tabelle 7: Programm für die Amplifikationen

DNA = Desoxyribonukleinsäure

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94°C	5 min	1x
Denaturierung	94°C	30 s	40x
Primer annealing	59°C	30 s	
DNA-Synthese	72°C	30 s	
Stabilisierung der H ₂ -Brückenbindung, Beendigung der Synthese	72°C	7 min	1x
Reaktionsende	4°C	∞	

2.3.6 Elektrophorese

Die amplifizierten DNA-Fragmente werden horizontal in Gelkammern (Horizon 11.14, Gibco, Gathersburg, MD, USA) durch Agarosegele aufgetrennt. Zur Differenzierung der eng beieinander liegenden methylierten und unmethylierten Banden werden 3% Agarosegele in 1x TBE-Puffer verwendet. Es werden 5 μ l DNA-Proben mit 2 μ l Ladepuffer (PCR Ladder Set, Sigma Aldrich) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in 1x TBE als Laufpuffer bei 150 V. Als Marker wird das PCR Low Ladder Set (Sigma Aldrich) für 20 kb und 100 kb verwendet. Die so aufgetrennten DNA-Fragmente werden im Gel mit Ethidiumbromid inkubiert, unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

2.3.7 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wird das PCR-Produkt aus der methylspezifischen PCR mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und überschüssige Nukleotide entfernt. Die Aufreinigung erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers mit QIAquick

2 Material und Methoden

Spin Columns (Qiagen). Anschließend wird die zu sequenzierende DNA mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs des ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer) versetzt und im Thermo Cycler amplifiziert. Das eingesetzte Volumen an aufgereinigtem PCR-Produkt ist abhängig von der Stärke der Banden in der Elektrophorese der ursprünglichen PCR (in etwa 2 bis 4 μl). Zum PCR-Produkt werden pro Sequenz 4 μl BigDye Terminator Premix und 1 μl Primer der Konzentration 10 pmol/ μl gegeben und der Ansatz mit Aqua dest. auf 15 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Zur Amplifikation wird das Standard-PCR-Programm wie vom Hersteller angegeben mit insgesamt 45 Zyklen durchgeführt.

Anschließend erfolgt die Aufreinigung des Ansatzes und die Entfernung überschüssiger Nukleotide mit den Spin Columns des DyeEx 2.0 Spin Kits (Qiagen). Die Sequenzierung der DNA erfolgt mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems).

2.3.8 Pyrosequenzierung

Die isolierte DNA von jeweils 10 Proben der Hirntumor- und der MDS-Patienten wird zur Pyrosequenzierung an das Labor varionostic in Ulm (varionostic GmbH, Söflingerstr. 100, D-89077 Ulm) geschickt. Die Pyrosequenzierung ermöglicht die qualitative Sequenzanalyse und quantitative Analyse des Methylierungsstatus des gewählten Genabschnittes. Hierzu wird der komplementäre Strang an einen DNA-Einzelstrang synthetisiert. Jeder Einbau einer komplementären Base aktiviert eine Kaskade von chemolumineszenten Enzymen, woraus ein Lichtsignal resultiert. Dieses Lichtsignal wird fortlaufend detektiert und gibt Aufschluss über die Sequenz und Methylierung der DNA-Stränge.

Im ersten Schritt wird der Primer an einen durch PCR vervielfältigten DNA-Einzelstrang hybridisiert und mit den Enzymen DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und

2 Material und Methoden

Apyrase und den Substraten Adenosin-5'-phosphosulfat und Luciferin inkubiert. Daraufhin wird eines der vier verschiedenen Desoxy-ribonukleotid-triphosphate (dNTP) zugegeben. Ist das zugegebene dNTP komplementär zur Base des vorgelegten Einzelstranges, wird das Nukleotid durch die DNA-Polymerase in den Strang eingebaut. Beim Einbau der Base in den Strang wird Pyrophosphat frei, dessen Menge equimolar zur eingebauten Menge an Nukleotiden ist. In der Anwesenheit von Adenosin-5'-phosphosulfat wird das freigewordene Pyrophosphat mithilfe der ATP-Sulfurylase in Adenosin-triphosphat (ATP) umgewandelt. Das ATP wiederum treibt die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin mittels des Enzyms Luciferase an, s. Abb. 5. Die Menge des entstandenen Oxyluciferins ist dabei proportional zur eingesetzten Menge an ATP. Die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin generiert sichtbares Licht. Das Licht wird durch eine Digitalkamera aufgezeichnet und in einem PyrogramTM als Peak dargestellt. Die Höhe des dargestellten Peaks ist dabei proportional zur Menge der eingebauten Nukleotide. Die anfangs zugegebene Apyrase degradiert ATP und nicht eingebaute dNTP's, beendet damit die Lichtreaktion und regeneriert die Reaktionslösung. Nun wird ein weiteres der vier unterschiedlichen dNTP's hinzugefügt. In jedem Durchlauf wird immer nur eines der vier dNTP's verwendet. Anstelle von dATP (Desoxy-adenosin-triphosphat) wird Desoxy-adenosin-alpha-thio-triphosphat eingesetzt. Dieses kann von der DNA-Polymerase zum Einbau von Adenosin in den Strang benützt werden, erzeugt aber keine Luciferase-Reaktion. Im weiteren Verlauf wird der komplementäre DNA-Strang gebildet und für jede eingebaute Base ein Peak im PyrogramTM verzeichnet.

2 Material und Methoden

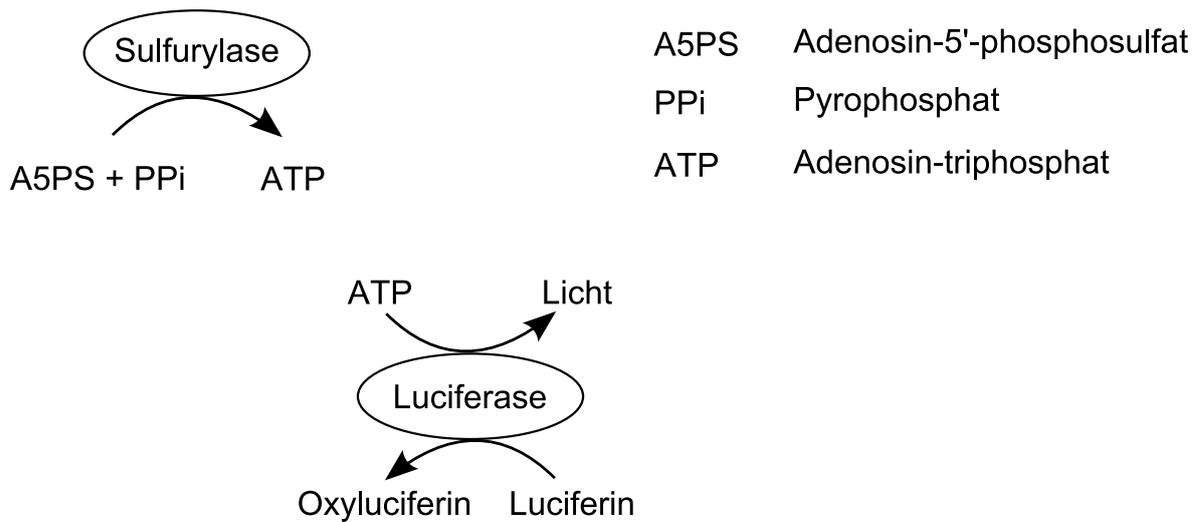


Abbildung 5: Darstellung der Reaktionsschritte wie oben beschrieben zur Entstehung von sichtbarem Licht nach Umwandlung des Pyrophosphats und anschließender ATP-getriebener Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin.

Für die Pyrosequenzierung wurde die DNA wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben isoliert und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Original-Sequenz des MGMT-Promotors (NCBI Zugriffsnummer AL355531) setzt sich wie im Folgenden dargestellt zusammen. CpG-Stellen sind rot markiert. Die grün markierten CpG-Stellen bezeichnen den End- bzw. Startpunkt von Teil 1/Teil 2 des durchgeführten Assays.

CTTGCTTTTCTCAGGTCCTCGGCTCCGCCCCGCTCTAGACCCCGCCCCACGCCGATCCCCGTGCCCTCGG
 CCCC GCCCGCGCCCCGGATATGCTGGGACAGCCCGCGCCCCTAGAACGCTTTGCGTCCCGACGCCCGCAGG
 TCCTCGCGGTGCGCACCGTTTGCGACTTGGTGAGTGTCTGGGTCCCTCGCTCCCGGAAGAGTGCGGAGCTCT
 CCCTCGGGACGGTGGCAGCCTCGAGTGGTCTGCAGGCGCCCTCACTTCGCCGTGGGTGTGGGGCGCCCTG
 ACCCCACCCATCCCGGGCGAGCTCCAGGTGCGCCCAAGTGCCTCCAGGTGTTGCCAGCCTTCCCCGGG
 CCTGGGGTTTCTGGACTAGGCTGCGCTGCAGTACTGTGGACTGGCGTGTGGCGGGGGTCGTGGCAGCCCCTG

2 Material und Methoden

CCTTACCTCTAGGTGCCAGCCCCAGGCCCGGGCCCCGGGTTCTTCCTACCCTTCCATGCTGCCAGCTTCCCT
CCGCCAGCTGCTCCAGGAAGC

Nach Bisulfitmodifikation ergibt sich die folgende, modifizierte Sequenz. CpG-Stellen sind rot markiert. Die grün markierten CpG-Stellen bezeichnen wieder den End- und Startpunkt von Teil 1/Teil 2 des Assays. Y bezeichnet C/T-Basenpaare, t bezeichnet ursprünglich unmethylierte Cytosine nach Bisulfitmodifikation. Die hellgrau markierten C's sind Bisulfit-Kontrollen.

tTTGtTTTTtTtAGGTttTtGGtTttGttttGtTtTAGAttttGttttAtGttGttATttttGTGttttTtGG
ttttGtttttGtGttttGGATATGtTGGGAtAGttYGYGCttttTAGAAYGtTTTGYGtTtYGA YGttYGtAG
GTttYGYGGTGYGCtAtYGTtTGYGAtTTGGTGAGTGTtGGGTYGttTYGtTttYGAAGAGTGYGGAGtT
tTtttYGGGAYGGTGGCtAGttYAGTGGTttTgTAGGYGtttTtAtTTYGtYGYGGGTGTGGGGtYGtt
tTGAtttttCAtttAtttYGGGYGAGtTttAGGTGYGttttAAGTGttTtttAGGTGTTGtttAGttTTTttt
tGGGttTGGGGTTttTGGAtTAGGtTgTgTgTAgTGAAtTGTGGAAtGGtGTGTGGtGGGGGTtGTGGtAGtt
ttTGttTTAttTtTAGGTGttAGttttAGGtttGGGttttGGGTTtTTttTAtttTTttATGtTgTtAGtTTT
tttTttGttAGtTgTttAGGAAGt

Zur Amplifikation wurde eine nested PCR durchgeführt. Die äußere PCR ergab dabei ein 332 bp Produkt, die innere PCR ein 288 bp Produkt. Der Ansatz der inneren PCR mit 50 μ l enthält die in der folgenden Tabelle dargestellten Konzentrationen und Volumina.

2 Material und Methoden

Tabelle 8: Der nested PCR-Ansatz

PCR = Polymerase-Kettenreaktion; Mg = Magnesium; MgCl₂ = Magnesiumchlorid; dNTP = Desoxynukleotidtriphosphat; DNA = Desoxyribonukleinsäure

Substanz	Konzentration	eingesetztes Volumen
USB E Puffer mit Mg ²⁺	10x / 15 mmol	5 μ l
MgCl ₂	25 mM	1 μ l
dNTP	10 mM	1,8 μ l
Forward Primer	5 μ M	2,2 μ l
Reverse Primer (biotinyliert)	5 μ M	2,2 μ l
Taq DNA Polymerase USB Hotstart IT	1,25 U/ μ l	1,6 μ l
DNA (332 bp Produkt der äußeren PCR)		1,2 μ l
destilliertes Wasser		35 μ l

Das Programm für die Amplifikationen der inneren PCR setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 9: Programm für die Amplifikationen der nested PCR

PCR = Polymerase-Kettenreaktion; DNA = Desoxyribonukleinsäure

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	1x
Denaturierung	94°C	35 s	50x
Primer annealing	51,5°C	35 s	
DNA-Synthese	72°C	35 s	
Stabilisierung der H ₂ -Brückenbindung,	72°C	5 min	1x
Reaktionsende	4°C	∞	

2 Material und Methoden

Im Anschluss an die nested PCR werden die Proben mit Hilfe des Vacuum Prep Tool nach Herstellerangaben aufbereitet. Es werden 25 μl des PCR-Produktes an 3 μl Streptavidin SepharoseTMHP Kugeln (GE Healthcare, bisher Amersham Biosciences) immobilisiert. Anschließend erfolgt das Annealen an 2 μl Primer (5 μM) für die Sequenzierung bei 80°C für 2 min. Die Sequenzierung wird nach Standardvorgehen der Firma varionostic durchgeführt. Die Analyse der CpG's erfolgt mit der Pyro Q-CpG Software.

2.4 Proteine

2.4.1 Protein-Isolierung aus Tumormaterial und Zelllinien

Wie schon bei der DNA-Isolierung beschrieben wird das Probenmaterial im gefrorenen Zustand auf Trockeneis mit Einmalskalpellen in 2-3 mm große Stücke geschnitten. Diese werden mit 800 μl Lysispuffer in Precelly-Tubes mit Keramikkügelchen (PEQLAB Biotechnologies, Erlangen) im Homogenisator (FastPrep Bio101/Savant) bei 4°C mit 6-facher Geschwindigkeit 3-5 mal für je 45 s geschüttelt, bis keine festen Gewebebestandteile mehr erkennbar sind. Anschließend rotieren die Proben für 15 min bei 4°C auf einem Rotator und werden dann 10 min mit Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Die im Puffer gelösten Proteine werden daraufhin abpipetiert und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Analog dazu werden für die Protein-Isolierung aus Zelllinien die Zellpellets mit jeweils 100 μl Lysispuffer versetzt, 15 min bei 4°C rotiert, zentrifugiert und der Überstand abpipetiert.

2.4.2 Messung der Protein-Konzentration

Die Konzentration der Proteine wird mit Hilfe des Bradford-Reagenzes (BIO-RAD Protein Assay) bestimmt. Die 5x Stammlösung wird 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Zu 1

2 Material und Methoden

ml 1x Protein Assay wird je 5 μl der zu analysierenden Probe gegeben. Für jede Probe erfolgt die Messung der Extinktion von jeweils zwei Verdünnungen bei 595 nm im Bio Photometer (Eppendorf, Hamburg). Aus dem Mittelwert der beiden Messergebnisse wird anhand einer Eichkurve die Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ berechnet.

2.4.3 Auftrennung der Proteine

Die Auftrennung der Proteine erfolgt mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung von 12% Bis-Tris-Gelen (NuPAGE, Invitrogen). Hierfür werden 20 μg Proteine in wässriger Lösung mit 5 μl Ladepuffer für 10 min bei 70°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Als methylierte Kontrolle wird K562 aufgetragen, als unmethylierte Kontrolle HL-60, als Standard werden 10 μl des Precision Plus Protein All Blue Standards eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt mit MOPS-SDS-Running-Buffer (Invitrogen), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt, bei 70-80 mA.

2.4.4 Western Blotting

Die aufgetrennten Proteine werden im Semidry Blotting Verfahren mittels Fastblot B43 (Biometra) auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu werden jeweils 3 Schichten Chromatographiepapier mit Anodenpuffer I und II und Kathodenpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wird mit Methanol getränkt. Das Chromatographiepapier wird dann wie folgt vom Pluspol zum Minuspol in den Blotter geschichtet: Anode II, Anode I, befeuchtete PVDF-Membran, Gel mit aufgetrennten Proteinen, Kathode. Der Proteintransfer auf die Membran benötigt 30 min bei 400 mA. Um eine unspezifische Hintergrundaktivität von Antikörpern zu vermeiden, wird die Membran mit einer Milchprotein-Lösung bei 4°C über Nacht geblockt.

2.4.5 Qualitative Analyse der Proteine durch Antikörper-Markierung

Die Analyse der aufgetrennten Proteine erfolgt laut Standardprotokoll mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern. Dazu wird die Membran entweder für 2-3 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht mit einem monoklonalen Erstantikörper inkubiert. Als Waschlösung wird 1x PBS/0,05% oder 0,1% Tween je nach Erstantikörper verwendet. Die Membran wird dreimal für 15 min gewaschen. Darauf folgt die Inkubation mit einem polyklonalen Zweitantikörper ebenfalls bei Raumtemperatur für 2-3 h oder bei 4°C über Nacht. Der Zweitantikörper ist mit Horseradish Peroxidase gekoppelt. Als Substrat für die Horseradish Peroxidase dienen ECL detection reagents (Amersham Biosciences, UK), bestehend aus 2 Einzelreagenzien, welche im Verhältnis 1:1 gemischt werden. Die Membran wird kurz im ECL-Reagenzgemisch inkubiert und auf einen Fotofilm (Hyperfilm) aufgelegt. Beim Umsetzen des Substrats durch die Peroxidase entsteht Lumineszenz. Diese wird durch Belichten des Films nach dessen Entwicklung (Curix, AGFA) als schwarze Bande sichtbar.

2.5 Kultivierung von Zelllinien

Die Zelllinien werden bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in RPMI 1640 Medium kultiviert. Dem Medium werden 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% L-Glutamin zugesetzt. Das Medium wird unter Konstanthaltung der Zellkonzentration alle 3 Tage gewechselt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Adhärenent wachsende Zellen werden mit 7 ml Trypsin 5 min im Inkubator gelöst und mit FCS gestoppt. Es werden Zellpellets mit ca. 5×10^6 Zellen pro Pellet hergestellt, in 1 ml PBS resuspendiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

2.6 Statistik

Da die Fallzahl in dieser Arbeit $n=30$ für die Hirntumorpatienten, bzw. $n=18$ für die MDS-Patienten beträgt, wird auf statistisches Testen verzichtet. Die Darstellung der Ergebnisse in der Auswertung erfolgt in absoluten Zahlen und Prozentwerten.

3 Ergebnisse

3.1 Hirntumorpatienten

3.1.1 MGMT-Methylierungsstatus von Zelllinien

Die DNA aus den drei Zelllinien HL60, K562 und HeLa wird mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wird die DNA mittels methylspezifischer PCR nach Bisulfit-Modifikation analysiert. Es werden zwei Primersets verwendet, ein Set jeweils für die methylierte und die unmethylierte Sequenz. Die HL60-Zellen zeigen nur für das unmethylierte Primerset eine Bande, die K562- und HeLa-Zellen zeigen jeweils nur eine Bande für das methylierte Primerset, s. Abb. 6. DNA der HL60-Zelllinie wird im Folgenden als unmethylierte Kontrolle bei der methylspezifischen PCR mitgeführt, DNA von K562 und HeLa als methylierte Kontrolle.

Zusätzlich werden die Proteine der drei Zelllinien mittels eines Lysispuffers isoliert und im Westernblot-Verfahren analysiert. Die HL60-Zelllinie zeigt dabei eine starke Expression von MGMT, in den Zelllinien K562 und HeLa lässt sich MGMT-Protein im Westernblot nicht nachweisen, s. Abb. 7.

3 Ergebnisse



Abbildung 6: MGMT-Polymerase-Kettenreaktion für K562 und HL-60; „K562 m“ entspricht methyliertem Primerset, „K562 u“ entspricht unmethyliertem Primerset, für HL-60 entsprechend, „A“ entspricht der Negativkontrolle mit destilliertem Wasser;
MGMT = Methylguanin-Desoxyribonukleinsäure-Methyltransferase

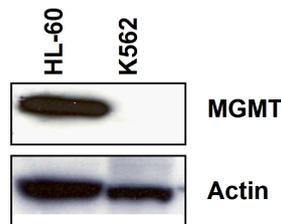


Abbildung 7: Westernblot für HL-60 und K562;
MGMT = Methylguanin-Desoxyribonukleinsäure-Methyltransferase

3.1.2 MGMT-Methylierung auf DNA-Ebene in primärem Tumormaterial von Patienten mit Gehirntumoren

Die DNA von 30 primären Hirntumoren wird aus den bei -20°C gelagerten Proben unter Verwendung der Trizol-Methode extrahiert. Anschließend wird die DNA mittels methylspezifischer PCR (MSP) nach Bisulfit-Modifikation analysiert. Mithilfe von zwei unterschiedlichen Primersets, einem für die methylierte Sequenz 5'-TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC-3' und einem für die unmethylierte Sequenz 5'-TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT-3' wird der Methylierungsstatus des

3 Ergebnisse

MGMT-Gens bestimmt. Als unmethylierte Kontrolle wird die Zelllinie HL-60 mitgeführt, als methylierte Kontrolle werden die Zelllinien K562 und HeLa verwendet.

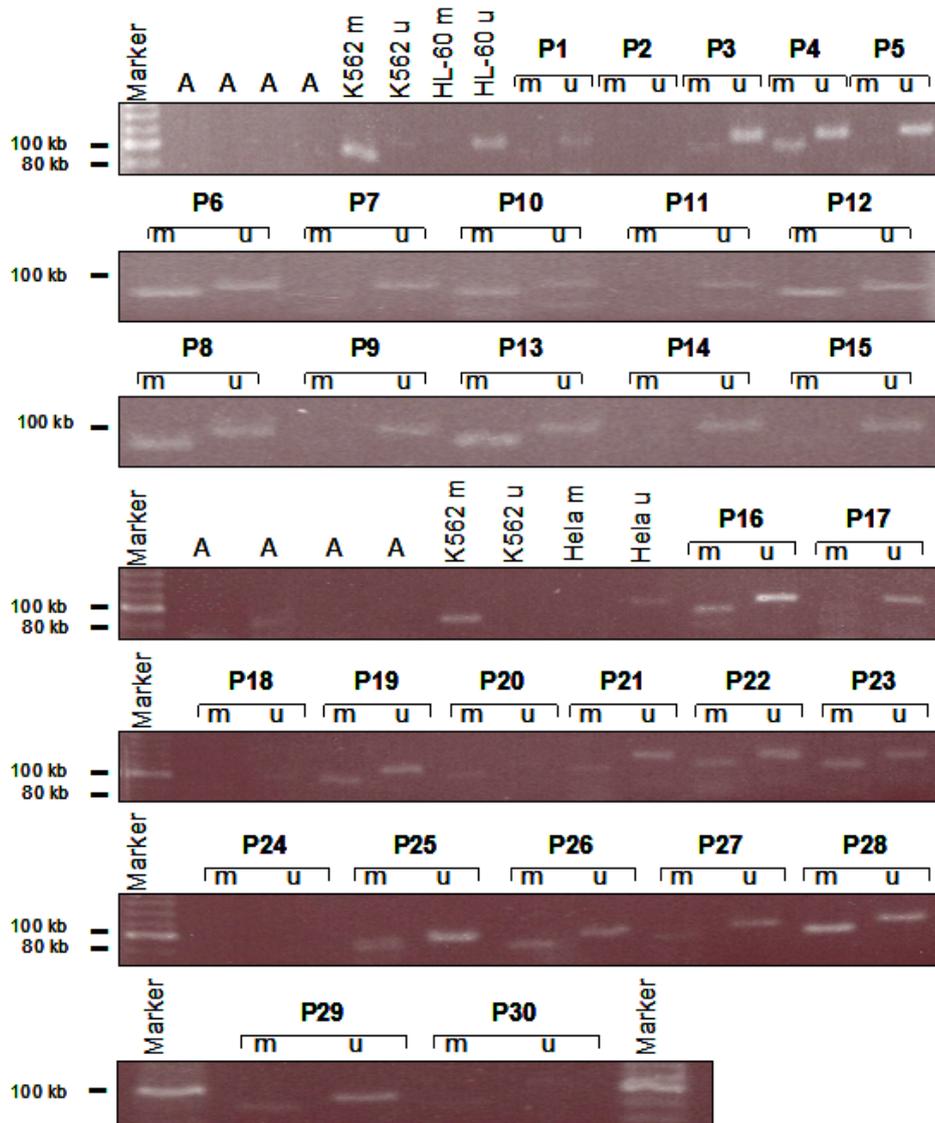


Abbildung 8: MGMT-Polymerase-Kettenreaktion für K562, HL-60 und die Hirntumorproben von den Patienten P1-P30; „m“ entspricht methyliertem Primerset, „u“ entspricht unmethyliertem Primerset, „A“ entspricht der Negativkontrolle mit A. dest.; MGMT = Methylguanin-DNA-Methyltransferase

3 Ergebnisse

Proben werden als methyliert gewertet, wenn die Bande des methylierten Primers nachweisbar ist. Bei fast allen Proben findet sich gleichzeitig eine unmethylierte Bande, wie in der Literatur beschrieben, da bei primärem Tumormaterial davon auszugehen ist, dass das Probenmaterial neben Tumorzellen auch gesunde, unmethylierte Zellen (Blutbestandteile, Gefäßwand, Bindegewebe) enthält. Es ist daher unwahrscheinlich, in einer Tumorgewebsprobe nur Banden der methylierten Sequenz nachzuweisen.

13 von 26 auswertbaren Proben sind methyliert und 13 unmethyliert, das entspricht jeweils einem Anteil von 50% der Proben. Unter Einbeziehung der Tumorhistologie sind 8 der methylierten Proben Glioblastome, 3 anaplastische Gliome WHO-Grad III, davon jeweils 1 anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III, ein anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III und 1 anaplastisches Astrozytom WHO Grad III, sowie ein Astrozytom WHO Grad II und ein Gliosarkom.

7 der 13 unmethylierten Proben sind Glioblastome und 3 anaplastische Gliome WHO-Grad III, davon 1 anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III und 2 anaplastische Astrozytome WHO Grad III. 3 Metastasen (2 Karzinome, ein Sarkom) erweisen sich ebenfalls als unmethyliert. 4 von 30 Proben (2 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III, 2 Glioblastome WHO-Grad IV) können nicht eindeutig ausgewertet werden.

Bezieht man diese Ergebnisse nur auf die aggressivsten Hirntumoren, die Glioblastome WHO Grad IV, so sind 8 von 15 Proben methyliert (53,3%) und 7 von 15 unmethyliert (46,7%), s. Abb. 9.

3 Ergebnisse

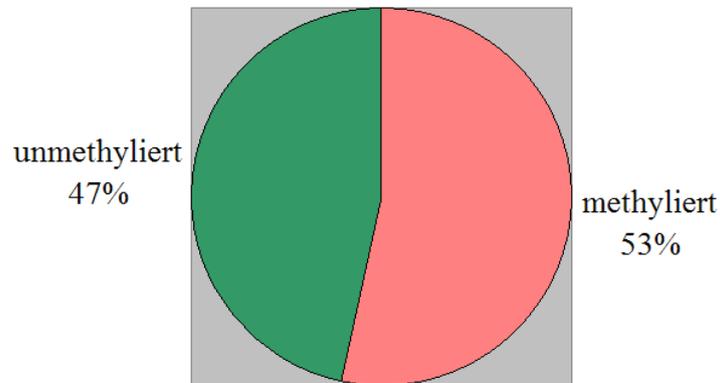


Abbildung 9: Grafische Darstellung der Anteile der methylierten und unmethylierten Proben bei Glioblastomen WHO (World Health Organisation) Grad IV

3.1.3 Expression des MGMT-Proteins

Proteine des primären Tumormaterials werden, wie im Kapitel 2.4.1 beschrieben, extrahiert. Anschließend wird die Protein-Expression von MGMT mittels Westernblotanalyse bestimmt. Als Referenz dienen die unmethylierte Zelllinie HL-60 mit Nachweis des MGMT-Proteins und die methylierte Zelllinie K562, bei der im Westernblot kein MGMT-Protein nachweisbar ist. Das Housekeeping-Gen Aktin wird zur Kontrolle des Westernblots benützt. Die MGMT-Bande wird mit der Aktin-Bande verglichen und ihre Stärke bezogen auf Aktin abgeschätzt.

3 Ergebnisse

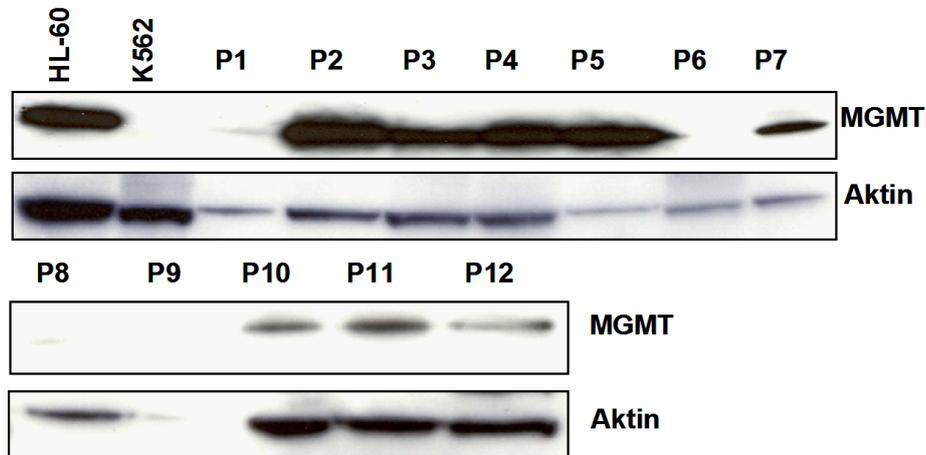


Abbildung 10: Westernblot mit Aktin- und MGMT-Antikörpern für K562, HL-60 und die Patienten P1-P12.

MGMT = Methylguanin-DNA-Methyltransferase

4 von 30 Proben können aufgrund fehlender Aktinbanden und zu wenig Material nicht ausgewertet werden. Bei 6 von 26 Proben (23%) ist bei vorhandener Aktin-Bande kein MGMT-Protein nachweisbar. Die restlichen 20 Proben zeigen jeweils eine unterschiedlich starke MGMT-Bande bei 22 kDa. Diese wurde je nach Stärke der MGMT-Bande bezogen auf Aktin in drei Untergruppen unterteilt. 6 von 26 auswertbaren Proben (23%) zeigen eine hohe MGMT-Proteinkonzentration mit starker Proteinbande. 5 von 26 Proben (19%) zeigen eine mittelstarke Bande und 9 von 26 Proben (35%) zeigen eine schwache MGMT-Bande verglichen mit Aktin und folglich eine niedrige MGMT-Proteinkonzentration.

Insgesamt ist die Proteinkonzentration in 58% der Fälle vermindert oder nicht nachweisbar.

3.1.4 Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus, Expression und Tumorhistologie

Von den insgesamt 30 Proben werden 6 aufgrund von nicht auswertbarer DNA- oder Protein-Ergebnisse von dieser Analyse ausgeschlossen. 8 von 24 Proben (33,3%) sind methyliert und zeigen keine, bzw. eine geringe Proteinexpression. Dagegen ist bei 4 von 24 Proben (16,7%), die in der PCR methyliert waren, das MGMT-Protein im Westernblot deutlich nachweisbar. 6 von 24 Proben (25%) zeigen bei unmethylierter MGMT-Sequenz eine mittlere bis hohe Proteinkonzentration. Weitere 6 von 24 Proben (25%) sind unmethyliert bei geringem oder nicht nachweisbarem MGMT-Protein.

Es kann gezeigt werden, dass bei 67% der Proben (8/12) mit methylierten MGMT-Promotor wenig bzw. kein MGMT-Protein nachweisbar ist. Bei einem Großteil dieser methylierten Proben mit niedriger Proteinkonzentration handelt es sich um Gliome WHO Grad III und IV (7/8). Ein gemistozytisches Astrozytom WHO Grad II zeigte ebenfalls bei methylierter Sequenz eine niedrige Proteinkonzentration, s. Tabelle 10 und Abb. 11. 50% der unmethylierten Proben zeigen eine mittlere bis hohe Proteinkonzentration und weitere 50% zeigen eine niedrige bzw. nicht nachweisbare Proteinkonzentration, s. Tabelle 10 und Abb. 11.

3 Ergebnisse

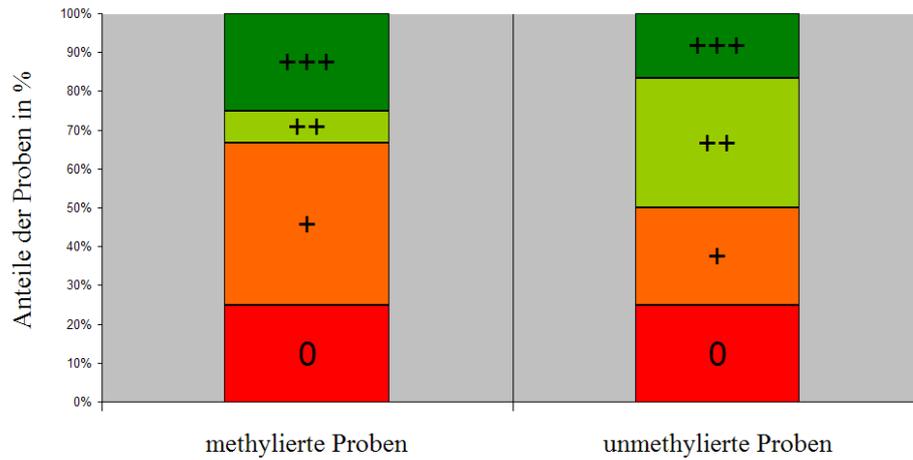


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Methylierung und Proteinkonzentration:

0 entspricht nicht nachweisbarer Proteinkonzentration, + entspricht niedriger Proteinkonzentration, ++ entspricht mittlerer Proteinkonzentration, +++ entspricht hoher Proteinkonzentration; jeweils für die methylierten und unmethylierten Proben.

3 Ergebnisse

Tabelle 10: Methylierung und Expression der Hirntumorpatienten

MGMT = Methylguanin-DNA-Methyltransferase, GBM = Glioblastoma multiforme, Ca = Carcinom, Met = Metastase, AA = anaplastische Astrozytom, gemistozyt. A = gemistozytisches Astrozytom, AOD = anaplastisches Oligodendrogliom, AOA = anaplastisches Oligoastrozytom, WB = Western Blot

Pat-Nr.	Histologie	PCR-Ergebnis	MGMT Protein	Bandenstärke im WB
Pat. 1	GBM	nicht methyliert	kein Protein	0
Pat. 2	Adeno-Ca-Met	nicht methyliert	Protein	+++
Pat. 3	GBM	nicht methyliert	Protein	++
<i>Pat. 4</i>	<i>AA III</i>	<i>nicht auswertbar</i>	<i>Protein</i>	<i>+++</i>
Pat. 5	niedrig-diff. Ca-Met.	nicht methyliert	Protein	+++
Pat. 6	gemistozyt. A II	methyliert	Protein	+
Pat. 7	Sarkom	nicht methyliert	Protein	+
Pat. 8	GBM	methyliert	kein Protein	0
Pat. 9	GBM	nicht meythliert	kein Protein	0
<i>Pat. 10</i>	<i>GBM</i>	<i>nicht auswertbar</i>	<i>Protein</i>	<i>+</i>
Pat. 11	AOD III	nicht methyliert	Protein	++
Pat. 12	AOA III	methyliert	Protein	+
Pat. 13	GBM	methyliert	Protein	+
Pat. 14	GBM	nicht methyliert	Protein	++
Pat. 15	GBM	nicht methyliert	Protein	+
Pat. 16	GBM	methyliert	Protein	+++
Pat. 17	AA III	nicht methyliert	Protein	+

3 Ergebnisse

<i>Pat. 18</i>	<i>GBM</i>	<i>nicht methyliert</i>	<i>nicht auswertbar</i>	-
Pat. 19	GBM	methyliert	Protein	++
Pat. 20	GBM	methyliert	kein Protein	0
Pat. 21	GBM	methyliert	Protein	+
Pat. 22	GBM	methyliert	Protein	+++
Pat. 23	AA III	methyliert	kein Protein	0
<i>Pat. 24</i>	<i>AA III</i>	<i>nicht auswertbar</i>	<i>nicht auswertbar</i>	-
Pat. 25	Gliosarkom	methyliert	Protein	+++
<i>Pat. 26</i>	<i>GBM</i>	<i>methyliert</i>	<i>nicht auswertbar</i>	-
Pat. 27	AA III	nicht methyliert	kein Protein	0
Pat. 28	AOD III	methyliert	Protein	+
Pat. 29	GBM	nicht methyliert	Protein	++
<i>Pat. 30</i>	<i>GBM</i>	<i>nicht auswertbar</i>	<i>nicht auswertbar</i>	0

3.1.5 Sequenzanalysen

Die Sequenz der MGMT-Promotorregion wird mittels fluoreszenzmarkierter Nukleotide im ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems) analysiert. Die Daten werden mit Sequenzen der Genbank verglichen. Es lassen sich methylierte CpG-Inseln im Bereich der Promotorregion von MGMT auf Chromosom 10q26 nachweisen. Es werden jeweils 6 der methylierten und 6 der unmethylierten Proben sequenziert. Sowohl für die untersuchten 6 methylierten als auch die 6 unmethylierten Proben konnten die Ergebnisse, die mit Hilfe der methylspezifischen PCR nach Bisulfit-Modifikation erhoben wurden, bestätigt werden. Bei Analyse der methylierten Proben zeigte sich eine Methylierung aller analysierten CpG-Inseln, während alle CpG-Inseln der unmethy-

3 Ergebnisse

lierten Proben auch in der Sequenzanalyse keine Methylierung zeigten. In Abb. 12 ist exemplarisch die Sequenzierung von Patient Nr. 5 gezeigt.



Abbildung 12: Ergebnis der Sequenzierung von Patient Nr.5

3.1.6 Pyrosequenzierung von Proben der Hirntumorpatienten

Die isolierte DNA von jeweils 10 Proben der Hirntumorpatienten wird mittels Pyrosequenzierung, wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben, im Labor varionostic in Ulm (varionostic GmbH, Söflingerstr. 100, D-89077 Ulm) untersucht. Die Pyrosequenzierung ermöglicht die qualitative Sequenzanalyse und quantitative Analyse des Methylierungsstatus der einzelnen CpG's des gewählten Genabschnittes.

Für jede der 27 im untersuchten Genabschnitt ermittelten CpG-Positionen wird der Anteil der methylierten Cytosine in Prozent angegeben. Nach den Angaben des Labors

3 Ergebnisse

werden Anteile von weniger als 3% der Cytosine als unmethyliert gewertet. Diese Annahme ergibt sich aus Erfahrungen des auswärtigen Labors mit Negativkontrollen. 5 von 10 der von uns eingesandten Proben zeigen in unserer MSP Banden für den methylierten Primer, die anderen 5 Proben für den unmethylierten. Die Analyse von varionostic zeigt in 9 von 10 Proben der Hirntumor-Patienten eine Methylierung von mindestens einer der 27 möglichen Positionen. Dabei sind in den einzelnen Proben 2 bis maximal 9 von 27 CpG-Positionen methyliert. Der Grad der Methylierung liegt zwischen 0% und 100%. Ein Methylierungsmuster innerhalb der verschiedenen Positionen lässt sich angesichts der geringen Fallzahl nicht erkennen. Allerdings sind 9 von 27 CpG-Positionen in allen Proben unmethyliert. Immerhin 3 CpG-Positionen (Position 20, 24 und 27) zeigen in jeweils 5 von 10 Proben eine Methylierung. Ein bestimmtes Muster in der Methylierung wäre bei einer größeren Fallzahl durchaus denkbar. Zur Veranschaulichung eines solchen möglichen Musters ist im Anschluss Abb. 13 eingefügt. Diese zeigt zusätzlich zu den Ergebnissen der Hirntumor-Proben die Methylierungsanalysen aus DNA von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, AML, die ebenfalls von unserem Labor über die Firma varionostic veranlasst wurden. Die folgende Tabelle 11 und Abbildung 14 zeigen die Ergebnisse der Pyrosequenzierung der Hirntumorproben mit den Anteilen der methylierten CpG-Positionen in Prozent.

3 Ergebnisse

Tabelle 11: Ergebnisse der Pyrosequenzierung von Proben der Hirntumor-Patienten

Anteile der Methylierung sind in % angegeben. Methylierte Positionen sind rot unterlegt.

CpG = Cytosine preceding Guanine

Pat.	CpG-Position										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
3	0	0	0	0,75	6,08	0	0	81,06	0	0	53,51
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0,39	0	0	0	0	0	0	0	0,57	0
14	51,35	0	0	0,07	0	0	0,66	0	1,26	0	0
15	0	0	0	0	1,06	0,52	0	34,2	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0,75	0	0	0	0	0
21	0		87,73	1,65	36,53	6,38	0	0	0	0	44,6
22	0	0	0	0	0	0	0	0,68	0	0	0
29	0	0,27	0	0	1,14	0	0	0	0	0,35	0

3 Ergebnisse

	CpG-Position										
Pat.	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
3	0	0,87	0	0	0	0	0	45,07	52,33	76,32	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49,38
13	0	0	0	78,02	2,24	0	0	1,26	6,93	1,7	0
14	46,2	0	0	0	0	0	0	0	38,67	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,06	0
20	0	0	0	0	0	0,23	0	0	0	94,44	0
21	0	100	0	0	55,14		0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	47,12	0	0,63
29	1,92	26,94	0	0	0	0	0	0	7,33	0	0

	CpG-Position				
Pat.	23	24	25	26	27
3	0,05	39,92	97,42	0	37,98
9	0	51,1	0	0	5,03
13	0	0,65	0	0,62	3,31
14	0	28,52	0	0	0,09
15	0	29,08	0	0	0,8
16	0	0	0,93	0	0
20	0	0,18	0	0,43	35,92
21	0	0	0	0	0
22	0,44	0	0	0	5,35
29	0,26	5,75	0	4,36	0

3 Ergebnisse

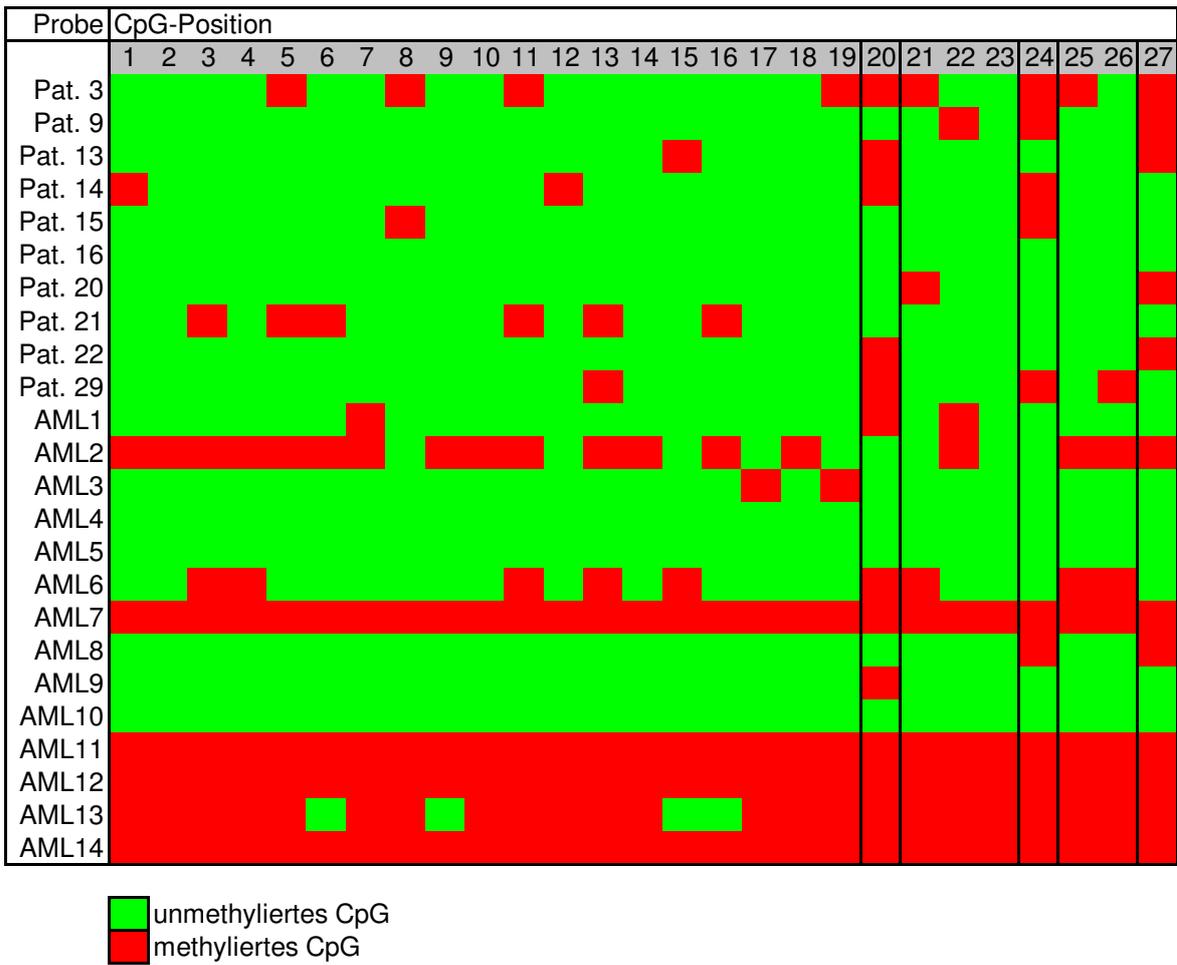


Abbildung 13: Grafische Darstellung eines eventuell vorhandenen Methylierungsmusters. Dargestellt sind die Ergebnisse von Gliompatienten (Pat. 3-29) und Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML 1-14). Drei Positionen mit besonders hoher Methylierung in mehreren Proben sind markiert. CpG = Cytosine preceding Guanine

3 Ergebnisse

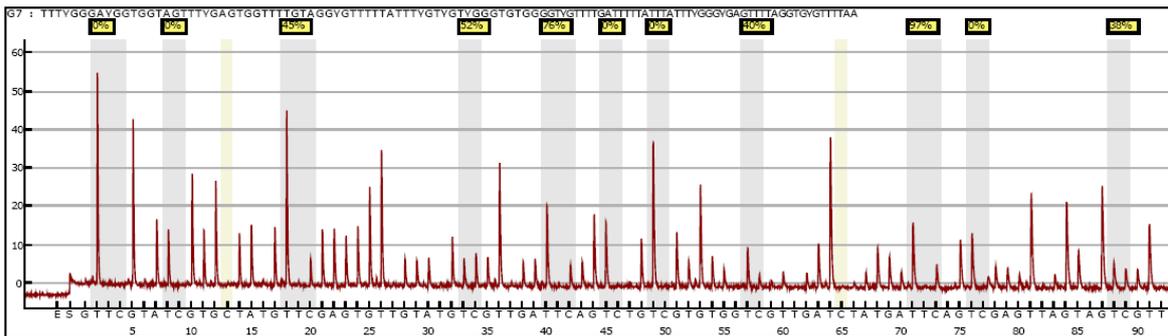


Abbildung 14: Darstellung eines PyrogrammsTM am Beispiel von Patient Nr.3

3.2 MDS-Patienten

3.2.1 Methylierungsstatus der MDS-Patienten

Die DNA von 18 Patienten mit myelodysplastischem Syndrom wird mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits extrahiert. Mittels methylen-spezifischer PCR nach Bisulfit-Modifikation wird die extrahierte DNA, wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, analysiert. Als unmethylierte Kontrolle wird DNA der Zelllinie HL-60 mitgeführt, als methylierte Kontrolle werden die Zelllinien K562 und HeLa verwendet, s. Kapitel 3.1.1 und Abb. 6.

8 der untersuchten 18 Proben (44,4%) zeigen eine Methylierung des MGMT-Gens. In 10 von 18 Proben (55,6%) ist nur die unmethylierte Bande nachweisbar, s. Abb. 15.

Nach Analyse der Knochenmarkzytologie und -histologie handelt es sich bei 3 der 8 methylierten Proben um refraktäre Anämien, 1 der 8 Proben zeigt ein RAEB I, 2 von 8 sind RAEB II und 2 von 8 sind nicht klassifizierbar. Bei den unmethylierten Proben sind 4 von 10 refraktäre Anämien, 2 von 10 RAEB I und 3 von 10 RAEB II, s. Tabelle 12.

3 Ergebnisse

Tabelle 12: Methylierungsstatus der MDS-Patienten

MDS = Myelodysplastisches Syndrom, RA = Refraktäre Anämie, RAEB = Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten, sek. = sekundär, AML = akute myeloische Leukämie, PNH = Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

Pat-Nr.	WHO-Klassifikation	PCR-Ergebnis
1	RAEB I	unmethyliert
2	RAEB II	unmethyliert
3	RA	methyliert
4	RA	unmethyliert
5	RA	unmethyliert
6	RAEB II	methyliert
7	RAEB I	unmethyliert
8	sek. AML bei MDS	unmethyliert
9	RAEB II	unmethyliert
10	RAEB I nach AML M1/2	methyliert
11	RA	unmethyliert
12	RAEB II	methyliert
13	RA	unmethyliert
14	RA	methyliert
15	RAEB II	unmethyliert
16	MDS	methyliert
17	RA mit PNH-Klon	methyliert
18	MDS	methyliert

3 Ergebnisse

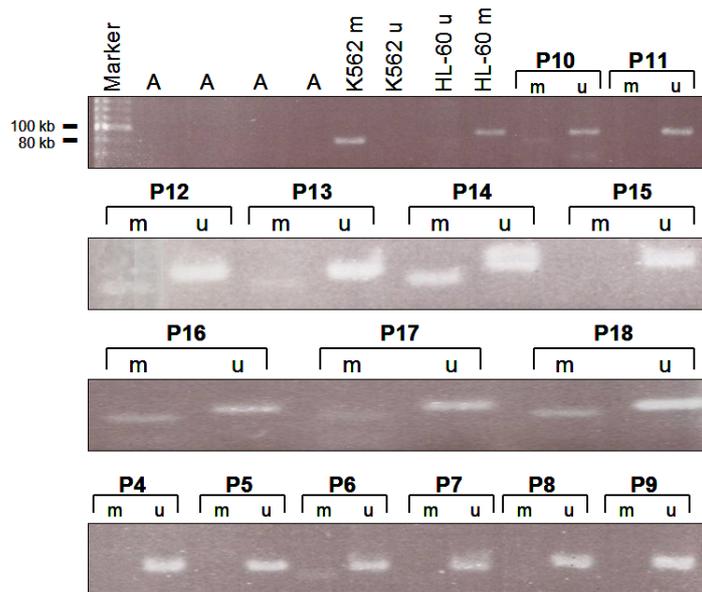


Abbildung 15: Polymerasekettenreaktion von O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase für K562, HL-60 und die Proben der MDS-Patienten P4-P18; „m“ entspricht methyliertem Primerset, „u“ entspricht unmethyliertem Primerset, „A“ entspricht der Negativkontrolle mit destilliertem Wasser. MDS = Myelodysplastisches Syndrom

3.2.2 Pyrosequenzierung von Proben der MDS-Patienten

Die isolierte DNA von jeweils 10 Proben der MDS-Patienten wird zur Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung (s. Kapitel 2.3.8) im Labor varionostic in Ulm untersucht. Die Auswertung erfolgt wie im Abschnitt 3.1.6 beschrieben. Ab einem Methylierungsanteil von über 3% gilt die Probe als methyliert.

Die Proben der MDS-Patienten erweisen sich in der Pyrosequenzierung größtenteils als unmethyliert, s. untere Tabelle 13. Der höchste Methylierungsanteil einer CpG-Position beträgt nur 7,49%. Der höchste Methylierungsanteil der Hirntumor-Proben lag im Vergleich dazu bei 100%.

3 Ergebnisse

Jedoch zeigt immerhin die Hälfte der Proben eine sehr geringe Methylierung mit Anteilen unter 8% an einzelnen, jeweils unterschiedlichen CpG-Positionen. Dabei entfallen auf eine Probe nur 1 bis maximal 2 methylierte CpG-Positionen, verglichen mit einer Methylierung von bis zu 9 Positionen bei den Hirntumor-Proben.

Tabelle 13: Ergebnisse der Pyrosequenzierung von Proben der MDS-Patienten

Teil 1: CpG-Positionen 1-12

Anteile der Methylierung in %; Methylierte Positionen sind rot unterlegt.

MDS = Myelodysplastisches Syndrom; CpG = Cytosine preceding Guanine

Pat.	CpG-Position											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	5,61	0	0	0	0,03	0	0,46	0	0	0	0	6,46
2	0,1	0	0	0,75	0,49	1,91	0	0	0	0,55	0	0
3	0	0	0	0,26	0	1,2	0,11	0	0	0	1,81	0
4	0	0	0	0	0,37	0	0	0	0	0,92	2,17	0
6	0	0	0	0	0	0,26	0	0	0,61	1,3	0	0
11	0	0,26	0	0	0,76	2,19	1,94	0	0	0	1,68	0
14	0	0,15	0	0	0	0	0,17	0	2,06	0,45	0	1,01
15	0	1,82	0	0	0	0	0	0	0	0	0,84	0
16	0	0,85	1,67	0,64	0	0	0,42	0,81	0	1,35	0	0,72
17	0	0	0	0	0	0	0	3,37	0,32	0	0	0

3 Ergebnisse

Tabelle 14: Ergebnisse der Pyrosequenzierung von Proben der MDS-Patienten

Teil 2: CpG-Positionen 13-24

Anteile der Methylierung in %; Methylierte Positionen sind rot unterlegt.

MDS = Myelodysplastisches Syndrom; CpG = Cytosine preceding Guanine

Pat.	CpG-Position											
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	0	0	0	0	0	0	0	1,42	0,69	0,13	0	2,7
2	0	0	0	0	0	1,01	0	0,28	0	0,68	0	0,05
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,14	0	0	0
4	3,19	0	0	0	0	0	0	6,47	0	0,23	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0,66	0	0,57	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0,15	0	0,72	0,93	0,82	2,08
14	0	0	0	0	0	0	1,08	0	0	0,88	0,19	0,05
15	1,59	7,49	0	0,94	0	0	0	0	0	1,22	0	0
16	0	0	0	0	2,38	0	0	1,63	0	0,25	0	0,69
17	0	0	0	0	0	0	2,96	0	0,19	0	0	0

3 Ergebnisse

Tabelle 15: Ergebnisse der Pyrosequenzierung von Proben der MDS-Patienten

Teil 3: CpG-Positionen 25-27

Anteile der Methylierung in %; Methylierte Positionen sind rot unterlegt.

MDS = Myelodysplastisches Syndrom; CpG = Cytosine preceding Guanine

Pat.	CpG-Position		
	25	26	27
1	0	0	1,06
2	0	0	4,16
3	0	0	0,22
4	0	0	0
6	0	0	0
11	1,85	0	0
14	0	0	0,79
15	1,16	0	0
16	0,37	0	0
17	0	0	0

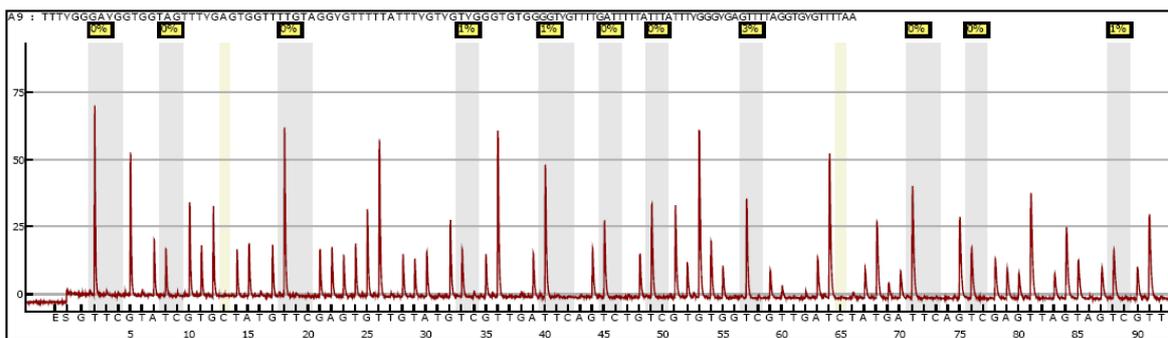


Abbildung 16: PyrogramTM von Patient Nr.1

4 Diskussion

4.1 MGMT-Promotormethylierung bei Hirntumoren

In Deutschland erkranken durchschnittlich 10 von 100 000 Menschen pro Jahr neu an einem Hirntumor. Die Hirntumore stellen 1,6% der neu diagnostizierten Krebserkrankungen dar. Über die Hälfte davon sind maligne Gliome. Bei den Gliomen astrozytären Ursprungs ist das Glioblastoma multiforme (Glioblastom) das häufigste. Es handelt sich hierbei um einen der bösartigsten Tumoren des Menschen. Die Prognose und die Langzeit-Überlebensraten für Hirntumoren sind im Allgemeinen schlecht. Sie verursachen 2-3% der krebsbedingten Todesfälle (Parkin et al. 1999).

Die Therapie von Gliomen sollte unter einem multidisziplinären Ansatz mit primärer chirurgischer Resektion und anschließender Radiochemotherapie erfolgen (Stupp et al. 2005). Für Patienten mit Astrozytomen WHO Grad II liegt die 5-Jahres-Überlebensrate dann zwischen 50% und 60%. Bei Patienten nach Diagnosestellung Glioblastom WHO Grad IV beträgt die mittlere Überlebenszeit nur ca. 1 Jahr, trotz multimodaler Therapie (Stupp et al. 2005).

Die relativ hohe Mortalität ist vor allem dadurch bedingt, dass primäre Tumoren des Gehirns schwer zu behandeln sind und im Falle des Glioblastoms auch noch sehr schnell und aggressiv wachsen. Hirntumoren können nicht großzügig im Gesunden mit breitem Sicherheitsabstand reseziert werden, da hierdurch zu große neurologische Defizite entstehen können. Des Weiteren können nicht alle Chemotherapeutika die Blut-

4 Diskussion

Hirnschranke durchdringen und eine effektive Wirkkonzentration am Tumor aufbauen.

Ein neues Chemotherapeutikum für die Behandlung von Hirntumoren ist das alkylierende Pharmakon Temozolomid. Es überwindet die Bluthirnschranke, erhöht die Strahlensensibilität von Tumoren bei simultaner Radiotherapie und ist gut verträglich. Studien zeigen, dass die Gabe von Temozolomid die mittlere Überlebenszeit signifikant verlängert. Patienten, die während und nach einer Strahlentherapie adjuvant für 6 Zyklen Temozolomid erhielten, erreichten eine mittlere Überlebenszeit von 14,6 Monaten. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten, die nur Strahlentherapie erhielten, lag bei 12,1 Monaten (Stupp et al. 2005). Temozolomid verursacht Zelltod durch Alkylierung der O⁶-Position des Guanins und darauf folgender Apoptose (Roos et al. 2007). Ein wichtiger Resistenzmechanismus der Zelle gegenüber alkylierenden Substanzen ist das DNA-Reparaturenzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, MGMT (Gerson et al. 1986, Roos et al. 2007). Es kommt in allen gesunden menschlichen Zellen vor und bewirkt als Katalysator die Entfernung von Alkylgruppen von der O⁶-Position des Guanins (Gerson et al. 1986, Gerson 2004, Pegg et al. 1983).

Für einige Tumorzelllinien konnte eine verminderte Expression von MGMT gezeigt werden, so z.B. bei Hirntumoren, Kolonkarzinomen, Ösophagus- und Lungenkarzinomen (Nakagawachi et al. 2003, Kondo et al. 2003). Es wird angenommen, dass die verminderte Expression von MGMT durch epigenetische Veränderungen der DNA bedingt ist. Epigenetik bezeichnet stabile, vererbare Veränderungen der Genexpression, die während der Entwicklung der Zelle und der Zellproliferation stattfinden. Die Gensequenz wird dabei nicht verändert (Das and Singal 2004). Epigenetische Veränderungen sind im Gegensatz zu Mutationen reversibel. Die häufigste epigenetische Modifikation ist die DNA-Methylierung. Dabei wird eine Methylgruppe (CH₃) an den Kohlenstoff 5 eines CpG-Dinukleotids kovalent gebunden. Ein solches CpG-Dinukleotid enthält ein

4 Diskussion

Cytosin, das in der Basenabfolge einem Guanin direkt vorausgeht (C preceding G). Durch die Methylierung entsteht 5-Methylcytosin, 5'm5CG 3' (Herman and Baylin 2003).

Besonders CpG-reiche Bereiche des Genoms, sogenannte CpG-Inseln, sind besonders häufig in der Promotorregion eines Gens zu finden. Die meisten CpG-Inseln sind im Normalfall jedoch unmethyliert (Antequera and Bird 1993). Übermäßige Methylierung der Promotorregion eines Gens kann zu dessen Inaktivierung führen, dem so genannten Epigenetic Gene Silencing (Herman and Baylin 2003). Betrifft dieses Epigenetic Gene Silencing Tumorsuppressorgene oder Reparaturenzyme kann dies zu einer malignen Transformation der Zelle führen. Wie M. Esteller in einem Review schreibt: „Zusätzlich zu genetischen Ursachen kann Krebs auch als epigenetische Erkrankung betrachtet werden“ (Esteller 2005). Es wird davon ausgegangen, dass der in einigen Tumorzelllinien gefundene verminderte MGMT-Proteingehalt (Nakagawachi et al. 2003) durch eine solche übermäßige Methylierung der Promoterregion und daraus folgender Inaktivierung des Gens verursacht wird. Ein niedriger MGMT-Proteingehalt sensibilisiert die Tumorzellen für die Wirkung von alkylierenden Chemotherapeutika und korreliert mit längeren Überlebenszeiten (Hegi et al. 2005, Esteller et al. 2000, Chen et al. 1999).

In einer Studie von Hegi et al. zeigten Patienten mit methyliertem Promotor des MGMT-Gens bei kombinierter Radiochemotherapie mit Temozolomid eine mittlere Überlebenszeit von 21,7 Monaten, im Vergleich zu 15,3 Monaten bei Patienten ohne Temozolomid. Bei Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promoter war der Unterschied zwischen Radiotherapie alleine und Radiochemotherapie mit Temozolomid nur gering mit einer Differenz der Überlebenszeiten von 0,9 Monaten (12,7 Monate mit Temozolomid versus 11,8 Monate bei alleiniger Radiotherapie). Die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit unmethylierter MGMT-Promotorregion war mit 12,3 Monaten insgesamt signifikant kürzer als für Patienten mit Promotormethylierung (Hegi et al. 2005). MGMT-Promotormethylierung kann demnach laut Hegi als ein unabhängiger

4 Diskussion

prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Therapie mit alkylierenden Substanzen angesehen werden (Hegi et al. 2004, Esteller et al. 2000).

In dieser Arbeit wurde der Methylierungsstatus von insgesamt 30 Hirntumorproben mittels methylspezifischer PCR untersucht, s. Kap. 2.3.5. Es zeigte sich dabei, dass die Methode relativ anfällig ist und ein mehrmaliges Durchführen der Bisulfit-Behandlung mit nachfolgender methylspezifischer PCR unter gleichen Bedingungen für dieselben Proben teilweise unterschiedliche Ergebnisse zeigte. Es wurde daraufhin festgelegt, die oben genannten Prozeduren insgesamt drei Mal je Probe zu wiederholen. Eine Probe wurde als methyliert gewertet, wenn mindestens in zwei der drei Durchgänge im Anschluss an die PCR eine Bande für den methylierten Primer im UV-beleuchteten Agarose-Gel nachweisbar war. Wie in der Literatur beschrieben, werteten wir Proben, die sowohl für den methylierten als auch für den unmethylierten Primer eine Bande zeigen als methyliert. Es wird davon ausgegangen, dass in den Tumorproben auch gesundes Gewebe enthalten ist, dessen DNA unmethyliert ist (Herman et al. 1996).

Die Analyse von 30 primären Hirntumorproben mittels methylspezifischer PCR ergab eine Methylierung der MGMT-Promotorregion in 50% der Fälle (13 von 26). Esteller et al zeigte in einer Studie mit verschiedenen Tumorarten eine MGMT-Promotormethylierung von 34%. In dieser Studie wurde jedoch nicht zwischen verschiedenen Hirntumorarten nach der WHO-Klassifikation unterschieden (Esteller et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit dagegen handelt es sich bei den Tumorproben in der Mehrzahl um Glioblastome und höhergradige Astrozytome. Hegi et al. fand eine Promotormethylierung in 44,7% bei Glioblastomen (Hegi et al. 2005). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die MGMT-Promotorregion bei 45,2% der Patienten mit anaplastischem Astrozytom und 44,6% der Glioblastom-Patienten methyliert war (Kamiryo et al. 2004). Ein etwas höherer Anteil an Promotormethylierung wurde in einer Studie von Maxwell et al nachgewiesen. Methylspezifische PCR ergab in 61% eine Methylierung.

4 Diskussion

rung der Promotorregion bei 31 Proben von malignen Gliomen (Maxwell et al. 2006). Die Ergebnisse der methylspezifischen PCR sind unter anderem stark abhängig von der Aufbereitung und Aufbewahrung der entnommenen Tumorproben (in Paraffin eingebettet oder in Formalin fixiert, unterschiedliche Aufbewahrungstemperaturen) und schwanken daher zwischen den einzelnen Zentren und Studien.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Pyrosequenzierung, die das varionostic Labor in Ulm für uns durchführte, mit unseren MSP-Ergebnissen zeigt ebenfalls Unterschiede im Methylierungsstatus der Proben.

In den Analysen mittels Pyrosequenzierung zeigte sich eine unterschiedlich starke Methylierung an den einzelnen CpG-Positionen für die jeweiligen Proben, s. Tab. 11 in Kap. 3.1.6. Insgesamt 9 Positionen waren in keiner einzigen Probe methyliert, andere dagegen relativ häufig. Nur eine der untersuchten 10 Proben wies im untersuchten Abschnitt kein einziges methyliertes CpG auf, während in der von uns selbst durchgeführten MSP 50% der Proben (13 von 26) als unmethyliert gewertet wurden. Im Vergleich dazu zeigten sich die MDS-Proben in der Analyse des auswärtigen Labors als fast vollständig unmethyliert. Nach unserem Ergebnis hingegen sind 44,4% der MDS-Proben (8 von 18) methyliert.

Die von uns und von dem auswärtigen Labor auf Methylierung untersuchten CpG-Inseln befanden sich dabei in unterschiedlichen DNA-Abschnitten, s. Kap. 2.1.5 und 2.3.8. In welchem DNA-Abschnitt ist Methylierung nun relevant für die epigenetische Inaktivierung eines Gens? Es stellt sich außerdem die Frage, wie viele methylierte CpG's eine Inaktivierung des MGMT-Gens bewirken oder ob bestimmte CpG-Positionen methyliert sein müssen, während die Methylierung anderer vielleicht keine Inaktivierung zur Folge hat. Interessant wäre hier eine weiterführende Studie mit größerer Fallzahl, in der die Analysen der Pyrosequenzierung mit Western Blots oder immunhistochemischen Analysen für das MGMT-Protein verglichen werden.

4 Diskussion

Der Zusammenhang zwischen Promotormethylierung und verminderter Expression des MGMT-Gens zeigte sich in bisherigen Studien ebenfalls als unterschiedlich stark. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen wurde in dieser Arbeit der Methylierungsstatus der MGMT-Promotorregion bei Gliomen analysiert und mit der Genexpression verglichen. Die Expression des MGMT-Gens wurde durch Nachweis des Proteins mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Proteinkonzentration war in 57,7% vermindert bezogen auf Aktin oder nicht nachweisbar. In einer anderen Studie konnte durch Immunfluoreszenz-Assays ebenfalls ein verminderter MGMT-Gehalt bei Gliomen nachgewiesen werden. In 36% wurde kein MGMT nachgewiesen (Chen et al. 1999). In immunhistochemischen Analysen konnte gezeigt werden, dass bei malignen Gliomen in 31% der Fälle die MGMT-Konzentration vermindert war. Die Untersuchung der MGMT-Aktivität in dieser Studie ergab eine niedrigere Aktivität in 38% der Fälle (Maxwell et al. 2006).

Ein Vergleich der PCR-Ergebnisse mit den Expressionsanalysen zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen Promotormethylierung und verminderter Genexpression. Bei 67% der methylierten Proben war das MGMT-Protein im Western Blot vermindert oder nicht mehr nachweisbar, bei den unmethylierten Proben dagegen nur in 50%. Immunhistochemische Analysen von 52 Oligodendrogliomen zeigen, dass bei methylierten Proben in 79% der Fälle die Anzahl der MGMT-positiven Tumorzellen vermindert (<10%) oder nicht nachweisbar war (Möllemann et al. 2005). Der Methylierungsstatus wurde in dieser Studie ebenfalls mittels methylspezifischer PCR und anschließender Sequenzierung bestimmt. Eine Studie von Brell et al. konnte dagegen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Promotormethylierung und Genexpression bei Gliomen nachweisen (Brell et al. 2005). In dieser Studie wurde der Methylierungsstatus ebenfalls mittels MSP untersucht. Der MGMT-Proteingehalt der Tumorzellen wurde immunhistochemisch bestimmt. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergeb-

nisse ist der stark schwankende Gehalt an zellulärem MGMT-Protein in verschiedenen Arealen einer Tumorprobe, der in immunhistochemischen Analysen nachgewiesen wird (Brell et al. 2005).

Ein gemeinsames Problem der methylspezifischen PCR, Western Blots und der immunhistochemischen Färbungen ist der stark schwankende Anteil an malignen Zellen im Probenmaterial. Die zu untersuchenden Tumorproben enthalten neben maligne entarteten Zellen auch gesundes Bindegewebe, Nervenzellen, Blutgefäße und Blutzellen. Ergebnisse der MSP fallen dementsprechend heterogen aus (Herman et al. 1996) und auch in den immunhistochemischen Analysen schwankt der MGMT-Protein-Gehalt stark zwischen den einzelnen Arealen, s.o. (Brell et al. 2005).

4.1.1 Weitere mögliche Ursachen eines verminderten MGMT-Gehalts

Den unterschiedlichen Ergebnissen aus den oben genannten Studien könnten auch noch andere Ursachen zugrunde liegen. Studien legen nahe, dass eine Inaktivierung des MGMT-Gens durch Promotormethylierung nicht der einzige Grund für den niedrigen MGMT-Proteingehalt von Tumorzellen ist.

Sasai et al untersuchte anhand von transformierten normalen menschlichen Astrozyten (normal human astrocytes, NHA) die MGMT-Expression nach Zugabe von demethylierenden Substanzen wie 5-Aza-2-deoxycytidin und Histondeacetylase-Inhibitoren wie Valproinsäure oder Trichostatin A (Sasai et al. 2007). Die NHA-Zellsysteme wurden durch das Einbringen von Genen wie hTERT, SV40ER, H-RasV12 und myrAKT als experimentelle Modelle für Gliome benützt. Es konnte gezeigt werden, dass in diesen transformierten NHA-Zellsystemen der MGMT-Gehalt deutlich reduziert war. Wäre die Promotormethylierung der alleinige Grund für den reduzierten MGMT-Gehalt

4 Diskussion

in den transformierten Zellen, so müsste sich der MGMT-Proteingehalt nach Zugabe von demethylierenden Substanzen normalisieren. Durch die Zugabe von 5-Aza-2-deoxycytidin alleine bzw. die kombinierte Gabe von 5-Aza-2-deoxycytidin und Valproinsäure konnte eine leichte Erhöhung der MGMT-Proteinkonzentration in den Zellen bewirkt werden. Jedoch reichte diese Behandlung der Zellen nicht aus, die normale MGMT-Konzentration wiederherzustellen. Es ist davon auszugehen, dass weitere Faktoren nötig sind, um die MGMT-Proteinkonzentration in den Zellen weiter zu erhöhen. Das Modell zeigt, dass die Methylierung der CpG-Dinukleotide einer, aber wahrscheinlich nicht der einzige Mechanismus zur Inaktivierung des MGMT-Gens ist.

Eine zusätzliche Möglichkeit zur Gen-Inaktivierung ist eine verminderte Acetylierung der Histonproteine. Untersuchungen zeigen, dass Histondeacetylasen gehäuft in Komplexen mit Methyl-cytosin-bindenden Proteinen vorliegen. Eine Methylierung der Promotorregion führt zu einer Bindung von Methyl-cytosin-bindenden Proteinen an die methylierte DNA. Die Methyl-cytosin-bindenden Proteine sind mit Histondeacetylasen assoziiert und bewirken auf diese Weise eine verminderte Histonacetylierung (Bird and Wolffe 1999, Bird 2002, Fuks et al. 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass in Zelllinien mit verminderter Acetylierung von Histonen, nachgewiesen durch Chromatin-Immunpräzipitation, die MGMT-Expression bzw. die MGMT-RNA erniedrigt war im Vergleich zu Zelllinien mit normaler oder vermehrter Histonacetylierung. Danam et al. gelang es Zellen mit niedrigeren MGMT-Spiegeln durch eine Behandlung mit Trichostatin A, einem Inhibitor der Histondeacetylase, den Gehalt der Zellen an MGMT-RNA wieder leicht anzuheben. Allerdings ist der Effekt der Histondeacetylase-Inhibitoren bei der Wiederherstellung normaler MGMT-Spiegel geringer als der von demethylierenden Substanzen wie 5-Aza-2-deoxycytidin. Eine kombinierte Behandlung der Zellen mit Trichostatin A und 5-Aza-2-deoxycytidin erzielte dabei eine signifikant höhere MGMT-Expression als die Behandlung mit jeweils nur einer der beiden Substanzen (Danam et al. 2005). Histondeacetylierung scheint also

4 Diskussion

bei der Inaktivierung des MGMT-Gens eine Rolle zu spielen, allerdings dominiert nach bisherigen Studien der Effekt der Methylierung von CpG-Dinukleotiden. Normalisiert werden konnten die MGMT-Spiegel auch nicht nach Gabe beider Substanzen.

Die Ergebnisse neuerer Studien deuten darauf hin, dass in der Genese, Rezidiventstehung und Chemotherapieresistenz solider Tumoren transformierte Stammzellen eine wichtige Rolle spielen. Demnach würden nicht nur hämatopoetische Krebserkrankungen wie Leukämien aus transformierten Stammzellen entstehen, sondern auch solide Tumoren in geringen Anteilen Tumorstammzellen aufweisen. Charakteristisch für diese Tumorstammzellen ist ihre Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und Tumorgenese zu induzieren.

Es gelang der Nachweis einer Population von möglichen Stammzellen in Hirntumorgebe, die vermutlich bei der Genese, Rezidiventstehung und Chemotherapieresistenz von Gliomen eine wichtige Rolle spielen. Anhand des Oberflächenmarkers CD133 ließen sich die potentiellen Tumorstammzellen von Hirntumoren durch FACS-Analysen isolieren (Singh et al. 2004, Panagiotakos and Tabar 2007). Liu et al. konnte zeigen, dass die Expression von Genen zur Therapieresistenz und Apoptose-Inhibition in den Tumorstammzellen deutlich höher war als in CD133-defizienten Tumorzellen. Die Expression des DNA-Reparaturenzyms MGMT war in dieser Studie in den CD133+ Zellen 32,4-mal höher als in CD133-negativen Zellen. Ebenfalls erhöht war die Expression von anti-apoptotischem Protein, Apoptose-Inhibitoren und BRCP1, einem Protein, dessen physiologische Funktion im Schutz der Zellen vor zytotoxischen Substraten besteht (Liu et al. 2006, Zhou et al. 2002). CD133+ Zellen zeigten sich, verglichen mit CD133-negativen Zellen, in Kultur stärker resistent gegenüber Chemotherapeutika wie Temozolomid, Carboplatin, Paclitaxel und Etoposid (Liu et al. 2006).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD133 in Tumorgewebe von Glioblastomrezidiven signifikant höher war, als in Gewebe von neu diagnostizier-

4 Diskussion

ten Tumoren (Liu et al. 2006). Die Daten deuten darauf hin, dass die CD133+ Zellen durch die gesteigerte oder noch intakte Expression von Resistenzgenen und Reparaturenzymen chemoresistenter sind und daher in Rezidivtumoren in höheren Anteilen nachweisbar sind.

Es wäre interessant, in zukünftigen Studien den Methylierungsstatus der MGMT-Promoterregion dieser CD133+ Tumorstammzellen zu untersuchen, um nachzuprüfen, inwieweit die MGMT-Expression von der Methylierung oder auch von anderen Zellzyklus-regulierenden Faktoren, wie z.B. dem Hedgehog GLI Pathway abhängt (Sasai et al. 2007). Dieser Signalweg reguliert die Expression von Genen mit stammzellähnlichen Eigenschaften der CD133+ Zellen und deren Fähigkeit sich selbst zu erneuern. Es konnte gezeigt werden, dass die Signale des Hedgehog Pathways außerdem für das Wachstum und das Überleben der Tumorzellen von Gliomen benötigt werden. Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung der CD133+ Zellen ließ sich durch Gabe von Temozolomid nicht beeinträchtigen (Clement et al. 2007). Durch Methylierungsanalysen an den CD133+ Zellen könnten außerdem Aussagen darüber gemacht werden, zu welchem Zeitpunkt in der Differenzierung der transformierten Tumorzellen die Methylierung der CpG-Dinukleotide auftritt.

4.1.2 Zukünftige personalisierte Therapie nach Methylierungsstatus

Bisherige Therapieregimes für Hirntumoren erfolgen nach der „one fits all“-Strategie, wobei alle Patienten einer Risikogruppe die gleiche Therapie erhalten. Neuere Ansätze verfolgen jedoch das Ziel, die Therapie zu „personalisieren“. Dabei wird z.B. eine Chemotherapie neben klinischen Faktoren auch nach molekularen Gesichtspunkten ausgewählt. Patientenbezogene Faktoren wie der Methylierungsstatus des MGMT-Gens könnten zukünftig bei der Auswahl der geeigneten Therapie eine wichtige Rolle spielen

4 Diskussion

(Hau et al. 2007).

Vorher müsste allerdings in weiterführenden Studien nachgewiesen werden, ob die methylspezifische PCR die geeignete Methode zur Bestimmung des Methylierungsstatus eines Patienten darstellt. Die vorliegende Arbeit zeigt die unterschiedlichen Ergebnisse von MSP und Pyrosequenzierung.

Ist der Methylierungsstatus eines Patienten festgestellt, könnten Patienten mit MGMT-Promotormethylierung gezielt für eine adaptierte Therapie mit Temozolomid ausgewählt werden. Fälle von Patienten ohne Promotormethylierung mit voraussichtlich schlechtem Ansprechen aber hoher Toxizität könnten dann frühzeitig erkannt und anders behandelt werden. Alternativ könnten Patienten ohne Promotormethylierung von einer zusätzlichen Therapie mit MGMT-Inhibitoren profitieren. Ein solcher MGMT-Inhibitor ist O⁶-Benzylguanin. Es handelt sich hierbei um ein Pseudosubstrat, das mit MGMT analog der alkylierten DNA reagiert (Dolan et al. 1991). Neuere Studien zeigen, dass sich durch die Kombination von alkylierenden Substanzen wie Temozolomid mit MGMT-Inhibitoren zuvor Therapie-refraktäre Tumoren oder Leukämiezellen für die zytotoxischen Effekte der Alkylanzien sensibilisieren lassen. Eine Studie von Turriziani et al. belegt die Wirksamkeit von O⁶-(4-bromophenyl-)guanin (PaTrin-2), ebenfalls ein MGMT-Inhibitor, in Kombination mit Temozolomid bei kultivierten Zellen einer akuten Leukämie (Turriziani et al. 2006). Ergebnisse einer Studie von Kanzawa et al. deuten darauf hin, dass die Gabe von O⁶-Benzylguanin Glioblastomzelllinien empfindlicher für die zytotoxische Wirkung von Temozolomid macht (Kanzawa et al. 2003). Eine Phase I Studie von Quinn et al. bestimmte 2005 die benötigte Dosis von O⁶-Benzylguanin in vivo, die ausreicht um die MGMT-Aktivität in Tumorzellen zu unterdrücken. Es wurde außerdem die maximal tolerierte Einzeldosis von Temozolomid in Kombination mit O⁶-Benzylguanin bestimmt (Quinn et al. 2005). Phase II und III Studien sollen folgen.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass bei Patienten mit refraktärer bzw. rezidivierender akuter Leukämie Lomeguatrib, ebenfalls ein Pseudosubstrat des MGMT-Enzyms, die MGMT-Aktivität in vivo erfolgreich unterdrückt. 6 von 8 Patienten zeigten nach der Behandlung mit Temozolomid und Lomeguatrib einen partiellen oder kompletten Rückgang der Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark (Caporaso et al. 2007).

4.2 MGMT-Promotormethylierung bei myelodysplastischem Syndrom

Das myelodysplastische Syndrom, MDS, eine sehr heterogene Gruppe von hämatologischen Erkrankungen mit Veränderungen des Knochenmarks und des Blutbildes, entsteht ursächlich durch eine klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen. Es treten Reifungsstörungen mit einer meist erhöhten Zelldichte im Knochenmark auf, die eine oder mehrere Zellreihen betreffen. Im peripheren Blut zeigen sich typischerweise Zytopenien. Da das MDS häufig in eine akute myeloische Leukämie, AML, übergeht, liegt es nahe, auch hier das MGMT-Reparaturenzym und damit eventuelle Chemosensitivität oder -resistenz zu untersuchen. Eine MGMT-Promotormethylierung führt zu einem besseren Ansprechen von Tumor- bzw. Leukämiezellen auf das alkylierende Pharmakon Temozolomid. In Untersuchungen mit Gliompatienten konnte gezeigt werden, dass Tumoren von Patienten mit vermindertem MGMT-Proteingehalt bei Inaktivierung des MGMT-Gens sensibler auf Temozolomid reagieren als solche mit hohem MGMT-Proteingehalt (Hegi et al. 2005).

Seiter et al. wies einen signifikanten antileukämischen Effekt für Temozolomid nach. In der Behandlung von Therapie-resistenten akuten Leukämien konnte es erfolgreich eingesetzt werden (Seiter et al. 2002).

4 Diskussion

Im Rahmen von Phase I Studien wird das Alkylanz Temozolomid mittlerweile auch bei anderen malignen Erkrankungen eingesetzt, unter anderem bei Lymphomen und malignen Melanomen. Laber et al. setzten Temozolomid in Kombination mit Capecitabine und Thalidomid bei Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen ein. Die Studie schloss Patienten mit unterschiedlichen Tumoren ein (Magen-, Kolon-, Pankreas- und Prostatakarzinome, renale Tumoren), die bereits metastasiert und vortherapiert waren. Die Kombination aus Thalidomid, Capecitabine und Temozolomid erwies sich dabei als effektive palliative Chemotherapie mit 4 von 23 Fällen mit teilweisem Ansprechen (partial response) und 4 von 23 Fällen ohne eine weitere Verschlechterung der Erkrankung (stable disease) (Laber et al. 2007). Eine weitere Studie konnte die Wirksamkeit von Temozolomid bei primären Lymphomen des Gehirns in der second line Therapie nachweisen (Reni et al. 2007). In der Behandlung von malignen Melanomen wird Temozolomid ebenfalls eingesetzt (Wolchok and Saenger 2007).

Akute Leukämien, die häufig im Verlauf eines MDS auftreten, sind teilweise sehr schwer zu therapieren und sprechen schlecht auf etablierte Chemotherapien an. In Untersuchungen wird überprüft, inwieweit alkylierende Chemotherapeutika, speziell Temozolomid, in diesen Fällen effektiv sind. In dieser Arbeit wurde deshalb der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors in Blutproben von 18 MDS-Patienten mittels methylspezifischer PCR bestimmt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine MGMT-Promotormethylierung in 44% der Fälle vorliegt. 56% der Proben erwiesen sich als unmethyliert. Die Methylierung ließ sich dabei keinem bestimmten Krankheitsstadium nach WHO-Klassifikation zuordnen. Die methylierten Proben stammen von Patienten in allen Stadien von refraktärer Anämie bis hin zur RAEB II und sekundärer AML. Es ließ sich auch kein Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus und Karyotyp feststellen. Sowohl Patientenproben mit Veränderungen des Karyotyps als auch Proben mit normalem Karyotyp waren methyliert. Gleiches galt für die unmethylierten Pro-

4 Diskussion

ben.

In einer ersten humanen Zelllinie mit therapiebedingtem MDS, PC-MDS, wurde der Methylierungsstatus unterschiedlicher Gene untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Gene wie p15(INK4b) und p16(INK4a), die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, zudem aber auch das Reparaturenzym MGMT methylierte Promotorregionen aufweisen (Bogdanovic et al. 2007). Hofmann et al. zeigte ebenfalls an nicht-adhärenenten Zellen des Knochenmarks von MDS-Patienten, dass die Gene p15(INK4b) und p16(INK4a) methylierte CpG-Dinukleotide in der Promotorregion aufweisen. In Untersuchungen von aufgereinigten CD34+ Zellen des Knochenmarks, einem Marker für hämatopoetische Stammzellen, zeigen sich diese regulatorischen Gene dagegen unmethyliert. Dies deutet darauf hin, dass die Methylierung der den Zellzyklus kontrollierenden Gene erst spät in der Differenzierung von myelodysplastischen Zellen auftritt (Hofmann et al. 2006).

Das Alkylans Temozolomid wurde bereits in einer ersten Phase I Studie bei MDS Patienten eingesetzt. Ein therapeutischer Effekt trat nicht ein. Einige MDS-Patienten zeigten dagegen unter der Behandlung mit Temozolomid eine Verschlechterung der Zytopenien, des neutropenischen Fiebers und verstärkt kardiovaskuläre Probleme. Ein Rückgang der dysplastischen Zellen in Blut und/oder Knochenmark oder eine Normalisierung des Karyotyps wurde nicht nachgewiesen (Seiter et al. 2004).

Dass eine übermäßige Methylierung dennoch eine Rolle in der Pathogenese des MDS spielt, zeigt eine Untersuchung von Müller et al. Demethylierende Substanzen wie 5-Aza-cytidin und 5-Aza-2-deoxycytidin wurden dabei erfolgreich in der Therapie von MDS-Patienten eingesetzt. Etwa 30% der Patienten zeigten nach einer Behandlung mit 5-Aza-2-deoxycytidin eine Normalisierung des Karyotyps (Müller et al. 2006). 5-Aza-2-deoxycytidin (Decitabine) wurde mittlerweile in den USA von der FDA für die Behandlung aller MDS-Subtypen zugelassen.

5 Zusammenfassung

Pro Jahr erkranken durchschnittlich 10 von 100 000 Menschen neu an einem Hirntumor. Die Prognose und Langzeit-Überlebensraten sind im Allgemeinen schlecht. Die moderne Behandlung von malignen Gliomen schließt Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie ein. Ein dabei immer häufiger eingesetztes Chemotherapeutikum ist das Alkylanz Temozolomid.

Das Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Reparaturenzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, MGMT, erkennt DNA-Schäden, die durch alkylierende Substanzen wie z.B. Temozolomid entstanden sind. Durch das MGMT-Protein werden Alkylgruppen von der O⁶-Position des Guanins entfernt und die DNA repariert. Übermäßige Methylierung der Promotorregion von MGMT auf Chromosom 10q26 führt zum Funktionsverlust des Enzyms. Der Verlust von MGMT kann zu einer erhöhten Sensibilität für alkylierende Chemotherapeutika führen. Die durch die Alkylierung der DNA verursachten Schäden, insbesondere das gebildete O⁶-Methylguanin, können dann nicht repariert werden und führen zum Zelltod. In der Behandlung von Hirntumoren mit Temozolomid kann der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors daher eine große Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurden 30 Proben aus primärem Tumormaterial untersucht. Es handelte sich dabei um Gewebeproben von Gliomen WHO (World Health Organisation) Grad I-IV, sowie von Metastasen solider Tumoren. Der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors wurde mittels methylspezifischer Polymerase-Kettenreaktion (MSP) nach Natrium-Bisulfit-Modifikation der DNA bestimmt. Außerdem wurde durch Western

5 Zusammenfassung

Blot-Analyse das MGMT-Protein untersucht. Die Proteinkonzentration von MGMT wurde mit dem Methylierungsstatus verglichen. Es folgten Sequenzierungen des betroffenen Genabschnitts.

13 von 26 auswertbaren Proben (50%) zeigten sich methyliert, 13 von 26 unmethyliert. Bezieht man diese Ergebnisse nur auf die aggressivsten Hirntumoren, die Glioblastome WHO Grad IV, waren 8 von 15 Proben methyliert (53%). Es konnte gezeigt werden, dass bei 67% der Proben (8/12) mit methylierten MGMT-Promotor wenig bzw. kein MGMT-Protein nachweisbar ist. Bei einem Großteil dieser methylierten Proben mit niedriger Proteinkonzentration handelte es sich um Gliome WHO Grad III und IV (7/8). Die Sequenzierung der methylierten Proben bestätigte die Ergebnisse der MSP. Unsere Daten zeigen, dass bei höhergradigen Gliomen die Promotorregion des MGMT-Gens gehäuft methyliert und die Proteinkonzentration vermindert ist. Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor könnten daher eher von einer Temozolomid-Therapie profitieren, als solche, deren DNA unmethyliert ist.

Es wurden außerdem DNA-Proben von 18 Patienten mit myelodysplastischem Syndrom, MDS, untersucht. Da das MDS häufig in eine akute myeloische Leukämie übergeht, liegt es nahe, auch hier das MGMT-Reparaturenzym und damit eventuelle Chemosensitivität oder -resistenz zu untersuchen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine MGMT-Promotormethylierung in 44% der Fälle. Es konnte keine Korrelation zwischen Methylierungsstatus und dem Krankheitsstadium nach WHO-Klassifikation, dem Alter des Patienten oder des Karyotyps hergestellt werden.

Bei MDS-Patienten wurde Temozolomid in einer Phase I Studie eingesetzt, zeigte jedoch keinen therapeutischen Effekt. Dagegen konnten demethylierende Substanzen wie 5-Aza-2-deoxycytidin (Decitabine) erfolgreich in der Therapie von MDS-Patienten eingesetzt werden. Etwa 30% der Patienten zeigten nach einer Behandlung mit Decitabine eine Normalisierung des Karyotyps. Es wurde mittlerweile in den USA (United States of America) für die Behandlung aller MDS-Subtypen zugelassen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] M. Ammirati, N. Vick, Y. L. Liao, I. Ciric, and M. Mikhael. Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas. *Neurosurgery*, 21:201–206, 1987.
- [2] F. Antequera and A. Bird. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90:11995–11999, 1993.
- [3] C. Aul, N. Gattermann, and W. Schneider. Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 82:358–367, 1992.
- [4] S. B. Baylin, J. G. Herman, J. R. Graff, P. M. Vertino, and J. P. Issa. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*, 72:141–196, 1998.
- [5] T. H. Bestor and G. L. Verdine. DNA methyltransferases. *Curr Opin Cell Biol*, 6:380–389, 1994.
- [6] K. K. Bhakat and S. Mitra. CpG methylation-dependent repression of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene linked to chromatin structure alteration. *Carcinogenesis*, 24:1337–1345, 2003.
- [7] A. Bird. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16:6–21, 2002.

6 Literaturverzeichnis

- [8] A. P. Bird and A. P. Wolffe. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell*, 99:451–454, 1999.
- [9] T. Biswas, C. V. Ramana, G. Srinivasan, I. Boldogh, T. K. Hazra, Z. Chen, K. Tano, E. B. Thompson, and S. Mitra. Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. *Oncogene*, 18:525–532, 1999.
- [10] G. Bogdanovic, V. Jurisic, N. Kraguljac, J. Mrdjanovic, D. Jakimov, K. Krtolica, M. Krajnovic, Z. Magic, B. Stojiljkovic, L. Andrijevic, T. Srdic, M. Balti, and S. Popovic. Characteristics of novel myeloid precursor cell line, PC-MDS, established from a bone marrow of the patient with therapy-related myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*, 31:1105–1113, 2007.
- [11] M. Brell, A. Tortosa, E. Verger, J. M. Gil, N. Viñolas, S. Villá, J. J. Acebes, L. Caral, T. Pujol, I. Ferrer, T. Ribalta, and F. Graus. Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res*, 11:5167–5174, 2005.
- [12] J. C. Buckner. Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Semin Oncol*, 30:10–14, 2003.
- [13] J. G. Cairncross, K. Ueki, M. C. Zlatescu, D. K. Lisle, D. M. Finkelstein, R. R. Hammond, J. S. Silver, P. C. Stark, D. R. Macdonald, Y. Ino, D. A. Ramsay, and D. N. Louis. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*, 90:1473–1479, 1998.
- [14] P. Caporaso, M. Turriziani, A. Venditti, F. Marchesi, F. Buccisano, M. C. Tirindelli, E. Alvino, A. Garbin, G. Tortorelli, L. Toppo, E. Bonmassar, S. D’Atri, and S. Amadori. Novel role of triazenes in haematological malignancies: Pilot study

6 Literaturverzeichnis

- of Temozolomide, Lomeguatrib and IL-2 in the chemo-immunotherapy of acute leukaemia. *DNA Repair (Amst)*, 6:1179–1186, 2007.
- [15] G. Chen, W. Zeng, A. Miyazato, E. Billings, J. P. Maciejewski, S. Kajigaya, E. M. Sloand, and N. S. Young. Distinctive gene expression profiles of CD34 cells from patients with myelodysplastic syndrome characterized by specific chromosomal abnormalities. *Blood*, 104:4210–4218, 2004.
- [16] Z. P. Chen, D. Yarosh, Y. Garcia, D. Tampieri, G. Mohr, A. Malapetsa, A. Langleben, and L. C. Panasci. Relationship between O6-methylguanine-DNA methyltransferase levels and clinical response induced by chloroethylnitrosourea therapy in glioma patients. *Can J Neurol Sci*, 26:104–109, 1999.
- [17] V. Clement, P. Sanchez, N. de Tribolet, I. Radovanovic, and A. Ruiz i Altaba. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol*, 17:165–172, 2007.
- [18] R. P. Danam, S. R. Howell, T. P. Brent, and L. C. Harris. Epigenetic regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins. *Mol Cancer Ther*, 4:61–69, 2005.
- [19] P. M. Das and R. Singal. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*, 22:4632–4642, 2004.
- [20] L. M. DeAngelis. Chemotherapy for brain tumors—a new beginning. *N Engl J Med*, 352:1036–1038, 2005.
- [21] M. E. Dolan, R. B. Mitchell, C. Mummert, R. C. Moschel, and A. E. Pegg. Effect of O6-benzylguanine analogues on sensitivity of human tumor cells to the cytotoxic effects of alkylating agents. *Cancer Res*, 51:3367–3372, 1991.

6 Literaturverzeichnis

- [22] M. Ehrlich. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, 21:5400–5413, 2002.
- [23] M. Esteller. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol*, 17:55–60, 2005.
- [24] M. Esteller, J. Garcia-Foncillas, E. Andion, S. N. Goodman, O. F. Hidalgo, V. Vanaclocha, S. B. Baylin, and J. G. Herman. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*, 343:1350–1354, 2000.
- [25] M. Esteller, P. G. Corn, S. B. Baylin, and J. G. Herman. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 61:3225–3229, 2001.
- [26] M. Esteller, G. Gaidano, S. N. Goodman, V. Zagonel, D. Capello, B. Botto, D. Rossi, A. Gloghini, U. Vitolo, A. Carbone, S. B. Baylin, and J. G. Herman. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst*, 94:26–32, 2002.
- [27] P. Fenaux. Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol*, 73:429–437, 2001.
- [28] F. Fuks, W. A. Burgers, N. Godin, M. Kasai, and T. Kouzarides. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J*, 20:2536–2544, 2001.
- [29] S. L. Gerson. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 4:296–307, 2004.
- [30] S. L. Gerson, J. E. Trey, K. Miller, and N. A. Berger. Comparison of O6-

6 Literaturverzeichnis

- alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis*, 7:745–749, 1986.
- [31] P. Greenberg, C. Cox, M. M. LeBeau, P. Fenaux, P. Morel, G. Sanz, M. Sanz, T. Vallespi, T. Hamblin, D. Oscier, K. Ohyashiki, K. Toyama, C. Aul, G. Mufti, and J. Bennett. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 89:2079–2088, 1997.
- [32] L. C. Harris, J. S. Remack, P. J. Houghton, and T. P. Brent. Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res*, 56:2029–2032, 1996.
- [33] P. Hau, R. Stupp, and M. E. Hegi. MGMT methylation status: the advent of stratified therapy in glioblastoma? *Dis Markers*, 23:97–104, 2007.
- [34] M. E. Hegi, A.-C. Diserens, S. Godard, P.-Y. Dietrich, L. Regli, S. Ostermann, P. Otten, G. Van Melle, N. de Tribolet, and R. Stupp. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res*, 10:1871–1874, 2004.
- [35] M. E. Hegi, A.-C. Diserens, T. Gorlia, M.-F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. C. Bromberg, P. Hau, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross, R. C. Janzer, and R. Stupp. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 352:997–1003, 2005.
- [36] J. G. Herman and S. B. Baylin. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349:2042–2054, 2003.
- [37] J. G. Herman, J. R. Graff, S. Myöhänen, B. D. Nelkin, and S. B. Baylin.

6 Literaturverzeichnis

- Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:9821–9826, 1996.
- [38] H. Hirai. Molecular pathogenesis of MDS. *Int J Hematol*, 76 Suppl 2:213–221, 2002.
- [39] W. K. Hofmann, C. W. Miller, K. Tsukasaki, S. Tavor, T. Ikezoe, D. Hoelzer, S. Takeuchi, and H. P. Koefler. Mutation analysis of the DNA-damage checkpoint gene CHK2 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Leuk Res*, 25:333–338, 2001.
- [40] W-K. Hofmann, S. Takeuchi, N. Takeuchi, E. Thiel, D. Hoelzer, and H. P. Koefler. Comparative analysis of hypermethylation of cell cycle control and DNA-mismatch repair genes in low-density and CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*, 30:1347–1353, 2006.
- [41] K.-W. Jair, K. E. Bachman, H. Suzuki, A. H. Ting, I. Rhee, R.-W. Chiu Yen, S. B. Baylin, and K. E. Schuebel. De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Res*, 66:682–692, 2006.
- [42] T. Kamiryo, K. Tada, S. Shiraishi, N. Shinojima, M. Kochi, and Y. Ushio. Correlation between promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase gene and prognosis in patients with high-grade astrocytic tumors treated with surgery, radiotherapy, and 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-based chemotherapy. *Neurosurgery*, 54:349–57; discussion 357, 2004.
- [43] T. Kanzawa, J. Bedwell, Y. Kondo, S. Kondo, and I. M. Germano. Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. *J Neurosurg*, 99:1047–1052, 2003.

6 Literaturverzeichnis

- [44] P. Kleihues, D. N. Louis, B. W. Scheithauer, L. B. Rorke, G. Reifenberger, P. C. Burger, and W. K. Cavenee. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61:215–25; discussion 226–9, 2002.
- [45] Y. Kondo, L. Shen, and J.-P. J. Issa. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol*, 23:206–215, 2003.
- [46] C. Kress, H. Thomassin, and T. Grange. Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Lett*, 494:135–140, 2001.
- [47] D. Laber, M. Khan, G. Kloecker, C. Schonard, B. Taft, and C. Salvador. A Phase I Study of Thalidomide, Capecitabine and Temozolomide in Advanced Cancer. *Cancer Biol Ther*, 6, 2007.
- [48] M. Lacroix, D. Abi-Said, D. R. Fourney, Z. L. Gokaslan, W. Shi, F. DeMonte, F. F. Lang, I. E. McCutcheon, S. J. Hassenbusch, E. Holland, K. Hess, C. Michael, D. Miller, and R. Sawaya. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*, 95:190–198, 2001.
- [49] E. Li, T. H. Bestor, and R. Jaenisch. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69:915–926, 1992.
- [50] G. Liu, X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black, and J. S. Yu. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5:67, 2006.
- [51] J. A. Maxwell, S. P. Johnson, J. A. Quinn, R. E. McLendon, F. Ali-Osman, A. H. Friedman, J. E. Herndon, K. Bierau, J. Bigley, D. D. Bigner, and H. S. Friedman. Quantitative analysis of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in malignant glioma. *Mol Cancer Ther*, 5:2531–2539, 2006.

6 Literaturverzeichnis

- [52] M. Möllemann, M. Wolter, J. Felsberg, V. P. Collins, and G. Reifenberger. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer*, 113:379–385, 2005.
- [53] C. I. Müller, B. Rüter, H. P. Koeffler, and M. Lübbert. DNA hypermethylation of myeloid cells, a novel therapeutic target in MDS and AML. *Curr Pharm Biotechnol*, 7:315–321, 2006.
- [54] T. Nakagawachi, H. Soejima, T. Urano, W. Zhao, K. Higashimoto, Y. Satoh, S. Matsukura, S. Kudo, Y. Kitajima, H. Harada, K. Furukawa, H. Matsuzaki, M. Emi, Y. Nakabeppu, K. Miyazaki, M. Sekiguchi, and T. Mukai. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene*, 22:8835–8844, 2003.
- [55] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, and E. Li. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99:247–257, 1999.
- [56] M. Olsson and T. Lindahl. Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O6-methylguanine to a protein cysteine residue. *J Biol Chem*, 255:10569–10571, 1980.
- [57] G. Panagiotakos and V. Tabar. Brain tumor stem cells. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 7:215–220, 2007.
- [58] J. E. Parker and G. J. Mufti. The myelodysplastic syndromes: a matter of life or death. *Acta Haematol*, 111:78–99, 2004.
- [59] D. M. Parkin, P. Pisani, and J. Ferlay. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 49:33–64, 1, 1999.

6 Literaturverzeichnis

- [60] A. E. Pegg, L. Wiest, R. S. Foote, S. Mitra, and W. Perry. Purification and properties of O6-methylguanine-DNA transmethylase from rat liver. *J Biol Chem*, 258:2327–2333, 1983.
- [61] A. Prokhortchouk, B. Hendrich, H. Jørgensen, A. Ruzov, M. Wilm, G. Georgiev, A. Bird, and E. Prokhortchouk. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev*, 15:1613–1618, 2001.
- [62] B. Quesnel, G. Guillerm, R. Vereecque, E. Wattel, C. Preudhomme, F. Bauters, M. Vanrumbeke, and P. Fenaux. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*, 91:2985–2990, 1998.
- [63] J. A. Quinn, A. Desjardins, J. Weingart, H. Brem, M. E. Dolan, S. M. Delaney, J. Vredenburgh, J. Rich, A. H. Friedman, D. A. Reardon, J. H. Sampson, A. E. Pegg, R. C. Moschel, R. Birch, R. E. McLendon, J. M. Provenzale, S. Gururangan, J. E. Dancey, J. Maxwell, S. Tourt-Uhlig, J. E. Herndon, D. D. Bigner, and H. S. Friedman. Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol*, 23:7178–7187, 2005.
- [64] M. Reni, F. Zaja, W. Mason, J. Perry, E. Mazza, M. Spina, R. Bordonaro, F. Ilariucci, M. Faedi, G. Corazzelli, P. Manno, E. Franceschi, A. Pace, M. Candela, A. Abbadessa, C. Stelitano, G. Latte, and A. J M Ferreri. Temozolomide as salvage treatment in primary brain lymphomas. *Br J Cancer*, 96:864–867, 2007.
- [65] I. Rhee, K. E. Bachman, B. H. Park, K.-W. Jair, R.-W. C. Yen, K. E. Schuebel, H. Cui, A. P. Feinberg, C. Lengauer, K. W. Kinzler, S. B. Baylin, and B. Vogelstein. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*, 416:552–556, 2002.

6 Literaturverzeichnis

- [66] L. A. Gloeckler Ries, M. E. Reichman, D. Riedel Lewis, B. F. Hankey, and B. K. Edwards. Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Oncologist*, 8:541–552, 2003.
- [67] D. E. Rollison, M. Hayat, M. Smith, S. S. Strom, W.D. Merritt, L. Ries, B. K. Edwards, and A. F. List. First Report of National Estimates of the Incidence of Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myeloproliferative Disorders from the U.S. SEER Program. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 108:Abstract 247, 2006.
- [68] W. P. Roos, L. F Z Batista, S. C. Naumann, W. Wick, M. Weller, C. F M Menck, and B. Kaina. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene*, 26:186–197, 2007.
- [69] K. Sasai, T. Akagi, E. Aoyanagi, K. Tabu, S. Kaneko, and S. Tanaka. O6-methylguanine-DNA methyltransferase is downregulated in transformed astrocyte cells: implications for anti-glioma therapies. *Mol Cancer*, 6:36, 2007.
- [70] J. A. Schwartzbaum, J. L. Fisher, K. D. Aldape, and M. Wrensch. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*, 2:494–503, 2006.
- [71] K. Seiter, D. Liu, T. Loughran, A. Siddiqui, P. Baskind, and T. Ahmed. Phase I study of temozolomide in relapsed/refractory acute leukemia. *J Clin Oncol*, 20:3249–3253, 2002.
- [72] K. Seiter, D. Liu, A. D. Siddiqui, R. Lerner, J. Nelson, and T. Ahmed. Evaluation of temozolomide in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*, 45:1209–1214, 2004.
- [73] S. K. Singh, C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano, and P. B. Dirks. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432:396–401, 2004.

6 Literaturverzeichnis

- [74] J. S. Smith, A. Perry, T. J. Borell, H. K. Lee, J. O'Fallon, S. M. Hosek, D. Kimmel, A. Yates, P. C. Burger, B. W. Scheithauer, and R. B. Jenkins. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol*, 18:636–645, 2000.
- [75] K. S. Srivenugopal and F. Ali-Osman. The DNA repair protein, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein. *Oncogene*, 21:5940–5945, 2002.
- [76] K. S. Srivenugopal, S. R. Mullapudi, J. Shou, T. K. Hazra, and F. Ali-Osman. Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cells. *Cancer Res*, 60:282–287, 2000.
- [77] R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. B. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff, European Organisation for Research, Treatment of Cancer Brain Tumor, Radiotherapy Groups, and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352:987–996, 2005.
- [78] S. Tanaka, I. Kobayashi, S. Utsuki, H. Oka, K. Fujii, T. Watanabe, T. Nagashima, and T. Hori. O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression in gliomas by means of real-time quantitative RT-PCR and clinical response to nitrosoureas. *Int J Cancer*, 103:67–72, 2003.
- [79] M. Turriziani, P. Caporaso, L. Bonmassar, F. Buccisano, S. Amadori, A. Venditti, M. Cantonetti, S. D'Atri, and E. Bonmassar. O6-(4-bromothenyl)guanine (PaTrin-2), a novel inhibitor of O6-alkylguanine DNA alkyl-transferase, increases

6 Literaturverzeichnis

- the inhibitory activity of temozolomide against human acute leukaemia cells in vitro. *Pharmacol Res*, 53:317–323, 2006.
- [80] J. W. Vardiman. Hematopathological concepts and controversies in the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, pages 199–204, 2006.
- [81] T. Watanabe, Y. Katayama, C. Komine, A. Yoshino, A. Ogino, T. Ohta, and T. Fukushima. O6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course. *Int J Cancer*, 113:581–587, 2005.
- [82] P. J. Williamson, A. R. Kruger, P. J. Reynolds, T. J. Hamblin, and D. G. Oscier. Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, 87:743–745, 1994.
- [83] J. D. Wolchok and Y. M. Saenger. Current topics in melanoma. *Curr Opin Oncol*, 19:116–120, 2007.
- [84] S. Zhou, J. J. Morris, Y. Barnes, L. Lan, J. D. Schuetz, and B. P. Sorrentino. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:12339–12344, 2002.

Danksagung

Bei Herrn PD Dr. Mathias Schmid möchte ich mich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Unterstützung und fundierte Beratung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen bedanken.

Ich danke Frau Dr. Manuela Wölfe für die nette Betreuung und ihre Hilfestellung bei der Einarbeitung in die komplexe Thematik.

Besonders danken möchte ich auch Frau Katrin Lehmann für die hilfreiche Einführung in die Laborarbeit, ihre guten Ratschläge sowie die nette und freundliche Atmosphäre im Labor. Sie trug maßgeblich dazu bei, dass mir die Arbeit im Labor sehr viel Spaß gemacht hat.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern in den Laboren der Inneren Medizin III für ihre Hilfsbereitschaft, vor allem Frau Marianne Habdank für ihre Hilfestellung beim Sequenzieren.

Ferner danke ich den Kollegen der Neurochirurgie in Günzburg, die mir freundlicherweise Gewebeproben aus OP-Material überließen.

Meinen Eltern danke ich für die Geduld, die aufmunternde Motivation und die Unterstützung sowohl während meines Studiums als auch während der Arbeit an meiner Dissertation.