

**Molekularzytogenetische Untersuchungen zur Abhängigkeit  
des Therapieerfolgs maligner menschlicher Gliome mit  
Temozolomid-Chemotherapie von der Art der vorliegenden  
genetischen Veränderungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
der Doktorin der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von

Dipl. Biol. Silke Wemmert

Saarbrücken

2006

Tag des Kolloquiums

04. Juli 2006

Dekan

Prof. Dr. K. Hegetschweiler

Prüfungsausschuss

Vorsitzender

Prof. Dr. J. Walter

Berichterstatter

Prof. Dr. K.D. Zang

Prof. Dr. M. Löbrich

akad. Mitarbeiterin

Dr. M. Paulsen

Für Lara Alicia

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Thematische Einführung	1
1.2. Gliome	3
1.2.1. Astrozytome	3
1.2.2. Oligodendrogliale und oligoastrozytäre Tumore	5
1.3. Glioblastoma multiforme	6
1.3.1. Therapie des Glioblastoma multiforme	7
1.3.2. Strahlentherapie	8
1.3.3. Chemotherapie	8
1.3.3.1. Temozolomid-Therapie	10
1.4. Genetische Veränderungen in Gliomen	11
1.5. Epigenetische Veränderungen	20
1.6. Eigene Fragestellungen	23
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1. Untersuchungsgewebe	24
2.1.1. Einteilung der Patientengruppen	26
2.2. Zellkultur und Herstellung von Chromosomenpräparaten	27
2.3. DNA-Isolierung	27
2.3.1. Isolierung genomischer DNA aus Blut	27
2.3.2. Isolierung genomischer DNA aus Gewebe	28
2.3.3. Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	28
2.4. Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)	29
2.4.1. Markierung genomischer DNA	30
2.4.2. Dot-Blot	31
2.4.3. Agarosegel-Elektrophorese	31

---

2.4.4. Hybridisierung	31
2.4.5. Stringenzwaschungen und Detektion	32
2.4.6. Auswertung	33
2.4.7. Kontrollen der Markierungsreaktion und CGH	35
2.4.8. Überlebenszeitanalyse	36
2.5. Bestimmung der Genexpression mittels realtime-PCR	37
2.5.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	37
2.5.2. RNA-Isolierung	38
2.5.3. Reverse Transkription	38
2.5.3.1. RT-PCR	39
2.5.4. Aufbau des LightCyclers™	39
2.5.5. Expressionsanalyse von MGMT mittels SYBR® Green 1	42
2.5.6. Erstellen einer Standardkurve	42
2.5.7. Kalibrator-normalisierte relative Quantifizierung mit Effizienzkorrektur	43
2.5.8. Auswertung	44
2.6. Immunhistochemische Analyse	45
2.6.1. Gewebepräparation	45
2.6.2. Silanisieren von Objektträgern	45
2.6.3. Nachweis der O <sup>6</sup> -Methylguanin-Methyltransferase (MGMT)	45
2.6.4. Auswertung	46
2.7. Methylierungsanalyse	47
2.7.1. Bisulfit-Modifikation der DNA	47
2.7.2. PCR nach Bisulfitmodifikation	48
2.7.3. Präparative Agarosegel-Elektrophorese	49
2.7.4. Isolierung der DNA aus Agarosegelen	49
2.7.5. Klonierung der PCR-Produkte	50
2.7.6. Isolierung von Plasmid-DNA	50
2.7.7. Überprüfung der Produkte	51
2.7.8. Sequenzierung	52

---

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3.1. Ergebnisse der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) von Gliomen	53
3.2. Genetische Veränderungen der Glioblastome in der TMZ-Gruppe	59
3.3. Genetische Veränderungen der Glioblastome in der Kontroll-Gruppe	60
3.4. Häufigkeit der typischen genetischen Veränderungen in den beiden Patientengruppen	61
3.5. Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten	62
3.5.1. Therapieeffekt	62
3.5.2. Einfluss von genetischen Veränderungen auf die Überlebenszeit von Patienten	64
3.5.2.1. Tumore mit Gewinn auf Chromosomenarm 7p	64
3.5.2.2. Tumore mit Verlust auf Chromosomenarm 9p	66
3.5.2.3. Tumore mit Verlust auf Chromosomenarm 10q	68
3.5.2.4. Tumore mit Verlust auf Chromosomenarm 13q	70
3.5.2.5. Weitere genetische Veränderungen in Glioblastomen	72
3.6. Ergebnisse der Expressionsanalyse von MGMT mittels realtime-PCR am Lightcycler™	73
3.7. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von MGMT	80
3.7.1. TMZ-Gruppe	82
3.7.2. TMZ-unbehandelte Kontroll-Gruppe	82
3.8. Ergebnisse der Methylierungsanalyse	83
3.8.1. Ergebnisse der Methylierungs-Studie von <i>CDKN2A</i>	84
3.8.2. Ergebnisse der Methylierungsanalyse von <i>CDKN2B</i>	85
3.8.3. Ergebnisse der Methylierungsanalyse von <i>MGMT</i>	87
3.8.4. Korrelation der Methylierungsbefunde mit den Daten aus den anderen methodischen Ansätzen	89
<b>4. Diskussion</b>	<b>91</b>
4.1. Heterogenität des Untersuchungsmaterials	91
4.2. Kritische Anmerkungen zur Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH)	91

---

4.3. Interpretation der Ergebnisse der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH)	93
4.4. Prognostisch relevante klinische Faktoren für ein Ansprechen der Glioblastompatienten auf Chemotherapie	99
4.5. Genetische Veränderungen als prognostische Parameter	100
4.5.1. Gewinn von Chromosom 7 und Amplifikation von 7p12 ( <i>EGFR</i> )	101
4.5.2. Verluste von 9p	103
4.5.3. Verluste von Chromosom 10	104
4.5.4. Verluste auf Chromosomenarm 13q	105
4.5.5. Weitere genetische Veränderungen in Glioblastomen	106
4.6. Expressionsanalyse von <i>MGMT</i> mittels realtime PCR	106
4.7. Immunhistochemische Analyse von <i>MGMT</i>	108
4.8. Methylierungsanalyse	111
4.8.1. <i>CDKN2A</i> und <i>CDKN2B</i>	114
4.8.2. <i>MGMT</i>	116
4.9. Ausblick und Vorschläge für weitere Untersuchungen	119
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>121</b>
<b>6. Summary</b>	<b>123</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>125</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>148</b>
8.1. Abkürzungsverzeichnis	148
8.2. Material- und Herstellernachweis	150
8.2.1. Chemikalien, Enzyme, Kits, Verbrauchsmaterial	150
8.2.2. Lösungen	151
8.2.3. Geräte und Software	152
8.3. Sequenzierung der Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	153
8.4. Sequenzierung der Promotorregion von <i>CDKN2B</i>	161
8.5. Sequenzierung der Promotorregion von <i>MGMT</i>	169
<b>9. Danksagung</b>	<b>177</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Thematische Einführung

Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die malignen Tumore die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industriestaaten dar. Der Prozess der Tumorentstehung und –progression wird mittlerweile als eine Akkumulation einer großen Zahl von erworbenen aber auch prädisponierenden genetischen Veränderungen angesehen, die zu einer Entdifferenzierung und Proliferation, aber auch zum Tod der Zelle führen können. Damit bestätigte die Krebsforschung die bereits 1914 von Theodor Boveri aufgestellte These, dass ein Tumor durch chromosomale Veränderungen, die zu einer abnormen Proliferation führen, aus einer einzigen normalen Zelle entsteht.

Die genauere Untersuchung genetischer Veränderungen in malignen Zellen wurde erst durch die Zytogenetik möglich. Die Entwicklung von Techniken zur Chromosomenpräparation führte zur Bestimmung der exakten Zahl von 46 menschlichen Chromosomen beim Menschen (Tijio & Levan, 1956). Bereits sehr rasch wurden zuerst numerische, später auch charakteristische strukturelle Veränderungen mit bestimmten Neoplasien assoziiert. Die erste in neoplastischem Gewebe nachgewiesene Chromosomenanomalie war die partielle Deletion des kurzen Arms eines Chromosoms 22 bei der chronisch myeloischen Leukämie (Nowell & Hungerford, 1960). Diese wurde später als eine Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 („Philadelphischromosom“) identifiziert, die mit der Bildung eines proliferationsaktivierenden Fusionsgens einhergeht (Rowley, 1973). Die zweite Beobachtung war der Verlust eines kompletten Chromosoms 22 bei einem in der Regel gutartigen Tumor, dem Meningeom (Zang & Singer, 1967). Durch eine Weiterentwicklung der Bänderungstechniken Anfang der siebziger Jahre wurde es möglich, auch kleinere Deletionen und Translokationen und andere strukturelle Aberrationen mikroskopisch sichtbar zu machen. Diese bildeten die Grundlage für die Entwicklung der Tumorzytogenetik, die sich mit der Analyse von erworbenen Chromosomenveränderungen in vielen hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren befasst.

Während die konventionelle Zytogenetik von der Qualität der jeweiligen Chromosomenpräparation und Bänderung in ihrer Auflösung abhängig ist, führte die Einführung der Fluoreszenz - in situ - Hybridisierung (FISH) Mitte der achtziger Jahre zur Entwicklung der molekularen Zytogenetik und damit zu einem wesentlichen Fortschritt in der Chromosomendiagnostik. Bei dieser Methode wird mittels einer markierten DNA- oder RNA-Sequenz die Lokalisierung komplementärer Sequenzen auf Chromosomen, im Zellkern oder im Gewebeschnitt ermöglicht. Zunächst war mit dieser von Gall und Pardue 1969 erstmals beschriebenen Technik nur der Nachweis und die Lokalisierung von radioaktiv markierten

DNA-Sequenzen möglich. Aufgrund ihrer Nachteile wurden die ursprünglich verwendeten radioaktiv markierten Nukleotide immer mehr durch den Einsatz von nicht-radioaktiv markierten Nukleotiden, z.B. Biotin und Digoxigenin, verdrängt. Durch den Einsatz Fluorochrom-markierter Nukleotide konnte das Verfahren erheblich beschleunigt und zugleich eine Verbesserung des Auflösungsvermögens erreicht werden. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität, der räumlichen Auflösung der Signale und der Möglichkeit, verschiedene Sonden zu kombinieren und differentiell in den Präparaten nachzuweisen, ist diese Technik in vielen Bereichen angewendet worden. Nachdem es gelang, auch komplexe DNA durch Suppression repetitiver DNA-Elemente spezifisch zu hybridisieren und durch chromosomenspezifische DNA-Proben individuelle Chromosomen anzufärben (Painting, Ried et al., 1997), wurden Strategien entwickelt, um die Anzahl simultan hybridisierbarer und differentiell nachweisbarer DNA-Sonden zu erhöhen. Die Entwicklung der Techniken der Spektralen Karyotypisierung (SKY, Schröck et al., 1996), Multiplex-FISH (M-FISH, Speicher et al., 1996) und Combined Binary Ratio labelling (COBRA, Tanke et al., 1999) ermöglichten die durch eine 24-Farben FISH simultane Darstellung aller 22 Autosomen und der beiden Geschlechtschromosomen des menschlichen Genoms in unterschiedlichen Farben. Somit wird eine komplette Karyotypisierung mit einem einzigen FISH-Experiment erreicht, und durch die Vielfarben-Chromosomenpaints wird sowohl die Identifizierung von Markerchromosomen und interchromosomalen Umbauten als auch eine Analyse komplexer Aberrationen des gesamten Chromosomensatzes möglich

Ein anderer Ansatz, chromosomale Veränderungen in soliden Tumoren zu untersuchen, stellt die vergleichende genomische Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization - CGH) dar. Diese Methode erlaubt eine umfassende Analyse von DNA-Zugewinnen bzw. Verlusten aus nativem Gewebe und ermöglicht einen Überblick über das gesamte Genom einer Probe in einem einzigen Versuch. Entwickelt wurde diese Methode von Kallioniemi und Mitarbeitern (1992), deren Prinzip auf der gemeinsamen Hybridisierung von differentiell markierter Tumor- und Referenz-DNA auf Metaphase-Chromosomen eines gesunden Spenders beruht. Die unterschiedlich markierte DNA wird mit Fluorochromen nachgewiesen, an einem Fluoreszenzmikroskop digital aufgenommen und mit einem speziellen Programm ausgewertet. Da diese Methode keine Kultivierung der Tumorzellen erfordert und unabhängig von der Verfügbarkeit geeigneter DNA-Sonden ist, hat sie einen erheblichen Beitrag zum Auffinden neuer rekurrenter chromosomaler Veränderungen in soliden Tumoren geleistet. Dabei fanden sich eine Vielzahl von chromosomalen Aberrationen, die überraschenderweise häufig sehr tumorspezifisch auftreten. Mit der Entwicklung molekulargenetischer Methoden konnten inzwischen auch spezifische Gene identifiziert werden, die an der Tumorentstehung und -progression beteiligt sind.

## 1.2. Gliome

Hirntumoren treten in der Regel sporadisch auf und sind mit etwa 3% im Vergleich zu der gesamten Tumorinzidenz relativ selten. Lediglich 50% der Hirntumore sind neuroepithelialen Ursprungs, wobei die Gliome die überwiegende Mehrheit darstellen.

Diese entstehen bevorzugt in den Großhirn-Hemisphären und manifestieren sich gewöhnlich im Erwachsenenalter. Unterschieden werden neben den am häufigsten auftretenden Astrozytomen auch Oligodendrogliome, Oligoastrozytome (Mischgliome) und Ependymome.

Charakteristisch für diese Tumore ist sowohl ihre histopathologische Variabilität als auch ihre vom Differenzierungsgrad unabhängige Neigung zur diffusen Infiltration in benachbarte und entferntere Hirnstrukturen sowie ihrer Tendenz zur malignen Progression. Die maligneste Form der Astrozytome ist das Glioblastoma multiforme.

### 1.2.1. Astrozytome

Der Begriff „Astrozytom“ wurde erstmals Ende des 19. Jahrhundert von Rudolf Virchow eingeführt und als feststehender Ausdruck 1926 von Bailey und Cushing in die Histopathologie eingeführt.

Mit ca. 60% stellen die diffusen Astrozytome die häufigsten intracranialen Neoplasien des Menschen mit einer Inzidenz von etwa 6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr dar. Epidemiologische Studien konnten, mit Ausnahme der therapeutischen Strahlenbelastung besonders bei jungen Patienten (Neglia, 1991), keinen kausalen Zusammenhang zwischen spezifischen Noxen oder Umweltbedingungen und der Tumorentstehung aufdecken. Man geht davon aus, dass Tumoren durch eine sukzessive Akkumulation von Veränderungen der genomischen DNA entstehen. Neben einer genetischen Prädisposition werden weitere, bedingt durch verschiedene Noxen aus der Umwelt hinzukommende molekularbiologisch relevante Veränderungen vermutet.

Eine Einteilung der Tumore nach ihrer Gut- bzw. Bösartigkeit erfolgt entsprechend dem Vorhandensein bestimmter Merkmale, wie z.B. zellulären Pleomorphismen, Mitosen, Nekrosen und Endothelproliferaten, die Charakteristika für die Aggressivität und Malignität dieser Tumore darstellen (Kernohan, 1949; Daumas-Duport et al.; 1988; Kleihues et al., 1993; Kleihues & Cavenee, 2000).

Weltweit akzeptiert ist heutzutage die 2000 neu überarbeitete Einteilung der World Health Organisation (WHO-Klassifikation), die den einzelnen Gliom-Typen eine Graduierung zwischen I und IV zuteilt und weiterhin die Tumore den Zelltypen zuordnet, aus denen sie entstanden sind.

Die WHO teilt die astrozytären Gliome in 2 Hauptgruppen:

- a) die häufigen diffus infiltrierenden Tumore (niedriggradige Astrozytome (Grad II), anaplastische Astrozytome (Grad III), Glioblastoma multiforme (Grad IV))
- b) die selteneren astrozytären Neoplasien mit einem überwiegend umschriebenen Wachstum (pilozytische Astrozytome und pleomorphe Xanthoastrozytome).

Tumore der letzteren Gruppe treten häufiger bei Kindern und jungen Erwachsenen auf, zeigen ein verlangsamtes, umschriebenes Wachstum sowie ein begrenztes Potential zur malignen Progression. Bei der Mehrzahl der Patienten kann durch Tumoresektion eine Heilung erzielt werden. Hier muss jedoch angemerkt werden, dass auch diese Tumoren, wenn sie ungünstig liegen, für die Patienten prognostisch sehr schlecht sind.

Die diffusen Astrozytome manifestieren sich bei Erwachsenen, neigen zur malignen Progression und Rezidivbildung und können gewöhnlich nicht durch neurochirurgische, radiotherapeutische und/oder chemotherapeutische Behandlungsstrategien geheilt werden. Diese Unterschiede in ihren biologischen Charakteristika und klinischen Verhalten spiegeln sich auch in den unterschiedlichen Mustern genetischer Veränderungen wider.

Die niedriggradigen diffusen Astrozytome repräsentieren ca. 10-15% aller astrozytärer Hirntumore (1,4 Neuerkrankungen/1 Million Einwohner), wobei das Manifestationsalter bei 30-40 Jahren liegt. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (1,2:1). Die anaplastischen Astrozytome haben ein Manifestationsalter von 40-50 Jahren, wobei Männer fast doppelt so häufig davon betroffen sind als Frauen. Histologisch zeichnen sich diese gut differenzierten Tumore durch eine niedrige bis moderate Zelldichte und eine diffuse Infiltration in das benachbarte Hirnparenchym aus. Mikrozystische Degeneration ist ein häufiges Merkmal, während Nekrosen, mitotische Aktivität und mikrovaskuläre Proliferation nicht beobachtet werden. Bei den anaplastischen Astrozytomen treten zusätzlich zu diesen histopathologischen Kriterien eine erhöhte Zelldichte, Kern-Atypien und mitotische Aktivität auf. Die für die Glioblastome (WHO Grad IV) typischen Merkmale wie Nekrosen und mikrovaskuläre Proliferation sind in den anaplastischen Astrozytomen noch nicht zu beobachten.

Alle diffusen Astrozytome neigen zur Rezidivbildung sowie zur spontanen Progression. Diese Progression zu höhergradigen Tumoren ist für die Prognose der Patienten ausschlaggebend. So zeigen Patienten mit niedriggradigem Astrozytom (Grad II) individuell stark unterschiedliche Überlebenszeiten mit einem Mittelwert von etwa 7 Jahren, da die maligne Progression zum Glioblastom oft erst nach 4-5 Jahren auftritt. Auch für die anaplastischen Astrozytome besteht eine deutliche Tendenz einer für die Prognose wichtigen Progression zu sekundären Glioblastomen. Das Zeitintervall variiert auch hier zum Teil beträchtlich mit einer medianen Überlebenszeit von 2 Jahren.

Junges Patientenalter und die Möglichkeit zu einer radikalen Tumorresektion werden als prognostisch günstige Faktoren betrachtet. Bei den anaplastischen Astrozytomen werden zusätzlich eine oligodendrogliale Komponente sowie ein hoher präoperativer Karnofsky Performance-Status (KPS)<sup>1</sup> mit einer günstigeren Prognose in Verbindung gebracht. Eine Chemotherapie ist als Primärtherapie der diffusen Astrozytome Grad II bisher nicht üblich. Sie wird erst bei Rezidiven nach Strahlentherapie und radiologischen Hinweisen auf deren Malignisierung sowie höhergradigen Astrozytomen empfohlen. Retrospektive Studien zeigen, dass Patienten mit diesem Tumor nach inkompletter Resektion von einer Strahlentherapie zwar hinsichtlich eines verlangsamten Tumorwachstums, nicht jedoch hinsichtlich der Überlebenszeit profitieren (NOA, 2002).

### 1.2.2. Oligodendrogliale und oligoastrozytäre Tumore

Die Oligodendrogliome stellen eine eigene, gut charakterisierte klinisch-pathologische Entität dar und machen ca. 5-10% aller glialer Tumore aus. Sie entwickeln sich aus der Oligodendroglia, die die Nervenfasern umhüllen und sind vorwiegend im Frontallappen des Großhirns lokalisiert. Sie werden als WHO Grad II oder anaplastische Tumore Grad III eingestuft, die einen in der Regel prognostisch günstigeren Verlauf als die Astrozytome gleichen Malignitätsgrads zeigen. Das Manifestationsalter liegt zwischen 35 und 55 Jahren mit einem Gipfel bei 45 Jahren. Die Grad II Tumore treten eher bei Patienten unter 40 Jahren auf, während Grad III Tumore häufiger bei Patienten über 40 Jahren beobachtet werden. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen mit einem Verhältnis von 1,5:1 bis 2,1:1 (Zülch, 1964; Mork et al., 1986). Die medianen postoperativen Überlebenszeiten liegen bei Grad II Tumoren zwischen 3 und 5 Jahren, bei anaplastischen Oligodendrogliomen zwischen 1 und 3 Jahren. Eine günstigere Prognose geht mit jüngerem Patientenalter, Frontallokalisation, postoperativem Karnofsky Performance-Status, makroskopisch kompletter sowie Bestrahlung nach partieller Tumorresektion einher.

Als ungünstige Parameter gelten neben Nekrosen eine hohe mitotische Aktivität, erhöhte Zelldichte, nukleäre Atypien, zelluläre Pleomorphismen und mikrovaskuläre Proliferation.

Die Oligoastrozytome (Mischgliome) weisen sowohl einen astrozytären als auch einen oligodendroglialen Anteil auf und können ebenfalls als Grad II oder anaplastische Tumore Grad III vorliegen. Das Manifestationsalter der Grad II Tumoren liegt zwischen 35 und 45 Jahren, die anaplastischen Oligoastrozytome zeigen einen Altersgipfel bei 45 Jahren. Auch hier sind Männer etwas häufiger betroffen als Frauen (1,2:1-1,7:1). Nur wenige Studien liegen zur Überlebenszeit dieser Patienten vor. Für Tumore Grad II wurden postoperative

---

<sup>1</sup> Der KPS beschreibt die präoperative Morbidität des Patienten

Überlebenszeiten von 3,9 bis 6,3 Jahren und einer 5-Jahresüberlebensrate von 58% gezeigt. Die Prognose für anaplastische Oligoastrozytome (Grad III) ist relativ ungünstig. Die mediane Überlebenszeit beträgt knapp 3 Jahre und das 5- bzw. 10-Jahresüberleben 36% bzw. 9% (Shaw et al., 1997). Eine günstigere Prognose geht auch hier mit jüngerem Patientenalter, möglichst radikaler Tumoresektion sowie einer postoperativen Strahlentherapie einher (Kleihues & Cavenee, 2000; Leitlinie DGN, 2003).

### 1.3. Glioblastoma multiforme

Der häufigste und maligneste Tumor des zentralen Nervensystems ist das Glioblastom (Glioblastoma multiforme, GBM, WHO Grad IV). Der Anteil an der Gesamtzahl aller Hirntumoren des Erwachsenenalters beträgt ca. 15% mit 2-3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr und einem bevorzugten Auftreten im 5.-7. Lebensjahrzehnt. Dieser Tumor macht etwa 50-60% aller Astrozytome aus und manifestiert sich mit seinem raschen und diffus infiltrierenden Wachstum hauptsächlich in den Großhirn-Hemisphären. Histopathologisch ist er durch Gewebs- und Zellpolymorphie, hohe Mitoserate, ausgeprägte Gefäßproliferation und Nekrosen charakterisiert. Der Einsatz immunhistochemischer Marker erlaubt eine diagnostische Abgrenzung zu Karzinometastasen bzw. malignen Lymphomen, wobei häufig untersuchte Marker das saure Gliafaserprotein (GFAP) und das Protein S100 sind. Die supratentoriellen Gliome sind meist GFAP und /oder S100-positiv, aber negativ für epitheliale und lymphozytäre Marker. Bei Glioblastomen ist eine sichere Unterscheidung eines astrozytären, oligodendroglialen und oligoastrozytären Ursprungs durch Immunhistochemie nicht mehr möglich.

Glioblastome können sich sowohl aus weniger malignen Vorstufen (sekundäre Glioblastome, sGBM) als auch de novo (primäre GBM) entwickeln.

Prognostisch unterscheiden sich die sekundären Glioblastome nicht von den primären Glioblastomen. Jedoch wird immer deutlicher, dass die primären und sekundären Glioblastome genetisch unterschiedlichen Entstehungswegen folgen (s. Kap. 1.4.), die Patienten ein unterschiedliches Manifestationsalter zeigen und sich auch in ihrem Ansprechverhalten auf Therapie unterscheiden. Die primären Glioblastome stellen die größere Gruppe dar und treten überwiegend in älteren Patienten auf (im Mittel 55 Jahre). Nach einem kurzen klinischen Verlauf von gewöhnlich weniger als 3 Monaten manifestieren sich diese Tumoren *de novo* ohne klinischen oder histopathologischen Hinweis für eine Entstehung aus einer weniger malignen Vorläuferstufe. Die sekundären Glioblastome, die sich nach maligner Progression aus niedriggradigen Astrozytomen (WHO Grad II) oder anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III) entwickeln, treten bevorzugt bei jüngeren Patienten (< 45 Jahre) auf. Dabei variiert die Zeitspanne der Progression von einem

niedriggradigen Tumor bis zum sGBM zum Teil beträchtlich von weniger als einem Jahr bis hin zu mehr als 10 Jahren.

Als prognostisch günstigere Parameter werden auch hier ein hoher Karnofsky Performance-Status, junges Patientenalter, sowie eine möglichst radikale Tumoresektion diskutiert (Burger & Green 1987; Salmon et al., 1994; Sneed et al., 1995; Watanabe et al., 1996; Shafqat et al., 1999).

### **1.3.1. Therapie des Glioblastoma multiforme**

Ohne jegliche therapeutische Maßnahmen beträgt die mittlere Überlebenszeit der Patienten mit einem Glioblastom nur 3-4 Monate mit einer raschen Verschlechterung des allgemeinen und zerebralen Zustandes (Hofer et al., 1999). Die primäre Standardtherapie stellt die neurochirurgische Tumoresektion dar. Durch den Einsatz der Neuronavigation für die Eingriffsplanung und Tumorlokalisierung in Verbindung mit Magnetresonanz-Tomographie (MRT) und intraoperativer Sonographie ist es möglich geworden, selbst Tumoren in wichtigen Arealen sowie in tiefer liegenden Hirnstrukturen mit gutem funktionellen Ergebnis zu entfernen. Die Vermeidung zusätzlicher neurologischer Dauerschäden hat dabei Vorrang gegenüber der operativen Radikalität. Bei ungünstig lokalisierten oder multiplen Tumoren sowie bei älteren Patienten in schlechtem Allgemeinzustand wird eine stereotaktische Biopsie zur Diagnosesicherung durchgeführt (Leitlinie DGN 2003; Weller, 2004). Durch ihr in der Regel invasives Wachstum ist eine neurochirurgische Totalresektion generell unmöglich, so dass in ca. 90% Tumor-Rezidive in unmittelbarer Nachbarschaft des makroskopisch komplett entfernt erscheinenden Primärtumors beobachtet werden (Hofer et al., 1999; Kleihues & Cavenee, 2000; Weller, 2003b; Reifenberger & Colins, 2004). Inwieweit jedoch das Ausmaß der Resektion mit der Länge des Überlebens korreliert, wird kontrovers diskutiert (Wood et al., 1988; Kreth et al., 1993). Neuere, prospektive Studien sprechen dafür, dass ein wichtiger prognostischer Parameter bei WHO Grad III/IV Gliomen die makroskopisch vollständige Entfernung des Tumorgewebes ist (Prados & Levin, 2000; Lacroix et al., 2001; Leitlinie DGN, 2003).

### **1.3.2. Strahlentherapie**

Bei der Behandlung von anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen stellt die postoperative Strahlentherapie ein etabliertes Behandlungsverfahren dar. Trotz mäßiger bis geringer Strahlenempfindlichkeit der höhergradigen Tumore verlängert diese Therapie, insbesondere bei geringer Resttumormasse, die Überlebenszeit der Patienten bei einer guten Lebensqualität. Ihre Durchführung orientiert sich an der Histologie und

Ausbreitungscharakteristik des jeweiligen Tumors, wobei als Kriterien lokale Infiltration, Tumorlokalisation und Wirkung der Bestrahlung auf Tumor und gesundes Gewebe herangezogen werden. Sie bestimmen Zielvolumina, Dosierungen, Fraktionierungen und Technik der Bestrahlung (Leitlinie DGN, 2003).

Als Standardtherapie beim GBM wird eine fraktionierte Strahlentherapie mit 54-60 Gy und mehr als 20 Einzelfractionen von 1,8-2 Gy eingesetzt. Die Verlängerung der medianen Überlebenszeit durch diese postoperative Therapie beträgt allerdings nur etwa 6 Monate, eine Erweiterung der Lebenserwartung auf über zwei Jahre nach Diagnosestellung ist sehr selten. Zur Verkürzung der Gesamtbehandlungszeit kann bei älteren Patienten und Patienten mit schlechten prognostischen Faktoren eine Hochdosis-Strahlentherapie mit 30-45 Gy in 3 Gy-Fractionen erfolgen. Eine Ganzhirnbestrahlung erzielt keine besseren Ergebnisse als eine lokale Strahlentherapie, und die fokussierte Strahlentherapie oder Radiochirurgie bringt keine Verbesserung gegenüber konventioneller fraktionierter externer Strahlentherapie (Salcman et al., 1980; Walker et al., 1980; Brada et al., 1999; NOA, 2002; Leitlinie DGN, 2003).

### **1.3.3. Chemotherapie**

Aufgrund der geringen Chemosensitivität dieser Tumoren hat diese Therapieform einen niedrigeren Stellenwert als die Strahlentherapie. Ein zusätzliches Hindernis für die Chemotherapie stellt die Bluthirnschranke dar, welche die Aufnahme nicht-lipophiler Substanzen ins Gehirn reduziert und dadurch die Wahl der Chemotherapeutika stark einschränkt. Obgleich diese bei Hirntumoren nicht voll intakt ist, kann nicht von einer gleichmäßigen Erreichbarkeit aller Tumorareale ausgegangen werden.

Die am häufigsten eingesetzten chemotherapeutischen Substanzen sind die Nitrosoharnstoffe Nimustin (ACNU), Carmustin (BCNU), Lomustin (CCNU) und Procarbazin (PCB), welche als lipophile Alkylanzien die DNA- und Proteinsynthese hemmen und ausschließlich bei proliferierenden Zellen zur Apoptose führen. Die resultierenden morphologischen Veränderungen sind üblicherweise dauerhaft. Da diese Veränderungen grundsätzlich alle Körperzellen betreffen, sind solche Substanzen für die Therapie von Gliomen besonders gut geeignet, die aufgrund spezifischer Gewebeeigenschaften (z.B. hoher Fettgehalt des normalen Gewebes) und erhöhter Stoffwechselaktivität (z.B. bei schnell wachsenden Tumoren) zu einer Akkumulation im Tumorgewebe führen. Die chemotherapeutische Behandlung setzt ein normales Blutbild, normale Leber- und Nierenfunktionen sowie das Fehlen schwerwiegender pulmonaler und kardialer Erkrankungen voraus. Es sind regelmäßige Blutbildkontrollen notwendig, da vor allem die Verwendung von Nitrosoharnstoffen (ACNU, BCNU, CCNU) eine Störung der Blutbildung

(Leuko- und Thrombopenien) verursachen kann. Damit einhergehende Beeinträchtigungen der Immunabwehr, der Blutgerinnung und des Sauerstofftransportes können einen Therapiewechsel oder eine Dosisreduktion nötig machen. Daher wird die Chemotherapie vor allem jüngeren Patienten und Patienten mit einem Karnofsky Performance-Status von mindestens 70 angeboten (De Angelis et al., 1998; Leitlinie DGN, 2003).

Nitrosoharnstoffe werden nicht nur als Monotherapien eingesetzt, viel häufiger kommen sie in Kombinationsschemata zur Anwendung. Ein sehr häufig angewandtes Schema besteht aus Procarbazin, CCNU und Vincristin (=PCV). Vincristin ist ein hydrophiles Vincaalkaloid, welches als Mitosespindelgift wirkt und über seinen im Vergleich zu den anderen Zytostatika andersartigen Wirkmechanismus zu einer Synchronisation des Zellzyklus der Tumorzellen und damit zu einer besseren Wirksamkeit der anderen eingesetzten Alkylanzien führen kann. In Kombination mit Nitrosoharnstoffen kommen zum Teil auch Podophyllotoxinderivate wie Etoposid (VP16) und Teniposid (VM26) zum Einsatz, deren Wirkungsmechanismus auf einer Hemmung der Topoisomerase II beruht und zu Doppelstrangbrüchen führt. Weitere Substanzen, die aufgrund guter Erfahrungen im Einsatz bei anderen Tumorerkrankungen auch in größerem Umfang bei Glioblastom-Patienten Einsatz fanden, sind Methotrexat, Cytarabin und Topotecan. Aufgrund der einfachen oralen Applikationsweise und den geringen Nebenwirkungen ist in den letzten Jahren vor allem das Alkylanz Temozolomid eingesetzt worden (s. Kap. 1.3.3.1.).

Meta-analytisch ergab sich allerdings nur eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit mit kombinierter Radio- und Chemotherapie gegenüber alleiniger Radiotherapie nach Tumorresektion um 2-3 Monate. Die 1-Jahres-Überlebensrate stieg von 40% auf 46%, die 2-Jahres-Überlebensrate von 15% auf 20%. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen, auf Nitrosoharnstoff-basierenden Therapien wurden in der Primärtherapie der Glioblastome bisher nicht nachgewiesen (Fine et al., 1993; Stewart, 2002). Ebenso konnten keine Unterschiede in der Effektivität der Chemotherapie bei einer Betrachtung von Patientengruppen von unterschiedlichem Alter, Geschlecht, Karnofsky Performance-Status (KPS) oder Ausmaß der Resektion festgestellt werden. Die NOA-01 Studie zeigte eine sehr hohe mediane Überlebenszeit der Kombinationen ACNU/VM26 (17 Monate) und ACNU/Ara-C (16 Monate) sowie eine Verbesserung der 2-Jahres-Überlebensrate auf 29%, ein Überlebensvorteil bei unterschiedlichen Behandlungsstrategien, Patientenalter oder KPS wurde nicht beobachtet. Allerdings wurden in dieser Studie nur die beiden Chemotherapiearme miteinander verglichen und kein alleiniger Strahlentherapiearm mitgeführt (Weller et al., 2003a).

In der Rezidivbehandlung ist der Wert der Chemotherapie besser belegt. Hier sind derzeit 3 Regime zugelassen: (1) die Polychemotherapie nach dem PCV-Schema, (2) die Chemotherapie mit ACNU/VM26 und (3) die Monotherapie mit Temozolomid.

Die Metaanalyse verschiedener Phase-II-Rezidivstudien ergab ein mittleres progressionsfreies Intervall von 9 Wochen und eine progressionsfreie Überlebensrate nach 6 Monaten von 15% (Wong et al., 1999). Dabei zeigte die ausschließliche Behandlung mit Temozolomid ein mittleres progressionsfreies Intervall von ca. 11 Wochen sowie ein progressionsfreies Überleben nach 6 Monaten von 21% (Yung et al., 2000). Der Einsatz einer Therapie mit BCNU (Gliadel®) zeigte in einer randomisierten Studie nur einen marginalen Effekt.

Für die relativ geringen Erfolgsraten der Chemotherapie werden u.a. Resistenzmechanismen verantwortlich gemacht. Diese werden vornehmlich durch Enzyme vermittelt, die durch ihre Funktion die Wirkung der Chemotherapeutika aufheben oder deutlich abschwächen. Die wichtigsten derzeit bekannten Resistenzfaktoren sind die Glutathion-S-Transferase (GST), das p-Glycoprotein (p-gp) und die O<sup>6</sup>-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT).

Deutlich chemosensitiver als die rein astrozytären Tumore sind die oligodendroglialen Tumore gleichen Malignitätsgrades. So konnte für anaplastische Oligodendrogliome (WHO Grad III) ein gutes Ansprechen auf eine PCV-Chemotherapie mit Allelverlusten (LOH) auf den Chromosomenarmen 1p und 19q beobachtet werden (Cairncross et al., 1998, Chahlavi et al., 2003; Hashimoto et al., 2003; Thiessen et al., 2003; van den Bent et al., 2003a). Ein positiver Einfluss eines LOH auf 1p/19q zeigte sich auch für die Überlebenszeit von Patienten mit einem Oligodendrogliom WHO Grad II, ein Vorteil dieser Veränderungen für Patienten mit einem Oligoastrozytom (Grad III) oder Glioblastom konnte nicht nachgewiesen werden (Smith et al., 2000a). Umgekehrt wurden in den bisher untersuchten kleinen Patientengruppen auch negative molekulare Parameter für die Überlebenszeit mit anaplastischem Oligodendrogliom identifiziert: dies waren ein LOH auf 9p (*CDKN2A*-Deletionen) und LOH auf 10q (Cairncross et al., 1998; Hoang-Xuan et al., 2001; Sanson et al., 2002).

### **1.3.3.1. Temozolomid-Therapie**

Das Alkylanz Temozolomid (TMZ, Temodal®) weist ein breites Wirkungsspektrum bei relativ geringer Toxizität sowie geringen Nebenwirkungen auf und besitzt die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Aufgrund der einfachen oralen Applikation und guten Verträglichkeit wird es in der Neurochirurgischen Klinik der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg, seit seiner Zulassung in Deutschland Anfang 1999 in der Rezidivtherapie der Glioblastome eingesetzt. Wie alle Alkylantien hemmt auch Temozolomid die Teilungsfähigkeit der Stammzellen im Knochenmark und hat daher eine immunsupprimierende Nebenwirkung.

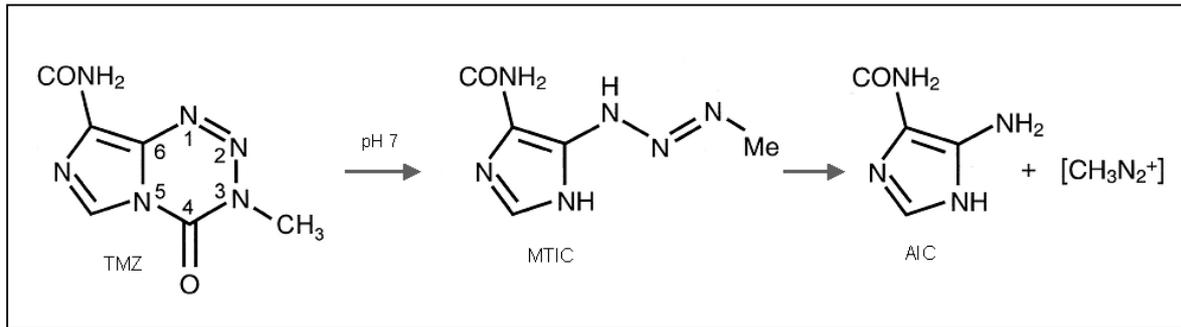


Abb. 1.1. Umbau von Temozolomid (nach Stevens et al., 1987).

Temozolomid gehört zu den Imidazo-Tetrazinonen, die durch ein bicyklisches, fusioniertes Ringsystem mit drei nebeneinanderliegenden Stickstoffatomen gekennzeichnet sind. Bei physiologischem pH erfolgt der spontane Umbau in das zytotoxisch wirksame MTIC (5-(3-Methyltriazen-1-yl)imidazol-4-carboxamid), welches in ein reaktives Methyldiazonium-Ion und 5-Aminoimidazol-4-carboxamid (AIC) abgebaut und über die Nieren ausgeschieden wird (Stevens et al., 1987, Abb.1.1.).

Der Wirkmechanismus beruht auf der alkylierenden Aktivität des MTIC, welches neben N<sup>7</sup>-Methylguanin, N<sup>3</sup>-Methyladenin auch die O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte generiert (O<sup>6</sup>-MeG). Werden diese durch die O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (=MGMT, Basen-Excisions-Reparatur) nicht eliminiert, steht den DNA-Reparaturenzymen keine komplementäre Base für O<sup>6</sup>-MeG zur Verfügung. Dies führt im weiteren Verlauf zu einer Vielzahl von Strangbrüchen, die durch Mismatch-Reparaturproteine (MLH1, MSH2, MSH6, PMS-2) nicht mehr repariert werden können und es zur Apoptose kommt (Pegg et al., 1995; Pepponi et al., 2003).

#### 1.4. Genetische Veränderungen in Gliomen

##### Stand der Forschung zu Beginn der Untersuchungen

Die überwiegende Anzahl der in den letzten zwanzig Jahren veröffentlichten zytogenetischen und molekularzytogenetischen Studien an Gliomen konzentrieren sich auf die diffus infiltrierenden Astrozytome, allen voran die Glioblastome.

In diesen Arbeiten wurden eine Vielzahl spezifischer chromosomaler Veränderungen sowie Aktivierung und Inaktivierungen tumorrelevanter Gene identifiziert.

Entsprechend ihrer Funktion werden die für eine Tumorentstehung wichtigen Gene in Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene eingeteilt. Als *Proto-Onkogene* bezeichnet man solche Gene, deren Reaktivierung oder Überaktivierung zu Onkogenen ein unkontrolliertes Zellwachstum fördert. Die Erhöhung der Gendosis erfolgt meist mittels Amplifikationen oder

aktivierender Mutationen. *Tumorsuppressorgene* dagegen begünstigen durch ihren Funktionsverlust eine neoplastische Transformation der Zelle. Während bei Onkogenen die Überexpression eines Allels ausreicht, müssen bei Tumorsuppressorgenen beide Allele inaktiviert sein. Die für Tumorsuppressorgene typischen Mechanismen der Inaktivierung erfolgen über die Deletion eines Allels (LOH; loss of heterozygosity) und inaktivierende Mutation des zweiten Allels oder die homozygote Deletion beider Allele. Neben den Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen spielen noch 2 weitere Genklassen eine wichtige Rolle. So verursacht das Ausschalten von *Mutatorgenen* oder „*mismatch repair*“ *Genen* genomweite Störungen vor allem in repetitiven Sequenzen, die zu einer bis zu 100-fachen Mutationsrate bei Mikrosatelliten-DNA führen können (Lengauer et al., 1998). Daher werden Mutationen in Mikrosatellitenrepeats als Marker für einen Mutatorphänotyp angesehen. Mutationen der sogenannten „*mitosis checkpoint*“ *Gene* führen zum Verlust der Apoptosefähigkeit und dadurch zu einem Anstieg numerischer Chromosomenanomalien (Lengauer et al., 1998). Diese als Aneuploidie bezeichneten numerischen chromosomalen Imbalancen stellen die am häufigsten auftretenden genetischen Veränderungen in den bis heute untersuchten soliden Tumoren dar (Heim & Mitelman, 1995).

Die Karyotypen von Gliomen sind meist sehr komplex aberrant und weisen neben multiplen numerischen auch strukturelle chromosomale Veränderungen auf.

Kopienzahlvermehrungen (Trisomie bzw. Polysomie) von Chromosom 7 und die Monosomie von Chromosom 10 stellen die häufigsten Veränderungen in diesen Tumoren dar. Daneben wurden in 30% der untersuchten Tumoren Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 9 nachgewiesen (Henn et al., 1987; Bigner et al., 1988a; Thiel et al., 1992). Typisch sind weiterhin extrachromosomale „double minutes“ (dmin) und/oder intrachromosomale „homogeneously staining regions“ (hsr), beide als Kennzeichen von Amplifikationen meist mehrerer benachbarter Gene.

Neben den bekannten Regionen auf 7p12 (*EGFR*-Gen) und 12q13q15 (*MDM2*, *CDK4*, *GLI*, *SAS*, *KUB3*, *GAS 41*) konnten auch Amplifikationen von 1q32 (*Renin*), 4q11q12 (*PDGFRA*), 7q31 (*Met*) und 8q24.1 (*cMYC*) nachgewiesen werden. Aber auch innerhalb der Chromosomenregionen 5p13, 7q21, 11p, 11q13, 11q22q23, 15q, 20p, 20q und 22q12 wurden amplifizierte Bereiche beobachtet (Schröck et al., 1994; Kim et al., 1995; Schlegel et al., 1996; Weber et al., 1996a; Weber et al., 1996b; Mohapatra et al., 1998; Nishizaki et al., 1998; Maruno et al., 1999; Brunner et al., 2000; Koschny et al., 2002). Zusätzlich zu diesen Veränderungen konnten weitere Marker identifiziert werden, welche inzwischen verschiedenen molekularen Regelkreisen zugeordnet wurden und denen zunehmend diagnostische und prädiktive Bedeutung an der Beteiligung der Tumorentwicklung zukommt. Dabei kodiert die Mehrzahl der in Gliomen veränderten Gene für Proteine, die maßgeblich in die Zellzykluskontrolle involviert sind und den Übergang in die G1/S-Phase kontrollieren

sowie apoptotische Mechanismen auslösen. Weitere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Rolle der Neoangiogenese bzw. Vaskularisierung und dem Mechanismus der chromosomalen Instabilität bei Gliomen.

### TP53-Regelkreis

Veränderungen innerhalb des *TP53*-Regelkreises sind die häufigsten gefundenen Störungen und treten bereits in niedriggradigen Astrozytomen auf. Sie entstehen durch Mutation bzw. Deletion des Tumorsuppressorgens *TP53*, aber auch durch eine Amplifikation des *TP53* hemmenden *MDM2*-Gens, oder durch eine Deletion des *p14<sup>ARF</sup>* Gens, dessen Genprodukt den MDM2 vermittelten Abbau des TP53-Proteins verhindert (Wu et al., 1993; Zhang et al., 1996).

Das auf Chromosomenarm 17p lokalisierte *TP53* kodiert für ein Protein, welches eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Transkriptionskontrolle, Regulation des Zellzyklus, Prüfung auf Genom-Integrität und Induktion von Apoptose spielt (Fulci et al., 1998). *TP53* spielt sowohl bei der Entwicklung von niedriggradigen Astrozytomen als auch bei der Progression zum Glioblastom eine zentrale Rolle. So konnten in niedriggradigen Astrozytomen, für die nur wenige zytogenetische und molekulargenetische Daten vorliegen, in ca. 60% Allelverluste auf Chromosom 17p in der *TP53*-Region gezeigt werden. Das verbleibende *TP53*-Allel lag in der Mehrzahl der Fälle mutiert vor. Die Anzahl untersuchter anaplastischer Astrozytome ist ebenfalls sehr begrenzt. Auch in diesen Tumoren liegen *TP53* Mutationen vor. Schätzungsweise 20% der anaplastischen Astrozytome weisen Veränderungen der an dem *TP53*-Regelkreis beteiligten Gene *MDM2* und *p14<sup>ARF</sup>* auf und führen damit zusätzlich zu einer Störung des *RB1*-Regelkreises (Tada et al., 1996; Collins, 2004). Bei der Entstehung primärer Glioblastome scheint *TP53* eine untergeordnete Rolle zu spielen, nur in lediglich 10% der Tumore wurden Mutationen dieses Gens nachgewiesen (Watanabe et al., 1996; Ichimura et al., 2000; Collins, 2004). Immunhistologische Studien zeigten eine abnorme *TP53*-Expression in 40-70% der untersuchten Tumore (Fulci et al., 1998). Auffällig ist, dass in den Tumoren der Anteil von immunhistochemisch detektierbarem TP53-Protein höher war, als Mutationen im Gen nachweisbar waren (Louis et al., 1993; Newcomb et al., 1993; Watanabe et al., 1997).

Das auf Chromosom 12q14.3q15 lokalisierte *MDM2*-Gen (mouse double minute) wird durch *TP53* aktiviert (Barak et al., 1994; Zauberman et al., 1995; Biernat et al., 1997). *MDM2* kodiert für 5 Proteine, von denen zwei direkt mit *TP53* interagieren und es inhibieren bzw. zu einer Degradation von p53 führen (Kubbutat et al., 1997). Im Gegenzug wird die Transkription des *MDM2*-Gens durch Wildtyp-*TP53* induziert. Dieses autoregulative Feedback kontrolliert sowohl die Aktivität von *TP53* als auch die Expression von *MDM2*

(Oliner et al., 1992; Picksley & Lane, 1993; Haupt & Oren, 1996). Eine Veränderung der Gene *MDM2* oder *p14<sup>ARF</sup>* wurde für Astrozytome Grad II nicht beschrieben (Collins, 2004).

Primäre Glioblastome weisen meist keine *TP53* Mutationen bzw. Deletionen auf. Allerdings wurde in 50% eine *TP53*-hemmende *MDM2*-Überexpression beobachtet, in 10% der Fälle eine Amplifikation von *MDM2* (Reifenberger et al., 1993; Newcomb et al., 1998; Biernat et al., 1999). Die Überexpression oder Amplifikation von *MDM2* stellt somit einen alternativen Mechanismus dar, um die *TP53*-regulierte Zellzykluskontrolle zu überwinden.

Ein weiteres Gen, dessen Transkription durch Wildtyp-*TP53* beeinflusst wird, ist das auf Chromosom 6p lokalisierte *p21/waf1/CDKN1A*-Gen. Das resultierende 21 kDa große Protein (p21) hemmt durch seine Bindung an den CDK4/Cyclin D1-Komplex den G1/S-Phase-Übergang, indem eine RB1-Phosphorylierung verhindert wird (Harper et al., 1993, vgl. Abb. 1.2.). Die Überexpression von p21 bewirkt einen Wachstumsarrest der Zelle. Dies unterstützt die These, dass es sich dabei um einen der Hauptregulatoren des Zellzyklus handelt (Harper et al., 1993). Unabhängig vom Malignitätsgrad ist die Expression von p21 in den meisten Gliomen erhöht; eine somatische Mutation von *p21* konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden (Jung et al., 1995; Koopmann et al., 1995; Li et al., 1998).

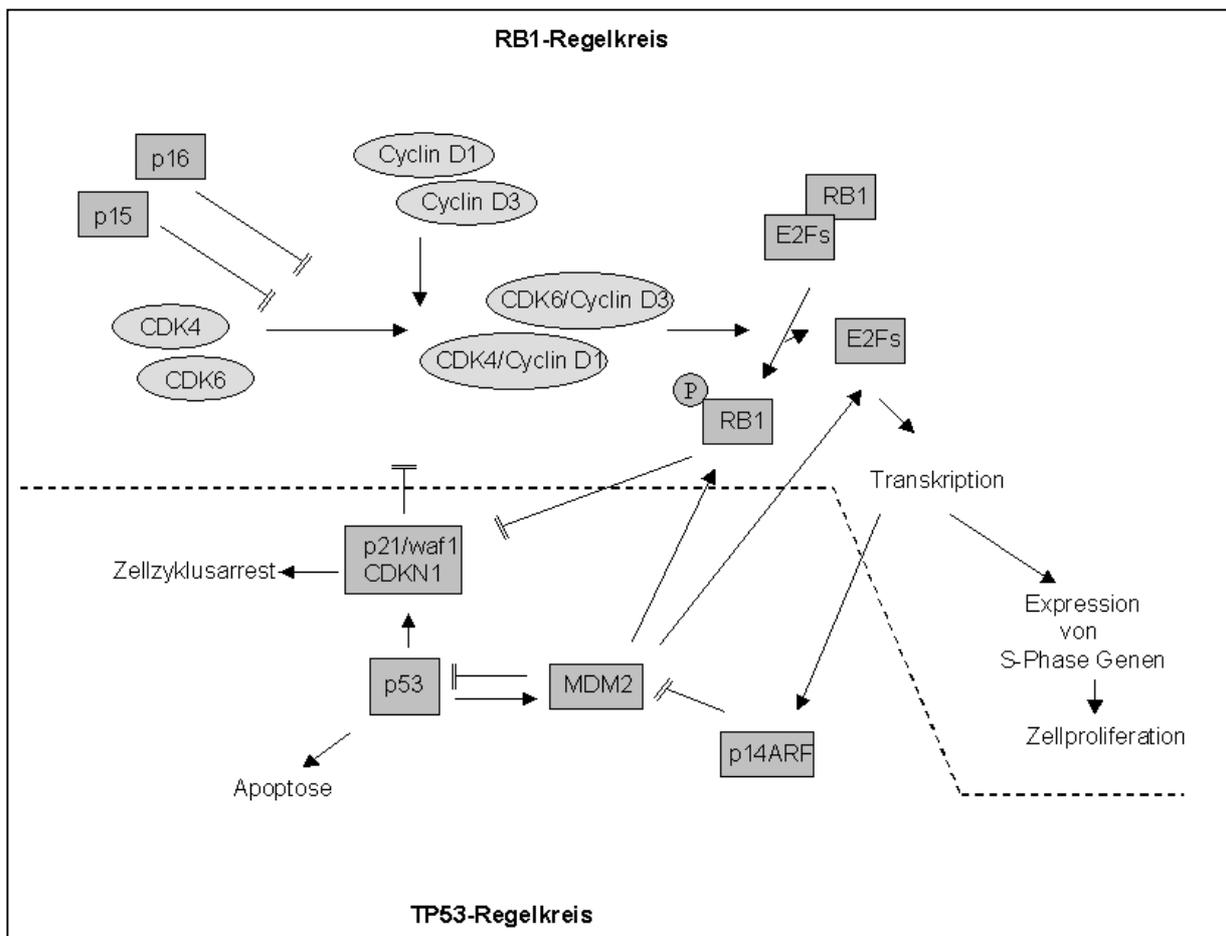


Abb. 1.2. Vereinfachtes Schema der Interaktionen zwischen den Proteinen des *RB1*- sowie des *TP53*-Regelkreises (nach Kleihues & Cavenee, 2000; Collins, 2004; Ichimura et al., 2004).

### RB1-Regelkreis

Neben Störungen des *TP53*-Regelkreises weisen die meisten Gliome auch Veränderungen innerhalb des *RB1*-Regelkreises (Retinoblastom-Gen) auf (Ueki et al., 1996; Bostrom et al., 1998). Dieser Regelkreis kontrolliert den Übergang von der G1 in die S-Phase und kann durch den Verlust von *pRB*, durch eine Amplifikation von *CDK4* oder durch den Verlust von p16, einem *CDK4*-Inhibitor, der die Phosphorylierung von pRB vermittelt, gestört sein (Schmidt et al., 1994). Diese Veränderungen resultieren alle in einem abnormen Anstieg der Menge an freien E2F-Transkriptionsfaktoren innerhalb der Zelle, so dass es zu einer unkontrollierten Zellproliferation kommt (Abb. 1.2).

Homozygote interstitielle Deletionen der Region 9p21 - mit den für p16 und p15 kodierenden Genen *CDKN2A* und *CDKN2B* - zählen zu den in malignen Gliomen sehr häufig vorliegenden genetischen Veränderungen. Während das Protein von *p14*, das einen alternativen Leseraster des *CDKN2A*-Gens darstellt, durch direkte Aktivierung von *MDM2* unmittelbar in die *TP53*-vermittelte Zellzyklussteuerung eingreift, fungieren p16 und p15 als Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen *CDK4* und *CDK6*, indem sie deren Fähigkeit zur *RB1*-Phosphorylierung blockieren (Serrano et al., 1993). Neben der homozygoten Deletion der Tumorsuppressorgene *CDKN2A* und *CDKN2B* in bis zu 40% aller untersuchten Glioblastome (Olapade et al., 1992; Jen et al., 1994; Schmidt et al., 1994; Ueki et al., 1994; Nishikawa et al., 1995; Ichimura et al., 1996) wurde auch eine transkriptionelle Stilllegung dieser Gene durch Methylierung der 5' CpG-Nukleotide in der Promotor-Region nachgewiesen (Merlo et al., 1995; Costello et al., 1996; Herman et al., 1996; Ueki et al., 1996).

Das *RB1*-Gen ist auf Chromosom 13q14 lokalisiert und stellt ein bevorzugtes Ziel für Verluste oder inaktivierende Mutationen dar (James et al., 1988; Henson et al., 1994). In der G1-Phase ist das *RB1*-Protein an E2F-Transkriptionsfaktoren gebunden, wodurch diese in einem inaktiven Zustand gehalten werden. Die *CDK*-Cyclin D-Komplex abhängige Phosphorylierung von *RB1* resultiert in der Freisetzung der Transkriptionsfaktoren und initiiert die an der Zellzyklussteuerung beteiligten S-Phase-Gene (Serrano et al., 1993)(vgl. Abb. 1.2.). Umfassende Studien zeigten Veränderungen von *RB1* in 20% der anaplastischen Astrozytome und in 35% der Glioblastome (James et al., 1990; Henson et al., 1994).

*CDK4*, auf Chromosom 12q13q14 lokalisiert, ist in 11-15% der malignen Gliome amplifiziert, hauptsächlich in solchen mit intaktem *CDKN2A/B* (Reifenberger et al., 1994; Schmidt et al., 1994; Ichimura et al., 1996). Sowohl *CDK4* als auch *CDK6*, dessen Gen auf 7q21q22 lokalisiert ist, bilden Komplexe mit den Mitgliedern der Cyclin D-Familie und werden sowohl von p16 als auch p15 gehemmt.

Mutationen im *RB1*-Gen können die gleichen funktionellen Konsequenzen wie *CDKN2A/B*-Mutationen oder *CDK4/6*-Amplifikationen haben, wobei die CDK4- und Cyclin D1-Überexpressionen möglicherweise einen alternativen Mechanismus zur p16-Deletion bilden, zumal diese genetischen Veränderungen häufig nicht im gleichen Tumor auftreten (He et al., 1994; Schmidt et al., 1994).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bereits der Übergang von niedriggradigen zu anaplastischen Astrozytomen von Allelverlusten auf den Chromosomen 9p und 13q, seltener von 12q-Amplifikationen begleitet wird (Furnari et al., 1996; von Deimling et al., 1995) (s. Abb. 1.3.). So ist in mindestens 50% der anaplastischen Astrozytome und nahezu allen Glioblastomen mindestens eine Komponente des *RB1*-Regelkreises verändert, wobei sich bis auf wenige Ausnahmen die einzelnen Veränderungen gegenseitig ausschließen (Ichimura et al., 2000; Collins, 2004).

### Wachstumsfaktoren und Rezeptoren

Viele Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, einschließlich EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor), PDGF (Platelet-derived growth factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) werden in Astrozytomen überexprimiert. PDGF-Ligand und Rezeptor werden sowohl in niedrig- als auch in hochgradigen Gliomen exprimiert, so dass deren Überexpression bereits in der Initialphase der Astrozytomentstehung eine wichtige Rolle spielen könnte (Hermanson et al., 1992; Westermark et al., 1995, Kleihues & Cavenee, 2000) (s. Abb. 1.3.).

Das auf 7p12.1 lokalisierte *EGFR*-Gen liegt in etwa einem Drittel der hochgradigen Astrozytome amplifiziert und überexprimiert vor (Lieberman et al., 1985; Wong et al., 1987; Bigner et al., 1990; Ekstrand et al., 1992). Der zur ERBB-Familie der Transmembran-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehörende Rezeptor reguliert die epitheliale Proliferation und Differenzierung. Zu seinen Liganden gehören EGF (Epidermal Growth Factor) und  $TGF\alpha$  (Transforming Growth Factor- $\alpha$ ). Durch Bindung dieser Wachstumsfaktoren dimerisiert der Rezeptor, wobei es zu einer Autophosphorylierung kommt, die ihrerseits durch eine Phosphorylierung sekundärer Substrate Zellteilung und Proliferation auslöst (Yarden et al., 1986). In fast 40% aller Glioblastome führt die Amplifikation zu einer intrazellulären Erhöhung der mRNA (Henn et al., 1986; Wong et al., 1987; von Deimling et al., 1992c). In etwa der Hälfte der Glioblastome geht mit der Amplifikation auch ein Gen-Rearrangement einher. Das häufigste Rearrangement resultiert in einem aberranten Spleißprodukt, dessen Variante EGFRvIII bzw. del2-7EGFR keine extranukleäre Bindungsstelle mehr besitzt und dadurch konstitutiv aktiv ist (Sugawa et al., 1990; Wong et al., 1992; Ekstrand et al., 1992 & 1994; Nishikawa et al., 1994; Wikstrand et al., 1997).

Die *EGFR*-Amplifikation stellt ein typisches Merkmal der primären Glioblastome dar, und scheint interessanterweise die für sekundäre Glioblastome typische *TP53*-Inaktivierung auszuschließen (Watanabe et al., 1996). Einer Studie mit knock-out Mäusen zufolge scheinen *EGFR*-Veränderungen in Kombination mit zusätzlichen Veränderungen im *RB1*-Regelkreis einen zur *TP53*-Inaktivierung unabhängigen anderen molekularen Regelkreis der Gliomentstehung darzustellen (Holland et al., 1998).

### Veränderungen auf Chromosom 10

Neben den Kopienzahlvermehrungen auf Chromosom 7 ist der Verlust eines Chromosoms 10 die am häufigsten gefundene genetische Veränderung in Glioblastomen. In niedriggradigen Astrozytomen wurde sie wesentlich seltener beobachtet (Ranson et al., 1992; Rasheed et al., 1992; von Deimling et al., 1992a; Karlbom et al., 1993; Kimmelman et al., 1996; Ichimura et al., 1998). Allelverluste auf dem langen Arm von Chromosom 10 wurden in über 90% der Glioblastome gezeigt, in anaplastischen Astrozytomen in ca. 40% (Karlbom et al., 1993; Albarosa et al., 1996; Bijleveld et al., 1997; Maier et al., 1997; Fults et al., 1998; Ichimura et al., 1998; Kon et al., 1998). Diese Befunde lassen vermuten, dass ein oder mehrere an der Entstehung und/oder Progression von Gliomen beteiligten Tumorsuppressorgene auf diesem Chromosom lokalisiert sind. Allelverluste auf Chromosom 10 lagen in 60-100% der Glioblastome zusammen mit einer *EGFR*-Amplifikation sowie in 40-80% der Fälle mit *TP53*-Mutation vor (von Deimling et al., 1992; Lang et al., 1994; Leenstra et al., 1998). Ihnen wird eine entscheidende Rolle sowohl für die Entstehung der primären als auch der sekundären Glioblastome zugeschrieben (s. Abb. 1.3.).

Bisher wurden 3 Kandidatenregionen mithilfe von Mutations- und LOH-Untersuchungen auf 10p14pter, 10q23 und 10q25q26 charakterisiert, wobei die Kandidatenregion auf 10p14pter seltener als die Regionen auf 10q von Allelverlusten betroffen ist. Ein putatives Tumorsuppressorgen wurde auf ihr bisher noch nicht identifiziert. Das am häufigsten verändert vorliegende und wohl am besten charakterisierte Gen auf Chromosom 10 ist das *PTEN/MMAC1*-Gen auf 10q23.3 (Li et al., 1997; Steck et al., 1997). Dieses Tumorsuppressorgen ist in schätzungsweise 30% der primären Glioblastome mutiert, weitaus seltener in anaplastischen Astrozytomen und sekundären Glioblastomen. In niedriggradigen Astrozytomen wurden noch keine Mutationen nachgewiesen (Albarosa et al., 1996; Rasheed et al., 1997; Wong et al., 1997; Duerr et al., 1998; Fults et al., 1998; Ichimura et al., 1998; Tohma et al., 1998).

Das *PTEN*-Gen, mit Homologie zum zytoskeletalen Protein Tensin, stellt eine bispezifische Phosphatase dar, eines der Hauptsubstrate ist das Lipidsignalmolekül Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3). Die Membranphospholipide, zu denen Phosphatidylinositole gezählt werden, sind Hauptregulatoren der Zellzykluskontrolle, indem sie die Proteinkinase 3B/Akt

(PKB/Akt) aktivieren. Diese Kinase ist ihrerseits ein zentraler Zellzyklusregulator, welche zahlreiche zelluläre Prozesse, wie z.B. Zelldifferenzierung, Glykolyse, Proteinsynthese und Apoptose beeinflusst (Downward et al., 1998). PTEN dephosphoryliert PIP3-Moleküle und ist somit ein negativer Regulator von PKB/Akt. Bei einem Ausfall des *PTEN*-Gens, oder einer inaktivierenden Mutation innerhalb der Phosphatase-Domäne, werden PIP3-Moleküle nicht länger deaktiviert, so dass der PKB/Akt-Pathway kontinuierlich aktiviert wird. In Kombination mit anderen Faktoren wird postuliert, dass eine solche Daueraktivierung zu verstärktem Zellwachstum und möglicherweise zur Tumorentstehung führt (Cantley & Neel, 1999). Das zweite, gliomassoziierte Tumorsuppressorgen auf 10q25q26 ist das *DMBT1*-Gen (Deleted in Malignant Brain Tumors 1). Dieses ist in ca. einem Drittel der Glioblastome homozygot deletiert (Mollenhauer et al., 1997; Somerville et al., 1998), die Aufklärung seiner genomischen Struktur lässt auf eine Rolle bei der Entwicklung einer genomischen Instabilität schließen (Mollenhauer et al., 1999).

Neben diesen Tumorsuppressorgen ist in der Kandidaten-Region 10q26 die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase *MGMT* lokalisiert (Rydberg et al., 1990; Tano et al., 1990). Diese ist in der Krebsforschung von hohem Interesse, da sie sowohl in der Ätiologie als auch in der Prävention eine Rolle spielt. *MGMT* kodiert für das DNA-Reparatur-Protein O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT bzw. *MGMT*). Durch kovalente Bindung werden Alkyladdukte an der O<sup>6</sup>-Position von Guanin, seltener an der O<sup>4</sup>-Position von Thymin, entfernt und *MGMT* dabei inaktiviert. Ist dieser Reparaturmechanismus ausgeschaltet, führen die Alkyladdukte zu G→A Transitionen oder zu Strangbrüchen. *MGMT* spielt somit eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Zudem schützt sie normale Zellen vor exogenen Karzinogenen und hat eine entscheidende Rolle bei der Resistenz von Tumorzellen gegen chemotherapeutische Agenzien (Pegg et al., 1995; Gerson, 2004).

#### Weitere genetische Veränderungen

Allelverluste auf dem langen Arm von Chromosom 19q wurden in allen drei unterschiedlichen Subtypen der Gliome beschrieben (von Deimling et al., 1992c; Bello et al., 1994; Maintz et al., 1997; von Deimling et al., 2000), wobei heterozygote Verluste in 44% der Astrozytome, in 45% der Oligoastrozytome und in bis zu 90% der Oligodendrogliome nachgewiesen wurden (Hartmann et al., 2004). Trotz Eingrenzung der Region auf den Bereich 19q13.3 konnte bisher kein gliomspezifisches Tumorsuppressorgen identifiziert werden. Als alternative Mechanismen der Inaktivierung wird zum einen eine Haploinsuffizienz infolge reduzierter Expression eines oder mehrerer putativer Tumorsuppressorgene in dieser Region, d.h. ein Gen-Dosiseffekt postuliert, zum anderen eine durch Hypermethylierung

verursachte Inaktivierung in der Kandidatenregion des zweiten Chromosoms 19 diskutiert (Hartmann et al., 2004).

Ein weiterer, häufig progressions-assoziiertes LOH wird auf 22q beobachtet. Dieser tritt in 20-30% aller untersuchten Astrozytome, auch bereits bei Grad II-Tumoren auf. Dies lässt auf ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung schließen (Rey et al., 1992). Eine Beteiligung des in dieser Region lokalisierten *NF2*-Gens konnte bei Astrozytomen ausgeschlossen werden. Es gibt in diesen Tumoren Hinweise auf die Beteiligung eines oder mehrerer Gene distal des *NF2*-Locus, wobei die Gene noch nicht näher charakterisiert sind (Ino et al., 1999; Oskam et al., 2000).

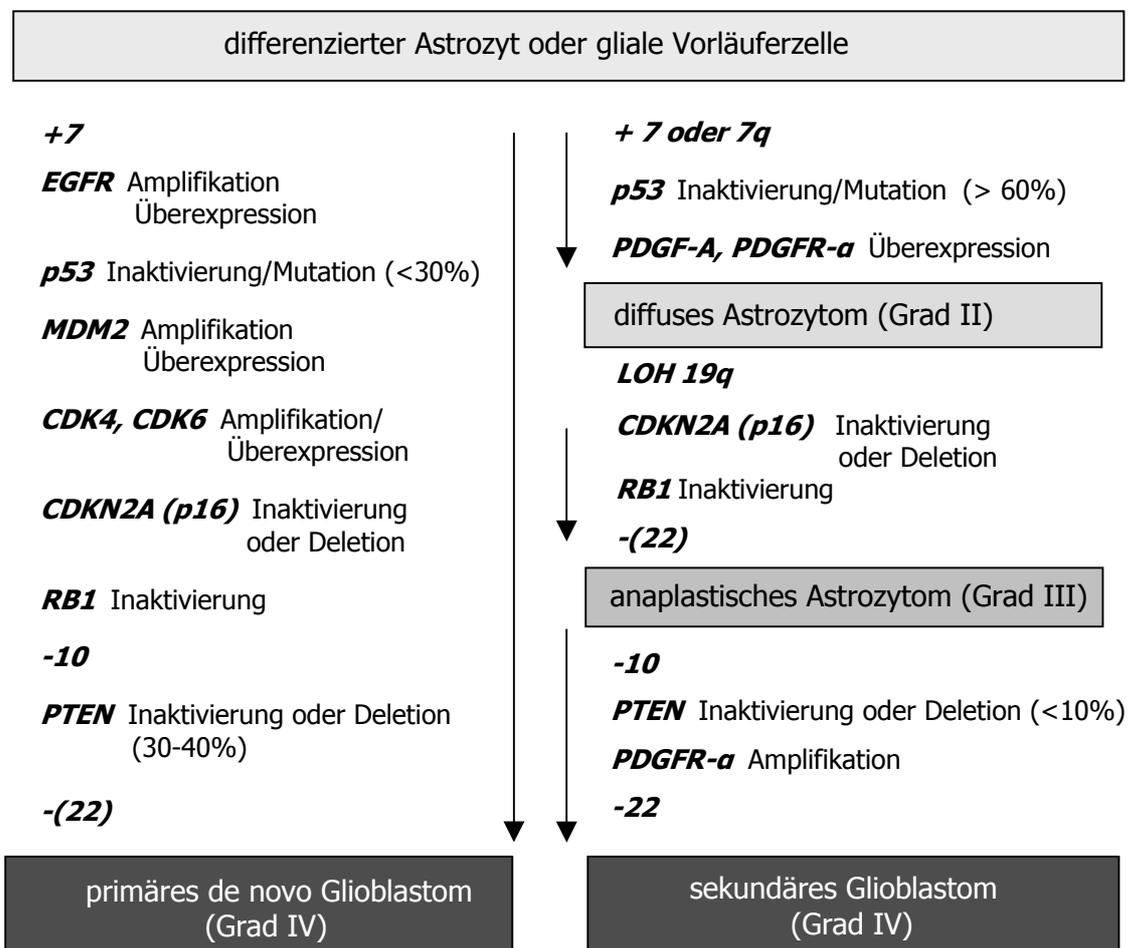


Abb. 1.3. Genetische Entstehungswege in der Evolution zu primären und sekundären Glioblastomen (nach Kleihues & Cavenee, 2000; Zang, 2002).

## 1.5. Epigenetische Veränderungen

Neben den genetischen Veränderungen wie Aneuploidie-Status, Deletionen und Gewinnen bzw. Amplifikationen von genomischen Material sowie Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen von zahlreichen Genen, die den Hauptaspekt der Krebsforschung der letzten zwanzig Jahre darstellen, nimmt die Epigenetik maligner Zellen einen immer größeren Stellenwert ein. Unterschieden werden drei Typen epigenetischer Informationsänderung: das Genomische Imprinting, Histonmodifikationen und die Cytosin-DNA-Methylierung.

Beim genomischen Imprinting erfolgt die Expression eines Gens in Abhängigkeit vom Geschlecht des übermittelnden Elternteils durch unterschiedlich methylierte Regionen in oder nahe der imprimierten (inaktivierten) Gene, d.h. die Stilllegung eines elterlichen Allels. Diese Modifikationen werden beim Durchgang durch die Keimbahn zunächst gelöscht und dann geschlechtsspezifisch wieder aufgebaut (entweder maternal oder paternal). Es sind bereits eine Vielzahl von Genen bekannt, die dem genomischen Imprinting unterliegen, so z.B. die maternal aktiven Allele *H19* und *WT1* und die paternal aktiven Allele *Xist* und *ApoE*. Beim Menschen konnten bereits einige Krankheiten mit diesen Genen in Zusammenhang gebracht werden, z.B. Chorea Huntington, Angelman- und Prader Willi-Syndrom. Auch bei der Entstehung mancher Krebsarten wie z.B. Wilms-Tumoren, konnte eine Beteiligung des genomischen Imprinting gezeigt werden.

Histone dienen nicht nur als „Verpackungsmaterial“ der DNA, vielmehr konnten Studien Histonmodifikationen - wie Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung - eine wichtige Rolle für die Durchführung DNA-abhängiger Prozesse, wie der Transkription, zuweisen. So korreliert z.B. eine Histonacetylierung mit einer Transkriptionsaktivierung, die Histondeacetylierung mit einer Transkriptionsrepression. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass Proteine, die diese Modifikationen verursachen, oftmals in den gleichen Komplexen eingebunden sind wie solche, die die DNA-Methylierung verursachen. Die Arbeitsgruppen von Keshet (1986) und Buschhausen (1987) konnten eine direkte Verbindung zwischen Chromatin und DNA-Methylierung zeigen: eine transkriptionelle Stilllegung der methylierten DNA erfolgt nur dann, wenn die DNA zusätzlich in inaktivem Chromatin verpackt vorliegt.

Die DNA-Methylierung stellt den Hauptangriffspunkt epigenetischer Modifikationen bei Säugetieren, im speziellen beim Menschen, dar. Es handelt sich hierbei um kovalente Modifikationen der DNA, bei der Methylgruppen von S-Adenosylmethionin durch die Cytosin-DNA-5-Methyltransferasen an die C5-Position von Cytosin übertragen werden. Die DNA-Methylierung tritt nahezu ausschließlich an CpG-Nukleotiden auf. Sie spielt eine wesentliche Rolle bei der Stilllegung von Genen und repetitiven Elementen im Genom und führt zu einem Expressionsverlust der betroffenen Gene. Bereits 1979 wurde ein direkter

Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Genexpression gezeigt (Taylor & Jones, 1979). Ihre Untersuchungen mit dem Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin an Mauszelllinien zeigten, dass Gene im methylierten Zustand stillgelegt werden und ihre Stilllegung reversibel ist, wenn die DNA-Methylierung verloren geht.

Die erste in Krebszellen beschriebene epigenetische Veränderung war jedoch der Verlust dieser Methylierung von CpG-Dinukleotiden (Hypomethylierung) (Feinberg & Vogelstein, 1983; Feinberg & Tycko, 2004). In den malignen Zellen besteht nicht nur eine Fehlregulation der methylierenden Enzyme, hauptsächlich der DNA-Methyltransferasen 1, 3a und 3b. Verglichen mit normalen Zellen liegt zusätzlich eine globale Demethylierung in den CpG-Nukleotiden der Gene vor, wobei diese Hypomethylierung möglicherweise für die chromosomale Instabilität und auch für die Re-Expression endogener retroviraler Sequenzen verantwortlich ist (Walsh et al., 1998). Durch Hypomethylierung können in Krebszellen bestimmte Gene wie z.B. das Onkogen *HRAS* aktiviert oder eine Überexpression von Cyclin D2 hervorgerufen werden (Feinberg & Vogelstein, 1983; Oshimo et al., 2003). Demgegenüber erfahren in Tumorzellen aber auch bestimmte Sequenzen, die normalerweise nicht methyliert sind, eine intensive Hypermethylierung (Baylin & Herman, 2000). Schätzungsweise die Hälfte der Gen-Promotoren, typischerweise Haushaltsgene, zeigen diese 0,5-4kb langen CpG-reichen Abschnitte. In normalen Zellen sind diese unmethyliert, mit Ausnahme monoallelisch inaktivierter Gene und dem inaktiven X-Chromosom bei Frauen. Sie ermöglichen die Expression benachbarter Gene, vorausgesetzt, die entsprechenden Transkriptionsfaktoren sind vorhanden.

Mittlerweile stellt die Hypermethylierung der CpG-reichen Promotorregionen die am besten analysierte epigenetische Veränderung in Tumoren dar und ist mindestens so häufig wie die klassische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Mutation. Da sie eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Stilllegung von Tumorsuppressorgenen und einem daraus resultierenden malignen Wachstum spielt, stellt sie bei Genen, denen aufgrund ihrer Funktion eine für die Tumorigenese wichtige Rolle zugeordnet wird und die häufig nicht mutiert oder deletiert vorliegen, oft den einzigen Mechanismus für einen Funktionsverlust in den Tumoren dar (Feinberg & Tycko, 2004; Esteller et al., 2000; Jones & Baylin, 2002; Esteller et al., 2005).

Für die astrozytären Tumore, allen voran die Glioblastome, konnten mehrere Gene identifiziert werden, die diese Promotor-Hypermethylierung aufweisen. Dazu zählen zellzyklusregulatorische Gene wie *CDKN2A*, *CDKN2B*, *p14<sup>arf</sup>*, *RB1* und *TP53*, Apoptose-assoziierte Gene wie *APAF1* (Watanabe et al., 2003) und DNA-Reparaturgene wie *MGMT* (Esteller et al., 2000; Gonzalez-Gomez et al., 2003). Eine *MGMT*-Promotormethylierung wurde mit einer kürzeren Zeit bis zur Tumorprogression sowie einer reduzierten Überlebenszeit von chemotherapeutisch nicht behandelten niedriggradigen Astrozytomen in

---

Verbindung gebracht (Komine et al., 2003). Studien an Patienten mit anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen zeigten, dass eine Promotor-Hypermethylierung des auf dem langen Arm von Chromosom 10 lokalisierten *MGMT* mit der Ansprechrate auf Chemotherapie und der Überlebenszeit unter Nitrosoharnstoff- und Temozolomid-Therapie korreliert (Esteller et al., 1999; Hegi et al., 2005; Paz et al., 2005).

## 1.6. Eigene Fragestellungen

Gegenüber operativer Entfernung und Strahlentherapie maligner Gliome war bisher der Stellenwert der adjuvanten Chemotherapie gemessen an der medianen Überlebenszeit der Patienten deutlich geringer. Mit der Anwendung von Temozolomid kam ein interessanter Wirkstoff in den klinischen Einsatz für die Therapie der diffusen hochgradigen Gliome.

Da diese Tumoren eine ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität mit verschiedenen zellulären Subpopulationen zeigen, ist eine Verbesserung der Prognose nur durch eine individuell angepasste Therapie zu erreichen. Dabei rückt zunehmend die Identifizierung von genetischen Parametern in den Mittelpunkt des klinischen Interesses.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit molekularzytogenetischen Methoden bei malignen Gliomen (Grad IV) das Profil genetischer Veränderungen erfasst und mit dem Ansprechen auf Temozolomid-Therapie mittels klinischer Parameter korreliert werden. Dabei sollten sowohl chromosomale Konsensusregionen, als auch eine Beteiligung bekannter tumorrelevanter Gene auf diesen chromosomalen Bereichen ermittelt werden. Besondere Berücksichtigung fand dabei die aus neueren Studie bekannte Rolle der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) für das Ansprechverhalten auf eine Temozolomid-Chemotherapie sowohl mit molekularen als auch immunologischen Methoden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Untersuchungsmaterial

Untersucht wurden Tumorgewebeproben von 53 Patienten mit hochgradigem Gliom. 38 waren männlichen, 15 weiblichen Geschlechts.

Die Gewebeproben wurden in der Neurochirurgischen Klinik der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg, unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff kryokonserviert, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und wie angegeben bearbeitet (Tab. 2.1.). Ein Teil jeder Probe wurde im Institut für Neuropathologie, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg, histopathologisch untersucht und nach den Kriterien der WHO beurteilt.

Tab. 2.1. Untersuchte Gliome

Fall	Histologie	Alter/ Geschlecht	ÜLZ [Monate]	Behandlung	durchgeführte Untersuchungsmethoden			
					CGH	MGMT IHC	RT-PCR	Methyl.
265/00	GBM	46/w	23.1	Radiatio + TMZ	X		X	
1349/99	GBM	54/m	33.8	Radiatio + TMZ	X			
1782/98	sGBM	26/m	24.2	Radiatio + TMZ	X	X	X	
1099/98	GBM	49/m	23.8	Radiatio + TMZ	X			
369/02	sGBM	37/m	14.3	Radiatio + TMZ	X		X	
1534/00	GBM	62/m	18.4	Radiatio + TMZ	X	X	X	
1106/00	GBM	70/m	19.8	Radiatio + TMZ	X	X	X	
662/01	GBM	70/m	13.4	Radiatio + TMZ	X		X	
1326/99	GBM	56/m	19.2	Radiatio + TMZ	X	X	X	
1515/00	sGBM	40/w	11.2	Radiatio + TMZ	X	X	X	
1707/00	GBM	47/m	29.4	Radiatio + TMZ	X		X	
1691/00	sGBM	39/w	17.4	Radiatio + TMZ	X		X	
497/00	GBM	58/w	16.9	Radiatio + TMZ	X	X	X	
1460/99	GBM	31/w	11.9	Radiatio + TMZ	X		X	X
896/99	GBM	51/m	13.0	Radiatio + TMZ	X	X	X	X
1405/01	GBM	53/m	7.4	Radiatio + TMZ	X		X	
643/01	GBM	54/w	15.3	Radiatio + TMZ	X			
1795/99	sGBM	31/m	6.9	Radiatio + TMZ	X		X	
T4789	GBM	38/m	44.1	Radiatio + TMZ	X	X		
T5958	GBM	63/w	14,4	Radiatio + TMZ	X			
784/03	GBM	52/m	22,5	Radiatio + TMZ	X			
T6002	GBM	53/m	11,2	Radiatio + TMZ	X			
1536/02	GBM	53/m	15,1	Radiatio + TMZ	X			
1940/02	GBM	54/w	17,3	Radiatio + TMZ	X			
6/02	GBM	41/m	26,2	Radiatio + TMZ	X			
596/98	GBM	32/m	21,1	Radiatio + TMZ	X			
947/02	GBM	46/w	17,7	Radiatio + TMZ	X			
XXL/02	GBM	45/m	8,6	Radiatio + TMZ	X			

Fortsetzung Tab. 2.1.

Fall	Histologie	Alter/ Geschlecht	ÜLZ [Monate]	Behandlung	durchgeführte Untersuchungsmethoden			
					CGH	MGMT IHC	RT-PCR	Methyl.
T6044	GBM	37/m	7,6	Radiatio + TMZ	X			
398/01	GBM	46/m	14,4	Radiatio + TMZ	X			
1067/98	AOA	31/m	45,7	Radiatio + TMZ	X	X		
820/00	AOA	32/m	26,6	Radiatio + TMZ	X	X	X	X
1488/00	AOA	36/w	11,1	Radiatio + TMZ	X	X	X	X
1921/01	GBM	66/m		TMZ	X			
861/99	GBM	70/w	22,7	Radiatio	X	X		
1856/98	GBM	46/m	65,8	Radiatio	X			
1028/98	GBM	62/m	5,6	Radiatio	X	X		
2046/97	GBM	39/m	39,8	Radiatio	X	X		
T6025	GBM	73/m	6,3	Radiatio	X			
393/98	GBM	65/m	4,6	Radiatio	X	X		
T5954	GBM	61/m	3,3	Radiatio	X			
1819/98	GBM	76/w	1	Radiatio	X	X		
63/99	GBM	77/w	10,9	Radiatio	X			
T6052	GBM	24/w	4,8	Radiatio	X			
832/97	GBM	57/m	8,9	Radiatio	X			
T4795	GBM	66/m	0,2	Radiatio	X	X		
838/97	GBM	56/w	1,3	Radiatio	X	X		
T4803	GBM	59/m	9,4	Radiatio	X	X		
H549	GBM	38/m	5,5	Radiatio	X	X		
H321	sGBM	48/m	18,2	Radiatio	X	X		
H147	GBM	48/m	7,5	Radiatio	X	X		
H281	GBM	56/m	12,5	Radiatio	X	X		
N111/99	sGBM	24/m	17,4	Radiatio	X	X		
1394/99	GBM	69/w	0,5	Radiatio		X		

GBM: Glioblastom multiforme, sGBM: sekundäres Glioblastom multiforme

AOA: anaplastisches Oligoastrozytom

m: männlich, w: weiblich

ÜLZ: Überlebenszeit

Radiatio: Strahlentherapie, TMZ: Temozolomid-Chemotherapie

CGH: vergleichende genomische Hybridisierung

Methyl. : Methylierungs-Analyse der Promotor-Regionen von *CDKN2A/B* und *MGMT*

MGMT: O<sup>6</sup>-Methylguanin-Methyltransferase

RT-PCR: Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

IHC: Immunhistochemie

### 2.1.1. Einteilung der Patientengruppen

Für die nachfolgende statistische Auswertung der Daten dieser retrospektiven Studie wurden die Patienten aufgrund ihrer histologischen Diagnose und erhaltenen Therapieform in zwei Gruppen eingeteilt. In der sogenannten Kontrollgruppe wurden Patienten eingeschlossen, die nach chirurgischer Resektion des Tumors eine fraktionierte Radiotherapie mit 60 Gy erhalten hatten. Zur Kontrolle wurden in regelmäßigen Abständen bildgebende Verfahren wie die Magnet-Resonanz-Tomografie (MRT) herangezogen. Patienten der TMZ-Gruppe erhielten nach OP und Strahlentherapie bei Auftreten eines Rezidives eine Chemotherapie mit Temozolomid (s. Abb. 2.1.). Drei Patienten mit einem anaplastischen Oligoastrozytom (WHO Grad III) und ein Patient mit abweichendem Therapieschema (Fall 1921/01) wurden in die spätere statistische Auswertung nicht mit einbezogen.

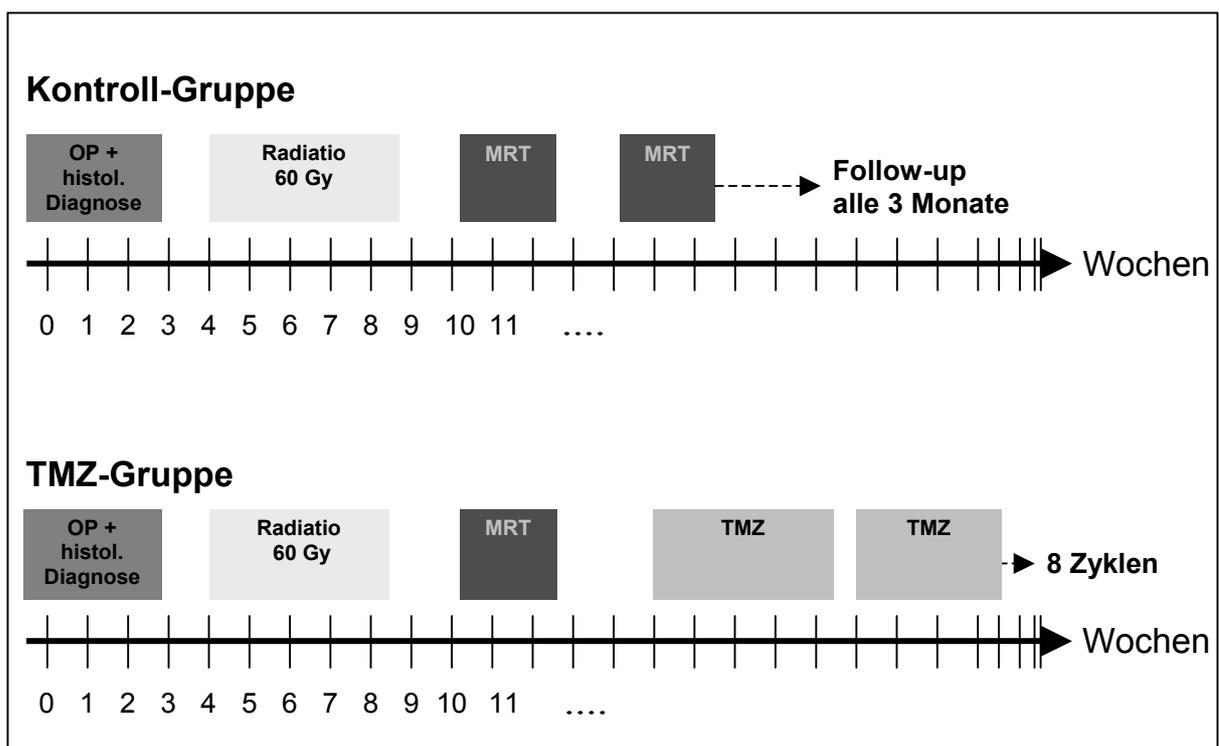


Abb. 2.1. Einteilung der Patientengruppen aufgrund des Behandlungsschemas.

OP: Operation; MRT: Magnet-Resonanz-Tomografie; TMZ: Temozolomid

## **2.2. Zellkultur und Herstellung von Chromosomenpräparaten**

Zur Gewinnung von Metaphasen-Präparaten für die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) wurden Lymphozyten-Kurzzeitkulturen angelegt.

0,8 ml heparinisieretes Vollblut eines gesunden Probanden wurden mit 8 ml Medium (RPMI, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin und 0,4 ml Phytohämagglutinin) vermischt und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Ein Mitosearrest wurde nach 70 Stunden durch Zugabe des Spindelgifts Colcemid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml erreicht. Die Zellen wurden bei 172 g 8 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen durch Zugabe von 0,0375 M KCl einer hypotonen Behandlung unterzogen. Je nach Luftdruck, Umgebungstemperatur und Luftfeuchte variierte die Hypotoniezeit zwischen 5 und 8 min. Anschließend wurden die Zellen bei 172 g 8 min zentrifugiert und der Überstand abgehoben. Zur Fixierung wurde vorsichtig eiskaltes Fixativ (Methanol:Eisessig (3:1)) zugegeben und die Lösung gut resuspendiert. Zur besseren Fixierung wurden die Zellen mindestens 20 min bei -20°C im ersten Fixativ gelagert, 8 min bei 172 g zentrifugiert, der Überstand abgehoben und erneut tiefgekühltes Fixativ zugegeben. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das Zellpellet eine weiße Farbe hatte.

Die Zellsuspension wurde auf Objektträger getropft, die in -20°C kaltem 50%igen Ethanol aufbewahrt wurden. Um eine optimale Spreitung der Chromosomen zu erzielen wurden die Präparate auf einem feuchten Tuch liegend sehr langsam getrocknet. Im Anschluss erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Chromosomenmorphologie im Phasenkontrast, da für die CGH eine sehr hohe Qualität erforderlich ist. In Frage kamen nur Präparate, die eine genügend hohe Anzahl gut gespreiteter Mitosen aufwiesen, sehr gut fixiert waren und darüber hinaus keine Zytoplasmareste um die Chromosomen der Metaphasen zeigten.

## **2.3. DNA-Isolierung**

### **2.3.1. Isolierung genomischer DNA aus Blut**

Zur Gewinnung einer Referenz-DNA für die CGH wurden einem gesunden Spender etwa 10 ml heparinisieretes Vollblut entnommen. Nach Zugabe von drei Volumen Erythrozyten-Lysis-Puffer wurde der Ansatz eine Stunde auf Eis gestellt und gelegentlich durchmischt. Während dieser Zeit platzen im hypotonen Puffer die Erythrozyten und die Lösung wird klar. Anschließend wurden die Lymphozyten 20 min mit 172 g abzentrifugiert und das Zellpellet mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Diese Schritte wurden solange wiederholt, bis das Pellet eine weiße Farbe hatte. Danach wurden die noch intakten Lymphozyten in 4,5

ml SE-Puffer mit 0,5 ml 10% SDS-Lösung unter Zugabe einer Spatelspitze Proteinase K 1-2 Tage bei 55°C verdaut. Die DNA Extraktions- und Reinigungsschritte erfolgten analog dem Protokoll der DNA-Isolierung aus Gewebe.

### **2.3.2. Isolierung genomischer DNA aus Gewebe**

Die Tumorgewebeproben wurden mechanisch zerkleinert, im Anschluss in 4,5 ml SE-Puffer, 0,5 ml 10%iger SDS-Lösung und einer Spatelspitze Proteinase K aufgenommen und 2-3 Tage bei 55°C inkubiert. Die DNA aus Blut (s. Kap. 2.3.1.) und Gewebe wurde durch vorsichtige Zugabe von 2 ml 6 M NaCl-Lösung gefällt. Zur DNA-Extraktion wurden dem Gemisch 7 ml 25:24:1 Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol zugegeben und dieses bei langsamer Rotation auf einem Überkopfschüttler eine Stunde durchmischt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation bei 400 g für 10 min getrennt, die wässrige Phase in ein frisches Röhrchen überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und weitere 30 min durchmischt. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase abpipettiert und die sich in dieser Phase befindliche DNA durch Zugabe des gleichen Volumens eiskaltem Isopropanol als knäuelartige Struktur ausgefällt. Die DNA wurde danach eine Stunde bei 4°C in 70%igem Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und nach Größe des DNA-Pellets in entsprechender Menge Aqua dest. gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

### **2.3.3. Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung**

Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mithilfe eines Spektrometers bestimmt. Nukleinsäuren besitzen in Lösung ein Lichtabsorptionsmaximum bei 260 nm. Einer optischen Dichte von 1 entspricht bei 260 nm und einer Küvette mit  $d = 1$  cm Schichtdicke eine Konzentration von:

50  $\mu\text{g/ml}$  dsDNA

40  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger DNA

33  $\mu\text{g/ml}$  Oligonukleotide

40  $\mu\text{g/ml}$  RNA

Da die Absorption nur in einem bestimmten Bereich proportional zur Konzentration ist, wurde die zu messende DNA-Lösung so verdünnt, dass die gemessene Absorption einen Wert von 1,0 nicht überschritt. Bei einer Wellenlänge von 280 nm liegt das Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren. Durch eine weitere Messung der DNA bei dieser Wellenlänge kann die Reinheit der DNA-Lösung bestimmt werden. Der Quotient  $\text{OD } 260 \text{ nm} / \text{OD } 280 \text{ nm}$  gibt den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung an und

sollte zwischen 1,65 und 1,85 liegen. Ein niedrigerer Wert zeigt Verunreinigungen durch Proteine an.

#### **2.4. Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)**

Die CGH wurde 1992 von Kallioniemi und Mitarbeitern entwickelt und stellt eine molekular-zytogenetische Methode dar, die dem Nachweis chromosomaler Imbalancen dient.

Sie beruht auf der gleichzeitigen Hybridisierung von unterschiedlich markierter Tumor- und Normal-DNA im Verhältnis 1:1 auf normale Metaphasen-Chromosomen aus Blutlymphozyten. Der mit eingesetzte Überschuss humaner Cot1-DNA dient der Absättigung hochrepetitiver Sequenzen und somit der Suppression unerwünschter Fluoreszenzsignale, insbesondere im Bereich der Zentromerregionen der Chromosomen.

Die genomische DNA bindet quantitativ an die ihr homologen Sequenzen der Chromosomen. Im Tumor relativ weniger vorkommende bzw. fehlende Sequenzen führen zur quantitativ überwiegender bzw. alleiniger Hybridisierung von Normal-DNA. Das Fluoreszenzsignal des Normalgenoms in diesem Bereich überwiegt. Im umgekehrten Fall einer DNA-Überrepräsentierung oder Amplifikation in der Tumor-DNA bindet entsprechend mehr Tumor-DNA und die Fluoreszenz des Tumorgenoms überwiegt. Durch die Aufnahme mehrerer Bilder am Auflichtfluoreszenzmikroskop mit geeigneten Farbfiltern und einer anschließenden quantitativen Auswertung der Fluoreszenzsignale entlang der Chromosomen können die DNA-Imbalancen eines Tumors berechnet werden. Das Ergebnis wird in Form eines Ratio-Profiles dargestellt, bei dem Ausschläge nach links einem DNA-Verlust und Ausschläge nach rechts einer DNA-Überrepräsentierung entsprechen (s. Abb. 2.2.).

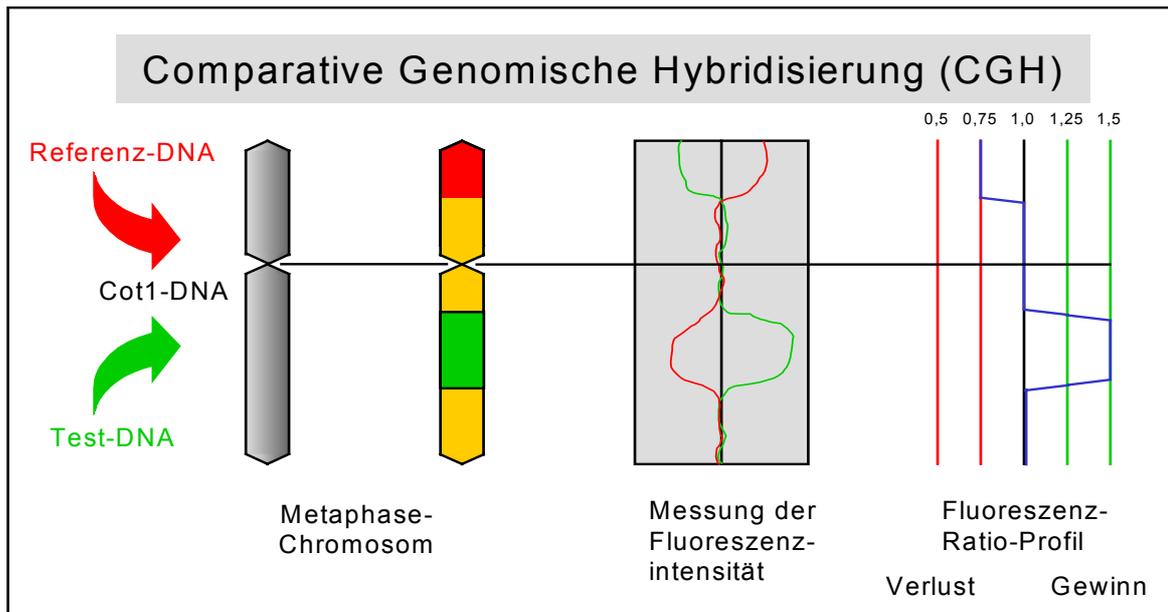


Abb. 2.2. Schema der CGH, nach Jung, 2001.

#### 2.4.1. Markierung genomischer DNA

Die genomische DNA wurde mit Nick-Translations-Systemen entsprechend den Herstellerangaben markiert.

Die Methode der Nick-Translation beruht darauf, dass die DNase I in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  an statistisch verteilten Stellen eines DNA-Substrates Einzelstrangschritte, sogenannte „Nicks“, erzeugt. Die DNA-Polymerase I aus *E. coli* benutzt die freien 3'OH Enden dieser Nicks als Primer für die 5'→3' DNA-Synthese, komplementär zum intakten Strang. Die 5'→3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I entfernt dabei gleichzeitig die Nucleotide in Synthese-Richtung. Die durch die Exonuklease-Aktivität abgebauten Nucleotide werden durch die Polymerase-Aktivität mit Hapten- oder Fluorochrom-markierten Nucleotiden ersetzt.

Verwendet wurden der Biotin- und DIG-Nick-Translation-Mix. Zur Markierung wurde 1,7 µg genomische DNA in einem Endvolumen von 16 µl gelöst und 4 µl Biotin- bzw. DIG-Nick-Translations-Mix dazu pipettiert. In diesen sind DNase I, DNA-Polymerase I, unmarkierte Nucleotide und Biotin-16-dUTP, beziehungsweise DIG-11-dUTP, enthalten. Die Reaktion erfolgte für 90 min bei 15°C im Kühlwasserbad.

Die Fragmentlängen wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft (s. Kap. 2.4.3.). Dazu wurden 2 µl des Markierungsansatzes eingesetzt. Die optimale Fragmentlänge sollte zwischen 200-500 bp liegen. Gegebenenfalls wurde die Inkubationszeit verlängert. Die Reaktion wurde mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 2,5x Vol eiskaltem

Ethanol<sub>absolut</sub> über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation bei 16.000 g und Trocknung wurden die Proben in 20 µl Aqua dest. gelöst und bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert.

#### 2.4.2. Dot-Blot

Der Dot-Blot dient der Kontrolle des Einbaus biotin- bzw. digoxigeninmarkierter Nukleotide in die DNA.

Von der Probe wird eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:10.000 in 10er Schritten in 6x SSC hergestellt und die einzelnen Konzentrationen auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht. Die Bindung zwischen der DNA und der Nitrocellulose wird durch Behandlung in einem UV-Strata-Linker verstärkt. Die nachfolgende Behandlung mit 1% BSA oder 1% Magermilchpulver in 6x SSC sättigt freie Bindungsstellen ab. Nachdem die Membran 30 min mit Streptavidin-alkalischer Phosphatase bzw. Digoxigenin-alkalischer Phosphatase 1:1000 in TN-Puffer inkubiert wurde, wird sie sorgfältig mit Dot-Puffer gewaschen und in eine BCIP- (chromogenes Substrat: 5-Bromo-4-Chloro-Indolyphosphat) und NBT- (Farbstoffverstärker: Nitroblau-Tetrazoliumsalz) Lösung (5,7 ml Dot-Puffer, 33 µl NBT, 25 µl BCIP) überführt und im Dunkeln inkubiert. Dabei lässt sich aufgrund des Substratumsatzes durch die Alkalische Phosphatase am Präzipitat eines violetten Farbstoffkomplexes die Einbauraten semiquantitativ feststellen. Damit die markierte DNA erfolgreich eingesetzt werden kann, sollte sie noch bis 1 pg nachweisbar sein.

#### 2.4.3. Agarosegel-Elektrophorese

Agarose wurde in einer Konzentration von 1% (w/v) in TAE-Puffer aufgekocht, auf 55°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (500 ng/ml) versetzt und in einen Gelträger gegossen. Die Proben wurden mit 1/10 Vol Ladepuffer versetzt und bei einer Feldstärke von 7-10 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Das zugefügte Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, so dass eine Anregung mit UV-Licht (254 nm) die DNA durch die resultierende Fluoreszenz sichtbar macht.

#### 2.4.4. Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurden 9,5 µl Nick-markierte Tumor-DNA (900 ng DNA), 9,5 µl Kontroll-DNA (900 ng), 60µg humane Cot1-DNA (1 mg/ml) mit 0,1x Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 2,5x Vol Ethanol<sub>absolut</sub> über Nacht bei -20°C oder 30 min bei -80°C gefällt. Die DNA wurde im Anschluss bei 16.000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, dekantiert und im

Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde in 3,5 µl Formamid 30 min unter Schütteln resuspendiert. Nach Zugabe von 3,5 µl 20% Dextransulfat/4x SSC wurde die DNA erneut 30 min gelöst und anschließend 7 min bei 75°C denaturiert. Zur Bindung von Cot1-DNA an repetitive DNA-Sequenzen innerhalb der Genome erfolgte eine Vorhybridisierung von 30 min bei 37°C.

Die Metaphasen-Präparate chromosomal unauffälliger Spender wurden folgendermaßen vorbereitet:

Sie wurden 20 min mit 100 µl RNase H (100 µg/ml) in 2x SSC bei 37°C inkubiert, zweimal 5 min in 2x SSC gewaschen und zur Entfernung von Proteinen in 100 ml 0,05% Pepsin in 0,01 M HCl bei 37°C für 1-3 min eingestellt. Der Pepsinverdau stellt einen besonders kritischen Schritt dar und musste für jede Charge der Metaphasen-Präparation zeitlich optimiert werden. Nach kurzem Spülen mit PBS wurden die Chromosomen 10 min bei RT in 4% Paraformaldehyd/PBS nachfixiert, erneut mit PBS gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96% Ethanol) dehydriert und luftgetrocknet.

Die Objektträger wurden mit 100 µl Denaturierungslösung (70% Formamid/2xSSC) für 90 sek bei 72°C auf einer Heizplatte denaturiert. Nach der Denaturierung wurden die Objektträger sofort in eiskaltes 70%iges Ethanol überführt, um ein Renaturieren der DNA zu verhindern. Nach einer aufsteigenden eiskalten Ethanol-Reihe wurden die Objektträger luftgetrocknet und vor der Hybridisierung kurz auf eine 37°C warme Heizplatte gelegt. Die DNA-Lösung wurde auf die vortemperierten OT gegeben, ein Deckglas aufgelegt und mit Fixogum abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer für 3 Tage bei 37°C.

#### **2.4.5. Stringenzwaschungen und Detektion**

Bei diesem Schritt erfolgt der Nachweis der hybridisierten DNA durch die Bindung von sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern bzw. Enzymen an Digoxigenin bzw. Biotin. Dazu wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger zunächst dreimal 5 min in 50% Formamid/2x SSC, zweimal 5 min in 2x SSC, und einmal 5 min in 0,1x SSC bei 45°C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate in 4x SSC/0,1% Triton-X100 5 min bei RT eingestellt.

Der anschließende Blockingschritt mit 100 µl 5% BSA/4x SCC erfolgte bei RT für 30 min in einer feuchten Kammer. Die biotinylierte Tumor-DNA wurde mit Streptavidin-FITC (Verdünnung 1:80 in 100 µl 5% BSA/4x SSC) detektiert, die DIG-markierte Referenz-DNA mit anti-DIG-Rhodamin-Antikörpern (Verdünnung 1:20 in 100 µl 5% BSA/4x SSC). Überschüssige Fluorochrome wurden durch Waschschriffe in 4x SSC-Triton X100 (3x 5 min bei 37°C) entfernt und die Präparate im Anschluss in einer aufsteigenden Ethanol-

Reihe dehydriert, luftgetrocknet und mit einer Antifade-Lösung mit DAPI (Vectashield®) eingedeckt.

#### 2.4.6. Auswertung

Die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse wurde mit der Software ISIS 3.0 durchgeführt. Die zu analysierenden Metaphasen wurden an einem Olympus AX 70 Auflichtfluoreszenzmikroskops mit einer gekühlten s/w-CCD-Kamera aufgenommen. Die Beleuchtung erfolgte mit einer 100 W Quecksilberlampe.

Tab. 2.2.: Charakteristika der Fluoreszenzfilter (Olympus, Hamburg)

Bezeichnung der Filter	NU (DAPI)	MWIBA (FITC)	MWIG (Rhodamin)
Anregungsfilter	360-370nm	460-490nm	520-550nm
Emissionsfilter	>420nm	515-550nm	>580nm
Strahlenteiler Transmission	400nm	505nm	565nm

FITC = Fluorescein-Isothiocyanat; DAPI = 4,6-diamino-2-phenylindol

Es wurde für jedes der drei eingesetzten Fluorochrome (FITC - grün / Rhodamin – rot / DAPI – blau) unter Verwendung der selektiven Filter (s. Tab. 2.2.) getrennt ein Schwarz-Weiß-Bild aufgenommen und am Bildschirm in Falschfarbendarstellung mit der Farbe der entsprechenden Fluoreszenz dargestellt (s. Abb. 2.3.). Die Belichtungszeiten hingen von der Intensität der Fluoreszenzsignale ab und lagen für FITC zwischen 1 und 15 s, für Rhodamin zwischen 2 und 12 s und für DAPI zwischen 0,1 und 0,6 s.

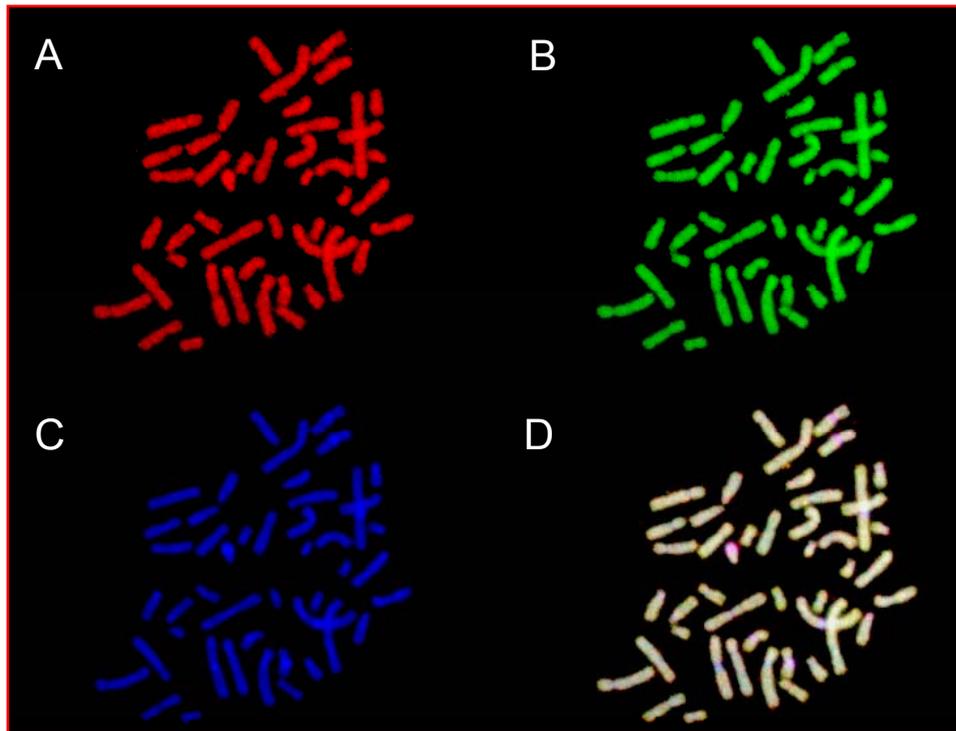


Abb. 2.3. Hybridisierte normale Metaphase mit der DNA eines Glioblastoms gegen die DNA eines genetisch gesunden Spenders.  
 (A) Mit Referenz-DNA hybridisierte Metaphase eines genetisch gesunden Spenders. Detektion mit Anti-Dig-Rhodamin (B) Hybridisierung der Tumor-DNA. Detektion mit Streptavidin-FITC. (C) DAPI-Gegenfärbung der Metaphasen-Chromosomen als Grundlage für die Karyotypisierung. (D) Überlagerung der FITC, Rhodamin und DAPI Bilder aus (A) (B) und (C) .

Nach Korrektur des Bildkontrastes werden die Chromosomen karyotypisiert und mithilfe der Software begradigt. Die Karyotypisierung erfolgte anhand der inversen Darstellung der schwarz/weiss aufgenommenen DAPI-Gegenfärbung. Durch diese Darstellung erzielt die DAPI-Bänderung bei guter Denaturierung und Präparation ein der GTG-Bänderung ähnliches Muster. Nicht eindeutig zuzuordnende oder sich überlagernde Chromosomen wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Für die Auswertung eines Falles wurden mindestens 12 auswertbare Metaphasen aufgenommen, damit genügend Einzel-Chromosomen für eine Analyse zur Verfügung standen. Das Programm berechnet zunächst das durchschnittliche Verhältnis von Grün (FITC) zu Rot (Rhodamin) einer Metaphase. Das Verhältnis wird für jede Metaphase automatisch neu berechnet, da versuchsbedingte Artefakte, wie z.B. unterschiedliche Hybridisierungsqualität und Signalintensität, berücksichtigt werden müssen. Dieses Verhältnis von Grün und Rot wird für jede Metaphase auf 1 gesetzt.

Danach erfolgt die Auswertung der einzelnen Chromosomen<sup>2</sup>. Entlang der Mittelachse jedes einzelnen Chromosoms wird über seine gesamte Breite für jeden detektierten Bildpunkt (Pixel) ein mittlerer Wert für Rot und Grün ermittelt und das Verhältnis (Ratio) von Rot zu Grün bestimmt. Das Programm ermittelt nun für jedes Chromosom ein sogenanntes Mittelprofil, welches mit einer Kurve die Verteilung von Rot zu Grün entlang der Mittelachse des Chromosoms darstellt. Eine Längennormierung der einzelnen Chromosomen wird ebenfalls durchgeführt, da innerhalb einer Metaphasen-Präparation Chromosomen unterschiedlicher Kondensationsgrade vorliegen. Das Zentromer wird hierbei als Fixpunkt benutzt und die p- und q-Arme getrennt voneinander normiert.

Bei der von uns verwendeten Software ISIS werden als Sicherheitsschranken die zweifache Standardabweichung oder ein Konfidenzintervall von 99% gewählt. Dabei berechnet dieses Programm für jeden einzelnen Pixel entlang der Chromosomenachse den Mittelwert aller vorliegenden Werte mit dem entsprechend eingestellten Sicherheitsintervall. Das eingestellte Konfidenzintervall entscheidet über Spezifität und Sensitivität der Ergebnisse. Eine Schranke von 99% ist weniger sensitiv, die noch erkennbaren Gewinne und Verluste jedoch deutlich spezifischer.

Nicht alle Chromosomenbereiche können gleichwertig in die Auswertung mit einbezogen werden. So weisen die Chromosomenabschnitte 1q, 9q und 16q in den zentromernahen Bereichen sowie der lange Arm des Y-Chromosoms einen hohen Gehalt an Heterochromatin auf, der zwischen verschiedenen Individuen sehr variabel ist und daher zu starken Schwankungen im Hybridisierungsergebnis führen kann (Kallioniemi et al., 1994). Die Chromosomenabschnitte 1p32pter, 16p, und die Chromosomen 19 und 22 weisen einen hohen GC-Gehalt auf und müssen aufgrund ihrer Anfälligkeit für Artefakte besonders kritisch bei der Analyse betrachtet werden.

#### **2.4.7. Kontrollen der Markierungsreaktion und CGH**

Zur Überprüfung der Qualität von Markierungsreaktion und CGH wurden nachfolgende Kontrollen durchgeführt:

Die mittels Nick-Translation markierte Tumor- und Referenz-DNA wurden zur Hybridisierung eingesetzt, wenn sie bis 1pg im Dot Blot nachweisbar war und in der Agarosegel-Elektrophorese eine Bandenlänge von 200-500 bp aufwies. Zum Ausschluss von versuchsbedingten CGH-Hybridisierungsartefakten wurde in einigen Fällen ein Aliquot der isolierten DNA erneut markiert und hybridisiert. Mehrmaliges Hybridisieren der DNA eines Falles erbrachte die gleichen Ergebnisse. Auch zeigte eine Hybridisierung mit

---

<sup>2</sup> CGH-Befunde führen zu der Formulierung Gewinne/Verluste **auf**, statt wie gewohnt **von** Chromosomen.

zwei unterschiedlich markierten Referenz-DNAs keine genetischen Veränderungen, wodurch Referenz-DNA-basierende und versuchsbedingte Artefakte ausgeschlossen werden können.

#### **2.4.8. Überlebenszeitanalyse**

Die statistische Auswertung wurde von Herrn Dr. Jörg Rahnenführer, Max Planck Institut für Informatik, Saarbrücken durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob das Ansprechverhalten der Gliome mit spezifischen genetischen Veränderungen im Tumorgewebe mit der Überlebenszeit und der Behandlungsart der Patienten korreliert ist, wurden Gruppen gemäß des genetischen Status und ihrer Therapie (OP und Strahlentherapie bzw. OP, Strahlentherapie und Temozolomid-Behandlung) definiert. Mithilfe der Überlebenszeitanalyse wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass ein Ereignis, in diesem Fall das Versterben des Patienten, bis zu einem bestimmten Punkt eintritt. Dieses ist mit der Kaplan-Meier-Methode auch dann möglich, wenn nicht alle Patienten identische Beobachtungszeiträume haben und ermöglicht das Ablesen spezifischer Überlebensraten oder Überlebenszeiten.

Die Behandlungseffekte wurden durch Cox-Regressionsanalyse (mit 95%igem Konfidenzintervall für die Abschätzung der Hazard Ratio) ermittelt. Die Cox-Regressionsanalyse, auch proportionales Hazard Modell genannt, stellt eine weit verbreitete Regressionsmethode zur Analyse von Überlebenszeitdaten dar. Sie wird eingesetzt, wenn gleichzeitig der Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable, in unserem Fall die Überlebenszeit, hin untersucht werden soll. Es handelt sich dabei um einfache Zwei-Gruppenvergleiche, in denen die Relevanz bzw. das Ausmaß des Therapieeffektes hinsichtlich des Überlebens der Patienten unter gleichzeitiger Berücksichtigung weiterer relevanter Einflussfaktoren (Alter, Karnofsky Performance-Status, Geschlecht und genetische Veränderungen) untersucht wird. Dabei erlaubt es dieses Modell, den Hazard, d.h. das unmittelbare Risiko, für eine Person im Hinblick auf das interessierende Ereignis zu schätzen. Gleichzeitig müssen jedoch die Werte für alle Einflussvariablen dieser Person gegeben sein. Als Maß für die Stärke des Zusammenhangs der Variablen dient die aus dem Regressionskoeffizienten berechnete adjustierte Hazard Ratio. Liegt die Hazard Ratio  $< 1$  ist das Risiko geringer,  $> 1$  ist das Risiko – in diesem Fall zu Versterben - höher (Ziegler et al., 2004). In allen Überlebenszeitanalysen wurden die ermittelten Werte ab  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet.

## 2.5. Bestimmung der Genexpression mittels realtime-PCR

### 2.5.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt eine Methode zur gezielten Vervielfältigung von DNA-Abschnitten dar, welche von zwei bekannten Sequenzen, sog. Primern, eingerahmt werden. Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) verlängert die Primer entlang einer einzelsträngigen DNA-Matrize in Gegenwart von Puffer und  $Mg^{2+}$ -Ionen durch den Einbau von Nukleotiden (dNTP). Dadurch werden neue DNA-Doppelstränge synthetisiert, welche in jeder Vermehrungsrunde wieder als Matrize dienen, so dass es theoretisch zu einer exponentiellen Erhöhung der Kopienzahl kommt.

Eine PCR besteht aus ca. 25-35 Zyklen mit jeweils drei definierten Schritten. Nach einer Denaturierung der als Matrize fungierenden DNA bei  $93^{\circ}C$  bis  $95^{\circ}C$  folgt die sog. „Annealing Phase“, bei der die Primer an die Matrize binden. Die exakte Annealing-Temperatur ist von der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer abhängig und liegt im Allgemeinen bei  $52^{\circ}C$  bis  $62^{\circ}C$ . Im Anschluss folgt die Extensions-Phase bei  $72^{\circ}C$ , dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Dabei synthetisiert die Polymerase durch Anhängen von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) an das 3'-Ende der Primer eine zur Matrize komplementäre DNA-Sequenz. In der ersten Runde entstehen noch Produkte nicht definierter Länge. Ab der ca. dritten Runde entstehen vorwiegend Produkte der gewünschten Länge, die durch die Primerpositionen vorgegeben sind. Theoretisch ist eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz ab der vierten Runde möglich. Dies wird aber in der Praxis durch verschiedene Faktoren behindert. Die Reaktion wird zum einen durch die Enzymmenge im Verhältnis zur steigenden DNA-Menge nach 25 bis 35 Zyklen begrenzt. Zudem nimmt die Aktivität des Enzyms ab, da die Polymerase in der Hitze langsam denaturiert. Weiterhin treten bei zunehmender Anzahl von DNA-Strängen auch Bindungen zwischen den komplementären Strängen auf, die um die Primerbindungen konkurrieren, und die Menge der zur Verfügung stehenden dNTPs nimmt zum Ende der Reaktion hin ab.

Der Erfolg einer PCR sowie die Qualität des gebildeten Produktes sind stark von den eingesetzten Primern abhängig. Um sequenzspezifisch zu binden, wurden Primer mit einer Länge von 18–24 Nukleotiden eingesetzt, da kürzere Primer eine geringere Sequenzspezifität bieten, während längere Primer die Spezifität nicht erhöhen. Sowohl die Länge als auch der GC-Gehalt von 40-60% der beiden Primer sollten ähnlich sein, sowie eine unbalancierte Verteilung von G/C- und A/T-reichen Domänen vermieden werden. Um der Entstehung von Primerdimeren entgegenzuwirken, sollten die jeweiligen Primerpaare, vor allem am 3'-Ende, nicht komplementär zueinander sein. Auch sollte auf eine ähnliche

Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der eingesetzten Primer geachtet werden. Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgt dabei nach folgender Formel:

$$T_m (\text{°C}) = 2 (N_A + N_T) + 4 (N_G + N_C) \quad (\text{Thein \& Wallace, 1986})$$

N= Anzahl der in den Primern enthaltenen Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin

### 2.5.2. RNA-Isolierung

Die Isolierung der Ribonukleinsäuren wurde mit dem RNeasy® Mini Kit nach der Guanidin-Isothiocyanat Methode (Chomczynski & Sacchi, 1987) und mit gesonderten RNase-freien Materialien und Lösungen durchgeführt.

Dazu wurden 40-60 mg Tumor-Gewebe in 1200 µl RLT-Puffer und 12 µl beta-Mercaptoethanol mit einem Zellhomogenisator aufgeschlossen und das Lysat auf Qiashredder®-Säulen pipettiert. Nach 2 min Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei ca. 6.000 g wurde das Lysat mit dem gleichen Volumen 70% Ethanol durch Pipettieren gemischt, auf eine RNeasy®-Säule gegeben, deren Silikagel-Matrix selektiv RNA bindet, zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Nach Waschen mit 700 µl Puffer RW1 wurde zentrifugiert, 2x 500 µl Puffer RPE zugegeben und wiederum zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA mit 40 µl Aqua dest. durch 1 min Zentrifugation bei 5.000 g eluiert, das Eluat zur Erhöhung der Ausbeute nochmals auf die Säule gegeben und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung (s. Kap. 2.3.3.) erfolgte die Lagerung der RNA bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 2.5.3. Reverse Transkription

Um die Expression verschiedener Gene untersuchen zu können, ist es notwendig, die in der extrahierten Gesamt-RNA enthaltene mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Man bedient sich hierbei eines Enzyms retroviralen Ursprungs, der reversen Transkriptase. Diese besitzt Funktionen als RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerase und fungiert weiterhin als RNase. Durch diese Kombination ist eine Umschreibung des einzelsträngigen RNA-Genoms in doppelsträngige cDNA möglich. Die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität stellt die eigentliche reverse Transkriptase dar und generiert einen komplementären DNA-Strang aus einer RNA-Matrize. Die RNase Aktivität degradiert dabei die RNA aus dem RNA-DNA-Hybrid, ohne freie RNA zu zerstören. Die erhaltene cDNA ist in einem nachfolgenden PCR-Ansatz als Template einsetzbar.

### 2.5.3.1. RT-PCR

Für die Expressionsanalyse von MGMT wurden jeweils 500 ng isolierte RNA mithilfe des Omniscript® Reverse Transcriptase Kit umgeschrieben. Das Reaktionsgemisch setzte sich aus 2 µl 10x RT-Puffer, 2 µl dNTP-Mix (je 5 mM dNTP), 1 µl PeqGold RNase Inhibitor Plus (3 U/µl in RT-Puffer), 1 µl Omniscript® Reverse Transkriptase, 2 µl Oligo(dT<sub>18</sub>)-Primer (10 µM), 500 ng RNA und RNase-freies Aqua dest. in einem Volumen von insgesamt 20 µl zusammen. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler für 1 h bei 37°C und einem abschließenden Inaktivierungsschritt bei 95°C für 5 min.

### 2.5.4. Aufbau des LightCyclers™

Zur relativen Quantifizierung der mRNA mittels realtime-PCR wurde ein LightCycler™ (Version 5.32) verwendet. Dieses Gerät stellt eine Kombination eines Thermocyclers mit einem Fluorimeter dar, der - über Luft geheizt und gekühlt - ein rotorähnliches Karussell beinhaltet (Wittwer et al., 1998). Als Reaktionsgefäße werden Glaskapillaren verwendet, die sowohl einen schnellen Wärmetransfer ermöglichen als auch gleichzeitig als optisches Element zur Sammlung des Lichtes dienen. Das Fluorimeter emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge (470 nm), welches über eine Linse auf die Spitze der Kapillare fokussiert wird. Dadurch wird ein Fluoreszenz-Farbstoff (SYBR® Green I) in den Kapillaren angeregt. Die von diesem Farbstoff abgegebene Fluoreszenz wird von derselben Linse wieder gesammelt und an Photohybrid-Detektoren weitergeleitet. Diese messen und vergleichen die Signalstärken der einzelnen PCR-Ansätze miteinander (s. Abb. 2.4.). Bis zu 32 Proben können in einem Lauf in einem Volumen von bis zu 20 µl und einer Zeitspanne von einer halben Stunde untersucht werden.

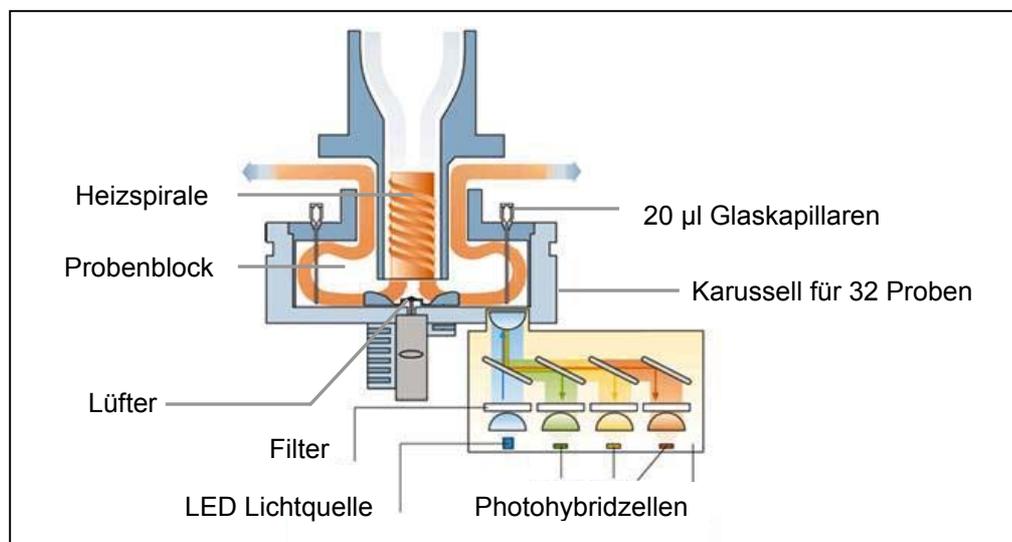


Abb. 2.4. Schematische Darstellung des Lightcycler™ (aus *Roche Diagnostics, Mannheim*).

Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR bietet die Methode der realtime-PCR die Möglichkeit, eine exakte Quantifizierung von PCR-Produkten über einen großen dynamischen Bereich zu erhalten. Quantitativ bestimmt und verglichen werden Fluoreszenzsignale, die mit der PCR-Produktbildung durch die Taq-Polymerase einhergehen. Voraussetzung dabei ist, dass das Reaktionsgemisch Hybridisierungs sonden oder Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR® Green I enthält. Der in dieser Arbeit verwendete Nachweis mit SYBR® Green I erfolgt durch dessen Bindung an doppelsträngige DNA und einen dadurch bedingten Anstieg der Fluoreszenzintensität (s. Abb. 2.5.). Das Absorptionsmaximum von SYBR® Green I liegt bei 497 nm, das Emissionsmaximum bei 521 nm.

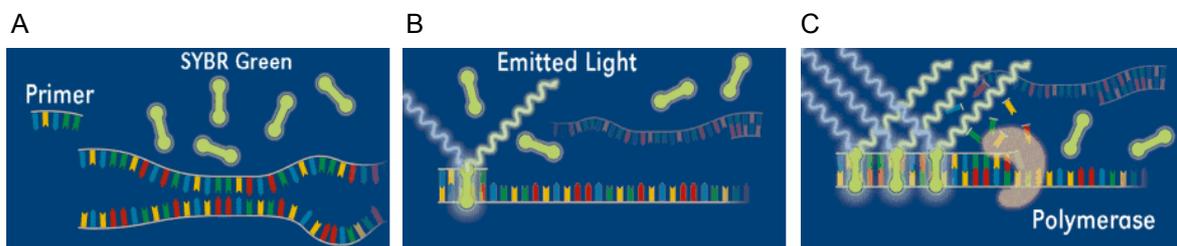


Abb. 2.5. Schematische Darstellung des Einbaus von SYBR® Green I in Doppelstrang-DNA.

Zu Beginn der Amplifikation enthält der Reaktionsansatz denaturierte DNA, Primer und den Farbstoff SYBR® Green I. Ungebundene Farbstoffmoleküle zeigen eine nur schwache Fluoreszenz, die in einem minimalen Hintergrundsignal resultiert und durch Computeranalyse subtrahiert wird (A). Nach Anlagerung der Primer binden schon wenige SYBR® Green I Moleküle am Doppelstrang (B). Die Bildung von doppelsträngigem PCR-Produkt resultiert in einem steilen Anstieg der von SYBR® Green I hervorgerufenen Lichtemission nach Anregung (C) (aus *Roche Diagnostics, Mannheim*).

Die Quantifizierung basiert auf der Software-gestützten Berechnung eines Fluoreszenzschwellenwertes. Der Zyklus, in dem die zu untersuchende Probe diesen Wert signifikant überschreitet, wird als Schwellenwert-Zyklus (threshold cycle,  $C_t$ ) der jeweiligen Probe zugewiesen. Erreicht wird dieser Schwellenwert umso schneller, je mehr Zielsequenzen sich in der zu untersuchenden Probe befinden. Eine Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich des der Probe zugewiesenen Schwellenwert-Zyklus ( $C_t$ ) mit den ermittelten Schwellenwertzyklen eines parallel amplifizierten DNA-Standards eines Haushaltsgens mit einer definierten Kopienzahl in der gleichen Probe und einer daraus abgeleiteten Korrelationsgeraden. Dabei kann der Prozess der PCR-Produktbildung während jedes Temperaturschrittes in allen Zyklen kontinuierlich und zu jedem Zeitpunkt online auf dem Bildschirm verfolgt werden (realtime).

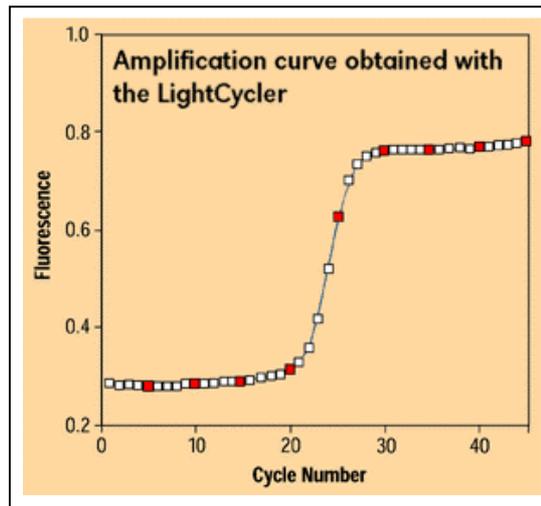


Abb. 2.6. Darstellung der Produktmenge bei steigender Zykluszahl (aus *Roche Diagnostics, Mannheim*).

Bei suboptimalen Bedingungen oder geringen Mengen an Ausgangsmaterial ist eine Bindung des Farbstoffes an jede Form doppelsträngiger DNA möglich, so dass z.B. unspezifische Nebenprodukte oder Primerdimere entstehen könnten. Um dies auszuschließen, kann die Schmelzkurve des jeweiligen PCR-Produktes eine Zuordnung liefern, da Amplifikat und Nebenprodukte unterschiedliche Schmelztemperaturen aufweisen. Dabei wird als Indikator für die Bildung von Einzelsträngen aus den PCR-Doppelstrangprodukten die Fluoreszenzabnahme bei einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung in der Reaktion gemessen. Diese Analyse der Schmelzkurve erfolgt im Anschluss an die Amplifikation. Eine Unterscheidung ist dann möglich, wenn sich der Schmelzpunkt der spezifischen Sequenz wesentlich vom Schmelzpunkt ( $T_m$ ) der unspezifischen Sequenz unterscheidet. Ein vorgeschalteter finaler Extensionsschritt gewährleistet, dass alle DNA-Moleküle als Doppelstrang vorliegen und die maximale Menge SYBR® Green I gebunden ist. Danach wird langsam auf 95°C erhitzt, wobei eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung erfolgt. Bei Erreichen des  $T_m$ -Wertes kommt es zu einer Freisetzung von SYBR® Green I aus dem denaturierenden Doppelstrang und somit zu einer Verringerung der Fluoreszenz. Die LightCycler™-Software erstellt für ihre Analyse die erste negative Ableitung ( $-dF/dT$ ) der gemessenen Fluoreszenz und trägt diese gegen die Temperatur (T) auf. Aufgrund dieser Darstellung erscheint der plötzliche Abfall der Fluoreszenz als Spitze („Peak“) und ermöglicht eine leichtere Zuordnung der spezifischen Schmelztemperaturen zu den Amplifikaten. In Abbildung 2.7. ist schematisch eine Schmelzkurve dargestellt. Die vorhergehenden kleineren Peaks entstehen durch die Aufschmelzung der Primerdimere, während der größere „Peak“ die Schmelztemperatur des PCR-Produktes präsentiert.

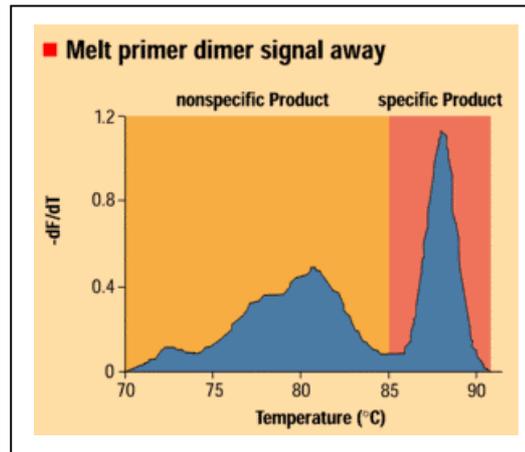


Abb. 2.7. Schematische Darstellung einer Schmelzkurve (aus *Roche Diagnostics, Mannheim*).

### 2.5.5. Expressionsanalyse von *MGMT* mittels SYBR® Green 1

In diesem Teilaspekt der Arbeit wurde untersucht, ob sich die einzelnen Tumore in ihrer *MGMT*-Transkription unterscheiden. Da die Effizienz der cDNA-Synthese gewissen Schwankungen unterliegen kann, liefert eine Quantifizierung nur eine Aussage über die Menge an cDNA im Ansatz, jedoch nicht über die ursprünglich vorhandene mRNA-Menge. Aus diesem Grunde wurde ein externer Standard hinzugezogen. Beta-2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2-MG) ist ein sogenanntes Haushaltsgen, von dem man annimmt, dass es in allen Zellen gleich exprimiert wird. Die Menge an spezifischer mRNA wird dann auf dieses Haushaltsgen, dessen Transkriptionsrate als Konstante genommen wird, bezogen.

### 2.5.6. Erstellen einer Standardkurve

Um die relative Expressionsstärke des Gens zwischen den einzelnen Tumoren und in den unterschiedlichen PCR-Läufen miteinander vergleichen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe eines externen Standards angelegt. Dazu wurde RNA von der Brustkrebszelllinie MCF7 (RNA wurde mir von Fr. Dr. Alexandra Klein zur Verfügung gestellt) in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 2.5.3.1.) und in einer Verdünnungsreihe in 10er Schritten von 1:10 bis 1:100.000 analog zu den untersuchten Tumoren mit *MGMT* und  $\beta$ 2-MG im LightCycler™ analysiert. Für jede Verdünnung wurde eine Dreifach-Bestimmung für das Zielgen *MGMT* und für das Referenzgen  $\beta$ 2-MG vorgenommen. Das Verhältnis von Zielgen zu Referenzgen sollte dabei in jeder Verdünnungsstufe gleich sein. Aus den resultierenden Daten, die die PCR-Effizienz von Zielgen und Referenzgen beschreiben, wurde mit der RelQuant™-Software eine Regressionsgerade erstellt, welche als Standardkurve eingesetzt wurde. Die relativen Standardkurven wurden für jedes Gen bestimmt und in einem Modul der Software (Version 3.5) als Koeffizient hinterlegt.

### 2.5.7. Kalibrator-normalisierte relative Quantifizierung mit Effizienzkorrektur

Für die Quantifizierung der mRNA des Zielgens *MGMT* relativ zu der mRNA des Haushaltsgens  $\beta$ 2-MG mit dem LightCycler™ wurden die Proben jeweils im Doppelansatz für beide Primerpaare gemessen. Die Ansätze setzten sich aus 10  $\mu$ l QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen), 0,25  $\mu$ l Primer 5'-MGMT bzw. 5'- $\beta$ 2-MG, 0,25  $\mu$ l Primer 3'-MGMT bzw. 3'- $\beta$ 2-MG, 2  $\mu$ l cDNA, 7,5  $\mu$ l Aqua dest. zusammen. Um die Bildung von Primerdimeren, die frühzeitige Elongation sowie unspezifische Primeranlagerungen zu verhindern, wurde die Quantifizierungs-PCR mit dem HotStart-Verfahren durchgeführt. Für die Reaktion wurde eine modifizierte DNA-Polymerase verwendet, die erst nach einer 15minütigen Denaturierung bei 95°C funktionsfähig ist. Die optimalen Bedingungen für die zu amplifizierenden Sequenzen wurden durch Vorversuche ermittelt.

In dieser Arbeit wurden die in der Studie von Tanaka und Mitarbeitern (2003) beschriebenen Primer mit der Software Blast (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer>) auf die entsprechenden Kriterien hin überprüft und verwendet.

Tab. 2.3. Sequenzen der eingesetzten Primer

Bezeichnung	Primersequenz
5'-MGMT	CCT GGC TGA ATG CCT ATT TTC
3'-MGMT	GAT GAG GAT GGG GAC AGG ATT
5'- $\beta$ 2-Mikroglobulin	TTC TGG CCT TGG AGG GGC ATC C
3'- $\beta$ 2-Mikroglobulin	ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG

Um eine Normalisierung der Ergebnisse zu erreichen und die unterschiedlichen Läufe miteinander vergleichen zu können, wurde in jedem Lauf ein Kalibrator mitgeführt. Prinzipiell kann jede beliebige positive cDNA-Vergleichsprobe als Kalibrator dienen, die ein stabiles Verhältnis von Ziel - zu Referenzgen besitzt. In diesen Untersuchungen wurde als Kalibrator die schon für die Erstellung der Standardkurve verwendete RNA von MCF7 eingesetzt, welche analog zu den Tumoren in cDNA umgeschrieben, portioniert und bei – 20°C gelagert wurde. Zum Vergleich der unterschiedlichen Läufe und einer Normalisierung der Ergebnisse wurde von der Software für jede Probe und den Kalibrator die Menge an Zielgen relativ zur Menge an Referenzgen mittels relativer Quantifizierung analysiert. Da die Ergebnisse als Verhältnis Zielgen/Referenzgen der Probe dividiert durch das Verhältnis Zielgen/Referenzgen des Kalibrators ausgedrückt werden, können Probeninhomogenität und nachweisabhängige Variabilitäten korrigiert werden.

$$\frac{\text{Cp Median (Zielgen}_{\text{Probe}}) / \text{Cp Median (Referenzgen}_{\text{Probe}})}{\text{Cp Median (Zielgen}_{\text{Kalibrator}}) / \text{Cp Median (Referenzgen}_{\text{Kalibrator}})}$$

Die Kalkulation der kalibrator-normalisierten relativen Quantifizierungsdaten basiert ausschließlich auf den von der Software automatisch ermittelten Cp-Werten (Crossing points). Das Ergebnis der Kalibrator normalisierten relativen Quantifizierung ist eine Funktion der PCR-Effizienz und der Bestimmung der Crossing Points.

In der Genauigkeit der Mengenbestimmung nehmen diese Effizienzunterschiede einen wichtigen Stellenwert ein.

Die Amplifikationseffizienz einer PCR wird beschrieben als

$$N = N_0 \times 2^n$$

N = Kopienanzahl nach n Zyklen,  $N_0$  = anfängliche Kopienzahl, n = Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen

Theoretisch beträgt eine optimale PCR-Effizienz den Wert 2, d.h. jedes PCR-Produkt wird in jedem Zyklus einmal repliziert. Tatsächlich wird diese Effizienz jedoch von mehreren Parametern beeinflusst, so dass sich die Effizienz von dem Wert 2 unterscheidet.

$$N = N_0 \times E^n$$

Die Lightcycler Software berechnet die Steigung für jede Standardkurve durch die relative Distanz der Cp-Werte. Dadurch errechnet sich die Effizienz der PCR nach der Formel

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Eine Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung des Kalibrator-normalisierten Verhältnisses von Zielgen zu Referenzgen wurde automatisch von der „Lightcycler™ Relative Quantification Software“ durchgeführt. Dabei greift die Software auf die relativen Standardkurven zurück, welche die PCR-Effizienz von Zielgen und Referenzgen beschreiben (s. Kap. 2.5.6).

### **2.5.8. Auswertung**

Eine mögliche Korrelation der Expressionsstärke von MGMT mit dem Ansprechverhalten, dem Alter und Geschlecht der Patienten wurde von Herrn Dr. Jörg Rahnenführer mit der Kaplan-Meier Analyse und dem *t*-Test untersucht. Als signifikant wurden Werte ab  $p < 0,05$  betrachtet.

## **2.6. Immunhistochemische Analyse**

### **2.6.1. Gewebepreparation**

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden Gewebeproben in gepuffertem Formalin (6%, pH 7,2-7,4) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von den Tumorblöcken wurden 5µm Schnitte angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgezogen.

Die Tumorgewebeschnitte wurden im Institut für Neuropathologie der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg, angefertigt. Die als Referenzgewebe dienenden Tonsillen wurden freundlicherweise von Frau Bechtel, Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg, zur Verfügung gestellt.

### **2.6.2. Silanisieren von Objektträgern**

Gereinigte Objektträger wurden unter Schütteln 30 sek in Aceton und im Anschluss 10 sek in 2% 3-(Triethoxysilyl)-propylamin in Aceton gewaschen. Danach wurden sie je 2x in Aceton und Aqua dest. gespült und bei 37°C getrocknet.

### **2.6.3. Nachweis der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT)**

Die Darstellung von Antigenen in Zellen und Gewebe erfolgte in einem Zweistufenprozess, durch die Bindung eines Antikörpers an das nachzuweisende Antigen und dem anschließenden Nachweis und das Sichtbarmachen des gebundenen Antikörpers durch ein Enzym-Chromogen-System.

Indirekte Nachweismethoden besitzen gegenüber direkten Methoden eine höhere Empfindlichkeit. Während bei der direkten Methode das Enzym direkt an den Primärantikörper gekoppelt ist, wird bei der indirekten Methode das Enzym an ein an den Primär-Antikörper bindendes sekundäres Reagenz (Link-Antikörper) gekoppelt, wodurch eine Verstärkung des Antigen-Bindungsvorganges erzielt wird. Bekannteste indirekte Methoden sind die Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP), der Avidin-Biotin Complex (ABC) und das Biotin-Streptavidin amplifizierte (B-SA) System.

Der in dieser Arbeit eingesetzte MultiLink®-HRP Kit repräsentiert ein verbessertes Biotin-Streptavidin (B-SA) System, bei dem der Link-Antikörper so modifiziert wurde, dass die Bindung mehrerer Biotin-Moleküle ohne Beeinflussung der Bindungsaffinität möglich wird.

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden nach einer indirekten Peroxidase-Reaktion durchgeführt. Zunächst wurden 5 µm Schnitte des in Paraffin eingebetteten Tumorgewebes bzw. Referenzgewebes 3 x 10 min in Xylol entparaffinisiert, anschließend 3 x 10 min in 96% Ethanol rehydriert und in 1,85% Wasserstoffperoxid in Methanol eingestellt. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Schnitte 10 min mit AR-10-Lösung in der Mikrowelle durch mehrfaches, kurzes Aufkochen vorbehandelt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach mehreren Waschschritten mit Aqua dest. und PBS erfolgte ein 15minütiges Blocken der endogenen Peroxidase (im Lieferumfang des MultiLink®-HRP Kit, s.u. enthalten), gefolgt von einem Waschschriff in PBS. Nach 15 min Blocken mit 3% BSA/PBS wurden die Schnitte mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen humanes MGMT-Protein (Klon MT3.1) in einer Verdünnung von 1:25 in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei den parallel angefertigten Negativ-Kontrollen wurde dieser Primär-Antikörper durch PBS ersetzt.

Die Schnitte wurden 1 Stunde auf Raumtemperatur adaptiert, mit PBS gewaschen und mit dem MultiLink®-HRP Kit behandelt. Die nachfolgenden Schritte wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Als Sekundär-Antikörper diente ein Biotin-konjugiertes Anti-Immunglobulin, mit dem die Schnitte 20 min inkubiert wurden. Zum Nachweis wurde Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Streptavidin benutzt, die Immunreaktion selbst wurde mit dem Substrat 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) nach 5 min Inkubationszeit sichtbar gemacht. Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung der Schnitte für 1 min mit Harris modified Hematoxylin, gefolgt von 5 min in Aqua dest., 10 sek in Ammoniakwasser (1 Tropfen 25% NH<sub>4</sub>OH in 250 ml Aqua dest.) und einer Bläuung unter fließendem Leitungswasser. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96% Ethanol), Lufttrocknen und Eindecken mit 50 µl Roti®-HistoKit wurden die Präparate mit einem Hellfeldmikroskop ausgewertet.

#### **2.6.4. Auswertung**

Ein möglicher Einfluss der Stärke der Aktivität von MGMT auf das Ansprechverhalten der Patienten auf die Chemotherapie und ihre Überlebenszeit wurden mit der Kaplan-Meier Analyse von Herrn Dr. Jörg Rahnenführer, Max Planck Institut für Informatik, Saarbrücken, untersucht. Die ermittelten Werte wurden bei  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet.

## 2.7. Methylierungsanalyse

### 2.7.1. Bisulfit-Modifikation der DNA

Die Bisulfitbehandlung zum Nachweis von 5-Methyl-Cytosinresten an der DNA erfolgte nach Zeschnigk et al., (1997) und Rein et al. (1998). Sie besteht in der Desaminierung von Cytosin-Resten durch die Behandlung mit Natrium-Bisulfit ( $\text{NaHSO}_3$ ) zu Uracil. Da Natrium-Bisulfit leicht mit der 5,6-Doppelbindung von Cytosin, sehr selten jedoch mit methylierten Cytosinen reagiert, werden generell nur nicht-methylierte Cytosin-Reste zu Uracil umgewandelt. Durch die Reaktion von Cytosin mit dem Bisulfit-Ion entsteht ein sulfoniertes Cytosin-Intermediat, welches durch anschließende Desaminierung ein sulfoniertes Uracil bildet. Unter alkalischen Bedingungen entsteht dann nach Abspaltung der Sulfongruppe Uracil (Abb. 2.8.).

Da das Kohlenstoffatom-6 des Pyrimidinringes in doppelsträngiger DNA sterisch blockiert ist, kann diese Reaktion nur in einzelsträngiger DNA stattfinden. Durch die Umwandlung von Cytosin zu Uracil nach erfolgter Bisulfit-Modifikation sind die beiden Einzelstränge jedoch nicht mehr komplementär zueinander, so dass bei einer nachfolgenden Amplifikation der DNA die jeweiligen PCR-Primer strangspezifisch ausgewählt werden müssen.

Bei der anschließenden Neusynthese des zu dem modifizierten DNA-Einzelstrang komplementären Strangs bewirkt Uracil den Einbau eines Adenins, so dass es zu einem Austausch eines GC-Basenpaares durch ein AT-Basenpaar kommt. Lediglich 5-Methylcytosin bleibt erhalten und ist bei einer Sequenzierung auch zu identifizieren, während alle nicht-methylierten Cytosine durch Thymin ersetzt sein sollten.

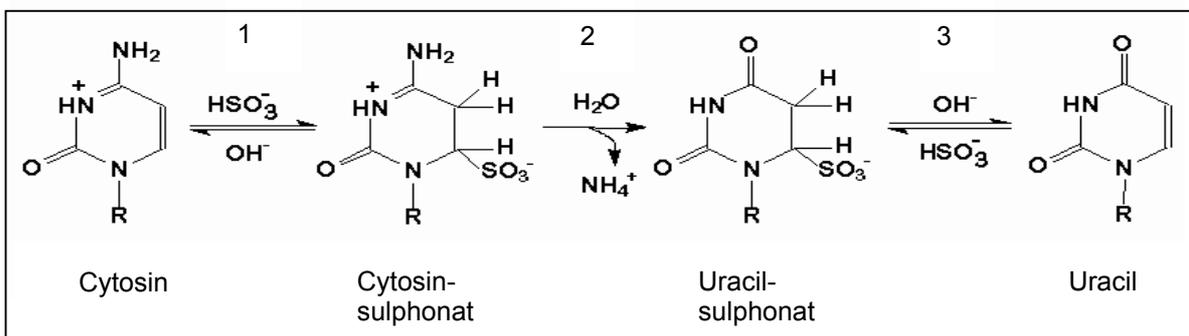


Abb. 2.8. Chemischer Ablauf der Bisulfit-induzierten hydrolytischen Desaminierung von Cytosin zu Uracil. 1: Sulphonierung, 2: Hydrolytische Desaminierung, 3: Alkali-Desulfonierung.

4  $\mu\text{g}$  genomische DNA wurden durch Zugabe von TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 70  $\mu\text{l}$  gebracht. Zur Denaturierung wurde die DNA mit 8  $\mu\text{l}$  3 mol/l NaOH versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Nach zusätzlicher Hitze-Denaturierung und anschließendem

Abkühlen auf Eis wurden 480 µl Natriumbisulfit-Lösung zugegeben und die Sulfonierung durch 20 Zyklen mit jeweils 30 sek 95°C und 15 min 50°C in einem Thermocycler durchgeführt.

Um Bisulfit, Hydrochinon und Salze nach erfolgter Modifikation zu entfernen, wurde die DNA mit dem Wizard® DNA Clean-Up System aufgereinigt. Dazu wurde die DNA mit der Wizard®-Gebrauchslösung gemischt, die DNA-bindende Komponenten enthält. Diese Lösung wurde auf die mitgelieferte Säule gegeben, durch Anlegen eines Vakuums schnell mit Isopropanol (80%) gespült und mit 80°C warmen 100 µl Aqua dest. eluiert.

Im Anschluss erfolgte die alkalische Desulfonierung durch Zugabe von 11 µl 3 mol/l NaOH und 15 min Inkubation bei 37°C. Danach wurde mit 80 µl Ammoniumacetatlösung neutralisiert und die DNA mit dem 2,5x Vol eiskalten Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation bei 5.000 g und Waschen in 70%igem Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und in 20 µl Aqua dest. gelöst.

### 2.7.2. PCR nach Bisulfitmodifikation

Für die Promotor-Regionen der Gene *MGMT*, *CDKN2A* und *CDKN2B* wurden entsprechend den in Kapitel 2.5.1. dargestellten Kriterien von uns Primer entworfen, deren Sequenzen in Tabelle 2.4. dargestellt sind. Alle verwendeten Primer wurden von der Fa. Operon, Köln, synthetisiert.

Tab. 2.4. Sequenzen der verwendeten Primer.

Bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
<b><i>MGMT</i></b> sense	TGA TAG GGT TTT TGT TGG TTT
<b><i>MGMT</i></b> antisense	CCT TTT CCT ATC ACA AAA ATA ATC
<b><i>p15</i></b> sense	TGG GAA AGA AGG GAA GAG TG
<b><i>p15</i></b> antisense	AAA CCC TAA AAC CCC AAC TAC C
<b><i>p16</i></b> sense	GGT GGG GAG GAG TTT AGT TTT T
<b><i>p16</i></b> antisense	CAA CCC CTC CTC TTT CTT CC

Der aus 5 µl 10x PCR-Puffer, 5 µl dNTP (je 2 mM), 0,5 µl PCR-Primer sense, 0,5 µl PCR-Primer antisense (je 100 pmol), 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), 10 µl Q-Lösung und 27,25 µl Aqua dest. zusammengesetzte Reaktionsansatz wurde zu den Probengefäßen mit 1 µl bisulfitmodifizierter DNA pipettiert.

Um eine ausreichende Menge an Amplifikations-Produkt zu erzielen, erfolgte eine weitere PCR mit dem bereits amplifizierten Produkt. Dazu wurden 4,5 µl 10x PCR-Puffer, 5 µl dNTP (je 2 mM), 0,5 µl PCR-Primer sense, 0,5 µl PCR-Primer antisense, 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), 9 µl Q-Lösung und 25,25 µl Aqua dest. zu 5 µl Template aus der ersten PCR pipettiert.

Beide PCR-Reaktionen wurden mit nachfolgendem Programm an einem Thermocycler durchgeführt.

Programm:	15 min	95°C	} 40 Zyklen
	45 sek	94°C	
	45 sek	60°C	
	1 min	72°C	
	7 min	72°C	
	10 min	4°C	

### 2.7.3. Präparative Agarosegel-Elektrophorese

10 µl des PCR-Amplifikats wurden mit 4 µl Ladepuffer versetzt und auf einem 2%igen präparativen Agarosegel in 1x TBE mit Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) bei 90 mV über 2,5-3 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt, auf einem UV-Transilluminator zur Überprüfung der PCR-Reaktion und Darstellung der Längenverteilung visualisiert und dokumentiert.

### 2.7.4. Isolierung der DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell möglichst genau ausgeschnitten und bis zur Aufreinigung bei -20°C trocken gelagert.

Zur Extraktion der DNA wurde der GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit verwendet. Zu je 10 mg Gel wurden 10 µl Capture Buffer in einem maximalen Volumen von 300 µl zugeben, gemischt und bei 60°C bis zur vollständigen Auflösung der Agarose inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Proben in GFX-Säulen transferiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, 30 sek bei 6.000 g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Im Anschluss wurde 500 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben, zentrifugiert und die Säulen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Membran der Säule wurde mit 50 µl Aqua dest. 1 min inkubiert, die DNA durch 1 min Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.7.5. Klonierung der PCR-Produkte

Der in dieser Arbeit verwendete TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing ermöglicht eine direkte Insertion mit Taq-Polymerase amplifizierter PCR-Produkte in Plasmidvektoren für nachfolgende Sequenzierungsanalysen.

Die Einklonierung erfolgt über die angehängten Desoxyadenosin-Reste an das 3'-Ende der PCR-Produkte durch eine Template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität der eingesetzten Taq-Polymerase. Der Vektor pCR®4-TOPO® besitzt zu diesen Desoxyadenosin-Resten komplementäre 3'-Desoxythymidin-Reste, so dass eine effiziente Ligation des PCR-Inserts mit dem Vektor gewährleistet wird.

Um sicherzustellen, dass nach der Gelextraktion der DNA-Bande ausreichend Desoxyadenosin-Reste vorhanden waren, wurde zusätzlich eine A-Überhang-Reaktion angeschlossen. Dazu erfolgte eine Inkubation von 50 µl Eluat mit 4µl dATP (2 mmol/l), 6 µl 10x Taq-Puffer und 0,1 µl Hot Star Taq Polymerase bei 72°C 15 min in einem Thermocycler.

2 µl dieses PCR-Produktes wurden zu 1 µl Salzlösung und 1 µl Aqua dest. pipettiert, nach Zugabe von 1 µl Vektor 5 min bei Raumtemperatur ligiert und 5-30 min auf Eis inkubiert. Zur abschließenden Transformation wurden 2 µl der Ligationsmischung entsprechend den Herstellerangaben in One Shot® TOP10 *Escherichia coli*- Zellen pipettiert, vorsichtig durchmischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 sek bei 42°C im Wasserbad wurde der Ansatz erneut auf Eis inkubiert und 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben. Der Transformationsansatz wurde 1 Stunde bei 37°C stark geschüttelt und 50 µl bzw. 150 µl auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 2.7.6. Isolierung von Plasmid-DNA

Je Fall wurden von den Ausstrichen 15 Einzelkolonien mit Zahnstochern gepickt und in Minikulturen mit 4 ml LB-Medium und 70 µg/ml Ampicillin überführt. Parallel wurden die Klone auf eine LB-Agarplatte aufgebracht und Platte sowie Minikulturen über Nacht bei 37°C inkubiert. Jeweils 1 ml der Kultur wurden anschließend 5 min bei 6.000 g pelletiert, der Überstand verworfen, und zur Langzeitaufbewahrung mit LB-Medium mit 20% Glycerin und 50 µg/ml Ampicillin resuspendiert. Nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff wurde der Bakterienstock bei -70°C gelagert, die restliche Bakterienkultur wurde zur Plasmidisolierung mit dem Plasmid Mini Kit eingesetzt.

Diese Methode basiert auf einer alkalischen Bakterienlyse und einer nachfolgenden selektiven Bindung von Plasmid-DNA an eine Silika-Matrix. Die Isolierung wurde gemäß den Herstellerangaben mit den im Kit enthaltenen Lösungen durchgeführt.

3 ml der Bakterienkultur wurden durch Zentrifugation bei 6.000 g für 5 min pelletiert, der Überstand entfernt und das Bakterienpellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit 300 µl Aufschlusspuffer P2 durch invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Dieser Puffer enthält SDS, welches die zellulären Proteine denaturiert, und Natriumhydroxid, das neben der Zelllyse eine Denaturierung von chromosomaler und Plasmid-DNA bewirkt. Durch Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer P3 erfolgte eine Renaturierung der unter diesen Bedingungen in Lösung vorliegenden Plasmid-DNA, während chromosomale DNA aufgrund ihrer Größe denaturiert bleibt und zusammen mit den Proteinen und SDS präzipitiert. Dieses Präzipitat wurde anschließend 10 min bei 6.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf die mit QBT-Puffer äquilibrierte Säule pipettiert, und nach 4maligem Waschen mit je 1 ml QC-Puffer die Plasmid-DNA mit 800 µl QF-Puffer eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 0,7x Vol Isopropanol und Zentrifugation bei 14.000 g gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10 µl Aqua dest. gelöst.

### 2.7.7. Überprüfung der Produkte

Um sowohl die erfolgreiche Klonierung als auch die Identität des Inserts zu kontrollieren, wurde eine PCR mit M13-Primern durchgeführt. Dazu wurden zu 0,1 µl des Plasmides jeweils 0,5 µl M13-Primer (s. Tab. 2.4.), 2,5 µl 10x Taq Puffer, 2,5 µl dNTP, 0,15 µl Taq und 18,75 µl Aqua dest. zugegeben. Nach 15 min bei 95°C, 30 Zyklen mit 35 sek 94°C, 45 sek 55°C und 1 min 72°C, anschließend 5 min 72°C, 10 min 4°C wurden jeweils 1 µl des ursprünglichen Plasmides neben 5 µl des PCR-Produktes auf einem 1%igen Agarosegel in TBE mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) aufgetrennt.

Eine erfolgreiche Klonierung zeigte sich in 2 Banden für lineares bzw. „coiled“ Plasmid, die Identität des Inserts wurde anhand der Bandenlänge des entsprechenden PCR-Produktes entsprechend der Länge des untersuchten Gens bestimmt.

Um die Ausbeute an Plasmid-DNA für die Sequenzierreaktion abzuschätzen, wurde zusätzlich eine quantitative Analyse auf einem Agarosegel durchgeführt. Dazu wurden in einem 1%igen Agarose-Minigel in TBE mit Ethidiumbromid, 1 µl Plasmid sowie 1 µl Marker VIII (0,25 µg/µl) bei 90 V eine Stunde aufgetrennt.

Tab. 2.5. Verwendete Primer.

Bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
<b>M 13</b> forward	GTA AAA CGA CGG CCA G
<b>M 13</b> reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC

Die Sequenzen der M13-Primer entstammen der Beschreibung des TOPO TA Cloning® Kit for Sequenzierung.

### 2.7.8. Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Proben nach der Kettenabbruch- bzw. Didesoxyribonukleosidtriphosphat(ddNTP)-Methode wurde von den Firmen Qiagen, Hilden bzw. Genterprise, Mainz, auf einem ABI Prism 3773 bzw. Abi 3730 durchgeführt.

Die resultierenden Sequenzen wurden mit den aus Datenbanken bekannten bzw. entsprechend den durch Bisulfitbehandlung veränderten Zielsequenzen auf ihren Methylierungsstatus hin verglichen (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>) und die erhaltenen tumorspezifischen Methylierungsmuster der jeweiligen Gene dokumentiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ergebnisse der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) von Gliomen

Aus kryokonserviertem Gewebe von 53 malignen Gliomen wurde die DNA isoliert und mit der Methode der CGH auf genetische Imbalanzen untersucht.

Die Tumore untergliederten sich in 43 primäre Glioblastome, 7 sekundäre Glioblastome und 3 anaplastische Oligoastrozytome. Eine Gesamtübersicht der Befunde ist in Tabelle 3.1. detailliert wiedergegeben.

Als Beispiel für eine CGH-Auswertung sind in Abbildung 3.1 eine karyotypisierte Metaphase (A) und das zugehörige Ratio Profil der CGH (B) des Falls H549 dargestellt. In diesem Tumor sind Gewinne auf 3q21q23, 3q26.2qter und 7q21.3q31.1 eine Amplifikation auf 12q11q14 sowie Verluste auf 6q21q23.3, 10q, 11p, 11q11, 13q12.1qter und 14 zu erkennen.

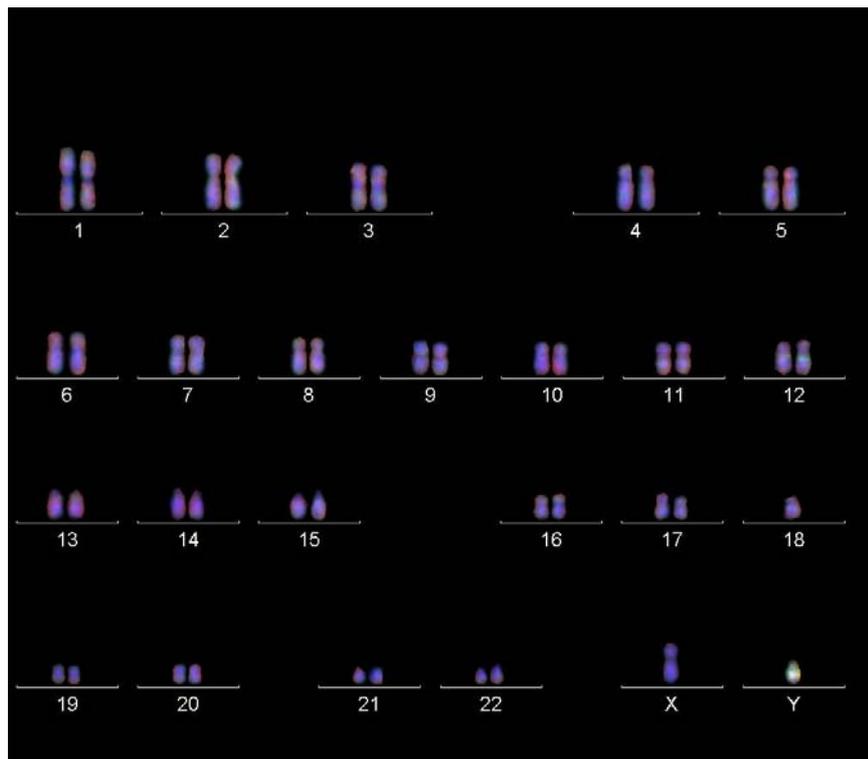


Abb. 3.1.A. Dargestellt sind die zugeordneten Chromosomen einer Metaphase nach CGH des Falles H 549. Einzelne Chromosomen, die den Kriterien der CGH nicht genügen, sind gelöscht.

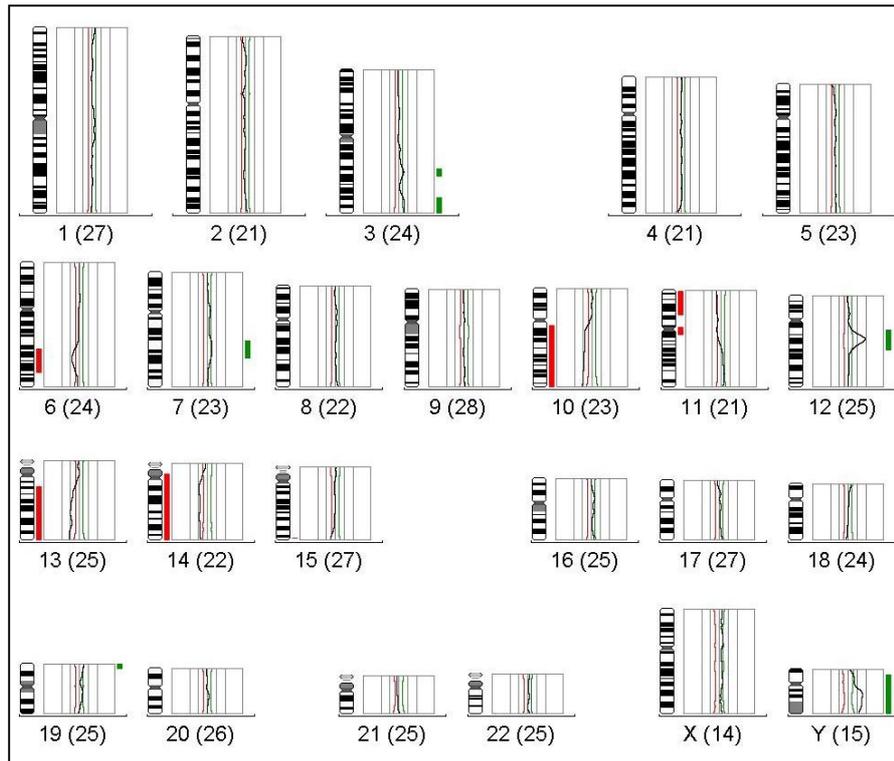


Abb. 3.1.B. Dargestellt ist das Ergebnis (Ratio Profile) der CGH des Falles H 549 nach Zuordnung der Chromosomen. Die erste Zahl unter jedem Chromosom gibt das Chromosom selbst an, die zweite Zahl gibt die Anzahl der Chromosomen an, aus denen der Mittelwert für dieses Profil errechnet wurde.

Mit der Methode der CGH waren zahlreiche quantitative genetische Veränderungen in den einzelnen Tumoren nachweisbar. Lediglich in Fall 398/01 wurden keine Aberrationen gefunden. Die anderen Tumore wiesen zwischen 2 und 30 Veränderungen auf (Mittelwert 9,5). Während in einem Tumor ausschließlich DNA-Gewinne nachgewiesen wurden (Fall H 281), zeigten zwei Tumore ausschließlich DNA-Verluste (Fall 265/00 und 1795/99). Die anderen untersuchten Tumore hatten sowohl chromosomale Gewinne als auch Verluste.

In den untersuchten Glioblastomen lagen DNA-Gewinne seltener als DNA-Verluste vor (171 DNA-Gewinne gegenüber 199 DNA-Verluste).

Die häufigsten, in den Glioblastomen nachgewiesenen Gewinne waren auf den Chromosomen 7 (68%) (34/50), 19 (41%) (20/50) und 12 (30%) (15/50) zu beobachten. Gewinne auf Chromosom 18 traten in 22% (11/50) der Fälle, Gewinne auf Chromosom 1 und Chromosom 20 in 18% (9/50) auf. Die Chromosomen 5 und 17 zeigten in jeweils 16% (8/50), Chromosom 4 in 14% (7/50) der untersuchten Glioblastome Gewinne.

Die Verluste betrafen vor allem die Chromosomen 10 (58%) (29/50), 9 (32%) (16/50) und 13 (32%) (16/50). Chromosom 1 zeigte in 20% (10/50) der Tumore DNA-Verluste, Chromosom 14 und 22 in 18% (9/50) der Tumore. In ebenfalls 18% (9/50) der Glioblastome war Chromosom 4 bzw. die Region 4p16 deletiert und in 16% (8/50) Chromosomenarm 6q.

In 6 Tumoren lagen Amplifikationen auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 in der *EGFR*-Region vor. Zwei Tumore zeigten eine Amplifikation der Region 12q11q14 (Fall H549) bzw. 12q13.1q21.2 (Fall 1921/01). Weitere Amplifikationen wurden für die Regionen 1p36pter (Fall 497/00), 2p22pter (Fall XXL/02), 12p13.1 und 18q11.1q11.2 (Fall T6052) nachgewiesen.

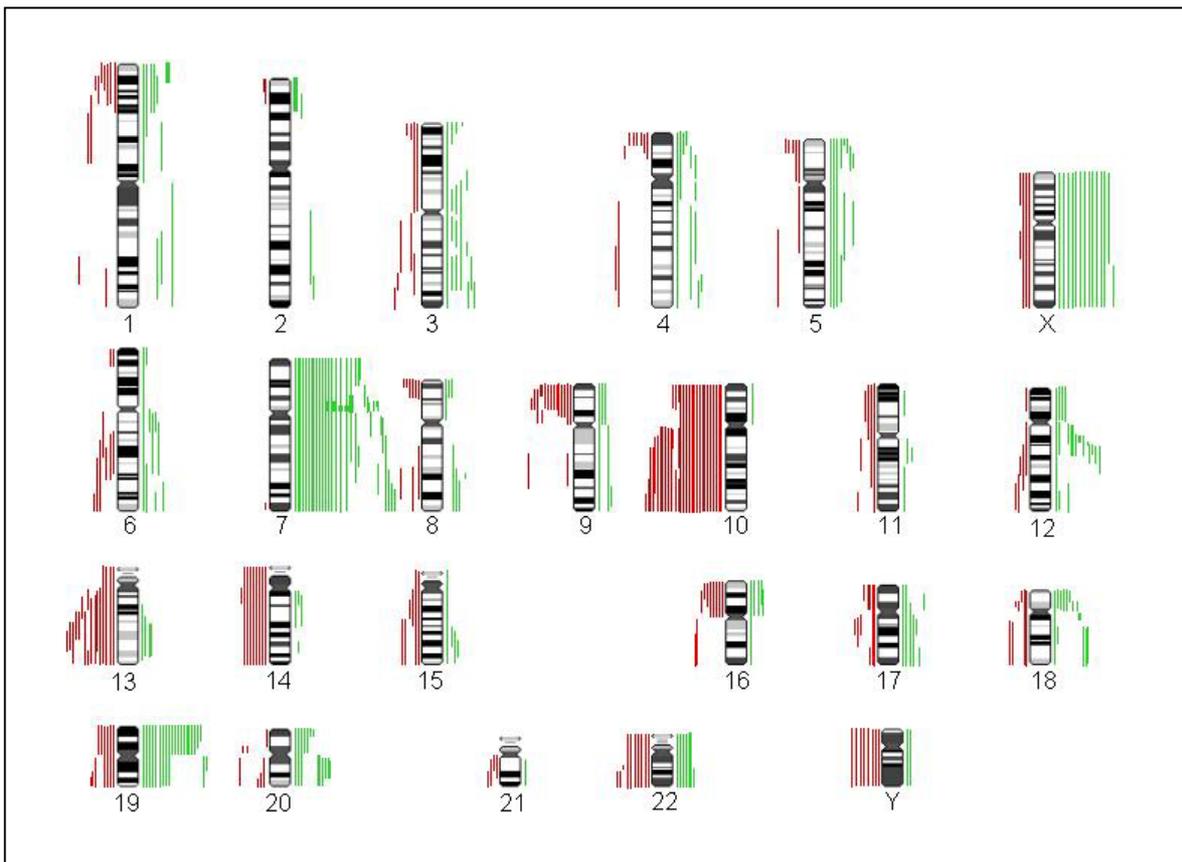


Abb. 3.2. Genetische Veränderungen der untersuchten Glioblastome.  
Chromosomale Gewinne sind grün, Verluste rot dargestellt.

Die graphische Darstellung verdeutlicht, dass die Chromosomen bzw. Chromosomenarme 4p, 9p, 10, 13 sowie 14 typischerweise Verluste aufzeigten, wohingegen Chromosom 7 nahezu ausschließlich chromosomale Gewinne zeigte. Interessanterweise zeigten die Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte 1p, 3, 5p, 6q, 8q, 12qter, 15qter, 16p, 17, 19 und 22 sowohl DNA-Gewinne als auch Verluste in einer vergleichbaren Häufigkeit.

Tab. 3.1. Genetische Veränderung in primären und sekundären Glioblastomen.

Vergleich	primäre GBM	sekundäre GBM
Anzahl Tumore	43	7
DNA Gewinne	154	17
DNA-Verluste	174	25
Gewinn auf 7	74% (32/43)	14% (1/7) (7q31.3qter)
Amp 7p	14% (6/43)	0
Gewinn auf 12q	28% (12/43)	0
Amp 12q	5% (2/43)	0
Verluste auf 9p	28% (12/43)	29% (2/7)
Verluste auf 10q	67% (29/43)	29% (2/7)
Verluste auf 13q	35% (15/43)	14% (1/7)
Verluste auf 4p	16% (7/43)	0
Verluste auf 4q	0% (0/43)	29% (2/7)

Ein Vergleich der primären und sekundären Glioblastome ergab, dass Gewinne von Chromosom 7 ein häufiges Ereignis in primären Glioblastomen darstellen, während in den sekundären Glioblastomen lediglich in einem Fall die terminale Region 7q31.3qter vermehrt vorlag. Amplifikationen in der *EGFR*-Region auf 7p wurden ausschließlich in primären Glioblastomen gezeigt und traten immer simultan mit Verlusten von Chromosom 10 auf. Verluste von Chromosom 10 lagen in 2/3 der primären Glioblastome vor, in den sekundären Glioblastomen weitaus seltener (2/7). Verluste auf dem Chromosomenarm 13q wurden ebenfalls häufiger in den primären Glioblastomen nachgewiesen (35% vs. 14%). Spezifisch für die primären Glioblastomen waren zudem Gewinne bzw. Amplifikationen auf dem langen Arm von Chromosom 12. Diese wurden in den untersuchten sekundären Glioblastomen nicht nachgewiesen.

Interessanterweise traten Verluste des kurzen Arms von Chromosom 4 nur in primären, und Verluste des langen Arms von Chromosom 4 nur in sekundären Glioblastomen auf.

Verluste auf Chromosomenarm 9p wurden mit annähernd gleicher Häufigkeit sowohl in den primären als auch den sekundären Glioblastomen gezeigt.

Von den drei untersuchten anaplastischen Oligoastrozytomen zeigte ein Fall Verluste, welche die Regionen 1p21p34.1 und 19q13.1qter betrafen. In einem weiteren Fall wurden Gewinne auf 4p15.1pter und 4q11q21.1 sowie 7q32q34, 10p12.2pter und 12p nachgewiesen (1488/00). Der dritte Fall (820/00) zeigte ebenfalls einen Gewinn auf dem langen Arm von Chromosom 7, hier in der Region 7q34qter. Verluste lagen in diesen beiden Tumoren auf 2q, 4q, 6q, 10q, 11p und 13q vor.

Tab. 3.2. Ergebnisse der vergleichenden genomischen Hybridisierung.

Fall	Alter/ Geschlecht	Histologie	ÜLZ [Monate]	Behandlung	Chromosomale Imbalanzen nach CGH
896/99	51/m	GBM	13,0	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7) rev ish dim (6q22.2qter, 9p21pter, 10p12.2pter, 10q23.1qter, 13q13qter, 14, 16q13qter, 22q12.2)
1326/99	56/m	GBM	19,2	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7q34qter, 12p13.1pter) rev ish dim (10q21.3qter, 22q13.1q13.3)
1349/99	54/m	GBM	33,8	Radiatio + TMZ	rev ish enh (X) rev ish dim (16p, Y)
1460/99	31/w	GBM	11,9	Radiatio + TMZ	rev ish enh (6q22.2qter, 9p21pter, 10p12.2pter, 10q23.1qter, 13q13qter, 14, 16q13qter, 22q12.2) rev ish dim (3q11.1q25.2, 5p, 13q12.3qter, 16q, 20q11.2qter, Y)
265/00	46/w	GBM	23,1	Radiatio + TMZ	rev ish dim (10q25.3qter, 16p12p13.3)
497/00	58/w	GBM	16,9	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7p11.2p13, amp 1p36pter) rev ish dim (6q12q21, 9p23p24)
1106/00	70/m	GBM	19,8	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7q21.1qter, 12q13.1q14, 19p) rev ish dim (10q, 13q12.3q22, Y)
1534/00	62/m	GBM	18,4	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7q11.2q21, 19p13.1p13.3, X) rev ish dim (4p16pter, 10q24.1qter, 13q21.3qter)
1707/00	47/m	GBM	29,4	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7, 12q13.3q14) rev ish dim (10q21.1qter)
398/01	46/m	GBM	14,4	Radiatio + TMZ	keine
643/01	54/w	GBM	25,0	Radiatio + TMZ	rev ish enh (4p16pter, 7p11.1p13, 7q32qter, 16p12pter, 19q, 22) rev ish dim (10, 13q15q22.1)
1099/98	49/m	GBM	23,8	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7, 12q13.2q13.3) rev ish dim (1p31.3p32.3, 1q32.1q41, 10q)
662/01	70/m	GBM	13,4	Radiatio + TMZ	rev ish enh (3q24q26.3, 7p11.1p12, 7q31.1q34, 18q12.1q21.1, X) rev ish dim (4p16, 8p22pter, 10q, 16p11.2p13.2, Y)
1405/01	53/m	GBM	7,4	Radiatio + TMZ	rev ish enh (4q31.3q33) rev ish dim (8p23.1pter, 16p, 17, 19q13.2qter)
T5958	63/w	GBM	14,4	Radiatio + TMZ	rev ish enh (2q22q35, 3p11.1p14.1, 3p25pter, 3q13.1q21, 3q24q26.3, 4p14p15.3, 4q21.2q34, 5p14, 5q13.1q22, 6q14q23.1, 7, 8q22.3, 11p13p15.3, 11q14.1qter, 13q14.1q33, 14q12q22, 20p12pter, amp 7p11.1p11.2) rev ish dim (1p32.3pter, 10, 12q23q24.3, 16p, 17p, 17q24qter, 18p11.2, 19, 22, Y)
784/03	52/m	GBM	22,5	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7p13p22, 7q11.1q22, 19p, X, amp 7p11.1p13) rev ish dim (4p16, 8p22pter, 9p11p13, 9p23pter, 10p13pter, 10q11.2q21.2, 16p)
T6002	53/m	GBM	11,2	Radiatio + TMZ	rev ish enh (5, 6, 7, 12p, 12q11q14, 12q24.1qter, 15, 19, 20, amp 7p11.1p11.2) rev ish dim (1p21p31.3, 3p, 3q23q26.3, 10, 13, 17p11.1p13, 18, 22)
T4789	38/m	GBM	44,1	Radiatio + TMZ	rev ish enh (8p, Xq23q28) rev ish dim (3q13.1q25.3, 9p)
1536/02	53/m	GBM	15,1	Radiatio + TMZ	rev ish enh (3p11.1p14.1, 3q11.1q26.3, 7, 9q, 21q21qter, X) rev ish dim (1p33p36.1, 4p15.1pter, 10, 12p12.1pter, 12q11q21.3, 15, 17q12q23, 18p11.1p11.2, 19q13.3qter, 20p11.1p11.2)
1940/02	54/w	GBM	17,3	Radiatio + TMZ	rev ish enh (5p13.3p15.2, 7p15.3pter, 18p) rev ish dim (8q22.1q24.1, 10, 12q14q23, Xp11.4pter, Xq13q21.3)
6/02	41/m	GBM	26,2	Radiatio + TMZ	rev ish enh (6q12q15, 6q25.1qter, 7, 12q14q21.1, X) rev ish dim (4p16, 9p11p23, 10, 11q12q14.3, 15q11.1q22.2, 20p11.1p11.2, Y)
596/98	32/m	GBM	21,1	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7, 12q13.3q21.1, 17p11.1p12, 19, Y) rev ish dim (3q26.1q36.3, 10, X)
947/02	46/w	GBM	17,7	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7, 15q24q26.1, 18p, 19, 20q) rev ish dim (9p21p23, 10q21.1q25.2)
T6044	37/m	GBM	7,6	Radiatio + TMZ	rev ish enh (18p11.1p11.2, 19p, X) rev ish dim (6q25.2qter, 7q36)

Fortsetzung Tab. 3.2.

Fall	Alter/ Geschlecht	Histologie	ÜLZ [Monate]	Behandlung	Chromosomale Imbalanzen nach CGH
XXL/02	45/m	GBM	8,6	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7p15.1pter, 7q11.1q31.3, amp 2p22pter) rev ish dim (1p36pter, 10, 13q13q21.1, 17p12pter, 22q13.1qter, X)
1921/01	66/m	GBM		TMZ	rev ish enh (7, X, amp 12q13.1q21.2) rev ish dim (8p23.1pter, 10, 15, 16p, 19q13.2qter)
H147	48/m	GBM	7,5	Radiatio	rev ish enh (7q11.1q11.2, 19, 20q11.1q13.1) rev ish dim (10p13pter, 10q11.2q21.3)
H281	56/m	GBM	12,5	Radiatio	rev ish enh (7p11.1p12)
H549	38/m	GBM	5,5	Radiatio	rev ish enh (3q21q23, 3q26.2qter, 7q21.3q31.1, amp 12q11q14) rev ish dim (6q21q23.3, 10q, 11p, 11q11, 13q12.1qter, 14)
T4793	57/m	GBM	8,9	Radiatio	rev ish enh (4, 5, 7, 8q22.1q24.3, 14q11.1q12, 14q24.3q31, 17q24q25, 19, 20, 22, X) rev ish dim (3p, 9p13p24, 9q22.1q31, 10, 21q22)
T4795	66/m	GBM	0,2	Radiatio	rev ish enh (4p15.1p16, 6q24q27, 7p15.1p22, 18q12.3q23, 20p13) rev ish dim (10, 11p, 11q11q23.1, 13, 14, 19, 22, X, Y)
T4797	56/w	GBM	1,3	Radiatio	rev ish enh (7, 16, 17q12q21.3, 19, X, amp 7p11.2p12) rev ish dim (9p21p24, 10, 13, 14, 22)
T4803	59/m	GBM	9,4	Radiatio	rev ish enh (1p32.1p36.3, 7, 9q32q34.2, 12q13.1q14, 15q22.1q24, 17, 20q11.1q13.1) rev ish dim (10, 14)
861/99	70/w	GBM	22,7	Radiatio	rev ish enh (2p21p23, 7p12, 12q14q21.3, 13q21.3q32) rev ish dim (4p15.3pter, 8p22pter, 16p, 19p, 20q13.1qter)
1856/98	46/m	GBM	65,8	Radiatio	rev ish enh (13q21.1q32) rev ish dim (1p34pter, 17q12q21.3, 19q, 22, Y)
1028/98	62/m	GBM	5,6	Radiatio	rev ish enh (6q11q14, 7, 19p, X, Y) rev ish dim (10, 14, 15, 18)
2046/97	39/m	GBM	39,8	Radiatio	rev ish enh (1p13.3p31.1, 1q25q41, 3p24.1pter, 3p11.1p13, 3q11.2q13.3, 3q24q26.3, 4p11p15.2, 4q12q13.3, 4q22q28, 5p13.3pter, 5q12q23.3, 6q12q23.1, 7, 8p22pter, 9p, 14q11.2q24.1, 18p11.3pter, 20p13, 21q11.1q22.1) rev ish dim (1p35pter, 10, 11, 12q22qter, 13q12.1q14.1, 13q32qter, 15q21.3qter, 17, 19, 20q11.2qter, 22)
T6025	73/m	GBM	6,3	Radiatio	rev ish enh (1p34.3p36.1, 1q31q43, 3p14.1p21.1, 7, 16p11.1p13.2, 17p11.1p12, 17q, 18p11.1p11.3, 19p, Y, amp 7p11.1p12) rev ish dim (2p24pter, 4p15.1p15.3, 5p15.2pter, 8p21.3pter, 8q22.1q24.1, 10, 12q15q21.3, 13q14.3qter, 14, 15q21.3qter, 20p12pter)
393/98	65/m	GBM	4,6	Radiatio	rev ish enh (1p, 3, 7, 12q11q13.2, 12q23q24.3, 16p, 17q, 19, 20q, 22, amp 7p11.1p12) rev ish dim (1q32.2qter, 9p, 10, 13q22q31, 21q11.1q21)
T5954	61/m	GBM	3,3	Radiatio	rev ish enh (1p24.1pter, 11q11q14.1, 16p, 18p11.1p11.2, 19, 20q, 22q12.3q13.3, Xp, Xq11.1q21.2) rev ish dim (9p13pter, 13, 14q11.1q12, 18q12.1qter)
1819/98	76/w	GBM	1	Radiatio	rev ish enh (4q32qter, 5p14pter, 5q23.3q35.1, 6p23pter, 6q22.3qter, 7q33q36, 8q23q24.2, 13q21.3q33, 18q12.2qter) rev ish dim (17q11.2q21.3, 19p)
63/99	77/w	GBM	10,9	Radiatio	rev ish enh (7p11.1p12, 7q11.1q11.2) rev ish dim (5p, 5q11.2q23.1, 6p23pter, 6q15q22.3, 9p23pter, 18p11.3pter)
T6052	24/w	GBM	4,8	Radiatio	rev ish enh (5, 7, 12, 18, 19p, amp 12p13.1, 18q11.1q11.2) rev ish dim (3p25pter, 3q26.3qter, 6p23pter, 8q22.1qter, 9p21pter, 11q23.3qter, 13q21.3q31, 20q13.2qter)
369/02	37/m	sGBM	14,3	Radiatio + TMZ	rev ish enh (1q, 5p15.1pter, 7q31.3qter, 8q21.1qter, 9p, 10p, 12p, 15q25qter, 18p11.2pter) rev ish dim (1p33p36.1, 4q21.1qter, 5q21qter, 10q21.3qter, 11p12p15.3, 13q12.1q31, 15q14q21.2, 19)
1795/99	31/m	sGBM	6,9	Radiatio + TMZ	rev ish dim (5p15.1pter, 6q16.3qter, 8p23.2pter, 9p13pter 18q12.1qter)
1782/98	26/m	sGBM	24,2	Radiatio + TMZ	rev ish enh (19p, X) rev ish dim (16p13.1p13.3)

Fortsetzung Tab. 3.2.

Fall	Alter/ Geschlecht	Histologie	ÜLZ [Monate]	Behandlung	Chromosomale Imbalanzen nach CGH
1515/00	40/w	sGBM	11,2	Radiatio + TMZ	rev ish enh (19p) rev ish dim (2p23pter, 3p24.2p26, 21q21qter)
1691/00	39/w	sGBM	17,4	Radiatio + TMZ	rev ish dim (1p35p36.1, 4q27q32, 9p21, 9q21.2q32, 14)
N111/99	24/m	sGBM	17,4	Radiatio	rev ish enh (1p32pter, 11q13, 17, 19, 20, 22) rev ish dim (6q16q23)
H321	48/m	sGBM	18,2	Radiatio	rev ish enh (19p, 20q11.2q13.1, X) rev ish dim (5p15.2pter, 9p21pter, 10q, Y)
1067/98	31/m	AOA	45,7	Radiatio + TMZ	rev ish enh (X) rev ish dim (1p21p34.1, 19q13.1qter)
820/00	32/m	AOA	26,6	Radiatio + TMZ	rev ish enh (7q34qter, Xp, Xq11.1q26) rev ish dim (6q22.1q25.2, 10q25.1q26.1, 13q11q13)
1488/00	36/w	AOA	11,1	Radiatio + TMZ	rev ish enh (4p15.1pter, 4q11q21.1, 7q32q34, 10p12.2pter, 12p) rev ish dim (2q31q32.1, 4q22qter, 11p15.4pter, Xp)

m: männlich, w: weiblich; GBM: Glioblastom multiforme, sGBM: sekundäres Glioblastom multiforme, AOA: anaplastisches Oligoastrozytom, ÜLZ: Überlebenszeit nach OP/Diagnose GBM; TMZ: Temozolomid; CGH: komparative genomische Hybridisierung; rev ish: reverse in situ hybridization; enh: enhanced (Zugewinne); dim: diminished (Verluste); amp: Amplifikation (nach ISCN, 1995)

### 3.2. Genetische Veränderungen der Glioblastome in der TMZ-Gruppe

In dieser Gruppe wurden Patienten mit einem Glioblastom zusammengefasst, die nach einer chirurgischen Resektion des Tumors eine fraktionierte Strahlentherapie sowie nach Diagnose eines Rezidives eine TMZ-Chemotherapie erhalten haben (n=29). Es soll an dieser Stelle betont werden, dass es sich um eine retrospektive Studie handelt; d.h. die genetischen Untersuchungen erfolgten nach Abschluss der Therapie und hatten keinen Einfluss auf diese.

Die Tumore gliederten sich in 24 primäre Glioblastome und 5 sekundäre Glioblastome.

In Abbildung 3.3. sind die chromosomalen Gewinne und Verluste der untersuchten Tumore als Übersicht dargestellt.

In Fall 398/01 konnten keine genetischen Veränderungen mit der Methode der CGH nachgewiesen werden, so dass dieser Fall von den weiteren statistischen Untersuchungen ausgeschlossen wurde. Ebenfalls ausgeschlossen wurde Fall 1921/01 aufgrund eines abweichenden Therapieschemas. Der Patient erhielt lediglich eine TMZ-Chemotherapie, jedoch keine Strahlentherapie im Anschluss an die Tumorresektion.

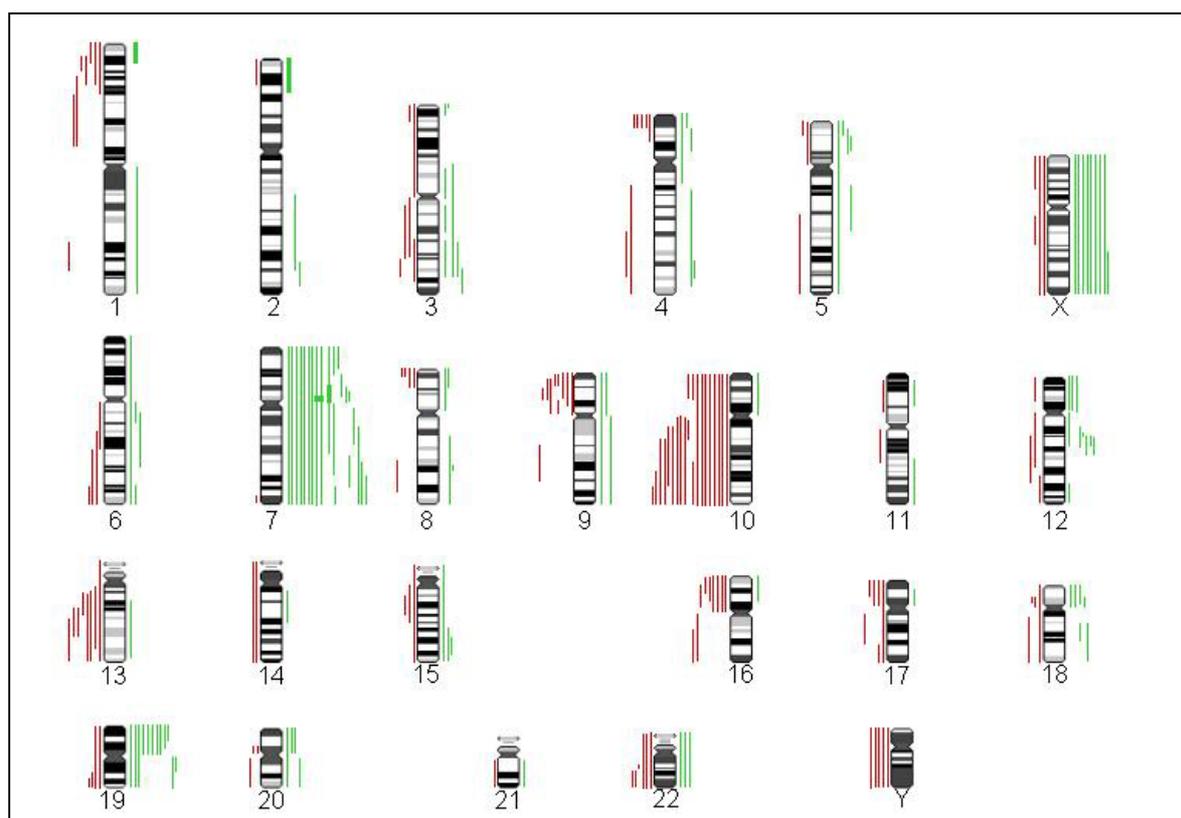


Abb. 3.3. Genetische Veränderungen der Tumore in der TMZ-Gruppe.

Am häufigsten waren die Chromosomen 7 und 10 von genetischen Veränderungen betroffen. Verluste von 10q zeigten 66%, Gewinne auf 7p 52% der untersuchten Fälle. Verluste von 9p und 13q traten in 28% der Fälle auf, während Gewinne auf 12q in 21% der Fälle beobachtet wurden.

### 3.3. Genetische Veränderungen der Glioblastome in der Kontroll-Gruppe

In dieser Gruppe wurden Glioblastome von Patienten einbezogen, welche nach OP ausschließlich eine fraktionierte Strahlentherapie ohne nachfolgende Chemotherapie erhielten (n=19).

Untersucht wurden 17 primäre Glioblastome und 2 sekundäre Glioblastome.

Abbildung 3.4. zeigt sowohl die chromosomalen Gewinne als auch Verluste der Tumoren dieser Kontroll-Gruppe.

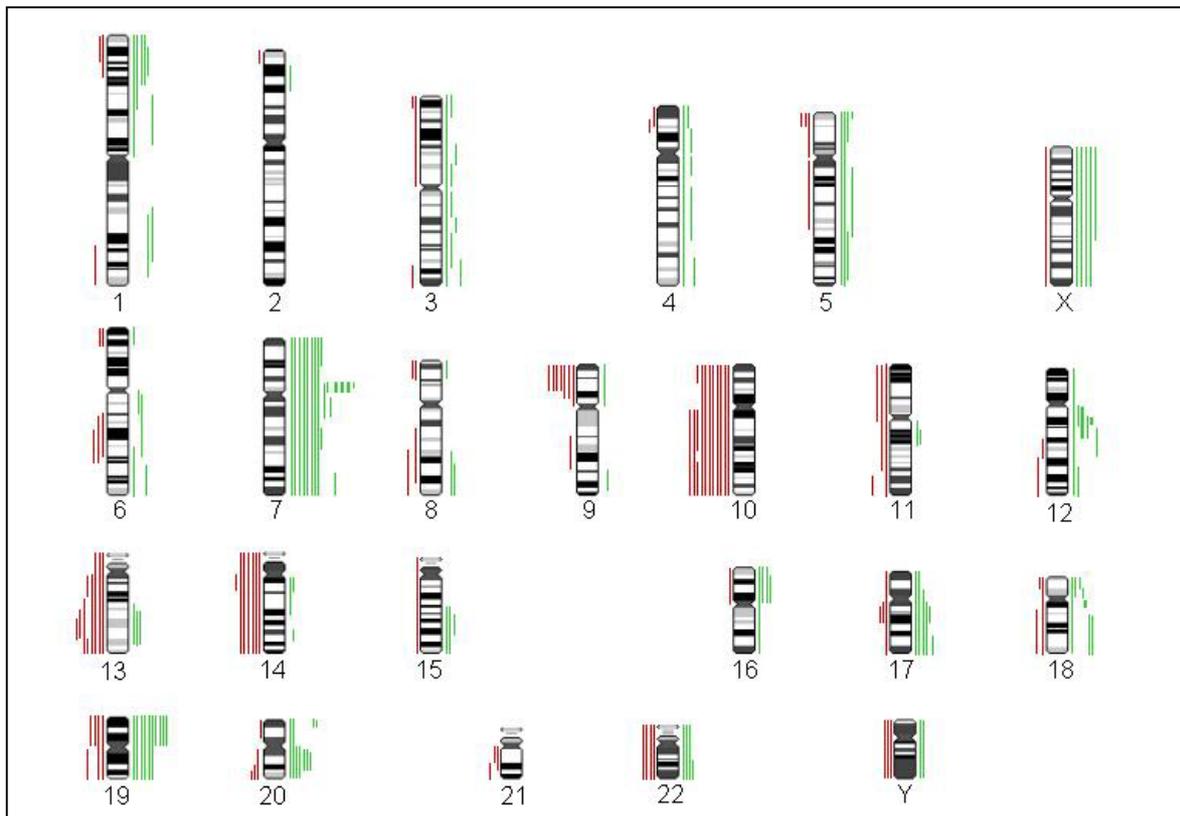


Abb. 3.4. Genetische Veränderungen der Tumore in der Kontroll-Gruppe.

Am häufigsten waren auch hier die Chromosomen 7 und 10 von genetischen Veränderungen betroffen. Verluste von 10q zeigten 58% der untersuchten Fälle, Gewinne auf 7p 63%. In 32% der Fälle traten Verluste von 9p und in 42% Verluste von 13q auf. Gewinne auf 12q wurden in 21% der Fälle beobachtet.

### 3.4. Häufigkeit der typischen genetischen Veränderungen in den beiden Patientengruppen

Tab. 3.3. Vergleich der TMZ-behandelten Gruppe vs. der TMZ-unbehandelten Kontroll-Gruppe

	TMZ-Gruppe	Kontroll-Gruppe
Verluste auf Chromosom 10	66 % (19/29)	58 % (11/19)
Gewinne auf Chromosom 7	52 % (15/29)	63 % (12/19)
Verluste auf 9p	28 % (8/29)	32 % (6/19)
Verluste auf 13q	28 % (8/29)	42 % (8/19)
Gewinne auf 12q	21 % (6/29)	21 % (4/19)

Die bekannten, tumorspezifischen Veränderungen wurden sowohl in der TMZ-behandelten Gruppe als auch in der Kontroll-Gruppe mit einer ähnlichen Häufigkeit detektiert. Eine Ausnahme stellten die Verluste des langen Arms von Chromosom 13 dar, hier wurde ein größerer Unterschied beobachtet (28% bzw. 42%).

### **3.5. Einfluss verschiedener Parameter auf die Überlebenszeit der Patienten**

Alle Patienten erhielten nach der (subtotalen) operativen Entfernung des Tumors eine Strahlentherapie. Ein Teil der Patienten (19/48) erhielt zusätzlich eine Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ). Im Folgenden werden die ausschließlich bestrahlten Patienten als „Kontrollen“ definiert.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen oben genannten Therapieformen und des genetischen Status des Tumors auf die mediane Überlebenszeit der Patienten wurde mittels Kaplan-Meier Analyse untersucht. Die möglichen Effekte von Therapieform, Geschlecht, Alter und Karnofsky Performance Status (KPS) wurden mit Hilfe der Cox-Regressionsanalyse und der Abschätzung der Hazard Ratio mit einem 95%igen Konfidenzintervall ermittelt.

#### **3.5.1. Therapieeffekt**

Die Überlebenszeit von Patienten mit alleiniger Strahlentherapie nach OP betrug 7,5 Monate; dabei lag das mediane Patientenalter bei 57 Jahren. Demgegenüber lag die mediane Überlebenszeit der Patienten mit Strahlentherapie und anschließender TMZ-Chemotherapie bei 19,2 Monaten. Hier war das mediane Patientenalter 49 Jahre. Die um mehr als das Doppelte verlängerte Überlebenszeit zeigte sich in der Kaplan-Meier Analyse als hochsignifikant ( $p=0,0058$ , Abb. 3.5).

In der univariaten Cox-Regressionsanalyse bestätigte sich der positive Effekt einer TMZ-Behandlung auf die Überlebenszeit der Patienten ( $p=0,00063$ , Hazard Ratio=0,409, Tab. 3.4.). Ebenfalls positiv auf die Überlebenszeit wirkten sich jüngeres Patientenalter sowie ein höherer Karnofsky Performance-Status aus (0,017 bzw. 0,0074). Patienten über 53 Jahren hatten eine schlechtere Prognose (Alter >53: Hazard Ratio=1,03). Keinen Einfluss auf das Ansprechverhalten - gemessen an der Überlebenszeit - hatte das Geschlecht der Patienten ( $p=0,93$ ).

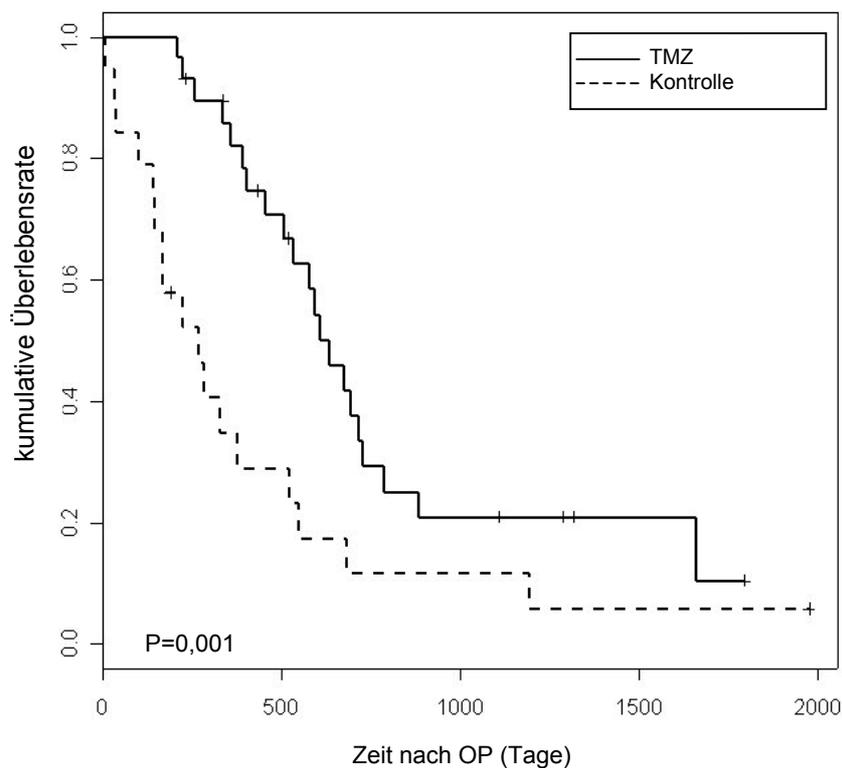


Abb. 3.5. Kaplan-Meier Analyse: Überlebenszeit der mit Operation, Bestrahlung und TMZ behandelten Patientengruppe (TMZ) vs. der Gruppe mit ausschließlicher Bestrahlung nach OP (Kontrolle).

Tab. 3.4. Univariate Cox-Regressionsanalyse unterschiedlicher Faktoren auf die Überlebenszeit.

Faktor	Hazard Ratio (95% Konfidenzintervall)	p-Wert
TMZ	0,409 (0,245-0,683)	<b>0,00063</b>
Geschlecht	1,03 (0,589-1,79)	0,93
Alter >53	1,03 (1,00-1,05)	<b>0,017</b>
KPS >90	0,955 (0,923-0,988)	<b>0,0074</b>

### 3.5.2. Einfluss von genetischen Veränderungen auf die Überlebenszeit der Patienten

#### 3.5.2.1. Tumore mit Gewinn auf Chromosomenarm 7p

58% (28/48) der Patienten zeigten einen (partiellen) Gewinn des kurzen Arms von Chromosom 7 in ihrem Tumor.

In der Kontroll-Gruppe lag die mediane Überlebenszeit der Patienten bei 7,5 Monaten. Hier hatten Patienten mit 7p-Gewinn eine um 15% verlängerte Überlebenszeit gegenüber Patienten ohne diese Veränderung (8,9 gegenüber 6,5 Monaten).

Die mediane Überlebenszeit der Patienten unter TMZ-Therapie war um mehr als das Doppelte erhöht (19,2 Monate). Lag ein Gewinn auf 7p im Tumor vor, betrug die mediane Überlebenszeit 17,3 Monate, bei Patienten ohne diesen 7p-Gewinn im Tumor 20,0 Monate.

Das mediane Alter der Patienten mit einem Gewinn auf 7p lag in der TMZ-Gruppe bei 52 Jahren, in der Kontroll-Gruppe bei 59 Jahren. Patienten ohne einen Gewinn auf 7p hatten in der TMZ-Gruppe ein medianes Alter von 40 Jahren, in der Kontrollgruppe von 47 Jahren.

Die Kaplan-Meier-Kurven und die univariate Cox-Regressionsanalyse zeigten trotz der verdoppelten Überlebenszeit (17,3 Monate vs. 8,9 Monate) keinen signifikanten Effekt der angewandten Chemotherapie für Patienten mit Tumoren, die einen Gewinn auf Chromosomenarm 7p aufwiesen ( $p=0,05$ , Abb. 3.6. bzw.  $p=0,61$ , Tab. 3.6.A).

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse (Subgruppenanalyse) wurde ein signifikant häufigeres Auftreten von Gewinnen auf 7p in Tumoren älterer Patienten nachgewiesen, und ging mit einer extrem schlechten Prognose einher ( $p=0,038$ , Hazard Ratio=5,6, Tab. 3.6.B). Erhalten diese Patienten eine TMZ-Therapie, wirkt sich diese positiv auf ihre Überlebenszeit aus ( $p=0,032$ , Tab. 3.6.B).

Tab. 3.5. Vergleich der beiden Patientengruppen hinsichtlich medianem Alter und Überlebenszeit in Abhängigkeit der genetischen Veränderung auf 7p.

	Alter [Jahre]	ÜLZ [Monate]
TMZ		
Gewinn auf 7p (n=15)	52	17,3
Kein Gewinn auf 7p (n=14)	40	20,0
Median	49	19,2
Kontrolle		
Gewinn auf 7p (n=13)	59	8,9
Kein Gewinn auf 7p (n=6)	47	6,5
Median	57	7,5

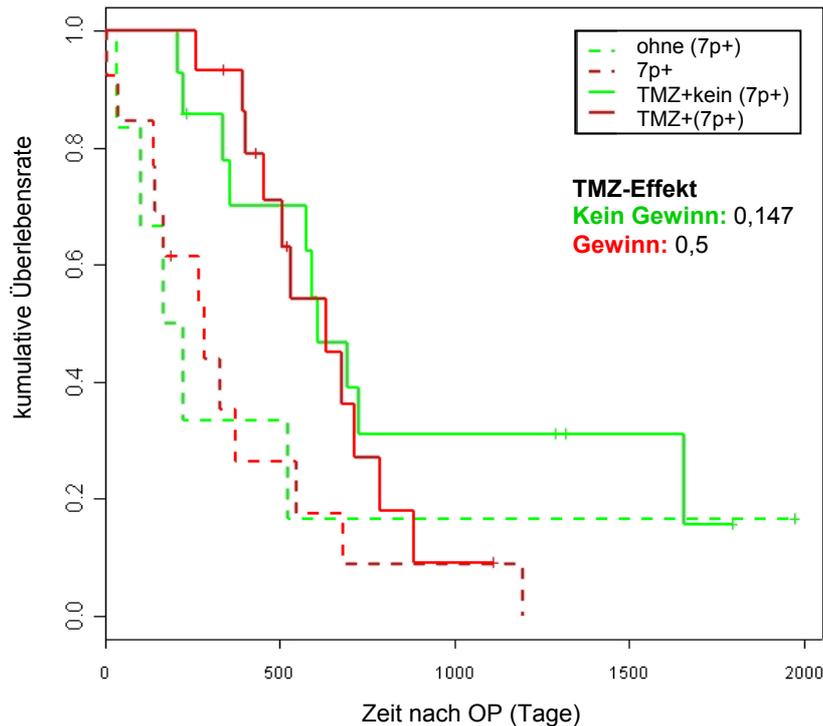


Abb. 3.6. Kaplan-Meier Analyse: Überlebenszeit der Patienten mit Gewinn auf 7p in der TMZ-Gruppe vs. Gruppe mit ausschließlicher Bestrahlung.

Tab. 3.6. Cox-Regressionsanalyse: Subgruppenanalyse von unterschiedlichen Effekten in Abhängigkeit der genetischen Veränderung auf 7p.

Im univariaten Modell wurde der TMZ-Effekt abgeschätzt (A), in dem multivariaten Modell wurden der TMZ-Effekt, der Alterseffekt und die Interaktion zwischen TMZ und Alter abgeschätzt (B).

Alteration/ Normal	Variable	Hazard Ratio (95% Konfidenzintervall)	p-Wert (2-seitig)
<b>A)</b> Gewinn auf 7p	TMZ/Kontrolle	0.427 (0.183-1.0)	0.05
	kein 7p-Gewinn	TMZ/Kontrolle	0.453 (0.152-1.35)
<b>B)</b> Gewinn auf 7p	TMZ/Kontrolle	1.5024 (0.31847-7.09)	0.61
	Alter >53/≤53	5.6158 (1.09933-28.69)	<b>0.038</b>
	TMZ x Alter	0.0846 (0.00884-0.81)	<b>0.032</b>
kein 7p-Gewinn	TMZ/Kontrolle	0.884 (0.230-3.40)	0.86
	Alter >53/≤53	(0.000-Inf)	*
	TMZ x Alter	(0.000-Inf)	*

\* aufgrund der geringen Fallzahl von älteren Patienten ohne Gewinn von 7p (n=4) konvergiert der Algorithmus nicht.

### 3.5.2.2. Tumore mit Verlust auf Chromosomenarm 9p

Ein (partieller) Verlust des kurzen Arms von Chromosom 9 wurde in 29% (14/48) der untersuchten Tumoren nachgewiesen.

Patienten, die diese genetische Veränderung im Tumor aufzeigten, hatten unter TMZ-Chemotherapie eine mediane Überlebenszeit von 20,1 Monaten gegenüber 4,7 Monaten von Patienten mit 9p-Verlust, die nur nachbetraht wurden. Diese um fast das Vierfache verlängerte Überlebenszeit der TMZ-behandelten Patienten mit dieser chromosomalen Veränderung war sowohl in der Kaplan-Meier Analyse als auch in der univariaten Cox-Regressionsanalyse hochsignifikant ( $p=0,001$ , Abb. 3.7 bzw.  $p=0,0085$ , Tab. 3.8.A). Ohne genetische Veränderung auf 9p betrug die Überlebenszeiten der Patienten in der TMZ-Gruppe 19,2 Monate, in der Kontroll-Gruppe 9,4 Monate. Obwohl die Überlebenszeit der chemotherapierten Gruppe mehr als doppelt so hoch war, erreichte dieser Unterschied keine Signifikanz ( $p=0,102$ , Abb. 3.7 und  $p=0,11$ , Tab. 3.8.A).

Tab. 3.7. Vergleich der beiden Patientengruppen hinsichtlich Alter und Überlebenszeit in Abhängigkeit der genetischen Veränderung auf 9p.

	Alter [Jahre]	ÜLZ [Monate]
TMZ		
Verlust auf 9p (n=8)	44	20,1
Kein Verlust auf 9p (n=21)	53	19,2
Median	49	19,7
Kontrolle		
Verlust auf 9p (n=6)	59	4,7
Kein Verlust auf 9p (n=13)	56	9,4
Median	57	7,5

Das mediane Alter von Patienten mit 9p-Verlust betrug in der TMZ-Gruppe 44 Jahre, in der Kontroll-Gruppe 59 Jahre. Patienten ohne Veränderungen von 9p waren in der TMZ-Gruppe 53 Jahre gegenüber 56 Jahren in der Kontrollgruppe.

Der positive Effekt der TMZ-Therapie auf die Überlebenszeit der Patienten mit Tumoren mit Verlust von 9p bestätigte sich in der Cox-Regressionsanalyse sowohl im univariaten ( $p=0,0085$ , Tab. 3.8.A) als auch im detaillierten multivariaten Modell nach Alterskorrektur ( $p=0,034$ , Tab. 3.8.B).

Ältere Patienten ohne diese genetische Veränderung hatten in der multivariaten Analyse eine schlechtere Prognose ( $> 53$  Jahren,  $p=0,048$ ). Der negative Einfluss des Alters in dieser Patientengruppe wurde durch die TMZ-Therapie ausgeglichen ( $p=0,0081$ , Tab. 3.8.B).

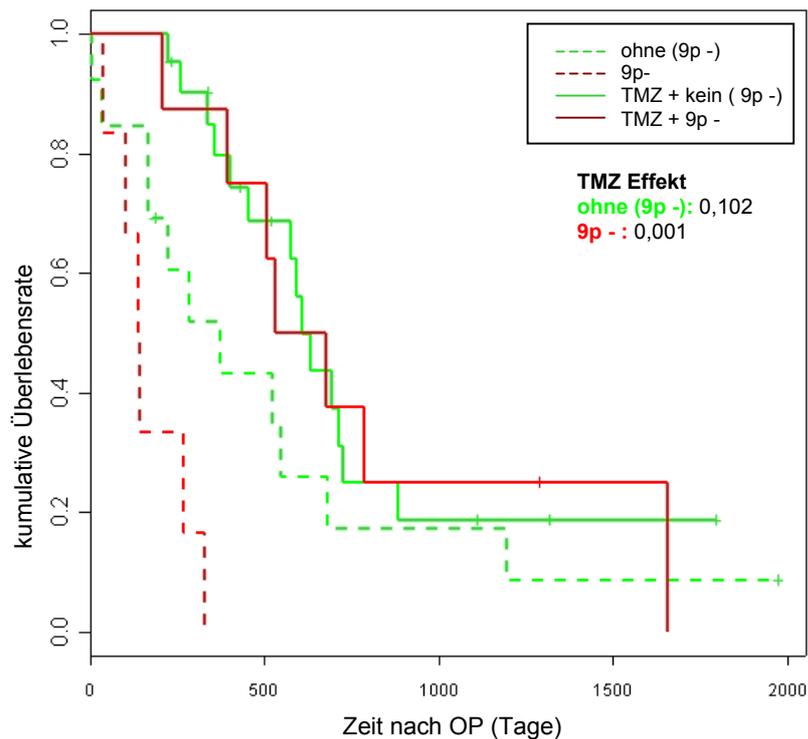


Abb. 3.7. Kaplan-Meier Analyse: Überlebenszeit der Patienten mit 9p-Verlust in der TMZ- Gruppe vs. Gruppe mit ausschließlicher Bestrahlung.

Tab. 3.8. Cox-Regressionsanalyse: Subgruppenanalyse von unterschiedlichen Effekten in Abhängigkeit der genetischen Veränderung auf 9p.

Im univariaten Modell wurde der TMZ-Effekt abgeschätzt (A), in dem multivariaten Model wurden der TMZ-Effekt, der Alterseffekt und die Interaktion zwischen TMZ und Alter abgeschätzt (B).

Alteration/ Normal	Variable	Hazard Ratio (95% Konfidenzintervall)	p-Wert (2-seitig)	
<b>A)</b> Verlust auf 9p	TMZ/Kontrolle	0.055 (0.0064-0.48)	<b>0.0085</b>	
	kein 9p-Verlust	TMZ/Kontrolle	0.52 (0.234-1.15)	0.11
<b>B)</b> Verlust auf 9p	TMZ/Kontrolle	0.037 (0.0017-0.78)	<b>0.034</b>	
	Alter >53/≤53	0.81 (0.081-8.09)	0.86	
	TMZ x Alter	3.57 (0.13-99.15)	0.45	
	kein 9p-Verlust	TMZ/Kontrolle	1.36 (0.45-4.16)	0.59
	Alter >53/≤53	3.67 (1.01-13.29)	<b>0.048</b>	
	TMZ x Alter	0.078 (0.012-0.52)	<b>0.0081</b>	

### 3.5.2.3. Tumore mit Verlust auf Chromosomenarm 10q

60% (29/48) der Patienten zeigten eine (partielle) Monosomie 10 in ihrem Tumor.

Die mediane Überlebenszeit der TMZ-behandelten Patienten mit einem Verlust des langen Arms von Chromosom 10 betrug 19,2 Monate gegenüber 6,3 Monaten von Glioblastom-Patienten mit dieser genetischen Veränderung, die nur nachbestrahlt wurden. Diese auf das nahezu Dreifache verlängerte Überlebensrate von Patienten mit TMZ-Chemotherapie und mit 10q-Verlust war in der Kaplan-Meier Analyse hochsignifikant ( $p=0,005$ , Abb. 3.8).

Die um nahezu 60% verlängerte Überlebensrate (TMZ-Gruppe: 19,8 Monate vs. Kontrollgruppe: 11,7 Monate) von Patienten ohne diese genetische Veränderung war nicht signifikant ( $p=0,32$ , Abb. 3.8.).

Patienten in der TMZ-Gruppe waren im Median 7 Jahre jünger als die in der Kontroll-Gruppe. Das mediane Alter von Patienten mit 10q-Verlust lag in der TMZ-Gruppe bei 49 Jahren, in der Kontroll-Gruppe bei 57 Jahren. Patienten ohne Veränderungen auf 10q waren in der TMZ-Gruppe im Median 52 Jahre, in der Kontrollgruppe 59 Jahre.

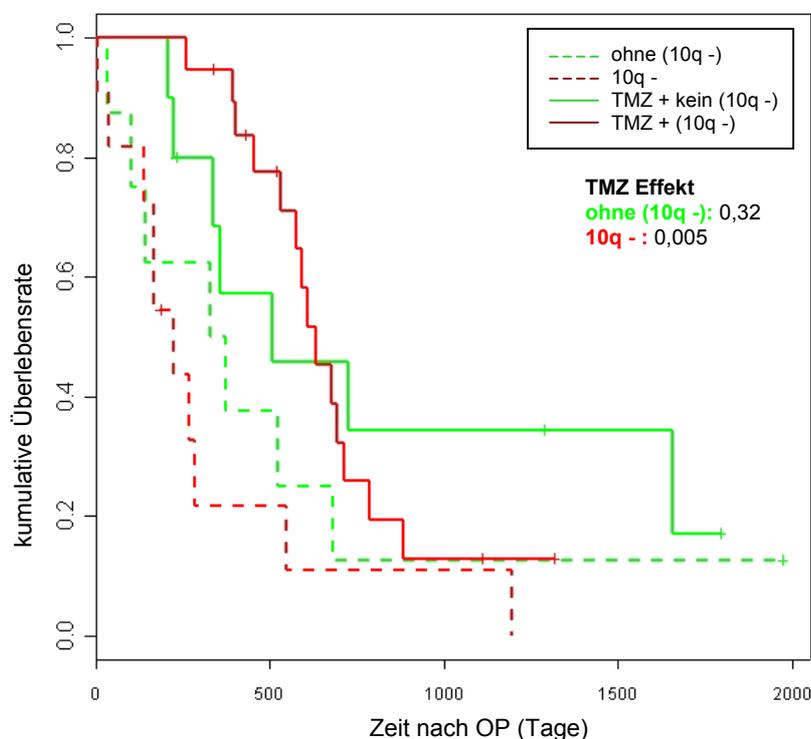


Abb. 3.8. Kaplan-Meier Analyse: Überlebenszeit der Patienten mit 10q-Verlust (10q -) in der TMZ-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe.

Tab. 3.9. Vergleich der beiden Patientengruppen hinsichtlich Alter und Überlebenszeit in Abhängigkeit der genetischen Veränderung auf 10q.

	Alter [Jahre]	ÜLZ [Monate]
TMZ-Gruppe		
Verlust auf 10q (n=19)	49	19,2
Kein Verlust auf 10q (n=10)	52	19,8
Median	50	19,5
Kontroll-Gruppe		
Verlust auf 10q (n=11)	57	6,3
Kein Verlust auf 10q (n=8)	59	11,7
Median	57	7,5

Tabelle 3.10. Cox-Regressionsanalyse: Subgruppenanalyse von unterschiedlichen Effekten in Abhängigkeit der genetischen Veränderungen auf 10q.

Im univariaten Modell wurde der TMZ-Effekt abgeschätzt (A), in dem multivariaten Modell wurden der TMZ-Effekt, der Alterseffekt und die Interaktion zwischen TMZ und Alter abgeschätzt (B).

Alteration/ Normal	Variable	Hazard Ratio (95% Konfidenzintervall)	p-Wert (2-seitig)	
<b>A)</b> Verlust auf 10q	TMZ/Kontrolle	0.31 (0.134-0.729)	<b>0.0071</b>	
	kein Verlust auf 10q	TMZ/Kontrolle	0.59 (0.204-1.69)	0.33
<b>B)</b> Verlust auf 10q	TMZ/Kontrolle	0.85 (0.25-2.91)	0.79	
	Alter >53/≤53	10.47 (1.87-58.65)	<b>0.0076</b>	
	TMZ x Alter	0.040 (0.0044-0.36)	<b>0.0042</b>	
	kein Verlust auf 10q	TMZ/Kontrolle	1.40 (0.28-7.04)	0.69
	Alter >53/≤53	3.28 (0.59-18.02)	0.17	
	TMZ x Alter	0.12 (0.0077-1.94)	0.14	

Auch in der univariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich der positive Effekt der TMZ-Therapie für Patienten mit Verlusten des langen Arms von Chromosom 10 ( $p=0,0071$ , Tab. 3.10.A).

Dieser Therapieeffekt konnte im multivariaten Modell, in dem neben dem TMZ-Effekt auch ein möglicher Alterseffekt sowie eine Interaktion zwischen TMZ und Alter berücksichtigt wurden, nicht gezeigt werden (Tabelle 3.10.B).

Die Subgruppenanalyse ergab jedoch, dass Verluste auf 10q mit einer schlechten Prognose bei älteren Patienten einhergehen ( $> 53$  Jahren  $p=0,0076$ ). Dieser negative Alterseffekt kann durch eine TMZ-Therapie ausgeglichen werden ( $p=0,0042$ ). Für Patienten, deren Tumoren diese genetische Veränderung nicht zeigten, wurden keine entsprechenden Effekte nachgewiesen.

#### 3.5.2.4. Tumore mit Verlust auf Chromosomenarm 13q

In 35% (17/48) der Tumoren lagen Verluste auf dem langen Arm von Chromosom 13 vor. Dabei war die mediane Überlebenszeit der TMZ-behandelten Patienten gegenüber nur nachbestrahlten Patienten mit Tumoren, die einen Verlust von 13q aufwiesen, auf das Dreifache verlängert (16,4 gegenüber 4,8 Monaten). Dieser positive, überlebenszeitverlängernde Effekt der TMZ-Chemotherapie von Patienten mit einem Verlust von 13q erreichte in der Kaplan-Meier Analyse und im univariaten Cox-Regressionsmodell statistische Signifikanz ( $p=0,047$ , Abb. 3.9. und  $p=0,0057$ , Tab. 3.12.A.).

Tab. 3.11. Vergleich der beiden Patientengruppen hinsichtlich Alter und Überlebenszeit in Abhängigkeit der genetischen Veränderung auf 13q.

	Alter [Jahre]	ÜLZ [Monate]
TMZ-Gruppe		
Verlust auf 13q (n=8)	52	16,4
Kein Verlust auf 13q (n=21)	47	19,2
Median	49	19,2
Kontroll-Gruppe		
Verlust auf 13q (n=9)	56	4,8
Kein Verlust auf 13q (n=10)	58	10,2
Median	57	7,5

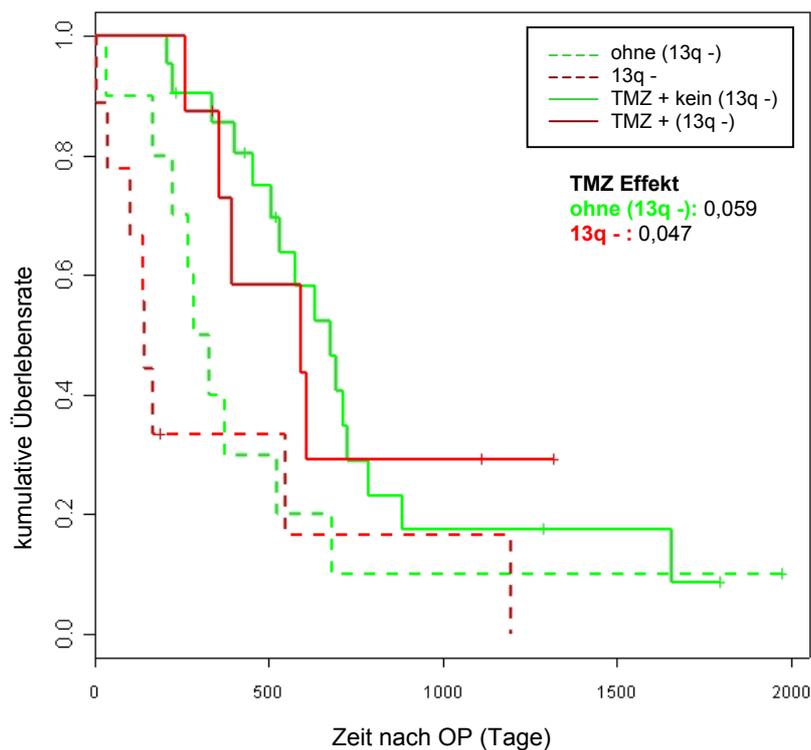


Abb. 3.9. Kaplan-Meier Analyse: Überlebenszeit der Patienten mit 13q-Verlust.

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse konnte der Vorteil dieser genetischen Veränderung unter Chemotherapie nicht gezeigt werden ( $p=0,91$ , Tab. 3.12.B). Diese ergab - ungeachtet einer Alteration auf Chromosom 13 - einen negativen prognostischen Effekt eines höheren Patientenalters, der in beiden Gruppen durch die TMZ-Therapie ausgeglichen werden konnte, wenngleich in der Gruppe ohne 13q-Verlust die Signifikanzgrenze nicht erreicht wurde.

Die Patienten der TMZ-Gruppe waren im Median 8 Jahre jünger als die der Kontroll-Gruppe. Dabei betrug das mediane Alter von Patienten mit 13q-Verlust in der TMZ-Gruppe 52 Jahre, in der Kontroll-Gruppe bei 56 Jahre. Patienten ohne Veränderungen auf 13q waren in der TMZ-Gruppe im Median 47 Jahre, in der Kontrollgruppe 58 Jahre.

Tab. 3.12. Cox-Regressionsanalyse: Subgruppenanalyse von unterschiedlichen Effekten in Abhängigkeit der genetischen Veränderung auf 13q.

Im univariaten Modell wurde der TMZ-Effekt abgeschätzt (A), in dem multivariaten Modell wurden der TMZ-Effekt, der Alterseffekt und die Interaktion zwischen TMZ und Alter abgeschätzt (B).

Alteration/ Normal	Variable	Hazard Ratio (95% Konfidenzintervall)	p-Wert (2-seitig)
<b>A)</b> Verlust auf 13q	TMZ/Kontrolle	0.327 (0.103-1.03)	<b>0.0057</b>
	kein 13q-Verlust	TMZ/Kontrolle	0.458 (0.200-1.05)
<b>B)</b> Verlust auf 13q	TMZ/Kontrolle	1.0867 (0.244307-4.834)	0.91
	Alter >53/≤53	9.3446 (1.299987-67.170)	<b>0.026</b>
	TMZ x Alter	0.0169 (0.000725-0.395)	<b>0.011</b>
kein 13q-Verlust	TMZ/Kontrolle	1.334 (0.2937-6.06)	0.71
	Alter >53/≤53	5.507 (1.0446-29.03)	<b>0.044</b>
	TMZ x Alter	0.129 (0.0159-1.06)	0.056

### 3.5.2.5. Weitere genetische Veränderungen in Glioblastomen

Eine genetische Veränderung, die für die untersuchten Glioblastome ebenfalls typisch ist und relativ häufig gezeigt werden konnte, ist die Kopienzahlvermehrung auf dem langen Arm von Chromosom 12. Signifikante Unterschiede der Überlebenszeiten zwischen den beiden untersuchten Patientengruppen wurden nicht beobachtet.

Andere genetische Veränderungen mit zum Teil bekannter prognostischer Bedeutung traten für eine statistische Analyse zu selten in den Tumoren auf. Dies traf z.B. auf die Veränderungen der Chromosomen 1p, 17, 19q und 22 zu. Daher war auch keine Einteilung in Untergruppen bezüglich unterschiedlicher Kombinationen der vorstehend dokumentierten Veränderungen auf den Chromosomen 7, 9, 10 und 13 möglich.

### 3.6. Ergebnisse der Expressionsanalyse von MGMT mittels realtime-PCR am Lightcycler™

Ob ein (heterozygoter oder homozygoter) Verlust der auf 10q26 lokalisierten Region für MGMT vorliegt und wie sich dieser auf die Expression dieses Gens in den Hirntumoren auswirkt, sollte die Untersuchung mittels realtime-PCR am Lightcycler™ aufzeigen.

Insgesamt konnte von 17 Tumoren sowie von humaner Kopfhaut und der Zelllinie MCF 7 als Kontrolle die Gesamt-RNA isoliert und revers transkribiert werden. Im Anschluss wurden mittels realtime-PCR die Expressionsunterschiede von MGMT im Verhältnis zu  $\beta$ -2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2-MG) als Haushaltsgen untersucht.

Alle untersuchten Fälle gehören aufgrund der Gewebeverfügbarkeit der TMZ-chemotherapierten Patientengruppe an.

Zur Etablierung der Methode und Erstellung der für die Datenverarbeitung notwendigen Standardkurven wurde die RNA der Zelllinie MCF7 in cDNA transkribiert und mittels Dreifach-Bestimmung in 10er-Verdünnungsschritten von 1:10 bis 1:100.000 eingesetzt. Die näherungsweise exponentielle bzw. exponentielle Zunahme der Mittelwerte der verschiedenen cDNA-Mengen zeigt (Abb. 3.10), dass die Bedingungen bei nachfolgendem Programm (Tab. 3.13.) optimal waren. Die Schmelzkurvenanalyse ergab für MGMT und  $\beta$ 2-MG charakteristische Kurven, sodass SYBR® Green Artefakte oder Primerdimere ausgeschlossen werden konnten (Abb. 3.11).

Die Proben wurden im Doppelansatz für beide Primerpaare von MGMT und  $\beta$ 2-MG gemessen und der jeweilige Median für die Bestimmung der mRNA-Expressionswerte verwendet. Im Anschluss wurde mit Hilfe der RelQuant™ Software die MGMT-Expression im Vergleich zu der Expression des Haushaltsgens  $\beta$ 2-MG bestimmt.

Tab. 3.13. PCR-Protokoll für die quantitative realtime-PCR mit MGMT und  $\beta$ 2-MG

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen	Aufheizen
Aktivierung	95°C	15 min	} 50	20°C/s
Denaturierung	94°C	15 s		20°C/s
Annealing	60°C	25 s		20°C/s
Extension	72°C	20 s		20°C/s
Schmelzkurven-Analyse	95°C	0 s		20°C/s
	65°C	15 s		20°C/s
	95°C	0 s		0,1°C/s
Ende	40°C	20 s		20°C/s

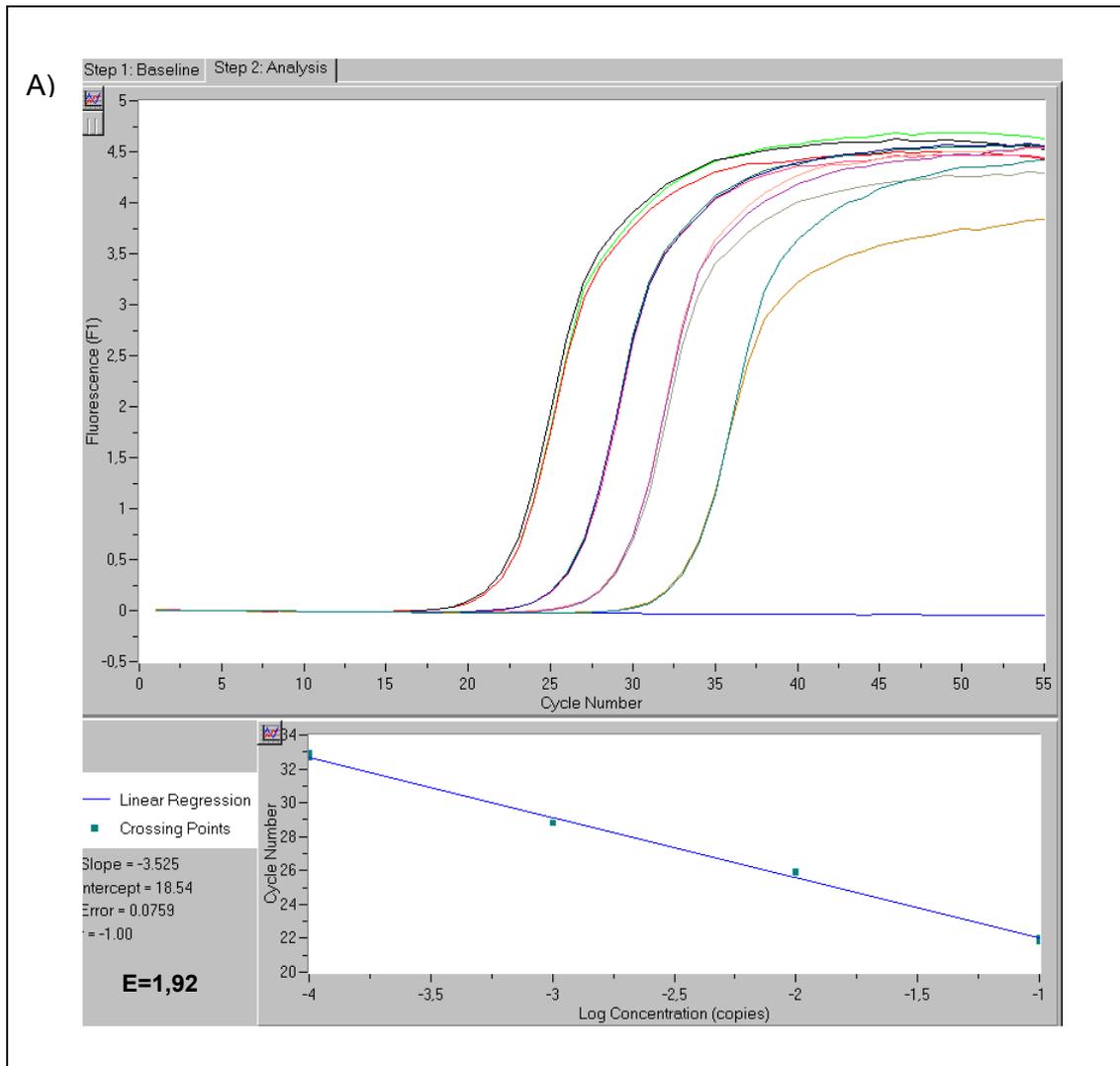


Abb. 3.10. A) Standardkurven und PCR-Effizienz für MGMT.

Der obere Bereich der Abbildung stellt jeweils die Messkurven für die cDNA-Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:100.000 dar, der untere Teil die daraus von der Software ermittelten Standardgerade.

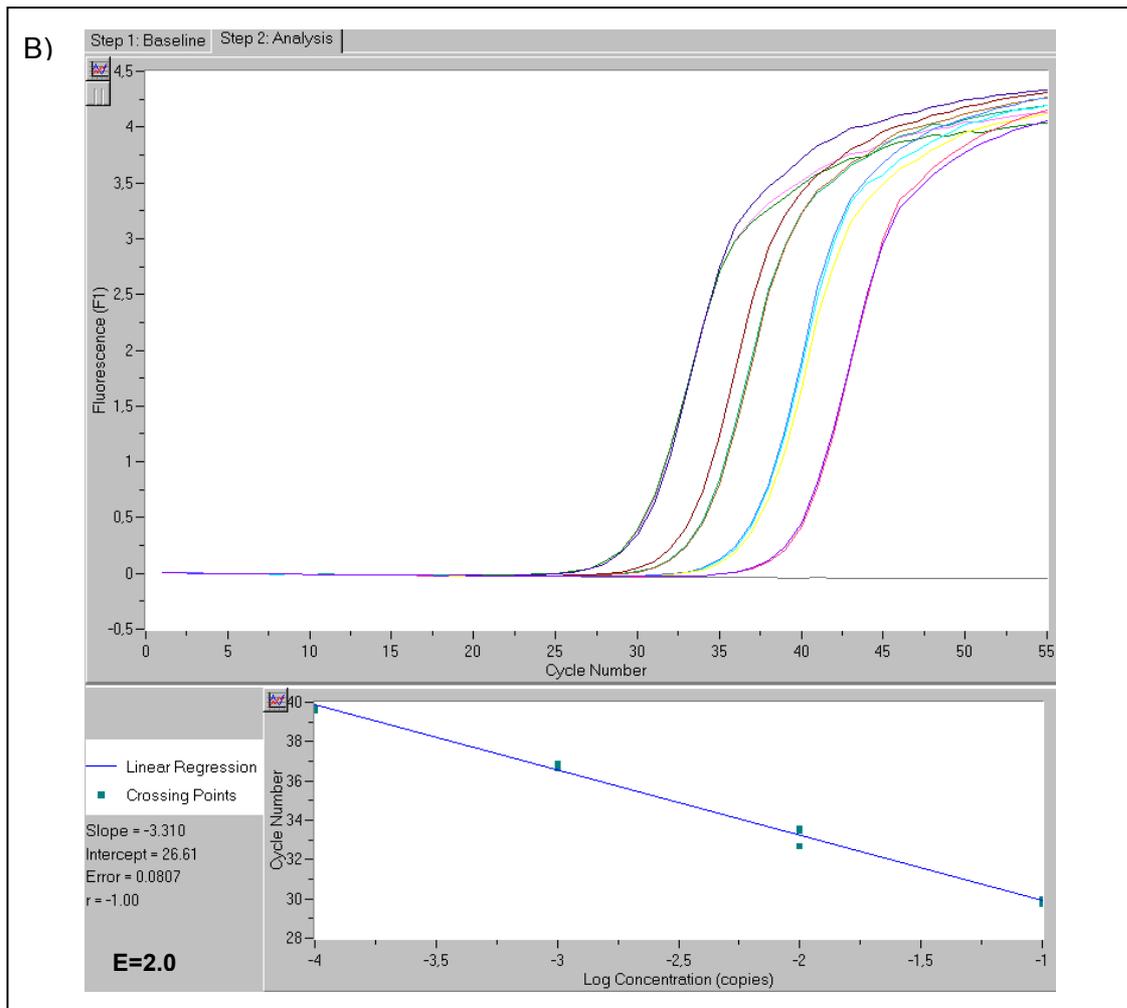


Abb. 3.10. B) Standardkurven und PCR-Effizienz für  $\beta$ 2-MG.

Der obere Bereich der Abbildung stellt jeweils die Messkurven für die cDNA-Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:100.000 dar, der untere Teil die daraus von der Software ermittelten Standardgerade.

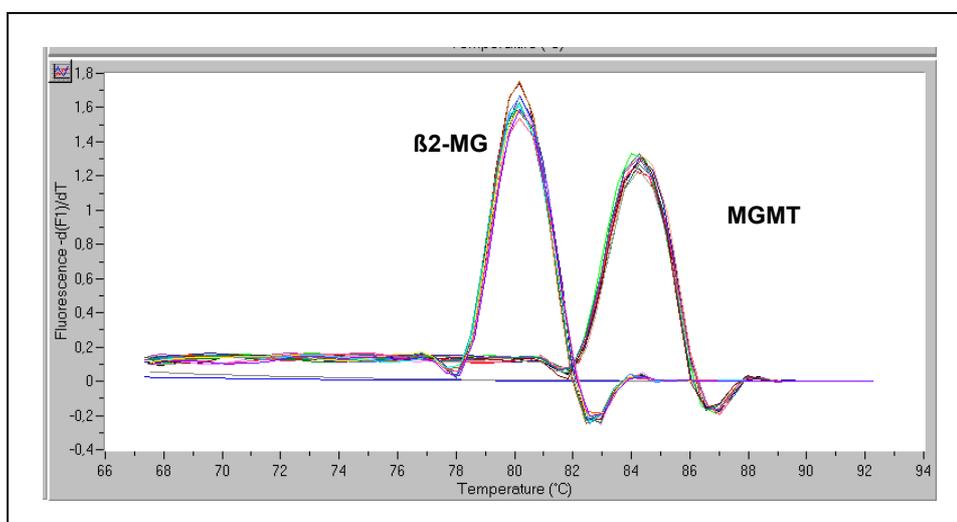


Abb. 3.11. Schmelzkurvenanalyse für  $\beta$ 2-MG und MGMT.

Abbildung 3.12. zeigt exemplarisch die Messung der MGMT-Expression mittels realtime-PCR am Beispiel der Glioblastome 1795/99 und 369/02. In Tabelle 3.14. sind die Mittelwerte der einzelnen Versuchsläufe nach der Kalibrator-normalisierten relativen Quantifizierung mit Effizienzkorrektur (RQV) unter Verwendung der Standardkurven sowie die zugehörige Standardabweichung zusammengefasst.

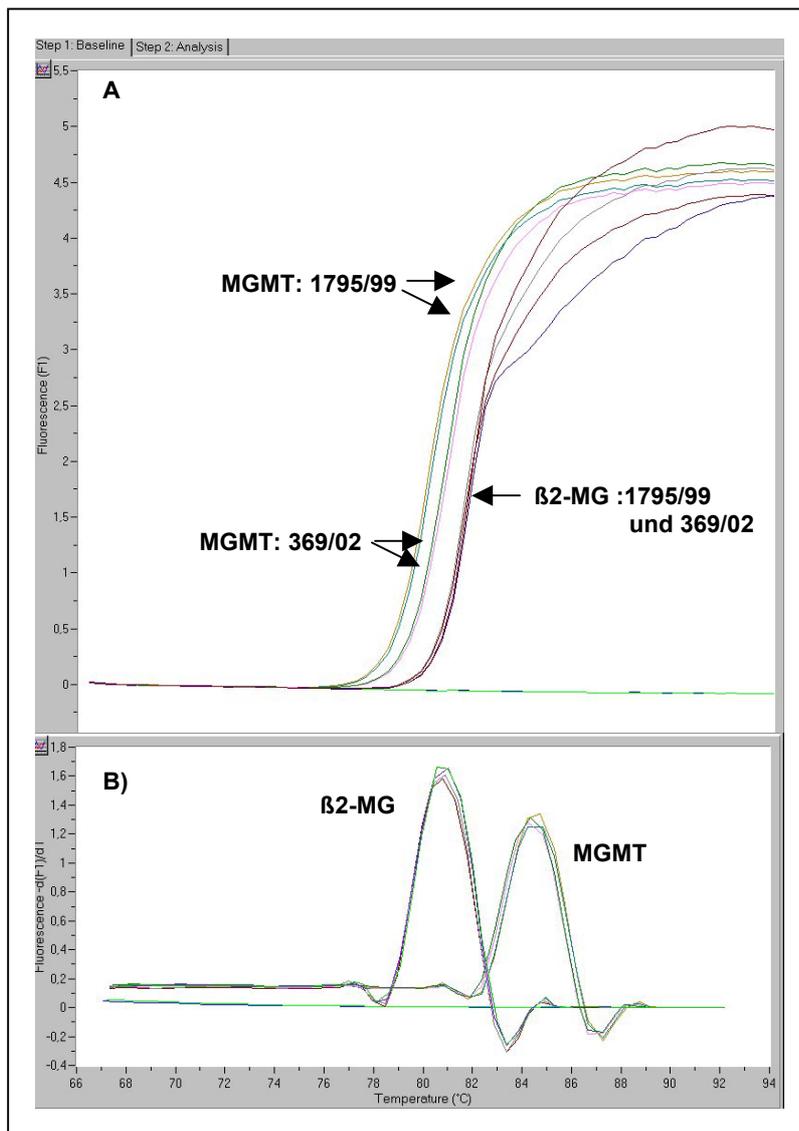


Abb. 3.12. Messung der MGMT-Expression gegen β2-MG mittels realtime-PCR an den Glioblastomen 1795/99 und 369/02 (A) und Schmelzkurvenanalyse (B).

Tab. 3.14. Ergebnisse der Expression von MGMT mittels realtime-PCR und CGH-Befunde auf Chromosom 10q.

Fall	Geschlecht	RQV MGMT [MW] $\pm$ SD	Verlust von 10q
1795/99	m	0,743 $\pm$ 0,693	0
896/99	m	0,995 $\pm$ 0,064	1
1534/00	m	0,045 $\pm$ 0,007	1
1326/99	m	1,43	1
1106/00	m	0,26 $\pm$ 0,198	1
1405/01	m	1,325 $\pm$ 0,488	0
369/02	m	0,145 $\pm$ 0,021	1
662/01	m	1,14	1
1782/09	m	1,625 $\pm$ 0,163	0
1707/00	m	0,147 $\pm$ 0,081	1
265/00	w	0,44	1
1691/00	w	0,093 $\pm$ 0,059	0
1460/99	w	0,123 $\pm$ 0,043	0
1515/00	w	0,16 $\pm$ 0,071	0
497/00	w	0,02	0
820/00 <sup>a</sup>	m	0,025 $\pm$ 0,007	1
1488/00 <sup>a</sup>	w	0,015 $\pm$ 0,007	0

m = männlich, w = weiblich

RQV = Wert der Kalibrator-normalisierten relativen Quantifizierung mit Effizienzkorrektur

SD = Standardabweichung

<sup>a</sup> = anaplastisches Oligoastrozytom, nicht in statistischer Auswertung berücksichtigt

Eine Korrelation der Daten mit dem Geschlecht der Glioblastom-Patienten ergab für Frauen eine signifikant geringere MGMT-Expression (RQV) als für Männer ( $P=0,01$ , Tab. 3.15.).

Tab. 3.15. Korrelation der Expression von MGMT mit dem Geschlecht der Patienten

	Männer (n=10)	Frauen (n=5)	t-Test
RQV MGMT	0,786 ± 0,599	0,167 ± 0,161	0,0107
Alter	50,3	42,8	
mediane ÜLZ	19,7	21,2	

RQV = Kalibrator-normalisierte relative Quantifizierung mit Effizienzkorrektur

ÜLZ = Überlebenszeit in Monaten

Ein Vergleich der Expressionsstärke mit den CGH-Befunden auf Chromosomenarm 10q zeigte keine Korrelation (Tab. 3.16.). Der Mittelwert der MGMT-Expression in Tumoren mit 10q-Verlust lag bei  $RQV=0,542$ , in Tumoren ohne 10q-Verlust bei  $RQV=0,505$ .

Tab. 3.16. Korrelation der Expression von MGMT mit den Veränderungen auf Chromosomenarm 10q nach CGH.

	Verlust von 10q (n=8)	Kein 10q Verlust (n=7)
RQV MGMT	0,542	0,505
Alter	58,9	39,7
mediane ÜLZ	22,8	17,3

RQV = Kalibrator-normalisierte relative Quantifizierung mit Effizienzkorrektur

ÜLZ = Überlebenszeit in Monaten

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der CGH-Untersuchungen wurde auch in dieser kleineren Patientengruppe ein bevorzugter 10q-Verlust bei älteren Patienten gezeigt. Die Überlebenszeit dieser Patienten war um 31% verlängert gegenüber Patienten ohne 10q-Verlust (22,8 vs. 17,3 Monate).

TMZ-behandelte Patienten, in deren Tumoren eine geringe MGMT-Expression nachgewiesen wurde, zeigten eine um 53% verlängerte mediane Überlebenszeit gegenüber Patienten mit einer stärkeren Expression (20,2 vs. 13,2 Monate) (Abb. 3.13, Tab. 3.17). Eine

statistische Signifikanz wurde aufgrund der geringen Fallzahl nicht erreicht. Auch der Einfluss weiterer, sich möglicherweise gegenseitig beeinflussender Faktoren wie Patientenalter und Geschlecht kann bei der kleinen Fallzahl durch statistisches Testen nicht ausgeschlossen werden.

Tab. 3.17. Korrelation der Stärke der Expression von MGMT mit der Überlebenszeit der Patienten.

	RQV MGMT < 0,500	RQV MGMT > 0,500
mediane ÜLZ	20,2	13,2
Alter	46	52
Geschlecht w/m	5/4	0/6

RQV = Wert der Kalibrator-normalisierten relativen Quantifizierung mit Effizienzkorrektur  
 ÜLZ = Überlebenszeit in Monaten, w = weiblich, m = männlich

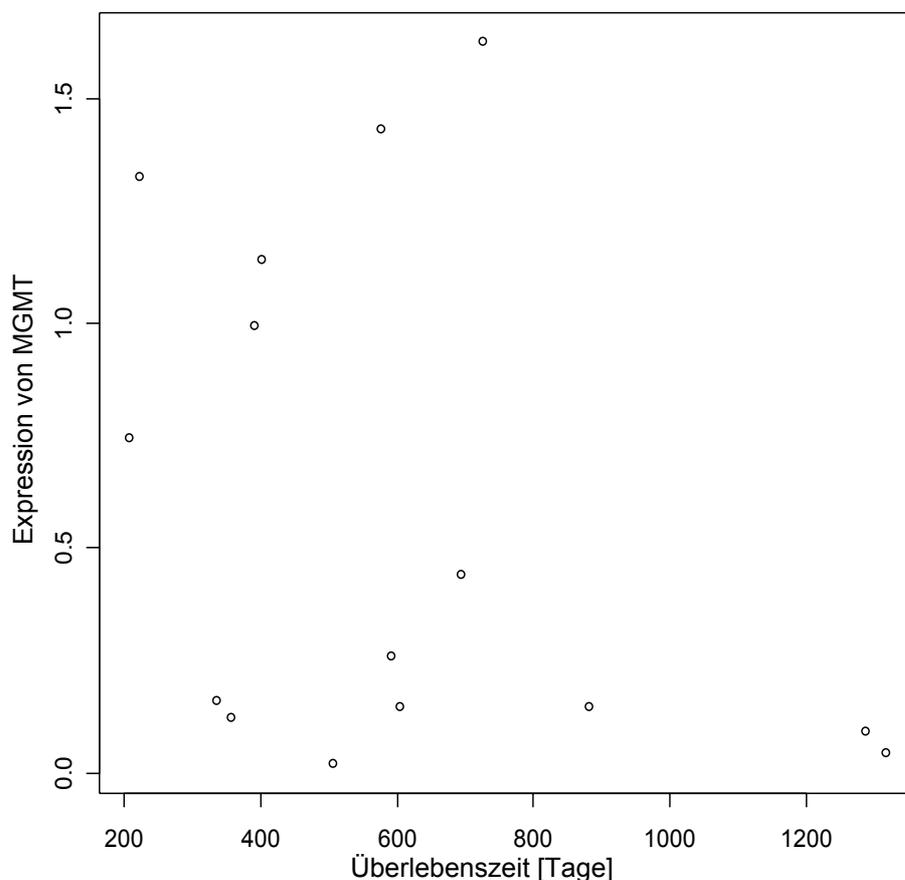


Abb. 3.13. Korrelation der Expression von MGMT mit der Überlebenszeit der Patienten.

### 3.7. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von MGMT

Es wurde geprüft, ob mit dem Verlust einer Kopie des langen Arms von Chromosom 10 nur eine heterozygote oder durch eine nicht erkennbare Mikrodeletion auf dem zweiten Chromosom 10 eine homozygote Inaktivierung des *MGMT*-Gens einhergeht. Mit einem gegen humanes MGMT-Protein gerichteten monoklonalen Antikörper wurde untersucht, ob MGMT vermindert oder gar nicht mehr exprimiert wird.

Die Etablierung der Methode wurde an humanen Tonsillengewebeschnitten als Positivkontrolle sowie normalem Hirngewebe durchgeführt. Zur internen Versuchskontrolle wurden Tonsillengewebeschnitte parallel zu den Tumorgewebeschnitten behandelt.

Von den 25 eingesetzten Paraffingewebeschnitten waren 16 Fälle auswertbar. 14 dieser Tumoren stammten von Patienten, die der ausschließlich bestrahlten Kontroll-Gruppe zugeordnet waren. Nur zwei Fälle standen von Patienten der TMZ-Gruppe zur Verfügung, da infolge eines Kommunikationsproblems die übrigen Präparate keine von mir untersuchten Fälle waren.

Tab. 3.18. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von MGMT mit den entsprechenden CGH-Befunden für den Chromosomenarm 10q.

Fall	Behandlung	MGMT-IHC	Verlust von 10q (CGH)
T4789	Radiatio+TMZ	0	0
1782/98	Radiatio+TMZ	1	0
H281	Radiatio	0	0
1394/99	Radiatio	0	n.a.
861/99	Radiatio	1	0
T4795	Radiatio	1	1
1819/98	Radiatio	1	0
2046/97	Radiatio	1	1
H147	Radiatio	1	1
T4803	Radiatio	1	1
N111/99	Radiatio	0	0
H321	Radiatio	0	1
838/97	Radiatio	1	1
393/98	Radiatio	0	1
H549	Radiatio	1	1
1028/98	Radiatio	1	1

ICH= Immunhistochemisches Ergebnis, 0 = negativ, 1 = positiv, n.a. nicht auswertbar

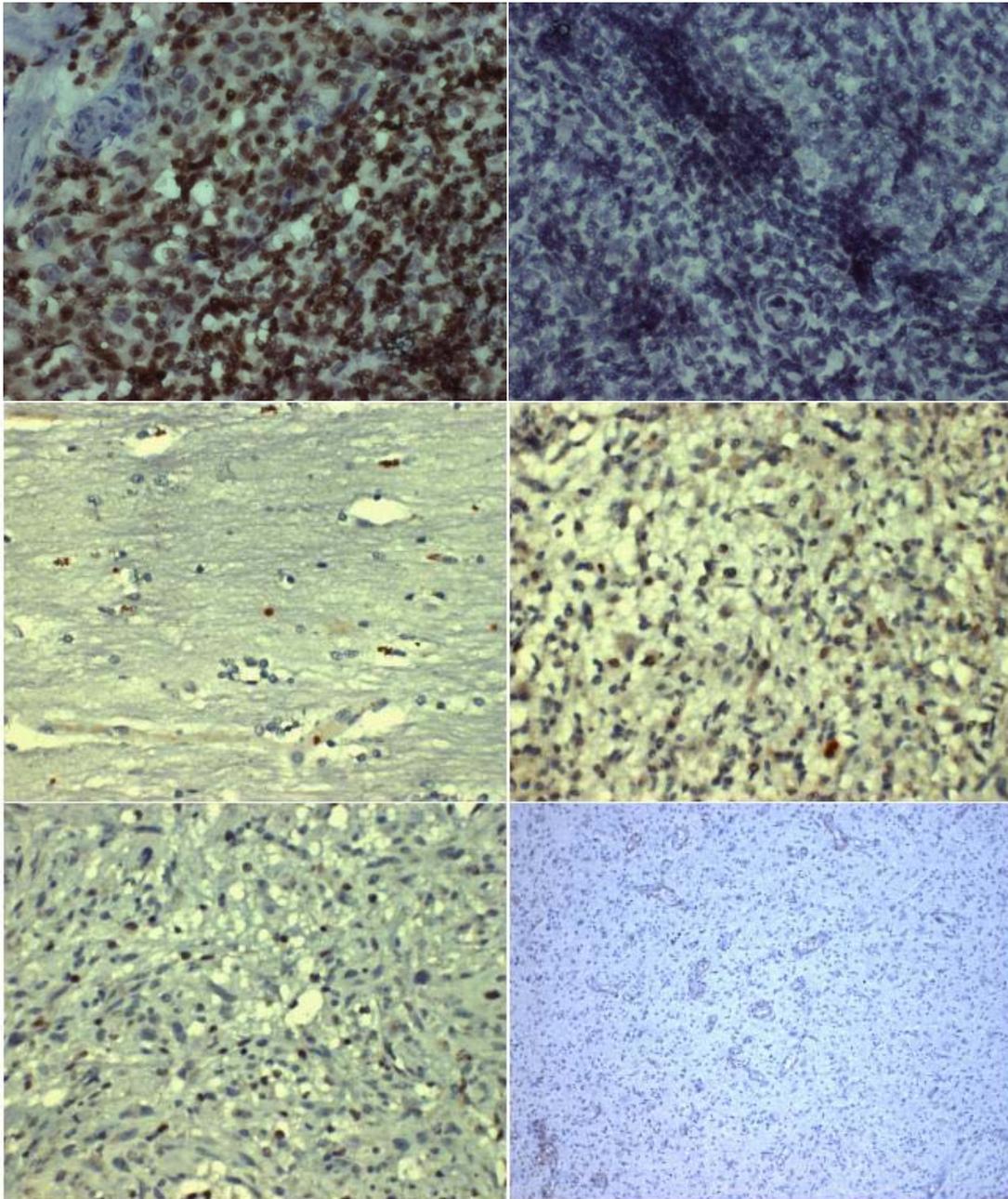


Abb. 3.14. Immunhistochemischer Nachweis von MGMT an  
A) Positivkontrolle und B) Negativkontrolle an einer humanen Tonsille  
C) normalem Hirngewebe, D) Fall T4803 (positiv),  
E) 1394/99 (positiv) und F) Fall 393/98 (negativ), mit 100x bzw. 60x Vergrößerung.

### 3.7.1. TMZ-Gruppe

In der TMZ-behandelten Patientengruppe lag in einem Fall (1782/98) ein positiver MGMT-Proteinnachweis am Tumorgewebeschnitt vor, der zweite Fall (T4789) war negativ.

Die Überlebenszeit des MGMT-positiven Patienten betrug 24 Monate. Der andere Patient ohne nachweisbares MGMT-Protein hatte eine Überlebenszeit von 55 Monaten.

Die CGH-Analyse ergab in beiden Fällen keine Veränderungen auf Chromosom 10.

Eine Korrelation von MGMT-Protein, chromosomaler Veränderung und der Überlebenszeit der Patienten ist jedoch aufgrund dieser kleinen Zahl an auswertbaren Präparaten der chemotherapierten Patientengruppe nicht möglich.

### 3.7.2. Kontroll-Gruppe

Tumore dieser nach OP ausschließlich bestrahlten Patientengruppe (n=14) waren in 9 Fällen MGMT-positiv, in 5 Fällen war das MGMT-Protein immunhistochemisch nicht nachweisbar. Eine Korrelation der immunhistochemischen Ergebnisse mit den für Chromosom 10 erhobenen CGH-Befunde wurde nicht gezeigt (s. Tab. 3.19.).

Die mediane Überlebenszeit der MGMT-Protein positiven Patienten lag bei 7,5 Monaten, die der Patienten ohne nachweisbares Protein bei 12,5 Monaten. Diese um 60% verlängerte Überlebenszeit der negativen Patientengruppe war statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ , Abb. 3.15).

Tab. 3.19. Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchung von MGMT in der Kontrollgruppe.

	MGMT positiv	MGMT negativ
Verlust von 10q	7	2
10q unauffällig	2	2
kein CGH-Befund		1
mediane ÜLZ [M]	7,5	12,5

ÜLZ = Überlebenszeit in [Monaten]

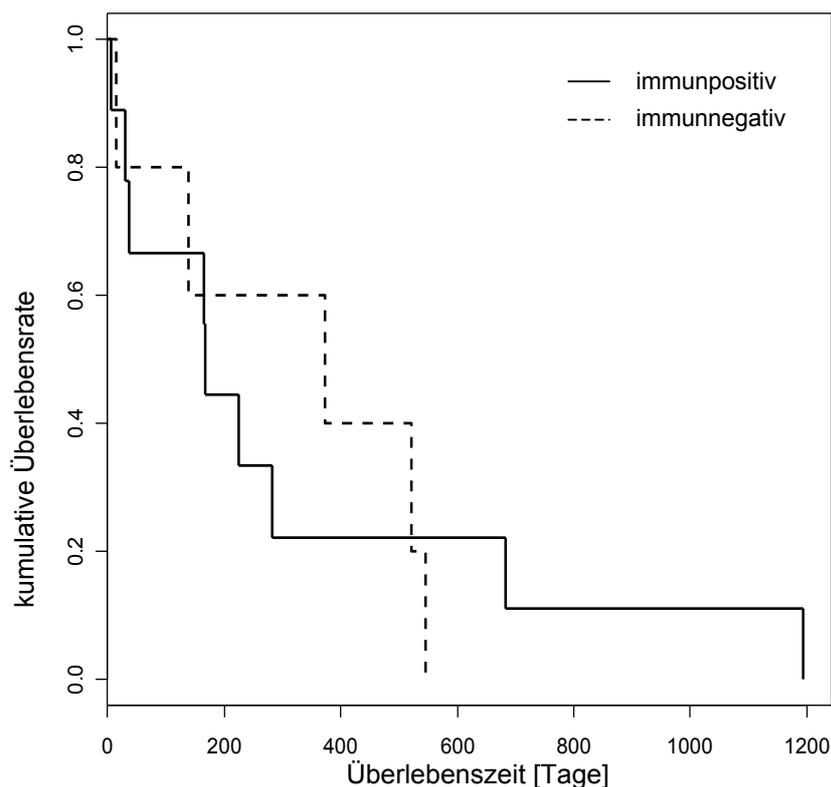


Abb. 3.15. Kaplan-Meier Analyse der Überlebenszeit von ausschließlich bestrahlten Patienten mit bzw. ohne nachweisbares MGMT-Protein.

### 3.8. Ergebnisse der Methylierungsanalyse

Um zu prüfen, ob die Gene *CDKN2A*, *CDKN2B* und *MGMT* epigenetisch verändert sind und eine dadurch resultierende Stilllegung Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten hat, wurde eine Methylierungsanalyse der Promotor-Regionen dieser Kandidatengene etabliert.

Untersucht wurden die Methylierungsmuster der jeweiligen CpG-Nukleotide von 4 Tumoren sowie als Kontrolle DNA aus Blut eines gesunden Probanden.

Je Fall wurden zwischen 7-12 unterschiedliche Klone auf Hyper- bzw. Hypomethylierung der Kandidatengene hin analysiert.

Die Abbildungen 3.16.-3.18. zeigen schematisch den Vergleich der jeweiligen Sequenzen einzelner Klone für die entsprechende Tumor-DNA bzw. eingesetzte Kontroll-DNA. In den Tabellen 3.20.-3.22. sind die prozentualen Anteile methylierter Cytosinreste aufgeführt.

### 3.8.1. Ergebnisse der Methylierungsanalyse von *CDKN2A*

In der Promotor-Region von *CDKN2A* wurden 15 CpG-Nukleotide mittels Sequenzanalyse auf ihren Methylierungsstatus untersucht. Eine Analyse der Kontroll-DNA aus Blut ergab überwiegend unmethylierte Klone (75%), in 2/8 untersuchten Klonen (25%) lag ein methyliertes CpG vor (s. Tab. 3.20.). Dieses war in Klon 1 an Position 1, in Klon 2 an Position 9.

In Tumor 820/00 war ein Klon (10%) an einer CpG-Stelle methyliert (Position 6), die anderen Klone zeigten keine methylierten CpG-Nukleotide (90%). In den Tumoren 896/99, 1460/99 und 1488/00 lagen ausschließlich unmethylierte Klone vor (s. Abb. 3.16. und Tab. 3.20.). Die erste Reihe der Abbildung 3.10. zeigt, dass 3 der 15 möglichen CpG's methyliert waren, 2 waren in der Kontroll-DNA methyliert (schraffiert), ein CpG-Nukleotid in Tumor 820/00 (dunkelgrau).

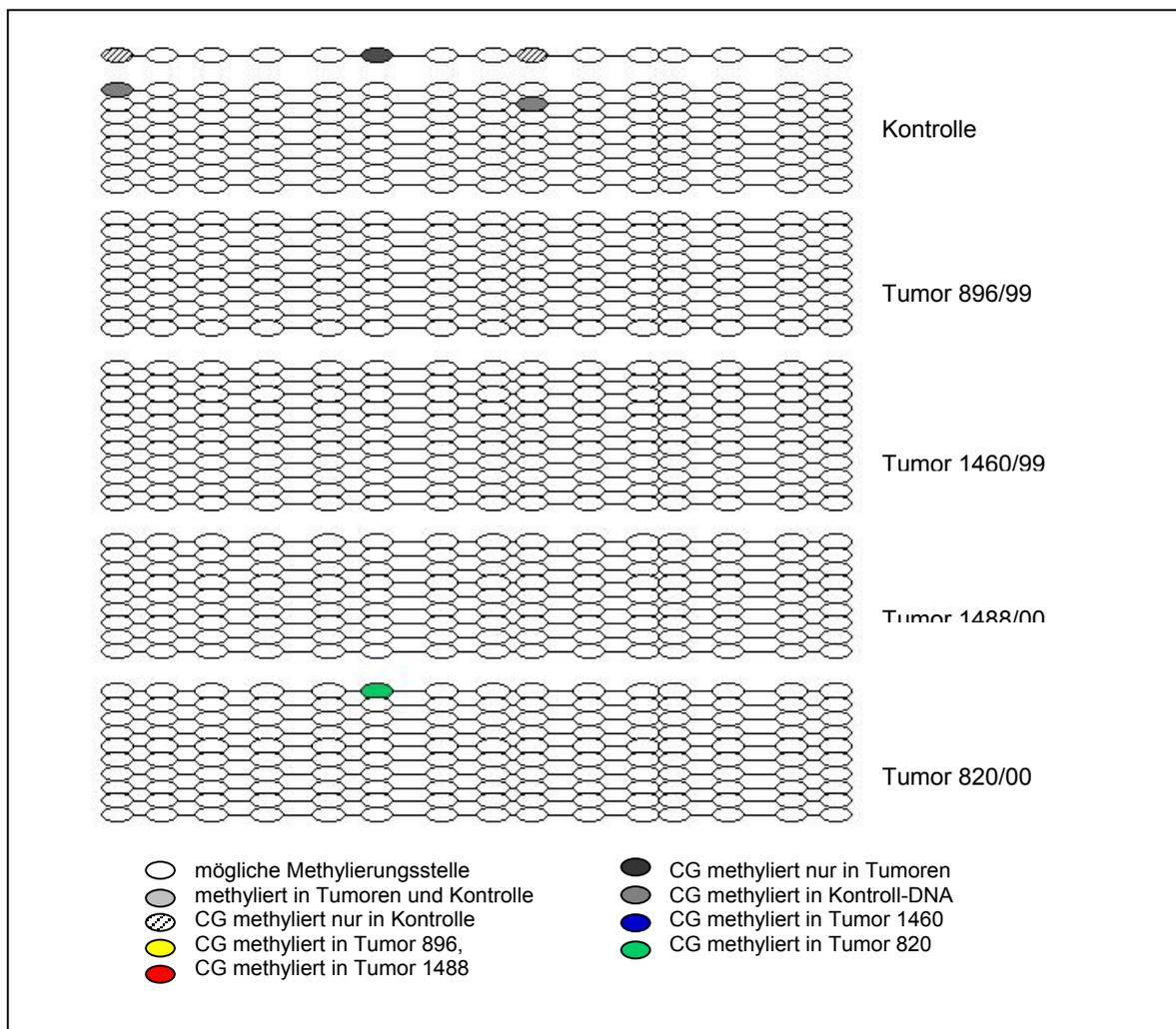


Abb. 3.16. Verteilung der CpG-Nukleotide in der Promotor-Region von *CDKN2A*. Eine horizontale Reihe entspricht jeweils einem sequenzierten Klon.

Tab. 3.20. Methylierungsanalyse von *CDKN2A*.

Fall	unmethylierte Klone [%]	methylierte Klone [%]	methylierte CpG's [%]
Kontrolle	75 (6/8)	25 (2/8)	6,7 (1/27)
896/99	100 (9/9)	0 (0/9)	0
1460/99	100 (11/11)	0 (0/11)	0
1488/00	100 (9/9)	0 (0/9)	0
820/00	90 (9/10)	10 (1/10)	6,7 (1/27)

### 3.8.2. Ergebnisse der Methylierungsanalyse von *CDKN2B*

Die Analyse der Promotor-Region von *CDKN2B* ergab 27 CpG-Stellen. In der Kontroll-DNA lagen unmethylierte (50%) und methylierte Klone vor (50%). Drei Klone zeigten jeweils ein methyliertes CpG, ein Klon an Position 25, zwei an Position 19. In einem Klon waren die Positionen 1, 5, 8, 13 und 22 methyliert, dies entspricht einer Methylierung des Klons von 18,5%.

In den Tumoren waren zwischen 50 und 90% der Klone unmethyliert. In den Tumoren 1460/99 und 1488/00 lag ein methyliertes CpG an Position 18 bzw. 14 vor (s. Abb. 3.17. und Tab. 3.21.). Tumor 896/99 zeigte 3 methylierte Klone (30%): Klon 1 zeigte 5 methylierte CpG's an den Positionen 5, 8, 13, 22 und 27; Klon 2 ein methyliertes CpG an Position 22 und Klon 3 zwei methylierte CpG's an den Positionen 22 und 24. In Tumor 820/00 waren in 5 Klonen (50%) methylierte CpG's vorhanden, in Klon 1 an den Positionen 1 und 18, Klon 2 an Position 12 und 15, Klon 3 an Position 26, Klon 4 an Position 11 und Klon 5 an den Positionen 2, 3, 24 und 25.

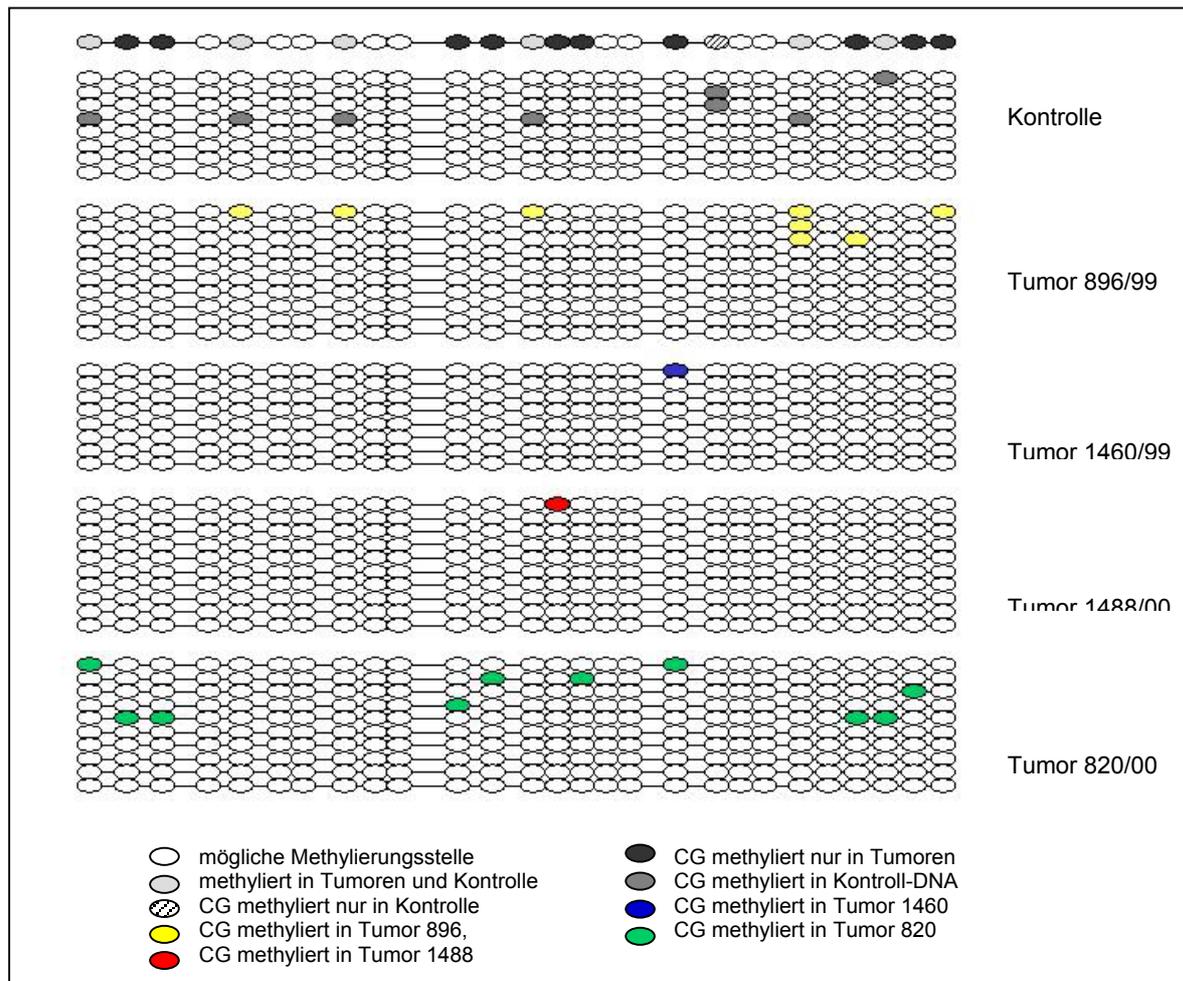


Abb. 3.17. Verteilung der CpG-Nukleotide in der CDKN2B-Promotor-Region.  
Eine horizontale Reihe entspricht jeweils einem sequenzierten Klon.

In der ersten Reihe der Abbildung 3.17. ist die Verteilung der CpG-Nukleotide in der Kontroll-DNA und den Tumor-DNAs dargestellt. 10 der 27 möglichen CpG's lagen nur in den Tumoren methyliert vor (Positionen 2, 3, 11, 12, 14, 15, 18, 24, 26, 27 - dunkelgrau), wohingegen Position 19 nur in der Kontrolle methyliert war (schraffiert). 6 CpG-Stellen waren sowohl in der Kontroll-DNA als auch in der DNA aus den Tumoren methyliert (Position 1, 5, 8, 13, 25 – hellgrau) und 10 CpG's waren nicht methyliert (weiß).

Tab. 3.21. Methylierungsanalyse von *CDKN2B*.

Fall	unmethylierte Klone [%]	methylierte Klone [%]	methylierte CpG's [%]
Kontrolle	50 (4/8)	37,5 (3/8) <u>12,5</u> (1/8) 50	3,7 (1/27) 18,5 (5/27)
896/99	70 (7/10)	10 (1/10) 10 (1/10) <u>10</u> (1/10) 30	3,7 (1/27) 7,4 (2/27) 18,5 (5/27)
1460/99	87,5 (7/8)	12,5 (1/8)	3,7 (1/27)
1488/00	90 (9/10)	10 (1/10)	3,7 (1/27)
820/00	50 (5/10)	20 (2/10) 20 (2/10) <u>10</u> (1/10) 50	3,7 (1/27) 7,4 (2/27) 14,8 (4/27)

### 3.8.3. Ergebnisse der Methylierungs-Studie von *MGMT*

Mittels Sequenzanalyse der Promotor-Region von *MGMT* wurden insgesamt 20 CpG-Stellen untersucht.

In der normalen Kontroll-DNA lagen sowohl methylierte als auch unmethylierte Klone vor. Der Anteil der methylierten CpG-Stellen betrug zwischen 5 und 35% (s. Tab. 3.22.), betroffen waren die Positionen 1-6 und 8. An den Positionen 6 sowie 9-20 wurde in den 10 untersuchten Klonen der Kontroll-DNA keine Methylierung nachgewiesen (s. Abb. 3.18.). Ein Tumor (896/99) zeigte einen zur Kontroll-DNA ähnlichen Methylierungs-Status: der Anteil der methylierten CpG's in den 12 sequenzierten Klonen betrug maximal 35%, vollständig unmethylierte Klone lagen nicht vor (s. Tab. 3.22.). Methyliert waren die CpG-Nukleotide an den Positionen 1-9, 14 und 15.

Auch in den Tumoren 1460/99, 1488/00 und 820/00 wurden ausschließlich methylierte Klone nachgewiesen, der Anteil der methylierten CpG's war zum Teil erheblich höher. Betrug dieser Anteil über 50% aller möglichen CpG-Stellen, wird er im Folgenden als Hypermethylierung bezeichnet.

In Tumor 820/00 lag der Anteil methylierter CpG's bei 10-95%, d.h. neben Klonen mit einem der Kontroll-DNA vergleichbaren Methylierungsmuster lagen auch Klone mit einer Hypermethylierung vor. Tumor 1460/99 zeigte in der Mehrzahl der Klone (9/10) eine Hypermethylierung von 65-95% aller möglichen CpG-Stellen, ein Klon wies eine zur Kontroll-DNA vergleichbare Methylierung von 25% auf. In Tumor 1488/00 lag in allen sequenzierten Klonen (8/8) eine Hypermethylierung von 55-80% der CpG's vor (Tab. 3.22.).

Die erste Reihe der Abbildung 3.18. verdeutlicht, dass alle analysierten, möglichen CpG-Stellen wenigstens einmal in methylierter Form vorgefunden wurden. Die sowohl in der Kontroll-DNA als auch in den Tumoren methyliert vorliegenden Positionen sind hellgrau dargestellt (Position 1-6, 8), die ausschließlich in den Tumoren methylierten CpG's dunkelgrau (Position 7, 9-20).

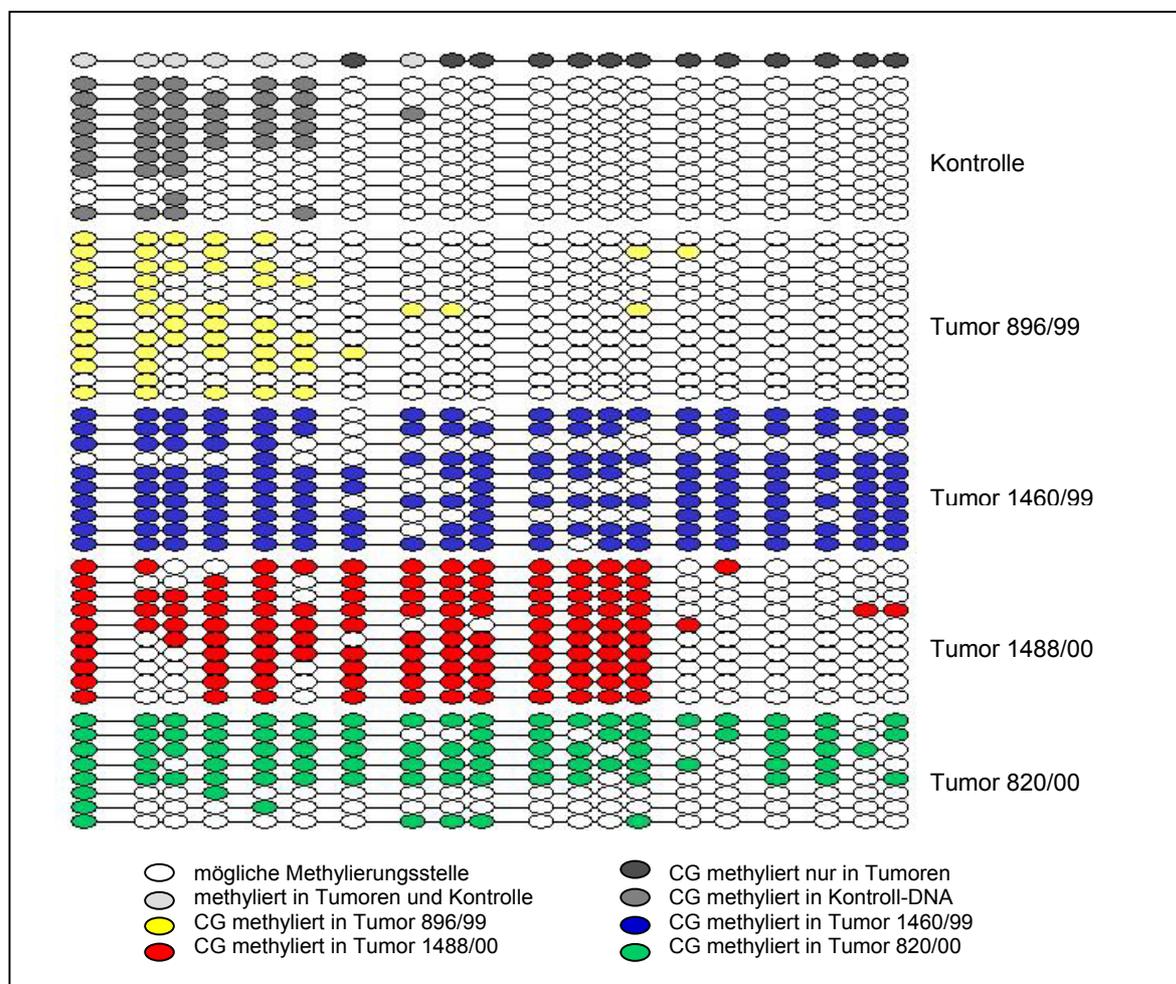


Abb. 3.18. Verteilung der CpG-Nukleotide in der Promotor-Region von MGMT. Eine horizontale Reihe entspricht jeweils einem sequenzierten Klon.

Tab. 3.22. Methylierungsanalyse von *MGMT*.

Fall	unmethylierte Klone [%]	methylierte Klone [%]	methylierte CpG's [%]
Kontrolle	10 (1/10)	10 20 10 10 30 <u>10</u> 90	5 (1/20) 15 (3/20) 20 (4/20) 25 (5/20) 30 (6/20) 35 (7/20)
896/99	0 (0/12)	16,7 25,0 33,3 16,7 <u>8,3</u> 100	5 (1/20) 20 (4/20) 25 (5/20) 30 (6/20) 35 (7/20)
1460/99	0 (0/10)	10 20 10 20 <u>40</u> 100	25 (5/20) 65 (13/20) 70 (14/20) 90 (18/20) 95 (19/20)
1488/00	0 (0/10)	40 20 30 <u>10</u> 100	55 (11/20) 60 (12/20) 65 (13/20) 80 (16/20)
820/00	0 (0/8)	25 12,5 12,5 37,5 <u>12,5</u> 100	10 (2/20) 25 (5/20) 75 (15/20) 80 (16/20) 95 (19/20)

#### 3.8.4. Korrelation der Methylierungsbefunde mit den Daten aus den anderen methodischen Ansätzen

Tumor 1460/99 zeigte einen chromosomalen Gewinn der Region 10q23.1qter. Weiterhin wurde eine erniedrigte Expression von *MGMT* (RQV=0,123±0,043) sowie eine Hypermethylierung der Promotor-Region von *MGMT* nachgewiesen. Die Überlebenszeit dieser Glioblastom-Patientin unter TMZ-Therapie betrug 11,9 Monate. In Fall 896/99 handelt es sich um einen 51-jährigen Glioblastom-Patienten mit einer Überlebenszeit von 13 Monaten. Im Tumor lag ein Verlust der Region 10q23.1qter sowie eine relativ hohe *MGMT*-

Expression ( $RQV=0,995\pm 0,064$ ) vor. Eine Hypermethylierung der *MGMT*-Promotor-Region lag nicht vor.

Bei den Tumoren 1488/00 und 820/00 handelte es sich um anaplastische Oligoastrozytome (WHO Grad III). Der erste Fall (1488/00), eine 36-jährige Patientin, zeigte eine Überlebenszeit von 11,1 Monaten. Eine genetische Veränderung auf Chromosom 10 wurde mittels CGH nicht nachgewiesen. Die weiteren Untersuchungen ergaben eine Hypermethylierung der *MGMT*-Promotor-Region sowie eine geringe Expression von *MGMT* auf RNA-Ebene ( $RQV=0,015\pm 0,007$ ). Der zweite Fall (820/00), ein männlicher Patient von 32 Jahren, hatte eine Überlebenszeit von 26,6 Monaten. Die CGH zeigte einen Verlust auf Chromosom 10q25.1q26.1. Die weiteren Befunde zeigten eine geringe *MGMT*-Expression ( $RQV=0,025\pm 0,007$ ) und eine Hypermethylierung der *MGMT*-Promotor-Region (s. Tab. 3.23.A).

Weder in den beiden Glioblastomen noch in den beiden anaplastischen Astrozytomen wurde eine Hypermethylierung der Promotor-Regionen von *CDKN2A* und *CDKN2B* nachgewiesen. Die CGH ergab einen Verlust der Region 9p21pter in dem Glioblastom 896/99, das Glioblastom 1460/99 sowie die beiden anaplastischen Oligoastrozytome 1488/00 und 820/00 waren in der CGH unauffällig bezüglich Veränderungen auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p21).

Tab. 3.23. Korrelation der Daten aus verschiedenen methodischen Ansätzen  
A) zu Chromosomenarm 10q und *MGMT*

Fall	Histol.	Alter/ Geschlecht	ÜLZ	CGH	Expression <i>MGMT</i>	Hypermethyl. <i>MGMT</i>
1460/99	GBM	31/w	11,9	+10q23.1qter	$0,123\pm 0,043$	ja
896/99	GBM	51/m	13,0	-10q23.1qter	$0,995\pm 0,064$	nein
1488/00	AOA	36/w	11,1	unauffällig	$0,015\pm 0,007$	ja
820/00	AOA	32/m	26,6	-10q25.1q26.1	$0,025\pm 0,007$	ja

B) zu Chromosomenarm 9p und *CDKN2A/B*

Fall	Histol.	Alter/ Geschlecht	ÜLZ	CGH	Hypermethylierung <i>CDKN2A</i> <i>CDKN2B</i>	
1460/99	GBM	31/w	11,9	unauffällig	nein	nein
896/99	GBM	51/m	13,0	-9p21pter	nein	nein
1488/00	AOA	36/w	11,1	unauffällig	nein	nein
820/00	AOA	32/m	26,6	unauffällig	nein	nein

## **4. Diskussion**

### **4.1. Heterogenität des Untersuchungsmaterials**

In dieser Arbeit wurde natives Tumormaterial direkt, d.h. ohne vorhergehende Kultivierung der Tumore, eingesetzt. Eine mögliche klonale Selektion, wie sie z.B. bei der klassischen Zytogenetik aufgrund der vorangehenden Zellkultur beobachtet wird, kann somit ausgeschlossen werden.

Da es sich bei den überlassenen Tumorproben nur um einen Teil des Resektates handelt, ist allerdings nicht gewährleistet, dass der histopathologisch diagnostizierte Tumorabschnitt dem genetisch untersuchten Tumorstück entspricht. Aufgrund des diffus infiltrierenden Wachstumsverhaltens der Gliome kann in den Gewebeproben neben Tumor- auch Normalgewebe enthalten sein. Zudem weist das Tumorgewebe, wie auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, neben einer morphologischen auch eine genetische Heterogenität auf (Jung et al., 1999; Loeper et al., 2001). Nach der Tumoraufarbeitung ist in der isolierten DNA und in der RNA ein Gemisch aus Anteilen von Zellen unterschiedlicher Dignität vorhanden. Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen dabei den Zellen, die im Homogenat überwiegen. Veränderungen, die nur wenige Zellen betreffen, bleiben unbeobachtet. Eine zusätzliche histopathologische Untersuchung der für die DNA- und RNA-Isolierung vorgesehenen Tumorabschnitte zur CGH- bzw. Expressionsanalyse ist aufgrund der oft recht kleinen Tumorproben nicht möglich.

### **4.2. Kritische Anmerkungen zur Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH)**

Die erstmalig 1992 von Kallioniemi und Mitarbeitern beschriebene Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung stellt eine zeitaufwendige Methode dar, bei der die Herstellung einheitlicher Präparationen von Metaphasen-Chromosomen, die als Basis für die Hybridisierungen dienen, einen kritischen Schritt darstellt. Nicht jede nach Standardprotokoll (s. Kap. 2.2.) hergestellte Präparation liefert Chromosomen, die den Anforderungen der CGH genügen. Die Qualität dieser Metaphasen-Präparate ist abhängig von vielen Faktoren, insbesondere der umgebenden Raumtemperatur und der Luftfeuchtigkeit, deren Einflüsse auf den Trocknungs- und Spreitungsprozess der Metaphase noch immer nicht vollständig aufgeklärt sind (u. a. Hliscs et al., 1997).

Die CGH lässt nur Aussagen über relative quantitative Veränderungen des genomischen Materials zu. Eine Vermehrung oder Verminderung des Gesamtgenoms, z.B. ein tetraploider Chromosomensatz, ist nicht zu erkennen. Strukturelle Aberrationen wie beispielsweise Translokationen, Inversionen oder Insertionen können nicht nachgewiesen werden.

Punktmutationen oder sehr kleine quantitative Veränderungen (<5-10 Mb) (Deletionen, Duplikationen) sind ebenfalls nicht nachweisbar. Auch im Hinblick auf die nachweisbaren Gewinne und Verluste ist die Auflösungsgrenze unterschiedlich. Für Tumorproben wird die minimale Größe einer nachweisbaren einfachen Kopienvermehrung mit 15 Mb angegeben, wohingegen eine 1,5 Mb lange Sequenz noch nachweisbar ist, wenn sie zehnfach amplifiziert vorliegt (Parente et al., 1997). Bei einer sehr guten Hybridisierungsqualität und einer sehr starken Amplifikation, z.B. eines Onkogens, kann sogar eine Auflösung von 1 Mb erreicht werden (Forozan et al., 1997; Kirchhoff et al., 1999). Der Nachweis von Deletionen ist schwieriger. In Modellversuchen mit definierten Veränderungen an Zelllinien lag die Auflösung einer Deletion bei 2 Mb (Piper et al., 1995). In Versuchen mit nativem Tumor-Material wurde eine solche Auflösung jedoch nicht erreicht. Die kleinsten nachweisbaren Deletionen werden mit 5-20 Mb angegeben (Kallioniemi et al., 1992; Forozan et al., 1997; Bentz et al., 1998). Dabei wurde festgestellt, dass kleinere Deletionen zwar erkennbar sind, ihre Profile jedoch nicht die Signifikanzschranken überschreiten und daher nicht als Verlust gewertet werden (Bentz et al., 1998).

Eine Kontrolle der Präparate vor einer CGH-Untersuchung ist unerlässlich, z.B. auf einen unvollständigen Verdau der Zytoplasmareste um die Chromosomen, wodurch eine homogene Hybridisierung behindert wird, sowie eine Überdenaturierung der Chromosomen (Kallioniemi et al., 1994; Karhu et al., 1997). Es hat sich bewährt, für eine komplette Metaphasen-Präparation Probe-Hybridisierungen mit Test-DNA mit bekannten genetischen Veränderungen durchzuführen, um die Qualität der Einzelcharge zu beurteilen.

Eine weitere Limitierung der Hybridisierungsqualität liegt in der Stöchiometrie der eingesetzten Tumor- und Kontroll-DNA. Beide DNAs müssen systembedingt in gleichen Mengen hybridisiert werden. Die Konzentrationsbestimmung ist beim Einsatz von genomischer Tumor-DNA oder aus Blut isolierter Kontroll-DNA relativ zuverlässig und reproduzierbar photometrisch oder mit einem Agarosegel zu bestimmen. Enthält das DNA-Homogenat der Tumorprobe selbst jedoch mehr als 50% Normal-DNA aus Bindegewebe-Stroma, kann ein pathologischer Befund verfälscht sein (Kallioniemi et al., 1994).

Die Sicherheitsschranken zur Beurteilung der Mittelwerte werden in der Literatur unterschiedlich angegeben. Schranken nahe dem Mittelwert von 1,0 bedeuten eine hohe Sensitivität bei einer geringen Sicherheit des Ergebnisses. Bei weiter gewählten Schranken wird eine größere Sicherheit erzielt, dafür werden aber auch weniger Veränderungen nachgewiesen. Die rechnerisch ermittelte Sicherheitsschranke für die Nachweisbarkeit eines monosomen bzw. trisomen Chromosomenabschnitt beträgt 0,75 bzw. 1,25. Diese Schranke ist jedoch sehr weit gelegt und birgt die Gefahr einer zu geringen Spezifität. Als Standard für gute Hybridisierungen werden mittlerweile Sicherheitsschranken von 0,85 und 1,15 gewählt (Kallioniemi et al., 1994; Nupponen et al., 1998; Alers et al., 1999), wobei diese festen und

vordefinierten Schranken keine Schwankungen in der Hybridisierungsqualität berücksichtigen. Da diese von Versuch zu Versuch, aber auch innerhalb eines Präparates in verschiedenen Arealen unterschiedlich sein kann, wurden mit statistischen Methoden Sicherheitsschranken gezogen, die sich aus den jeweiligen Hybridisierungsergebnissen eines Versuchs ergeben (du Manoir et al., 1993 & 1995). Das verwendete Programm ISIS berechnet für jeden einzelnen Pixel entlang der Chromosomenachse die Mittelwerte aller vorliegenden Werte mit dem entsprechend eingestellten Sicherheitsintervall. Das eingestellte Konfidenzintervall von 99% entscheidet über Spezifität und Sensitivität der Ergebnisse. Dieses Vorgehen ist zwar weniger sensitiv, die nachgewiesenen Gewinne und Verluste sind jedoch deutlich spezifischer, so dass diese Schranken auch häufig in anderen Arbeiten verwendet wurden (Altura et al., 1997; Kirchhoff et al., 1998; Knuutila et al., 1998; Sattler et al., 1999)

Wie in Kap. 2.4.6. bereits beschrieben, wurden nicht alle Chromosomenbereiche bei der Einordnung der Ergebnisse gleich gewertet. Kritisch beurteilt wurden die zentromernahen Bereiche der Chromosomenarme 1q, 9q, 16q sowie Yq. Die in diesen Bereichen auftretenden Polymorphismen können zu starken Schwankungen in den Hybridisierungsergebnissen und somit zu Artefakten führen. Die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen wurden von der Analyse ausgeschlossen, da diese Regionen aufgrund ihrer repetitiven Sequenzen sehr polymorph sind. Außerdem wurden die GC-reichen Regionen 1p32pter, 16p, 19p+q und 22q sehr kritisch bei der Analyse betrachtet (Kallioniemi et al., 1994; Karhu et al., 1997).

#### **4.3. Interpretation der Ergebnisse der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) von Gliomen**

Trotzdem hat sich die CGH als sehr wertvolles Screening-Verfahren in der Tumorgenetik etabliert. Es ist bereits eine Vielzahl von Studien an verschiedenen Tumortypen veröffentlicht, da die CGH trotz ihres limitierten Auflösungsvermögens den Vorteil bietet, auch bei sehr unübersichtlichen strukturellen Chromosomenaberrationen ein komplexes Bild der quantitativen Veränderungen aller Chromosomen(abschnitte) des Tumors gleichzeitig zu ermitteln. Allerdings gelingt dies nur, wenn ca. 40-50% der untersuchten Zellen die Veränderungen aufweisen (Kallioniemi et al., 1994). Bei der Untersuchung von Homogenaten histomorphologisch heterogener Tumoren, wie den in dieser Arbeit untersuchten Glioblastomen, ist nicht gewährleistet, dass alle im Tumor (klonal) vorliegenden Veränderungen nachgewiesen werden können. Zudem ist vor allem in den Randzonen eine eventuelle Verschiebung der Ergebnisse durch nicht-neoplastische Zellen dieser diffus infiltrierenden Tumoren in Richtung Normalbefund zu berücksichtigen. Letzteres könnte auf

Fall 398/01 zutreffen, da hier mit der CGH keine genetischen Veränderungen nachgewiesen wurden. Hier scheint der Anteil an normalen Zellen zu überwiegen und hat daher mit großer Wahrscheinlichkeit zu diesem nicht repräsentativen Ergebnis geführt.

Die zahlreichen - auch von unserer Arbeitsgruppe - zu Glioblastomen publizierten CGH-Studien (Schröck et al., 1994; Kim et al., 1995; Schlegel et al., 1996; Weber et al., 1996 a&b; Harada et al., 1998; Mohapatra et al., 1998; Nishizaki et al., 1998; Huhn et al., 1999; Jung et al., 1999; Maruno et al., 1999; Brunner et al., 2000) bestätigen die hohe Inzidenz der aus der konventionellen Chromosomenanalyse bereits bekannten Gewinne von Chromosom 7 und Verluste der Chromosomen/arme 9p und 10 (Bigner et al., 1997; Shapiro, 2002). Glioblastome sind in der Regel hypotetraploid. Dabei sind relative chromosomale Verluste in diesen Tumoren häufiger als Gewinne. Systembedingt sind Verluste mit der CGH schlechter darstellbar (s. Kap. 4.2.) und wurden deshalb vermutlich nicht immer erkannt. In den untersuchten Glioblastomen (n=50) wurden insgesamt 171 chromosomale Gewinne gegenüber 199 Verlusten beobachtet.

Tab. 4.1: Prozentsatz der mit der Technik der CGH ermittelten häufigsten chromosomalen Aberrationen in Glioblastomen.

Veränderung	Häufigkeit (n = 178)*	eigene Daten (n = 50)
+7	51%	68%
-10	50%	58%
-9p	18%	32%

\* aus: Meta-Analyse CGH an Gliomen, Koschny et al., 2002

Deletionen der Chromosomenabschnitte 1p, 4q31q32, 11p und 11q, 13q13q14, 14q21q23, 14q24q32, 17q22q24, 18q12q22, 19q und 22 stellen ebenfalls häufige Aberrationen in diesen Tumoren dar (Schröck et al., 1994; Schlegel et al., 1996; Schröck et al., 1996; Weber et al., 1996 a&b; Mohapatra et al., 1998; Brunner et al., 2000).

Amplifikationen wurden typischerweise für die Chromosomenabschnitte 7p12 (*EGFR*) (Schlegel et al., 1996; Weber et al. 1996a; Mohapatra et al., 1998) und 12q13-q15 (*GLI*, *MDM2*, *CDK2*, *CDK4*, *SAS* und *GAS*) gezeigt. Amplifikationen von Regionen, in denen andere als amplifiziert bekannte Gene lokalisiert sind, z.B. 1q31 (*Renin*), 4q11q12 (*PDGFRA*), 7q31 (*MET*) und 8q24 (*cMYC*), lagen selten vor (Schröck et al., 1994; Weber et al., 1996 a&b; Mohapatra et al., 1998). Mit der CGH konnten auch Amplifikationsregionen auf

1p34pter, 5p, 11p, 11q13 und 11q22q23, 12p, 13q32q34, 14q21q22, 15p, 17q22qter, 18p, 20p und 22q12 nachgewiesen werden (Schröck et al., 1994; Schlegel et al., 1996; Schröck et al., 1996; Weber et al., 1996 a&b; Mohapatra et al., 1998; Brunner et al., 2000).

Diese hohe Anzahl chromosomaler Veränderungen spiegelt sowohl die Komplexität der genetischen Veränderungen als auch die ausgeprägte intratumorale Heterogenität in Glioblastomen wider.

In der eigenen Studie an 50 Glioblastomen konnten alle charakteristischen Veränderungen wie Kopienzahlvermehrungen auf Chromosom 7 bzw. Amplifikationen der *EGFR*-Region auf 7p12 und Kopienzahlvermehrungen bzw. Amplifikationen auf 12q gezeigt werden. Auch die glioblastomtypischen DNA-Verluste von Chromosom 10 bzw. 10q, 9p und 13q wurden mit einer ähnlichen Häufigkeit wie aus der Literatur bekannt nachgewiesen (s. Tab. 4.1.).

Gewinne auf Chromosom 7 stellen in über 60% der Fälle die häufigste - sowohl mit zytogenetischen als auch molekularzytogenetischen Methoden - beobachtete Kopienzahlvermehrung in Glioblastomen dar (Jenkins et al., 1989; Thiel et al., 1992; Koschny et al., 2002; Wiltshire et al., 2004). In dieser Studie lagen Zugewinne auf diesem Chromosom in 70% der untersuchten Glioblastome vor. Diese umfassten in 16 Tumoren das komplette Chromosom, in 5 Tumoren waren bestimmte Regionen sowohl auf dem kurzen als auch dem langen Arm von Chromosom 7 vermehrt. Gewinne auf dem kurzen Arm waren in sechs, auf dem langen Arms in neun Tumoren nachweisbar. Diese Kopienzahlvermehrungen traten nahezu ausschließlich in primären Glioblastomen auf. In den weitaus seltener auftretenden sekundären Glioblastomen war in lediglich 14% (1/7) ein Teil von Chromosom 7 vermehrt, betroffen war der distale Bereich des langen Arms in der Region 7q31.3qter.

Zusätzlich zu diesen Kopienzahlvermehrungen zeigten 12% der primären Glioblastome eine Amplifikation in der Region 7p12. Das in dieser Region lokalisierte *EGFR*-Gen stellt mit bis zu 40% das am häufigsten in Glioblastomen amplifizierte Gen dar, wobei die Amplifikation mit einer signifikanten Erhöhung der mRNA einhergeht (Libermann et al., 1985; Henn et al., 1986; Wong et al., 1987; Watanabe et al., 1996; Tohma et al., 1998). Diese stellt ein spezifisches Ereignis in primären Glioblastomen dar. Sie wird nur sehr selten in anaplastischen Astrozytomen und sekundären Glioblastomen beobachtet (von Deimling et al., 1992a; Tohma et al., 1998; Chakravarti et al., 2001; Smith et al., 2001; Schmidt et al., 2002). Auch eine Überexpression von EGFR wird weitaus häufiger in primären (60%) als in sekundären (10%) Glioblastomen nachgewiesen (Watanabe et al., 1996), korreliert aber nicht zwingend mit einer Amplifikation des Gens. Typischerweise geht diese *EGFR*-Amplifikation in Glioblastomen mit einem simultanen Verlust von Chromosom 10 einher (von Deimling et al., 1992; Lang et al., 1994; Batchelor et al., 2004), was sich auch in den eigenen Befunden bestätigen ließ.

Allelverluste (LOH) auf Chromosom 10 stellen in über 80% der Fälle die häufigste genetische Veränderung sowohl in primären als auch in sekundären Glioblastomen dar. In anaplastischen Astrozytomen liegen sie weniger häufig (40%) und nur selten in niedriggradigen Astrozytomen vor (Rasheed et al., 1992; von Deimling et al., 1992a, Karlbom et al., 1993; Rasheed et al., 1995; Albarosa et al., 1996; Kimmelman et al., 1996; Sonoda et al., 1996; Fults et al., 1998; Ichimura et al., 1998). Die hohe Inzidenz von Verlusten auf Chromosom 10 wurde auch mit CGH-Studien in vergleichbarer Häufigkeit bestätigt und auch in den eigenen Untersuchungen in fast 60% der untersuchten Glioblastome gezeigt. Ein LOH auf Chromosom 10 wurde sowohl in bis zu 100% der Glioblastome in Verbindung mit einer *EGFR*-Amplifikation als auch in bis zu 80% der Glioblastome mit einer *TP53*-Mutation beobachtet, weshalb eine entscheidende Rolle sowohl bei der Entstehung der primären Glioblastome als auch bei der Progression zum sekundären Glioblastom vermutet wird (von Deimling et al., 1992a; Lang et al., 1994; Leenstra et al., 1998). Auch die in dieser Arbeit verwendete molekularzytogenetische Methode konnte diese 100%ige Korrelation bestätigen. In den primären Glioblastomen ist meist das komplette Chromosom betroffen, bei sekundären Glioblastomen gehen häufiger nur Teile dieses Chromosoms verloren (Tohma et al., 1998; Fujisawa et al., 2000). Auch in den 2/6 sekundären Glioblastomen der eigenen Studie beschränkte sich der Verlust auf den langen Arm von Chromosom 10. Da in dieser Arbeit nicht nach *TP53*-Mutationen gesucht wurde, sind keine Aussagen zu eventuellen Korrelationen möglich.

In den untersuchten Tumoren war meist das ganze Chromosom 10 bzw. der komplette lange Arm deletiert, Konsensusregionen lagen nicht vor. Somit können keine Rückschlüsse getroffen werden, ob bevorzugt gewisse Kandidatengene wie z.B. *PTEN/MMAC1* auf 10q23.31 (Li et al., 1997; Steck et al., 1997) oder *DMBT1* (deleted in malignant brain tumors 1) auf 10q24q25 (Mollenhauer et al., 1997) involviert sind. Der gewählte methodische Ansatz lässt auch keine Aussagen über homozygote Deletionen oder Punktmutationen dieser Kandidaten-Gene zu, die in 50-60% der Glioblastome für *PTEN* gezeigt werden konnten (Rasheed et al., 1997; Wang et al., 1997; Boström et al., 1998; Duerr et al., 1998; Fults et al., 1998).

Homozygote komplette, aber auch interstitielle Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 9 in der Region 9p21 sind ebenfalls sehr häufige genetische Alterationen in malignen Gliomen und werden je nach Untersuchungsmethode in bis zu 50% der Fälle gezeigt (Olopade et al., 1992; Jen et al., 1994; Schmidt et al., 1994; Nishikawa et al., 1995; Ichimura et al., 1996; Ueki et al., 1996; Biernat et al., 1997; Ichimura et al., 2000; Koschny et al., 2002; Wiltshire et al., 2004). Die in der Region 9p21 lokalisierten Tumorsuppressorgene *CDKN2A/p16* und *CDKN2B/p15* kodieren für drei unterschiedliche Genprodukte und sind auf unterschiedliche Weise in die Zellzykluskontrolle involviert. Die Genprodukte von *p16* und

*p15* wirken als Inhibitoren der cyclinabhängigen Kinasen CDK4 und CDK6, indem sie deren Fähigkeit zur RB1-Phosphorylierung blockieren. Ihre Inaktivierung wird hauptsächlich durch Deletionen verursacht und resultiert in der ungestörten Phosphorylierung von pRB durch den Cyclin D-CDK4-Komplex und letztendlich in unkontrolliertem Zellwachstum. Dagegen greift *p14<sup>ARF</sup>*, welches einen alternativen Leserahmen von *CDKN2A* darstellt, direkt über die Aktivierung von *MDM2* in die *TP53* vermittelte Zellzyklussteuerung ein (Serrano et al., 1994; Saxena et al., 1996).

Die eigenen Untersuchungen zeigten übereinstimmend mit der Literatur in über 30% der Glioblastome Verluste auf 9p. Da diese Deletionen größtenteils die Region 9p21 betrafen bzw. überspannten, ist von einem Verlust der in dieser Region lokalisierten Tumorsuppressorgene auszugehen. Ob es sich jedoch um heterozygote, homozygote Deletionen oder eine Promotor-Hypermethylierung handelt, die zu einer reduzierten oder fehlenden Expression führen, kann im Rahmen dieses methodischen Ansatzes nur spekuliert werden.

Eine durch Deletion oder Mutation verursachte Inaktivierung des auf Chromosom 13q14 lokalisierten Tumorsuppressorgens *RB1* stellt mit ca. 35% ein ebenfalls häufiges Ereignis in Glioblastomen dar und führt zu den gleichen funktionellen Konsequenzen wie die oben genannten Veränderungen von *CDKN2A/B* oder Amplifikationen des auf 12q lokalisierten *CDK4*-Gens (Smith & Jenkins, 2000; Koschny et al., 2002; Collins, 2004). Dabei scheint die p16-Expression der Tumorzellen negativ mit der von pRB korreliert zu sein. In Tumoren mit normaler pRB-Expression wurde eine verringerte bzw. keine p16-Expression nachgewiesen, im Gegenzug war bei inaktiviertem pRB die p16-Expression normal. Glioblastome haben also entweder einen Defekt in p16 oder pRB, während beide Gene eher selten im gleichen Tumor inaktiviert vorliegen (Goussia et al., 2000; Shapiro, 2002). Die CGH-Analyse zeigte in ca. 30% der eigenen Fälle Verluste auf Chromosom 13 und 9p. Ein sich gegenseitiges Ausschließen von Veränderungen auf 9p und 13q wurde nicht grundsätzlich bestätigt.

Amplifikationen der Region 12q13q15 wurden in bis zu 12% der mit CGH untersuchten Glioblastome gezeigt (Weber et al. 1996a; Schlegel et al., 1996; Mohapatra et al., 1998), Kopienzahlvermehrungen in bis zu 30% (Koschny et al., 2002). Bei den eigenen Untersuchungen wurden Amplifikationen von 12q13q15 bzw. Gewinne auf 12q in vergleichbarer Häufigkeit mit 5 bzw. 30% der Tumore nachgewiesen. Diese Veränderungen waren ausschließlich den primären Glioblastomen zuzuordnen und lagen auch in der Literatur nur selten in sekundären Glioblastomen vor (Biernat et al., 1997).

Auch unter Berücksichtigung der methodischen Grenzen der CGH-Analyse konnten generell die differenten Entstehungswege der beiden Tumorentitäten, die zur selben prognostisch

ungünstigen Erkrankung führen, aufgrund der vorliegenden genetischen Veränderungen bestätigt werden (s. Abb. 1.3.).

Als neuer Befund konnten Verluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 den primären Glioblastomen zugeordnet werden, während Verluste auf dem langen Arm dieses Chromosoms nur in den sekundären Glioblastomen auftraten. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei diesen Alterationen um weitere chromosomale Marker handelt, welche die genetischen Unterschiede der beiden Entstehungswege widerspiegeln. Eine Ausweitung dieser Untersuchung auf eine größere Fallzahl vor allem der eher seltenen sekundären Glioblastome wäre für diese Fragestellung erforderlich, da die eigenen Ergebnisse im Gegensatz zu einer Studie an 31 primären und 25 sekundären Glioblastomen stehen, die eine nahezu identische Verteilung dieser Veränderungen in beiden Glioblastomtypen ergab (Wiltshire et al., 2004). Eine spezifische Untersuchung möglicher Konsensregionen sowie eine Überprüfung potentieller Tumorsuppressorgene bzw. Onkogene sollten weitere Informationen liefern.

Ein weiteres Charakteristikum der Glioblastome wie der meisten malignen menschlichen Tumoren ist eine genetische Instabilität. Dabei werden 2 Typen unterschieden: Eine kleinere Gruppe von Tumorentitäten zeigt eine Instabilität auf Nukleotidebene, die durch einen Defekt von DNA-Reparaturmechanismen verursacht wird. Dies resultiert in einer gesteigerten Mutationsrate sowie einer Mikrosatelliteninstabilität (MIN) (Lengauer et al., 1998; Michor et al., 2005). Die Mehrzahl der soliden Tumoren zeigt jedoch eine Instabilität auf chromosomaler Ebene (CIN). Dabei treten Verluste oder Gewinne von kompletten bzw. lichtmikroskopisch erkennbaren größeren Teilen von Chromosomen auf, die zu einem aneuploiden Chromosomensatz und vermehrten Allel-Verlusten (LOH) führen. Die Folge sind Veränderungen der Kopienzahl von einem oder mehreren Genen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen sowie Unterschiede in der Genexpression. Aneuploidie und chromosomale Instabilität sind häufig mit der Progression zu höhergradigen, invasiven Tumoren assoziiert und gehen mit einer schlechteren Prognose einher (Borel et al., 2002).

Eine frühere Studie unserer Arbeitsgruppe konnte mittels FISH-Analysen mit Zentromer-spezifischen Sonden eine Aneuploidie der Chromosomen 8, 12 und 18 in Glioblastomen zeigen (Loeper et al., 2001). Die eigenen Befunde ergaben, dass noch weitere Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte wie 1p, 3, 5p, 6q, 12qter, 15qter, 16p, 17, 19 und 22 eine Anfälligkeit für Fehlverteilungen bzw. strukturelle Umbauten zeigen. Dies bestätigt zum Teil auch die CGH-Metaanalyse von Koschny et al. (2002). Ob jedoch allein genetische Mechanismen für die chromosomale Instabilität (CIN) verantwortlich sind, ist Gegenstand der aktuellen Studien (Lengauer, 2005). Auch epigenetische Veränderungen werden mittlerweile in diesem Zusammenhang vermutet. Als weitere Faktoren werden pathologische Besonderheiten der Spindelstruktur diskutiert, da abnormale Zentrosomen und

Spindeln in vielen Tumoren identifiziert werden konnten (Mitelman, 1994). Darüber hinaus konnte eine am Institut für Humangenetik angefertigte Dissertation zeigen, dass es selbst bei intakt erscheinendem bipolarem Spindelapparat zu einer erheblichen und chromosomenspezifischen Aneuploidierate in Glioblastomen kommt. Die Befunde sprechen für Zentromer- bzw. Kinetochor-spezifische und gegen Spindel-spezifische Mechanismen (Dissertation Dr. A. Klein). Um weiter zu klären, ob alle bzw. welche dieser Auffälligkeiten eher Ursache denn Konsequenz der chromosomalen Instabilität sind, ist ein weitaus tieferes Verständnis über die die Integrität des Genoms sichernden Mechanismen nötig (Lengauer et al., 1998).

#### **4.4. Prognostisch relevante klinische Faktoren für ein Ansprechen der Glioblastompatienten auf Chemotherapie**

Trotz der allgemeinen Fortschritte in der Medizin und der Erprobung neuer chemotherapeutischer Ansätze ist der Erfolg selbst multimodaler Therapiekonzepte für die Prognose von Patienten mit malignen Gliomen stark limitiert. Vergleiche unterschiedlicher chemotherapeutischer Ansätze konnten keinen Vorteil eines bestimmten Therapieschemas aufzeigen (Deutsch et al., 1989; Shapiro et al., 1992; Selker et al., 2002; Stewart, 2002). Aufgrund der allgemein guten Verträglichkeit sowie der geringen Nebenwirkungen wird in vielen Einrichtungen Temozolomid zur adjuvanten Behandlung eingesetzt. Obwohl Patienten mit diesen Tumoren generell eine sehr ungünstige Prognose haben, werden sehr große individuelle Unterschiede in ihrem Ansprechverhalten beobachtet, die sich in einer zum Teil überdurchschnittlich langen Überlebenszeit manifestieren.

In der eigenen Studie konnte der positive Einfluss von Temozolomid nach vorangegangener Operation und Radiotherapie der Glioblastompatienten gezeigt werden. Die mediane Überlebenszeit dieser Patientengruppe lag bei 19,2 Monaten im Vergleich zu 7,5 Monaten von Patienten mit alleiniger postoperativer Radiotherapie. Die Überlebenszeiten der Patienten mit Radiotherapie stimmen mit den aus der Literatur bekannten Zeiten von 7,7 - 12,1 Monaten überein, die Überlebenszeit der Patienten in der TMZ-Gruppe war gegenüber 13,4-16 Monaten in der Literatur leicht erhöht (Stupp et al., 2001a; Athanassiou et al., 2005; Stupp et al., 2005). Bisherige Arbeiten zeigten lediglich einen Effekt dieser Therapieform auf die progressionsfreie Überlebenszeit und keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Young et al., 2000; Brada et al., 2001; Stewart, 2002), d.h. das einmal eingetretene Rezidiv führt dramatisch schnell zum Tode. Da bisherige Studien sowohl Patienten mit Glioblastom als auch mit anaplastischem Astrozytom eingeschlossen hatten und letztere bekanntermaßen eine längere Überlebenszeit aufweisen, könnten abweichende Ergebnisse auf nicht vergleichbare Studienprotokolle zurückzuführen sein. Auch wurden in bisher publizierten

Arbeiten sehr unterschiedliche Chemotherapieansätze mit einer Temozolomid-Chemotherapie verglichen, so dass kein direkter Vergleich der jeweiligen Arbeiten möglich ist.

Im Laufe der letzten Jahre wurden zudem klinische und histopathologische Faktoren gezeigt, die sich als prognostisch relevant für die Überlebenszeit von Glioblastompatienten herausgestellt haben. Dazu zählen auch die in der eigenen Studie bestätigten Parameter eines jüngeren Lebensalters sowie eines höheren Karnofsky Performance-Status (Burger & Green, 1987; Nakamura et al., 2000; Kunwar et al., 2001; Reavey-Cantwell et al., 2001; Kleihues et al., 2002; Schmidt et al., 2002). Eine aktuelle Arbeit konnte zeigen, dass sowohl die Diagnostik mit bildgebenden Verfahren (MRI vs. CT) als auch die Behandlung (Probenbiopsie vs. Totalresektion, die Wahl der Strahlenquelle sowie die Fraktionierung der Bestrahlung) sich bei jüngeren und älteren Patienten nicht signifikant unterschieden. Unterschiede in der Patientenversorgung sind somit nicht für die schlechtere Prognose der älteren Patienten verantwortlich (Lutterbach et al., 2005). Bei zerebralen Lymphomen wird die schlechtere Prognose der älteren Patienten durch gleichzeitig vorliegende, zusätzliche Erkrankungen diskutiert (Corry et al., 1998), Studien einer diesbezüglichen Korrelation bei Glioblastompatienten stehen jedoch noch aus.

Interessanterweise konnte in den eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass gerade der negative Faktor eines höheren Patientenalters durch die TMZ-Behandlung kompensiert wurde. Die unterschiedliche Prognose bei jüngeren und älteren Gliompatienten ist von erheblichem Interesse. In diesem Zusammenhang wurde von der Neuroonkologischen Arbeitsgruppe (NOA) eine Studie ins Leben gerufen, die das Ansprechen alter Patienten (>65 Jahre) auf Temozolomid und Radiotherapie, auch unter Berücksichtigung prognostischer molekularer Parameter sowie möglicher Resistenzmechanismen (MGMT), untersuchen soll (Methvsalem/NOA-08: Temozolomid (one week on/one week off) versus Strahlentherapie in der Primärtherapie anaplastischer Astrozytome und Glioblastome bei älteren Patienten).

#### **4.5. Genetische Veränderungen als prognostische Parameter**

Um zu überprüfen, ob das Ansprechen der Patienten auf die Temozolomid-Chemotherapie mit bestimmten genetischen Veränderungen korreliert, wurden alle Glioblastome mithilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung auf ihre chromosomalen Veränderungen hin untersucht und die erhaltenen Befunde mit den Patientendaten korreliert.

Bekanntlich werden bei oligodendroglialen Tumoren (partielle) Verluste der Chromosomenarme 1p und 19q bereits als Marker für die Überlebenszeit und das

Ansprechen der Patienten auf eine Chemotherapie eingesetzt (von Deimling et al., 2000; Kraus et al., 2001; Reifenberger & Louis, 2003; Felsberg et al., 2004).

Ein gutes Ansprechen auf PCV-Chemotherapie ist bei Oligodendrogliomen mit Verlusten auf den Chromosomenarmen 1p und 19q positiv korreliert und wurde unabhängig vom Tumorgrad gezeigt (Caincross et al., 1998, Hartmann et al., 2004). Vorläufige Ergebnisse an einem kleinen Patientenkollektiv zeigten auch einen positiven Einfluss von Verlusten auf Chromosomenarm 1p auf das Ansprechverhalten dieser Tumore auf Temozolomid-Therapie (Chahlavi et al., 2003). Bei Oligoastrozytomen und Glioblastomen wurde dieser Effekt bisher nicht nachgewiesen (Smith et al., 2000), obwohl diese genomischen Alterationen auch in Glioblastomen, wenngleich in einer geringeren Häufigkeit mit ca. 10% LOH auf Chromosom 1p und bis zu 30% LOH auf 19q, auftreten (von Deimling et al., 1992, 1994 a,b, 2000; Schmidt et al., 2002).

Der bei den oligodendroglialen Tumoren gezeigte Effekt eines besseren Ansprechverhaltens auf die Chemotherapie ist offenbar vor allem von dem Verlust auf 1p abhängig. Für Tumoren mit einem Verlust von 19q ohne einen 1p-Verlust wurde er nicht gezeigt (von Deimling et al., 2000). Da letzterer jedoch in Glioblastomen weniger häufig als der Verlust von 19q auftritt, war eine aussagekräftige statistische Auswertung, welche weitere prognostische Parameter, wie z.B. Patientenalter und eine Interaktion mit anderen genetischen Markern mit einbezieht, aufgrund zu seltener Ereignisse bisher nicht möglich.

Außerdem führt die von uns verwendete Methode der CGH zu gelegentlichen Interpretationsschwierigkeiten bei den Besonderheiten der Region 1p36 und von Chromosom 19 (hoher GC-Gehalt), so dass die Ergebnisse mit Zurückhaltung zu bewerten sind.

Die für Glioblastome typischen genetischen Veränderungen der Chromosomen 7, 9, 10 und 12 wurden in einer vergleichbaren Häufigkeit sowohl in der TMZ-behandelten als auch in der TMZ-unbehandelten Kontrollgruppe gefunden (s. Kap. 3.4.) und stellten die Grundlage für die statistische Auswertung dar. Lediglich für die Verluste auf dem langen Arm von Chromosom 13 lag ein größerer prozentualer Unterschied vor (28% in der TMZ-Gruppe und 42% in der Kontroll-Gruppe). Da dieses Ereignis insgesamt weniger häufig in Glioblastomen vorliegt, führen bereits wenige Veränderungen zu einer größeren Abweichung in den Ergebnissen und sind deswegen als vorläufig zu betrachten.

#### **4.5.1. Gewinn von Chromosom 7 und Amplifikation von 7p12 (*EGFR*)**

Bereits in niedriggradigen Astrozytomen (WHO Grad II) konnten Kopienzahlvermehrungen von Chromosom 7 mit einer kürzeren Überlebenszeit korreliert werden (Wessels et al.,

2002). Eine CGH-Studie an anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III) zeigte ebenfalls den negativen prognostischen Einfluss von Gewinnen auf 7p sowie eines höheren Patientenalters, wobei diese beiden Effekte voneinander unabhängig waren (Kunwar et al., 2001).

Die überwiegende Mehrzahl der Studien bezüglich eines möglichen prognostischen Einflusses von Veränderungen auf Chromosom 7 in höhergradigen Gliomen konzentriert sich auf eine *EGFR*-Amplifikation bzw. Überexpression. So wird der Überexpression eine Bedeutung bei der relativen Resistenz von Glioblastomen gegenüber Strahlentherapie zugesprochen (Barker et al., 2001). Des Weiteren wird ein negativer prognostischer Einfluss der Amplifikation auf die Überlebenszeit der Patienten diskutiert. Einige Arbeitsgruppen konnten eine schlechtere Prognose bei *EGFR*-Amplifikationen sowohl bei der damit häufig einhergehenden Überexpression sowohl von Wildtyp-*EGFR* als auch der mutierten *EGFRvIII*-Variante zeigen (Chakravarti et al., 2001; Muracciole et al., 2002, Shinojima et al., 2003, Arslantas et al., 2004). Demgegenüber verneinen die Meta-Analyse von Huncharek & Kupelnick (2000) und die Studien von Burton et al. (2002), Simmons et al. (2001), Smith et al. (2001) und Chakravarti et al. (2005) einen prognostischen Einfluss von *EGFR*-Amplifikationen bzw. Überexpression. Die Arbeiten von Simmons et al. (2001), Smith et al. (2001) und Batchelor et al. (2004) wiesen jedoch nach, dass ältere Patienten mit einer Überexpression bzw. Amplifikation eine bessere Prognose als jüngere Patienten mit dieser Veränderung haben. Die gleiche Tendenz zeigten auch Schmidt und Mitarbeiter (2002), wengleich in ihrer Studie das Ergebnis keine Signifikanz erreichte.

*EGFR* liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 7. Im Hinblick auf die widersprüchlichen Befunde wurde eine Kopienzahlvermehrung des kurzen Arms von Chromosom 7 auf einen möglichen prognostischen Effekt hin untersucht. Ein negativer prognostischer Effekt dieser genetischen Veränderung wurde nicht gezeigt. Da hier Kopienzahlvermehrungen keine *EGFR*-Amplifikation bedeuten, aber trotzdem eine Überexpression erfolgen kann, sind Vergleiche nur indirekt möglich. Trotz der nicht gleichzusetzenden Aussagen bezüglich Kopienzahlvermehrungen von Chromosom 7p und der Überexpression wurde die aus der Literatur bekannte positive Korrelation mit einem höherem Patientenalter bestätigt (Barker F et al., 2001; Simmons et al., 2001; Schmidt et al., 2002; Shinojima et al., 2003). Die multivariate Analyse ergab weiterhin, dass gerade ältere Patienten eine verlängerte Überlebenszeit nach der TMZ-Chemotherapie haben. Ob dieser Effekt allein auf die TMZ-Therapie zurückzuführen ist oder den Zusammenhang zwischen *EGFR*-Amplifikation/Überexpression, Alter und Prognose (Simmons et al., 2001; Smith et al., 2001; Batchelor et al., 2004) widerspiegelt, kann an unserem Material nicht beantwortet werden, da aufgrund einer zu kleinen Anzahl an Patienten in dieser Altersgruppe ohne diese Veränderung keine Berechnung möglich ist (s. Tab. 3.5.). Die Befunde zeigen jedoch bereits

sehr deutlich, dass in diesen Tumoren Interaktionen einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren für das Ansprechverhalten der Patienten verantwortlich sind.

#### 4.5.2. Verluste von 9p

In bis zu 40% aller untersuchten Glioblastome findet man Deletionen der auf Chromosom 9p21 lokalisierten Tumorsuppressorgene *CDKN2A/p16* und *CDKN2B/p15* (Olopade et al., 1992; Schmidt et al., 1994; Nishikawa et al. 1995; Ichimura et al., 1996; Jen et al., 1996). Darüber hinaus wird in einigen malignen Gliomen eine reduzierte oder fehlende p16-Expression ohne mikroskopisch erkennbare 9p-Deletion nachgewiesen, weshalb ein anderer Mechanismus der p16 Inaktivierung vorliegen muss (Nishikawa et al., 1995). So konnten einige Arbeiten bereits eine transkriptionelle Stilllegung des *p16*-Gens durch eine Promotor-Hypermethylierung nachweisen (Merlo et al., 1995; Fueyo et al., 1996). Immunhistochemische Studien zeigten eine prognostische Bedeutung eines p16-Proteinverlusts. Der Verlust ging in hochgradigen Astrozytomen (WHO Grad III und IV) mit einer schlechteren Prognose einher (Miettinen et al., 1999, Newcomb et al., 1998; Kirla et al., 2000). Bestätigt wurde dieser Befund durch LOH-Studien bzw. Deletionsuntersuchungen von 9p bzw. *p16* (von Deimling et al., 2000; Rasheed et al., 2002). Weiterhin konnte ein negativer prognostischer Effekt bei älteren Patienten mit einem p16 Proteinverlust bzw. einer Deletion beobachtet werden (Newcomb et al., 1998; Batchelor et al., 2004). Eine negative Prognose für Glioblastompatienten mit dieser Veränderung wurde bisher nicht nachgewiesen (Miettinen et al., 1999). Die aufgeführten Arbeiten bezogen sich meist auf hochgradige Astrozytome, unterschieden aber nicht zwischen anaplastischem Astrozytom Grad III und Glioblastom. Nur in wenigen Fällen wurde das Alter der Patienten als zusätzlicher Faktor berücksichtigt; nach dessen Korrektur verlor sich die Signifikanz. Allen Arbeiten ist gemeinsam, dass sie nie einen Einfluss der Therapie (Teilbiopsie oder Kompletresektion, Bestrahlung oder Chemotherapie) in die Auswertung miteinbezogen.

Auch in der chemotherapeutisch unbehandelten Kontrollgruppe dieser Arbeit konnte ein negativer prognostischer Effekt, gemessen in einer verkürzten Überlebenszeit von 4,7 Monaten gegenüber 9,4 Monaten beobachtet werden, wenn keine 9p-Deletion vorlag. Sowohl die Kaplan-Meier Analyse als auch die univariate Cox-Regressionsanalyse ermittelten jedoch umgekehrt einen signifikanten überlebenszeitverlängernden Effekt der TMZ-Therapie bei Patienten mit dieser genetischen Veränderung. Dieser Effekt blieb auch in der multivariaten Analyse nach Alterskorrektur bestehen, so dass altersbedingte Effekte hier auszuschließen sind. Homozygote Deletionen des *CDKN2A* Gens auf 9p21 konnten in anaplastischen Oligodendrogliomen als Indikator für eine schlechte Prognose und eine schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie gezeigt werden (Cairncross et al., 1998). Diese

Deletionen wurden jedoch nur in Fällen ohne LOH auf 1p beobachtet. Auch für Glioblastome mit oligodendroglialer Komponente liegen ähnliche Befunde vor (Kraus et al., 2001; Fuller et al., 2003). Für oligodendrogliale Tumoren wurde zudem eine Assoziation von 9p Deletionen bzw. *CDKN2A* Alterationen mit dem Auftreten von Nekrosen und mikrovaskulärer Proliferation gezeigt. Eine stärkere Vaskularisierung kann eine Erklärung für das bessere Ansprechverhalten auf Chemotherapie liefern (Godfraind et al., 2003). Diese könnte auch der Grund für das bessere Ansprechverhalten der Glioblastom-Patienten auf die TMZ-Chemotherapie sein, wenngleich eine positive Korrelation dieser genetischen Veränderung mit einer erhöhten Vaskularisierung noch nicht gezeigt wurde. Es könnte sich bei dem positiven Effekt auch um einen unspezifischen Mechanismus handeln, da Deletionen von *CDKN2A* zu einer verstärkten Zellproliferation führen und Chemotherapeutika vor allem in proliferierenden Zellen wirksam sind.

Lag diese Deletion auf 9p nicht vor, zeigte die multivariate Cox-Regressionsanalyse einen negativen und durch TMZ-Chemotherapie kompensierbaren Alterseffekt. Da in den Tumoren ohne 9p-Verlust meist eine Deletion auf 10q vorlag, könnte dieses Ergebnis die Besonderheiten der Patientengruppe mit 10q-Verlust widerspiegeln.

#### 4.5.3. Verluste von Chromosom 10

LOH-Studien haben bereits eine negative prognostische Bedeutung genetischer Veränderungen auf Chromosom 10 gezeigt (Rasheed et al., 2002; Schmidt et al., 2002). So wurde ein LOH in der *PTEN*-Region auf 10q24 mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten korreliert (Balesaria et al., 1999; Tada et al., 2001; Terada et al., 2002). Mutationen des *PTEN*-Gens selbst bestätigten dieses Phänomen überraschenderweise nicht (James et al., 1999; Kraus et al., 2000; Smith et al., 2001; Schmidt et al., 2002).

Auch in der eigenen Arbeit wurde in der Kontrollgruppe die schlechtere Prognose von Patienten mit 10q-Verlust bestätigt. Die aus der Literatur bekannte positive Korrelation dieser genetischen Veränderung mit höherem Patientenalter wurde ebenfalls gezeigt.

Umgekehrt wird, wie beim 9p-Verlust, unter TMZ-Chemotherapie ein positiver Effekt eines 10q-Verlustes auf die Überlebenszeit der Patienten beobachtet. Er ist wahrscheinlich durch einen damit einhergehenden heterozygoten Verlust von *MGMT* bedingt.

Das auf 10q26 lokalisierte *MGMT*-Gen kodiert für ein Reparatur-Enzym, welches die Wirkung alkylierender Substanzen aufhebt und somit eine Erklärung für den geringen Effekt der Chemotherapie liefern kann. Der Verlust dieses Proteins konnte mit einer Hypermethylierung der *MGMT*-Promotor-Region korreliert werden (Esteller et al., 1999). In neueren Arbeiten wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der *MGMT*-Promotor-

Hypermethylierung und einer verbesserten Ansprechrate auf Temozolomid nachgewiesen (Esteller et al., 2000; Hegi et al., 2004 & 2005; Paz et al., 2005). Die antagonistische Wirkung von MGMT auf alkylierende Chemotherapeutika hängt direkt von der Menge des vorhandenen Proteins ab, da für jeden Transfer einer Alkylgruppe vom O<sup>6</sup>-Guanin ein MGMT-Molekül inaktiviert wird (Srivenugopal et al., 1996). Der heterozygote Verlust des Gens würde maximal in einem Dosiseffekt und einer geringen Proteinmenge resultieren. Ein kompletter Proteinverlust käme dann erst nach homozygotem Verlust, z.B. durch Deletion des einen und der epigenetischen Stilllegung des *MGMT*-Gens durch Hypermethylierung des anderen Allels zustande.

Nach Alterskorrektur war dieser Effekt in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse nicht mehr signifikant (s. Tab. 3.10.). Die multivariate Analyse ergab jedoch, dass gerade ältere Patienten mit einem 10q-Verlust von der TMZ-Chemotherapie profitieren. Dies ist insofern von besonderem klinischem Interesse, als ein höheres Patientenalter mit einer ungünstigen Prognose einhergeht, diesen Patienten aber oft aufgrund ihres meist schlechteren Allgemeinzustandes eine belastende Chemotherapie nicht zugemutet wird.

Ausgehend von den Studien einer *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung und dem Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Alkylanzien stellt sich die Frage, ob diese Hypermethylierung, möglicherweise über einen Dosis-Effekt mit einer homozygoten Inaktivierung von *MGMT*, in einem unterschiedlichen Ansprechverhalten resultiert.

#### 4.5.4. Verluste auf Chromosomenarm 13q

Auf Chromosom 13q14 ist das wie bei vielen anderen Tumoren auch in Glioblastomen inaktivierte Tumorsuppressorgen *RB1* (Retinoblastom-Gen) lokalisiert. Die Inaktivierung kann durch Deletionen, Mutationen oder Methylierung hervorgerufen werden und führt zu den gleichen funktionellen Konsequenzen wie *CDKN2A/B* Mutationen oder *CDK4/6* Amplifikationen. In Gliomen waren sowohl Alterationen von *RB1* als auch der ebenfalls für den *RB1*-Regelkreis kodierenden Gene *CDKN2A*, *CDKN2B* und *CDK4* mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten korreliert (Bäcklund et al., 2003). Auch bei Kopf-Hals-Tumoren, Brustkrebs und Myelomen (Kroger et al., 2004; Li et al., 1994; Eiriksdottir et al., 1998) wurde bei Deletionen auf 13q ein negativer prognostischer Effekt für den Patienten gezeigt. Ein prognostischer Effekt einer reduzierten oder fehlenden pRB Expression in Gliomen wurde bisher nicht nachgewiesen (Chakravarti et al., 2001).

In der relativ kleinen Glioblastom-Patientengruppe mit dieser Veränderung zeigte sich eine sehr kurze Überlebenszeit von 4,8 Monaten ohne TMZ-Therapie, und von 20 Monaten mit Therapie ( $p < 0,005$ ). Nach Einbeziehen weiterer prognostischer Faktoren wie Alter und der Kombination Alter mit Chemotherapie in der multivariaten Cox Analyse war dieser Nutzen

nicht mehr signifikant. Die multivariate Analyse ergab einen negativen prognostischen Effekt eines höheren Patientenalters. Dieser war jedoch unabhängig von einer Veränderung auf Chromosomenarm 13q. Bei einem Miteinbeziehen der Therapie wurde deutlich, dass ältere Patienten mit einem Verlust auf 13q von der TMZ-Chemotherapie profitierten, nicht jedoch ohne 13q-Verlust. Da dieses Ereignis jedoch insgesamt selten in Glioblastomen aufzufinden ist, können bereits geringe Änderungen der Fallzahl zu einer größeren Abweichung führen. Weiterhin ist denkbar, dass die vorliegenden Korrelationen auf parallel vorliegende, in diesem Zusammenhang nicht berücksichtigte Ereignisse zurückzuführen sind, da z.B. die Expression von pRB bekanntermaßen invers mit der von p16 korreliert. D.h. Glioblastome haben entweder einen Defekt in p16 oder pRB und liegen eher selten im gleichen Tumor inaktiviert vor (He et al., 1994; Schmidt et al., 1994; Ueki et al., 1996; Goussia et al., 2000).

#### **4.5.5. Weitere genetische Veränderungen in Glioblastomen**

Neben den diskutierten genetischen Veränderungen der Chromosomen 7, 9, 10 und 13 stellen auch Gewinne auf Chromosomenarm 12q bzw. Amplifikationen der Region 12q13q15 ein relativ häufiges und tumorspezifisches Ereignis in Glioblastomen dar. Die Häufigkeit im eigenen Untersuchungsmaterial entsprach den Literaturergebnissen. *EGFR* auf 7p12.1 ist das am häufigsten, *CDK4* auf 12q14 das am zweithäufigsten in Glioblastomen amplifizierte Onkogen. *MDM2* (12q14.3q15) liegt seltener amplifiziert vor (Collins, 1995 & 2004; Galanis et al., 1998). Bei einer zusammenfassenden Betrachtung von Veränderungen des *RB1*-Regelkreises (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDK4* und *RB1*) wurde eine Korrelation mit einer kürzeren Überlebenszeit nachgewiesen (Bäcklund et al., 2003). Eine Korrelation zwischen einer *CDK4*-Genamplifikation allein und der Überlebenszeit der Patienten bzw. einem Ansprechen auf Chemotherapie wurden bisher nicht gezeigt (Galanis et al., 1998; Bäcklund et al., 2003).

Auch die eigenen Untersuchungen ergaben keine Korrelation von Kopienzahlvermehrungen auf 12q mit einem prognostischen Effekt. Allerdings können die hier erhobenen Befunde nicht mit den aus der Literatur bekannten Befunden gleichgesetzt werden, da die CGH keine Aussage zulässt, welches Gen in dem nachgewiesenen Amplikon amplifiziert bzw. co-amplifiziert ist. Eine direkte Aussage bezüglich der *CDK4*-Amplifikation ist nicht möglich.

#### **4.6. Expressionsanalyse von MGMT mittels realtime PCR**

Seit der Einführung 1987 (Mullis & Faloona, 1987) wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) standardmäßig zum Nachweis und Amplifikation von definierten DNA-Sequenzen eingesetzt. Herkömmliche PCR-Reaktionen sind recht zeitintensiv. So dauert eine

konventionelle PCR zwei bis vier Stunden; zur Auswertung müssen die Proben im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem DNA-bindenden Farbstoff, z.B. Ethidiumbromid oder SYBR®Green, angefärbt werden. Die Auswertung erfolgt in der Regel semiquantitativ mit densitometrischen Methoden. Ein weiterer Nachteil der konventionellen PCR ist, dass man die Reaktion nicht verfolgen kann und somit nicht sieht, wann die Reaktion die exponentielle Phase verlässt und die Plateau-Phase erreicht.

Bei der realtime PCR erfolgen Reaktion und Auswertung in einem geschlossenen System, was eine erhebliche Zeitersparnis mit sich bringt. Durch die Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen wird weiterhin eine Detektion der gebildeten Produkte ermöglicht, wodurch die Reaktion „online“ verfolgt werden kann. Ein Nachteil dieser Methode besteht in ihrer Unfähigkeit, die Länge des Amplikons anzuzeigen. Die Schmelzkurvenanalysen ermöglichen lediglich, zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren zu unterscheiden. Eine Unterscheidung der Produkte selbst ist nur bei unterschiedlichen Schmelztemperaturen möglich. Ähnliche Schmelztemperaturen erfordern eine zusätzliche gelelektrophoretische Untersuchung.

Nach der erfolgreichen Etablierung der realtime-PCR bestätigten die eigenen MGMT-Expressionsdaten die aus der Literatur bekannten Zusammenhänge recht deutlich, wenngleich anhand der geringen Fallzahl keine statistisch signifikanten Ergebnisse erzielt werden konnten. Aufgrund der Gewebeverfügbarkeit konnte die für die Expressionsanalyse notwendige RNA-Isolierung nur an Tumorgewebe von Patienten, die der TMZ-Gruppe angehörten, durchgeführt werden.

Eine Studie der „Southwest Oncology Group“ (Jäckle et al., 1998) konnte die MGMT-Expression als einen unabhängigen prognostischen Faktor von Alter, KPS und Histologie auf das Gesamtüberleben der Patienten nachweisen, allerdings nach BCNU-Therapie. Die eigenen Befunde zeigten eine längere Überlebenszeit TMZ-chemotherapierter Patienten mit einer geringen MGMT-Expression (20,2 vs. 13,2 Monate, statistisch nicht signifikant).

Weiterhin lag eine positive Korrelation eines jüngeren Patientenalter und einer geringeren MGMT-Expression vor. Eine Alterskorrelation wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Immunhistochemische Assays zeigten ebenfalls eine geringere MGMT-Expression bei jüngeren Patienten (Jäckle et al., 1998), während Expressionsstudien mit RT-PCR eine inverse Korrelation der MGMT-Expression mit dem Alter nachweisen konnten (Rolhion et al., 1999; Silber et al., 1998). Interessanterweise lag in den eigenen Befunde eine signifikant geringere MGMT-Expression in Tumoren von weiblichen Patienten vor ( $P=0,01$ ). Diese Korrelation wurde auch von Rolhion und Mitarbeitern (1999) nachgewiesen. Wodurch die geschlechtsspezifischen Expressionsunterschiede jedoch begründet sind und ob sie in einem unterschiedlichen Ansprechverhalten auf Chemotherapie resultieren, ist bisher nicht

bekannt. In den eigenen Untersuchungen konnte kein relevanter Unterschied zwischen den medianen Überlebenszeiten von Männern und Frauen unter TMZ-Chemotherapie gezeigt werden (19,7 vs. 21,2 Monate). Diese Befunde veranschaulichen sehr deutlich, dass die ursächlichen prognostischen Parameter recht schwer zu bestimmen sind und weitere, sich möglicherweise synergistisch beeinflussende Parameter wie MGMT-Status, Alter, Geschlecht, aber auch andere genetische Veränderungen in der statistischen Auswertung berücksichtigt werden müssen.

Die naheliegende Korrelation der Expressionsdaten zu MGMT mit den CGH-Befunden auf Chromosomenarm 10q konnte nicht gezeigt werden. Neben dem bereits diskutierten Einfluss der intratumoralen Heterogenität auf diese Ergebnisse kann das unterschiedliche Auflösungsvermögen der molekularzytogenetischen bzw. molekulargenetischen Methode dafür verantwortlich sein, da der Verlust einzelner Gene mit CGH nicht darstellbar ist. Wie bereits in Kapitel 4.5.3. diskutiert, ist wahrscheinlich, dass ein heterozygoter Verlust des Gens maximal in einem Dosiseffekt und einer geringen Proteinmenge resultiert. Ein kompletter Proteinverlust käme dann erst nach homozygotem Verlust, z.B. durch Deletion des einen und der epigenetischen Stilllegung des *MGMT*-Gens durch Hypermethylierung des anderen Allels zustande. Untersucht wurde dieser Zusammenhang bisher jedoch noch nicht.

#### **4.7. Immunhistochemische Analyse von MGMT**

Zentrale Reagenzien der immunhistochemischen Analysen sind Immunglobuline oder Antikörper. Für repräsentative Ergebnisse ist es wichtig, Antikörper mit einer hohen Spezifität und geringen Kreuzreaktivität einzusetzen, die durch Interaktionen mit ähnlichen oder sogar völlig unterschiedlichen Epitopen hervorgerufen werden. Für die Bindungseffizienz und Gewebepenetration ist im Allgemeinen die Größe und Form der Antikörpermoleküle von untergeordneter Bedeutung, wohingegen eine ausgeprägte Überfixierung der Zellen durch Formalin die Penetration der Antikörper und ihrer Komplexe erschwert.

Eine entscheidende Rolle für die Qualität der immunhistochemischen Färbung spielen die sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren Antikörpertiter, Inkubationszeit und Temperatur. Dabei ist der Antikörpertiter so zu wählen, dass bei höchster Verdünnung des Antiserums eine optimale spezifische Färbung bei minimalem Hintergrund erreicht wird. Die optimalen Bedingungen wurden für den eingesetzten MGMT-Antikörper und die zu untersuchenden Tumor- und Kontroll-Gewebe durch Vorversuche bestimmt.

Die Detektion des Antigens kann bei der direkten Methode durch einen enzymmarkierten bzw. direkt fluoreszenzmarkierten Primärantikörper mit dem Gewebeantigen erfolgen und wird mit einer nachfolgenden Chromogen-Substrat-Reaktion abgeschlossen. Bei fluoreszenzmarkierten Antikörpern entfällt diese Detektion. Da jedoch keine

Signalverstärkung durchgeführt wird, ist diese Methode nicht sehr sensitiv. Bei der indirekten Methode bindet zunächst ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Danach wird ein gegen diesen Primärantikörper gerichteten, enzymmarkierten Sekundärantikörper aufgetragen. Den Abschluss stellt die Substrat-Chromogen-Reaktion dar. Da diese Methode flexibler und sensitiver als die direkte Methode ist, wurde sie in dieser Arbeit verwendet. Parallel zu den Versuchen mit *MGMT*-spezifischem Antikörper wurden Negativkontrollen ohne den Primärantikörper durchgeführt. Nur wenn keine Hintergrundfärbung durch den Sekundärantikörper vorlag, erfolgte die Auswertung der Präparate. Eine Hintergrundfärbung kann auch durch hydrophobe oder elektrostatische Interaktionen hervorgerufen werden. Diese Hydrophobie tritt in unterschiedlichem Ausmaß bei den meisten Proteinen auf und wird durch die Seitenketten der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan hervorgerufen. Sie gehört zu den natürlichen Kräften, die der Tertiärstruktur der Proteine Stabilität verleihen, wirkt aber auch zwischen unterschiedlichen Proteinmolekülen und verleiht gebildeten Immunkomplexen Stabilität. Auch die Fixierung mit aldehydhaltigen Fixativen wie Formalin kann die Bildung chemischer Quervernetzungen induzieren und dadurch einen partiellen oder vollständigen Verlust der Immunreaktivität der Antigene verursachen. Dies wird auch als „Maskierung“ des Antigens bzw. Epitops bezeichnet. Zur Verbesserung der Immunreaktivität formalinfixierter Gewebeanigene wurden deshalb, neben dem Einsatz von proteolytischen Enzymen, Methoden entwickelt, welche Erhitzen mit Mikrowellen und Citrat-Pufferlösungen (pH 6, 95-99°C) (Shi et al., 1991; Cattoretti et al., 1994) einsetzen. Der Mechanismus dieser Antigendemaskierung, auch Antigen Retrieval (AR) genannt, ist weitgehend ungeklärt. Hitze scheint jedoch dazu beizutragen, den Schaden, der durch die Formalinfixierung und Paraffineinbettung entstanden ist, zumindest teilweise rückgängig zu machen. Diese „strapaziöse“ Vorbehandlung kann aber auch zu einem Ablösen der Präparate führen, wie es zum Teil auftrat. Zur Unterdrückung einer endogenen Peroxidase-Aktivität, verursacht z.B. durch Diffusion von Blut in das Gewebe vor der Fixierung, wurde eine Inkubation mit 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung durchgeführt. Auch physikalische Verletzungen (Quetschartefakte) und Austrocknung des Gewebes vor der Fixierung oder unvollständige Infiltration des Gewebes mit dem Fixativ sowie unvollständige Entparaffinisierung können zu diffusen Färbungen und falsch positiven Ergebnissen führen.

In diesem Teil der Arbeit sollte gezeigt werden, ob sich der durch eine verringerte Proteinmenge von *MGMT* beschriebene positive, überlebenszeitverlängernde Effekt einer TMZ-Chemotherapie auf hochgradige Gliome (Esteller et al., 1999; Hegi et al., 2004; Paz et al., 2005; Hegi et al., 2005) auch in dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv von Glioblastomen bestätigen lässt. In diesem Zusammenhang sollte weiterhin überprüft werden, ob in Tumoren mit einer heterozygoten Deletion des langen Arms von Chromosom 10 in der Region des *MGMT*-Gens in einer verringerten Proteinmenge korreliert.

Das Patientenkollektiv bestand ursprünglich aus 11 TMZ-behandelten Fällen und 14 nicht TMZ-behandelten Kontrollen. Leider stellte sich heraus, dass infolge eines Kommunikationsfehlers nur 2 der 11 TMZ-behandelten Fälle zu meinem Kollektiv gehörten. Weder diese beiden Präparate der TMZ-Gruppe noch die 14 der Kontroll-Gruppe ergaben einen direkten Zusammenhang zwischen Verlusten des langen Arms von Chromosom 10 und einem negativen MGMT-Proteinnachweis.

Dies mag zum einen in der Heterogenität dieser Tumore begründet sein, da jeweils unterschiedliche Bereiche desselben Tumors mit den jeweiligen Methoden untersucht wurden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass bereits das durch eine heterozygote MGMT-Aktivität gebildete Protein noch ausreicht und sich der positive Nutzen einer Chemotherapie erst bei einem kompletten Proteinverlust äußert. Dieser kommt erst nach der Ausschaltung beider Allele zustande, z.B. durch Deletion des einen und der epigenetischen Inaktivierung des verbleibenden Allels (Esteller et al., 1999).

Da MGMT bekanntermaßen sowohl Tumor- als auch normale Zellen vor alkylierenden Agentien wie TMZ schützt (Gerson, 2002), wird diesem Protein-Verlust eine entscheidende Rolle für das Ansprechen von Glioblastom-Patienten auf die TMZ-Chemotherapie zugesprochen (Esteller, 2005b; Hegi et al., 2005; Paz et al., 2005).

In der TMZ-Gruppe lag die Überlebenszeit des einen Patienten (T4789), in dessen Tumorprobe kein MGMT-Protein nachgewiesen werden konnte, bei überdurchschnittlichen 55 Monaten. Die CGH konnte allerdings keine Deletion auf 10q zeigen. Der Verlust des Proteins kann durch eine unterhalb der Auflösungsgrenze der CGH liegenden Deletion von *MGMT* und/oder einer epigenetischen Inaktivierung des Gens verursacht sein. Überraschenderweise erreichte auch der andere Patient mit MGMT-positivem Tumor (1782/98) eine überdurchschnittlich lange Überlebenszeit von 24 Monaten. Dieser Befund erscheint außerordentlich wichtig, da er darauf hin deutet, dass es alternative Mechanismen geben muss, die auch in Anwesenheit von MGMT-Protein eine Wirksamkeit von TMZ ermöglichen.

In chemotherapeutisch unbehandelten niedriggradigen Astrozytomen, aber auch in anderen Tumoren wie z.B. Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass Patienten mit MGMT-positiven Tumoren eine schlechte Prognose haben (Matsukara et al., 2001; Cayre et al., 2002; Komine et al., 2003). Dieser negative prognostische Effekt eines Aktivitätsverlusts von MGMT wird auch bei Glioblastomen vermutet und als eine mit der epigenetischen Stilllegung von *MGMT* einhergehenden Akkumulation von Mutationen gedeutet (Esteller & Herman, 2004).

Die Befunde in der TMZ-unbehandelten Kontroll-Gruppe (n=14) zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Überlebenszeiten der Patienten mit MGMT-positiven bzw. MGMT-

negativen Tumoren, so dass diese Daten die Hypothese nicht bestätigen. Ferner lag, wie bei den beiden TMZ-behandelten Patienten, keine Korrelation der immunhistochemischen Befunde mit den CGH-Ergebnissen vor. Wie bereits oben diskutiert ist es möglich, dass zum einen eine Deletion von *MGMT* aufgrund der Heterogenität der Tumore und der geringen Auflösungsgrenze der CGH nicht nachgewiesen wurde. Zum anderen kann auch eine *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung allein, wie bereits unter Kapitel 4.5.2 diskutiert, oder in Kombination mit einer Deletion des anderen Gens den Proteinverlust verursacht haben.

Aufgrund der wenigen zur Verfügung stehenden Daten erbrachte auch der Vergleich der Befunde der TMZ-behandelten Patienten mit denen der Kontroll-Gruppe keinen Informationsgewinn, so dass eine abschließende Beurteilung der diskutierten Effekte und Korrelationen eine Ausweitung der Fallzahl notwendig macht.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde gezeigt, dass die immunhistochemische Darstellung von *MGMT* sowohl in normalem als auch in nicht-neoplastischen Hirngewebe eine Kernfärbung verursachen kann. Diese war sowohl in endothelialen, inflammatorischen und ependymalen Zellen, aber auch in Astrozyten und Oligodendroglia sichtbar. Wenngleich die endothelialen Zellen leicht von den neoplastischen Zellen unterschieden werden können, kann die in den höhergradigen Gliome vorliegende nicht-neoplastische, *MGMT*-positive Komponente fälschlicherweise für Tumorzellen gehalten werden. Da dieser Anteil nicht-neoplastischer Zellen mit unter 10% angegeben wird (Nakasu et al., 2004), liegt er unterhalb der von mir angelegten Grenze nach Berücksichtigung der parallel untersuchten Normalhirngewebeschnitte. Um letztendlich sicherzustellen, dass es sich bei den untersuchten Zellen um repräsentative Tumorzellen handelt, wäre es sinnvoll, spezifische Tumormarker simultan darzustellen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang zudem die Etablierung einer Kombination aus der immunhistochemischen Darstellung von *MGMT*-Protein mit einer Fluoreszenz - in situ - Hybridisierung der chromosomalen Region 10q26.

Da es sich bei der immunhistochemischen Untersuchung um „Momentaufnahmen“ handelt und sich *MGMT* beim Schutz der Zellen vor alkylierenden Substanzen selbst verbraucht, kann neben diesen Untersuchungen an einer entsprechend großen Fallzahl die weitere Analyse eines möglichen Dosis-Effektes z.B. durch Deletion in Kombination mit einer epigenetischen Stilllegung des *MGMT*-Gens zu einer genaueren Aussage des Einflusses von *MGMT* auf ein Therapieansprechen führen.

#### **4.8. Methylierungsanalyse**

Der wichtigste epigenetische Einfluss auf die Genregulation in Eukaryonten stellt die Methylierung von Cytosinresten an der 5'-Position des Pyrimidinringes dar. Das

Vorhandensein von CpG-Nukleotiden in der Promotor-Region bestimmter Gene beeinflusst die Bindung von Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen an die DNA, wie z.B. Methyl-DNA bindende Proteine und die die Chromatinstruktur modifizierenden Histon-Deacetylasen. Durch die Blockierung der Transkription kommt es zur Stilllegung des entsprechenden Gens, so dass der Methylierung der Cytosin-Reste eine Schlüsselrolle in der Regulation der Genexpression zukommt (Fraga & Esteller, 2002).

Bis vor wenigen Jahren war die Untersuchung einer DNA-Methylierung nur durch Methylierungs-sensitive Restriktionsenzyme möglich, die zwischen unmethylierten und methylierten Schnittstellen unterschieden. Die Nachteile dieser Methode liegen in der Limitierung der Untersuchungen auf bestimmte Regionen und einem möglichen inkompletten Schneiden dieser Restriktionsstellen. Auch eine Auflösung auf Einzelmolekül-Niveau ist nicht möglich und bei einer kombinierten Southern Blot Technik anstelle einer PCR-Reaktion werden relativ große Mengen hochmolekularer DNA benötigt (Esteller, 2005 a & b).

Die mittlerweile am weitesten verbreitete Methode zum Nachweis von 5-Methylcytosin ist die von Frommer et al. (1992) und Clark et al. (1994) entwickelte Bisulfitbehandlung der DNA, welche unmethyliertes Cytosin (C) in Uracil (U) umwandelt, nicht jedoch methyliertes C (5-mC). Durch die nachfolgende PCR werden alle U's in T's umgewandelt. Die in der Endsequenz verbleibenden C's sind auf 5-mC's in der ursprünglichen Sequenz zurückzuführen.

In Kombination mit einer Amplifikation durch spezifische PCR-Primer (MS-PCR), kombinierter Restriktions-Analyse oder genomischer Sequenzierung wurde es für nahezu jedes Labor möglich, DNA-Methylierung zu untersuchen. Durch diese Technik wurde sowohl die quantitative als auch die akkurate Bestimmung des Methylierungsstatus eines Allels, sogar auf Einzelzell-Niveau möglich.

Da die Bisulfitmodifikation einzelsträngige DNA erfordert, ist eine vorhergehende DNA-Denaturierung nötig (Fraga & Esteller, 2002). Die häufig auftretende partielle Denaturierung der DNA, entweder durch inkomplette Trennung der Stränge oder eine Wiederanlagerung während der Reaktion, kann zu falsch positiven Nachweisen von 5-Methylcytosin führen (Frommer et al., 1992; Fraga & Esteller, 2002; Warnecke et al., 2002). Dies kann durch den Einsatz stark fragmentierter DNA und der Verwendung frisch angesetzter NaOH-Lösung verhindert werden (Warnecke et al., 2002). Auch Proteinreste können eine komplette Bisulfitumwandlung der DNA verhindern, wodurch es zu einer offenbar zufälligen nicht-CpG-Methylierung kommt. Daher sollte nur möglichst reine DNA z.B. durch vorhergehenden Proteinase K-Verdau eingesetzt werden. Auch eine inkomplette Desulfonierung nach der Bisulfitbehandlung kann Probleme verursachen. So verhindern Reste der Bisulfitlösung eine adäquate Alkalisierung der Lösung, welche bei einem pH <9 die Pyrimidin-Desulfonierung

stark verlangsamt und letztendlich die DNA-Polymerase die Ziel-DNA nicht repliziert (Thomassin et al., 1999).

Der Erfolg dieser Methode ist somit hauptsächlich von der kompletten Umwandlung der Cytosine in Uracil abhängig, wobei die maximale Umwandlungsrate bei 55°C nach 4-18 h sowie bei 95°C nach 1 Stunde erreicht wird. Dabei werden zwischen 84-96% der DNA degradiert (Grunau et al., 2001), so dass alle bisulfit-assoziierten Methoden eine nachfolgende PCR-Amplifikation der modifizierten DNA benötigen. Da die DNA-Stränge nach der Bisulfitumwandlung nicht mehr komplementär zueinander sind, stellt das Primerdesign einen wichtigen und kritischen Schritt dar. Es ist jedoch ausreichend, Primer für einen Strang zu entwerfen, da davon ausgegangen wird, dass die Methylierung symmetrisch vorliegt (Eden et al., 1994; Tomatsu et al., 2002).

Die am weitesten verbreitete Methode nach Bisulfitumwandlung stellt die methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) dar (Herman et al., 1996). Sie differenziert zwischen methylierter und unmethylierter DNA, lässt jedoch keine Aussage der Methylierung auf Nukleotid-Ebene oder einer Quantifizierung und Identifizierung einer zellulären Heterogenität zu. Eine genauere Analyse ist nur durch eine Sequenzierung möglich. Erfolgt diese direkt im Anschluss an die PCR, müssen mehr als 10% der DNA methyliert vorliegen, um nachgewiesen werden zu können (Myöhänen et al., 1994).

Die sensitivste Methode stellt die Verwendung von PCR, nachfolgender Klonierung der PCR-Fragmente in Plasmidvektoren mit der anschließenden Sequenzierung zahlreicher einzelner Klone dar (Frommer et al., 1992; Clark et al., 1994). Diese auch in der eigenen Arbeit angewandte Methode ist zwar sehr zeit- und kostenintensiv, ihr Vorteil ist jedoch die Analyse aller Methylierungsstellen auf Nukleotid-Ebene sowie eine Darstellung möglicher Methylierungsmuster der jeweiligen Tumoren (Clark et al., 2002). Um eine Amplifikation der bisulfitmodifizierten DNA unabhängig ihres Methylierungsmusters zu erzielen, wurden „methylierungsunabhängige“ Primer verwendet, die außerhalb von CpG-Nukleotiden lokalisiert sind. Die Detektion einer 10%igen Methylierung, vergleichbar mit der MS-PCR, erfordert rein rechnerisch 10 sequenzierte Klone, der Nachweis einer 1%igen Methylierung 100 Klone.

Die erste beschriebene Veränderung einer aberranten DNA-Methylierung in menschlichen Tumorzellen war die Beobachtung einer globalen Hypomethylierung (Feinberg & Vogelstein, 1983). Eine ursprünglich vermutete Assoziation dieser genomischen Hypomethylierung mit einer Überexpression von Onkogenen wurde nicht bestätigt, wird jedoch in Zusammenhang mit einer generellen Chromosomeninstabilität diskutiert. Parallel mit der globalen Hypomethylierung des Genoms der Tumorzelle, die mit steigender Malignisierung zunimmt, erfolgt eine Hypermethylierung der CpG-Inseln, welche in den Promotor-Regionen von

Tumorsuppressorgenen lokalisiert sind (Fraga et al., 2004). Diese liegen normalerweise unmethyliert vor, erfahren in Tumorzellen aber eine starke Hypermethylierung, welche zu einer Stilllegung des Gens führt. Erstmals konnte eine Promotor-Hypermethylierung 1989 für das *Rb1*-Tumorsuppressorgen gezeigt werden (Greger et al., 1989). Den eigentlichen Anfang epigenetischer Studien stellt wohl die Entdeckung einer CpG-Hypermethylierung als weit verbreiteter Mechanismus der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung von *CDKN2A* in menschlichen Tumoren dar (Herman et al., 1995; Merlo et al., 1995). Mittlerweile sind eine Vielzahl potentieller Tumorsuppressorgene in unterschiedlichen Tumoren bekannt, die nicht nur durch Mutation, sondern auch durch eine Promotor-Hypermethylierung inaktiviert werden und dabei eine entscheidende Rolle bei der Tumorigenese spielen. Nicht jedes dieser Gene ist in jeder Tumorentität hypermethyliert, vielmehr liegt eine starke Gewebespezifität vor. So ist z.B. die Promotor-Hypermethylierung von *BRCA1* hauptsächlich auf Brust- und Ovarial-Karzinome beschränkt, während *CDKN2A* in vielen Tumortypen wie z.B. Lungen-, Brust- und Colontumoren, Kopf-Halstumoren sowie Gliomen hypermethyliert vorliegt. Generell ist eine steigende Anzahl von hypermethylierten Genen mit höherem Malignitätsgrad korreliert (Fraga et al., 2004).

Die funktionelle Signifikanz einer Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen wird ebenfalls bei einer Betrachtung der Konsequenzen einer Allel-Inaktivierung deutlich. Nach Knudson's two hit Modell erfolgt eine phänotypische Konsequenz erst nach der Inaktivierung beider Allele eines Tumorsuppressorgens. In diesem Zusammenhang konnten Studien belegen, dass es zu einer funktionellen Geninaktivierung aufgrund einer stabilen Mutation des einen und einer Hypermethylierung des anderen Allels im Tumor kommen kann. Hierbei scheint die Hypermethylierung das zweite, inaktivierende Ereignis darzustellen, das angeblich nur in der Promotorregion des Wildtyp-Allels und nicht im mutierten Allel auftritt (Jones & Baylin, 2002).

#### **4.8.1. *CDKN2A* und *CDKN2B***

Die auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 lokalisierten Tumorsuppressorgene *CDKN2A* und *CDKN2B* kodieren für die Proteine p16 und p15, welche durch Inhibieren der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 den G1/S-Phase-Übergang negativ regulieren (Ruas et al., 1998; Roussel, 1999). Beide Gene liegen bekanntermaßen in anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen (Olapade et al., 1992; Jen et al., 1994; Schmidt et al., 1994; Ueki et al., 1994; Nishikawa et al., 1995; Ichimura et al., 1996; Steilen-Gimbel et al., 1999; Ichimura et al., 2000), aber auch in einer Vielzahl von weiteren menschlichen Tumoren homozygot deletiert vor (Ruas et al. 1998; Roussel, 1999).

Neben der homozygoten Deletion von *CDKN2A* und *CDKN2B* konnte die in Gliomen vorliegende transkriptionelle Stilllegung zudem mit einer Hypermethylierung von CpG-Nukleotiden in der Promotorregion dieser Gene assoziiert werden (Merlo et al., 1995; Fueyo et al., 1996; Herman et al., 1996). Homozygote Deletionen von *CDKN2A* und *CDKN2B* liegen in 20-50% der untersuchten Gliome vor, während Mutationen mit 0-3% der Fälle ein seltenes Ereignis darstellen (Jen et al., 1994; Nishikawa et al., 1995; Ueki et al., 1996; Hegi et al., 1997). Demgegenüber variiert der Prozentsatz der hypermethylierten Tumore in der Literatur beträchtlich. Für *CDKN2A* werden von weniger als 5% (Hegi et al., 1997; Schmidt et al., 1997; Nakamura et al., 2000; Yu et al., 2004) bis hin zu etwa 60% Promotor-Hypermethylierungen nachgewiesen (Fueyo et al., 1996; Park et al., 2000). Allerdings liegt eher eine partielle denn komplette Hypermethylierung aller möglichen CpG-Nukleotide der *CDKN2A*-Promotor-Region vor, welche auch unabhängig vom Malignitätsgrad des Glioms auftritt (Costello et al., 1996). Neben den Glioblastomen wurde eine epigenetische Stilllegung des *CDKN2A*-Gens auch für anaplastische Astrozytome (Grad III), niedriggradige Astrozytome (Grad II) sowie Oligoastrozytome Grad II und III beschrieben (Costello et al., 1996; Fueyo et al., 1996; De Souza Nascimento et al., 2001; Nakamura et al., 2001a; Wolter et al., 2001; Fan et al., 2002; Watanabe et al., 2003). Bezüglich Veränderungen von *CDKN2B* liegen weitaus weniger Daten in der Literatur vor. Die Promotor-Hypermethylierung von *CDKN2B* ist in oligodendroglialen Tumoren (Grad II und III) (Wolter et al., 2001; Uhlmann et al., 2003) und in den niedriggradigen und anaplastischen Oligoastrozytomen relativ häufig anzutreffen (Wolter et al., 2001; Uhlmann et al., 2003). Demgegenüber scheint sie in den Astrozytomen - wenn überhaupt - nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da sie bisher nur sehr selten in den niedriggradigen Astrozytomen und in den wenigen untersuchten Glioblastomen nie gezeigt wurde (Uhlmann et al., 2001; Yu et al., 2004).

Die für die vorliegenden Untersuchungen etablierte und verwendete Methode ermöglicht es, eine in den Tumorzellen heterogen verteilte sowie eine nur partiell vorliegende Hypermethylierung nachzuweisen und erhöht somit im Vergleich zur methylierungsspezifischen PCR (MS-PCR) die Auflösungsgrenze. In den bisher untersuchten beiden anaplastischen Oligoastrozytomen sowie den beiden Glioblastomen wurde weder eine Promotor-Hypermethylierung von *CDKN2A* noch *CDKN2B* gezeigt. Da der Expressionsverlust von p16 und p15 hauptsächlich durch die homozygote Deletion der entsprechenden Gene verursacht und eine Hypermethylierung lediglich zur Aufrechterhaltung des Expressionsverlustes diskutiert wird, wäre es unter diesem Aspekt sinnvoll, sowohl Daten bezüglich des Methylierungsstatus als auch ergänzend die Expression sowie Deletionen der Tumorsuppressorgene zu erheben und diese mit der Prognose und dem Ansprechverhalten der Patienten auf Chemotherapie zu korrelieren. Dadurch könnte dann definitiv geprüft werden, ob der therapeutische Nutzen der

angewandten TMZ-Chemotherapie von Patienten auf eine Deletion von 9p und den Verlust der Tumorsuppressorgene *CDKN2A/B* zurückzuführen ist.

#### 4.8.2. *MGMT*

Eine CpG-Hypermethylierung stellt sowohl einen Marker für Tumorzellen dar, spielt aber auch eine Rolle als Marker für das Tumorverhalten oder das Ansprechverhalten auf die Behandlung.

Letzteres ist für die O<sup>6</sup>-Methylguaninmethyltransferase *MGMT* zutreffend. Diese kodiert für ein DNA-Reparatur-Enzym, welches Alkylreste von der O<sup>6</sup>-Position eines Guaninrestes entfernt und die Zelle somit vor zytotoxischen und mutagenen Einflüssen schützt (Pegg 1990; Pegg et al., 1995). Da diese Base den Hauptangriffspunkt einer Vielzahl von alkylierenden Chemotherapeutika an die DNA darstellt, wären Tumoren ohne *MGMT* aufgrund einer Promotor-Hypermethylierung sensitiver gegenüber diesen Agenzien. Die Schäden würden nicht mehr repariert und führten somit zum Zelltod (Esteller et al., 1999). Diese Korrelation wurde für Gliompatienten sowohl nach BCNU-Behandlung, als auch nach TMZ-Chemotherapie gezeigt. Ohne alkylierende Chemotherapie stellt die *MGMT* Promotor-Hypermethylierung jedoch einen ungünstigen prognostischen Parameter dar (Hayashi et al., 2002; Kohya et al., 2002; Brabender et al., 2003; Komine et al., 2003; Esteller & Herman, 2004), wahrscheinlich durch die mit der epigenetischen Stilllegung von *MGMT* bedingte Akkumulation von Mutationen. Diese Mutationen entstehen, da bei der DNA-Replikation O<sup>6</sup>-Methylguanin von der DNA-Polymerase fälschlicherweise als Adenin abgelesen wird, wodurch es zu einer bevorzugten Paarung von O<sup>6</sup>-Methylguanin mit Thymin kommt, d.h. es erfolgt eine Konversion von G/C zu A/T Paaren (Coulondre and Miller 1977; Horsfall et al., 1990). Dieser Effekt konnte bereits für *TP53* und *K-ras* sowohl in Hirntumoren als auch in kolorektalen Tumoren und Lungentumoren gezeigt werden (Esteller et al., 1999; Nakamura et al., 2001b; Yin et al., 2003; Watanabe et al., 2005). Vorhandenes funktionales *MGMT* verhindert diesen mutagenen Effekt (Pegg et al., 1995). Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass für jeden Transfer einer Alkylgruppe vom O<sup>6</sup>-Guanin ein *MGMT*-Molekül inaktiviert wird, welches anschließend mittels Ubiquitinierung degradiert wird (Srivenugopal et al., 1996). Wie stark *MGMT* als Antagonist der alkylierenden Chemotherapeutika wirkt, hängt somit direkt von der Menge des vorhandenen Proteins ab. Eine inverse Korrelation der Stärke der Promotor-Hypermethylierung mit einer *MGMT*-Expression konnte bereits in Gliom-Zelllinien gezeigt werden (Costello et al., 1994).

Eine verstärkte Sensitivität von Gliompatienten auf alkylierende Agenzien konnten immunhistochemische Untersuchungen mit einer reduzierten *MGMT*-Aktivität bzw. einem Proteinverlust korrelieren (Silber et al., 1993; Belanich et al., 1996; Jaeckle et al., 1998;

Gerson, 2002). Als Ursache für diesen MGMT-Aktivitätsverlust wurde von Esteller und Mitarbeitern (1999) eine aberrante *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung nachgewiesen. Nachfolgend konnten diese ihre Hypothese einer Hypermethylierung mit einem guten Ansprechen auf Chemotherapie, sowie eine längere Überlebenszeit und eine längere progressionsfreie Überlebenszeit von Gliompatienten unter BCNU-Therapie bestätigen (Esteller et al., 2000b; Balana et al., 2003). Dieser Effekt wurde auch für Cyclophosphamid (Mattern 1998, Cai et al., 1999; Friedman et al., 1999; Gamcsik et al., 1999), ACNU (Watanabe et al., 2005) und Temozolomid (Esteller et al., 2000b; Hegi et al., 2004; Paz et al., 2004; Hegi et al., 2005) gezeigt, jedoch nicht für Cisplatin (Mattern et al., 1998) oder die Kombination aus Temozolomid mit Cisplatin (Balana et al., 2003).

In den bisher erschienenen Studien wurde in ca. 40% der untersuchten Gliome eine *MGMT*-Hypermethylierung nachgewiesen (Esteller et al., 1999; Nakamura et al., 2001b; Yu et al., 2004; Watanabe et al., 2005). Dabei lag sowohl in den niedriggradigen Astrozytomen in bis zu 50% als auch in 50-80% der anaplastischen Astrozytome eine aberrante *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung vor. Bei den Glioblastomen war eine Hypermethylierung in 36% der primären und in 75% der sekundären Glioblastome vorhanden, so dass ein *MGMT*-Verlust als ein frühes Ereignis bei der Progression zu sekundären Glioblastomen diskutiert wird (Esteller et al., 1999; Nakamura et al., 2001b; Möllemann et al., 2005). In den oligodendroglialen Tumoren ist eine *MGMT*-Hypermethylierung sogar ein weitaus häufigeres Ereignis als in den rein astrozytären Tumoren. In der Studie von Möllemann und Mitarbeitern (2005) lagen in 90% der Oligodendrogliome (WHO Grad II und III) und in 85% der Oligoastrozytome (WHO Grad II und III) eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors vor. In der Mehrheit der hypermethylierten Tumoren resultierte dies in einer gegenüber Normalhirngewebe um mehr als 50% reduzierten Expression von MGMT. Weiterhin zeigte diese Studie, dass in oligodendroglialen Tumoren eine *MGMT*-Hypermethylierung signifikant häufiger in Tumoren mit Allelverlusten auf 1p und 19q auftritt (Möllemann et al., 2005).

Nach der erfolgreichen Etablierung der Methode war es möglich, eine in den Tumorzellen heterogen verteilte oder eine nur partiell vorliegende Hypermethylierung von MGMT nachzuweisen. Die untersuchte Kontroll-DNA aus Blut eines gesunden Spenders sowie ein Glioblastom (Fall 896/99) zeigten jeweils ca. 10% vollständig unmethylierte Klone, in den methylierten Klonen lagen maximal 35% der möglichen CpG's methyliert vor. Demgegenüber wurden bei dem zweiten Glioblastom (Fall 1460/99) und den beiden anaplastischen Oligoastrozytomen (Fall 1488/00 und Fall 820/00) ausschließlich hypermethylierte Klone nachgewiesen. Der Anteil methylierter CpG's in den untersuchten Klonen dieser Tumoren betrug dabei bis zu 95%. Bereits diese wenigen untersuchten Tumoren bestätigen die Literaturbefunde einer häufigen *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung sowohl in anaplastischen Oligoastrozytomen als auch in Glioblastomen. Stellt man diese

Methylierungsergebnisse in direkten Zusammenhang mit den Befunden aus der realtime PCR-Analyse, ist eine deutliche Korrelation eine verringerten MGMT-Expression der *MGMT*-Promotor-hypermethylierten Tumoren zu erkennen. Die beiden hypermethylierten anaplastischen Oligoastrozytome (1488/00, 820/00) zeigen eine geringe MGMT-Expression (RQV=0,015 bzw. 0,025). In Fall 820/00 lag ein Verlust auf 10q25.1q26.1 in der Region von *MGMT* vor, so dass in diesem Fall das Gen möglicherweise vollständig ausgeschaltet ist. In dem zweiten hypermethylierten anaplastischen Oligoastrozytom war mit CGH keine Deletion in der *MGMT*-Region nachweisbar. Da die Expression in diesem Tumor jedoch so gering war, ist eine unterhalb der Auflösungsgrenze liegende Deletion des *MGMT*-Gens sehr wahrscheinlich. Umgekehrt lag eine relativ hohe Expression (RQV=0,995) von MGMT in dem Glioblastom 896/99 ohne eine *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung vor. Hier ergab der CGH-Befund einen Verlust auf 10q in der *MGMT*-Region eines Chromosoms, d.h. bereits heterozygot vorhandenes *MGMT* resultiert in einer entsprechenden Proteinmenge. In dem Glioblastom 1460/99 wurde eine Hypermethylierung des Promotors sowie ein Gewinn in der *MGMT*-Region mit Hilfe der CGH nachgewiesen. Die Expression von MGMT liegt mit RQV=0,123 erheblich über den Werten der hypermethylierten Tumore mit bzw. ohne 10q Verlust. Trotz des mit CGH nachgewiesenen Gewinns in der *MGMT*-Region liegt der Wert der MGMT-Expression erheblich unter der Expression des Glioblastoms 896/99, in dem kein hypermethylierter *MGMT*-Promotor gefunden wurde. Bereits diese kleine Fallzahl verdeutlicht, dass die Promotor-Hypermethylierung eine entscheidende Rolle für die Stärke der MGMT-Expression spielt und bestätigt den aus der Literatur bekannten Zusammenhang einer geringeren Menge bzw. nicht vorhandenem MGMT durch epigenetische Stilllegung des Gens (Esteller, 2005b). Inwiefern sich ein direkter Einfluss homozygot oder heterozygot vorhandenem *MGMT* durch Deletion und/oder Promotor-Hypermethylierung zeigen lässt, kann nur eine höhere Fallzahl ergeben. Im Hinblick auf die *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung ist jedoch interessant, dass sich Klon- bzw. tumorspezifische Methylierungsmuster auszuprägen scheinen. Ob sich auch der Prozentsatz der methylierten CpG's, wie bereits beschrieben (Costello et al., 1994, Möllemann et al., 2005), auf die Stärke der Expression auswirkt, lässt sich mit den bisherigen Daten nicht zeigen. Denkbar wäre weiterhin, dass es für eine transkriptionelle Stilllegung ausreichend ist, wenn bestimmte CpG-Nukleotide methyliert vorliegen. Erst die Untersuchung einer größeren Fallzahl kann - nach gleichzeitiger Berücksichtigung weiterer prognostischer Parameter - zeigen, ob spezifische Methylierungsmuster der Promotorregion des einen Allels oder musterunabhängige Hypermethylierung das gute Ansprechverhalten der Patienten auf Chemotherapie bewirken (Dosiseffekt) oder, ob die deletionsbedingte Inaktivierung des zweiten Allels erforderlich ist. Dies würde klären, ob ein durch verschiedene genetische und epigenetische Mechanismen ausgelöster Dosis-Effekt zum gleichen Resultat, in diesem Fall

dem besseren Ansprechverhalten, führt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu überprüfen, ob auch in den Glioblastomen parallel vorliegende genetische Veränderungen, wie für die oligodendroglialen Tumoren beschrieben (Möllemann et al., 2005), zu dem besseren Ansprechverhalten der Patienten mit einem 10q-Verlust bzw. einer Promotor-Hypermethylierung von *MGMT* als positivem prognostischen Faktor beitragen.

#### **4.9. Ausblick und Vorschläge für weitere Untersuchungen**

Die vorgelegten Ergebnisse haben gezeigt, dass mit der im Vergleich zu einer molekulargenetischen Untersuchung relativ gering auflösenden vergleichenden genomischen Hybridisierung bereits gute Korrelationen zu der Wirksamkeit von Temozolomid beim Patienten gefunden werden können. Dabei überblickt die CGH das Gesamtgenom, zeigt also auch unerwartete Befunde, bzw. solche, nach denen nicht gezielt gesucht worden ist, während mit molekulargenetischen Ansätzen (z.B. Sequenzierung, SSCP, LOH) immer nur Informationen zu einzelnen Genen gewonnen werden, die gezielt untersucht werden. Aus den CGH-Befunden lässt sich jedoch keine Aussage über heterozygote oder homozygote Verluste treffen, so dass offen bleibt, welche der in diesen Regionen lokalisierten (und bekannten) Gene für das Tumorgeschehen und den Therapieerfolg jeweils relevant sind. Mittels weiterführenden molekulargenetischen Methoden sollte geklärt werden, ob die jeweils zweiten Allele dieser Gene ebenfalls durch Deletion, Mutation oder epigenetische Mechanismen, wie Promoter-Methylierung, inaktiviert werden. Auch die Wirksamkeit kombinierter heterozygoter Verluste oder Inaktivierungen mehrerer Gene wird diskutiert und ist beschrieben (Gendosis-Effekte). Bereits die reduzierte Expression eines DNA-Reparatur-Gens kann gegebenenfalls nicht mehr die Wirkung eines Zytostatikums verhindern. Der heterozygote Verlust eines Tumorsuppressorgens kann in Kombination mit anderen ebenfalls noch hemizygot aktiven Genen noch eine Apoptose erzwingen. Immunhistochemische Untersuchungen und solche mit Expressions-Arrays können hier weiterführende quantitative Ergebnisse über die Modulation der Genexpression liefern. Aus wissenschaftlichen Gründen ist es allerdings unverzichtbar, die beteiligten Gene, Wirkmechanismen und Dosisbeziehungen aufzuklären. Da diese Tumoren bekanntermaßen neben einer intertumoralen auch eine intratumorale Heterogenität aufzeigen, ist weiterhin denkbar, dass gerade durch die nachfolgende Strahlen- und Chemotherapie in vivo ein Selektionsvorteil bestimmter Klone entsteht.

Für die klinische Anwendung fragt sich allerdings, ob derartige Untersuchungen auf dem höheren Wissensstand dann für den konkreten Patienten noch sinnvoll und finanzierbar sind und die Ergebnisse in einem vernünftigen zeitlichen Abstand zur Operation erzielt werden können. Die CGH-Befunde können in ca. zwei Wochen nach Erhalt der Tumorbiopsie mitgeteilt werden, so dass diese Daten in der Nachsorge der Patienten bezüglich der an die

Operation anschließenden Chemotherapie nach etwa vier Wochen berücksichtigt werden können.

## 5. Zusammenfassung

Das Glioblastom, das typische Karzinom des Gehirns, gehört zu den bösartigsten Tumoren des Menschen. Es führt, behandelt wie unbehandelt zum Tode. Eine völlige operative Entfernung ist wegen der ausgeprägten Infiltration ins umgebende Hirngewebe unmöglich. In der Regel wird eine Strahlenbehandlung, häufig auch eine Chemotherapie angeschlossen, die den Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs und bis zum Tode des Patienten von weniger als einem Jahr bis auf etwa zwei Jahre zu verlängern vermag.

Das Glioblastom ist außerdem ein Tumor mit erheblichen genetischen Veränderungen und einer ungewöhnlichen großen intratumoralen wie intertumoralen genetischen Heterogenität, die im histologischen Befund nur bedingt zum Ausdruck kommt, aber offenbar wesentlichen Einfluss auf den - vorübergehenden- Therapieerfolg ausübt.

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob der unterschiedliche Behandlungserfolg von Glioblastomen mit dem handelsüblichen Zytostatikum Temozolomid (TMZ; Temodal®), einem DNA-alkylierenden Agens, durch definierte genetische Veränderungen der Tumorzellen beeinflusst wird.

Es wurden 53 Gliome mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung karyotypiert. Bei diesem Verfahren wird die Gesamt-DNA einer kleinen Tumorbioptie unter standardisierten Bedingungen auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert. Dadurch werden Vermehrungen und Verluste bestimmter Chromosomenabschnitte mit einer Auflösung von etwa 15 Mb für Kopingewinne (1,5 Mb für höhere Amplifikationen) und 20-30 Mb für Verluste erkennbar, die in ca. 40-50% der untersuchten Zellen vorliegen. Veränderungen in sehr kleinen Subklonen werden nicht erkannt.

Als charakteristische einheitliche Veränderungen, die in der überwiegenden Mehrzahl der Tumoren vorlagen, wurden Zugewinne von Chromosomen 7 (komplett oder partiell) und Verluste von 9p, 10 (komplett oder partiell) sowie 13q nachgewiesen. Es wurde sichergestellt, dass kein statistischer Unterschied in diesem Spektrum zwischen den Tumoren der Patienten die nur nachbestrahlt worden waren und denjenigen, die zusätzlich TMZ erhalten hatten, bestand.

TMZ-behandelte Patienten zeigten eine deutlich höhere Überlebenszeit von 19.2/7,5 Monaten. Bei den TMZ-unbehandelten Patienten bestätigte sich der bekannte Effekt, dass der Verlust von 9p- und 10q die Überlebenszeit signifikant verschlechtert. Es zeigte sich weiter, dass jedoch gerade diese Untergruppe von TMZ besonders profitiert. Eine Multivarianz-Analyse differenzierte dahingehend, dass der Effekt für 9p-Verluste der allgemein stärkere war, für Patienten über 53 Jahren jedoch 10q-Verluste.

In Übereinstimmung mit der Literatur wurde die Hypothese aufgestellt, dass als Markergene in erster Linie für 9p die einander benachbarten Tumorsuppressorgene *CDKN2A* und *CDKN2B* (p16, p15) und für 10q das DNA-Reparatur-Gen *MGMT* zu diskutieren sind. Die für einen weitgehenden oder kompletten Expressionsverlust dieser Gene erforderliche Inaktivierung der jeweils zweiten Kopie der Markergene kann durch (submikroskopische) Deletion, Mutation oder epigenetisch durch Promoter-Hypermethylierung erfolgen. In drei von vier darauf untersuchten Tumoren konnte eine Hypermethylierung und in der RT-PCR eine deutlich reduzierte Expression von *MGMT* gezeigt werden.

Die Ergebnisse genetischer Untersuchungen könnten künftig eine gezieltere Chemotherapie von Glioblastompatienten ermöglichen, da histologische Befunde keine diesbezüglichen Informationen liefern.

## 6. Summary

The Glioblastoma, typical carcinoma of the brain, belongs to the most malignant tumors of humans. It leads, treated as untreated to death. A complete surgical removal is impossible because of the pronounced infiltration in the surrounding brain tissue. Usually a radiotherapy, frequently also a chemotherapy, is attached which is able to extend the period up to the recurrence and up to the death of the patient of less than one year up to approximately two years.

In addition, the Glioblastoma is a tumor with substantial genetic changes and an unusual large intratumoral and intertumoral genetic heterogeneity, which is in the histological findings only conditionally expressed, but obviously exercises substantial influence on - passing therapy success.

In the available work it was examined, whether the different treatment success of glioblastoma with the commercial cytostatic drug Temozolomid (TMZ; Temodal®), an DNA alkylating agent, is affected by defined genetic changes of the tumor cells.

53 gliomas were karyotyped with the help of comparative genomic hybridizing (CGH). With this procedure, the entire DNA of a small tumorbiopsie is hybridized on normal metaphase-chromosomes under standardized conditions. Thus gains and losses of intended chromosomal regions become recognizable with a dissolution of approximately 15 Mb for copy gains (1.5 Mb for higher amplifications) and 20-30 Mb for losses, which are present in approx. 40-50% of the examined cells. Changes in very small subclones are not recognized.

As characteristic uniform changes, which were present in the predominant majority of the tumors, increases of chromosome 7 (completely or partially) and losses of 9p, 10 (completely or partially) as well as 13q became proven. It was guaranteed that no statistic difference in this spectrum between the tumors of the patients had been only after-illuminated and those, which had received additionally TMZ existed.

TMZ-treated patients showed a clearly higher survival period of 19.2/7,5 months. With the TMZ-untreated patients, the well-known effect was confirmed that the loss of 9p and 10q worsened the survival period significantly. However, straight this sub-group particularly profits from TMZ. A multivariate-analysis differentiated in such a way that the effect of 9p losses was the generally stronger, for patients over 53 years however 10q-losses.

In agreement with the literature the hypothesis was set up that as marker genes for 9p primarily the each other neighbouring tumorsuppressorgenes *CDKN2A* and *CDKN2B* (p16, p15) and for 10q the DNA repair gene *MGMT* are to be discussed. that necessary for a large or complete expression Inactivating loss of the second copy of the marker

genes can take place via (submicroscopic) deletion, mutation or epigenetically via promoter-hypermethylation. In three of four tumors examined for it a Hypermethylierung could be shown and in the RT-PCR a clearly reduced expression of MGMT.

In the future, the results of genetic investigations could make a more purposeful chemotherapy possible of glioblastoma patients, since histological findings do not supply relevant information.

## 7. Literaturverzeichnis

- Albarosa R, Colombo BM, Roz L, Magnani I, Pollo B, Cirenei N, Giani C, Conti AM, DiDonato S, Finocchiaro G (1996) Deletion mapping of gliomas suggest the presence of two small regions for candidate tumor-suppressor genes in a 17-cM interval on chromosome 10q. *Am J Hum Genet* 58(6):1260-1267.
- Alers JC, Rochat J, Krijtenburg PJ, van Dekken H, Raap AK, Rosenberg C (1999) Universal linkage system: an improved method for labeling archival DNA for comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 25(3):301-305.
- Altura RA, Maris JM, Li H, Boyett JM, Brodeur GM, Look AT (1997) Novel regions of chromosomal loss in familial neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 19(3):176-184.
- Arslantas A, Artan S, Oner U, Muslumanoglu H, Durmaz R, Cosan E, Atasoy MA, Basaran N, Tel E (2004) The importance of genomic copy number changes in the prognosis of glioblastoma multiforme. *Neurosurg Rev* 27(1):58-64.
- Athanassiou H, Synodinou M, Maragoudakis E, Paraskevaidis M, Verigos C, Misailidou D, Antonadou D, Saris G, Beroukas K, Karageorgis P (2005) Randomized phase II study of temozolomide and radiotherapy compared with radiotherapy alone in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 1;23(10):2372-2377.
- Backlund LM, Nilsson BR, Goike HM, Schmidt EE, Liu L, Ichimura K, Collins VP (2003) Short postoperative survival for glioblastoma patients with a dysfunctional Rb1 pathway in combination with no wild-type PTEN. *Clin Cancer Res* 15;9(11):4151-4158.
- Balana C, Ramirez JL, Taron M, Roussos Y, Ariza A, Ballester R, Sarries C, Mendez P, Sanchez JJ, Rosell R (2003) O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 9(4):1461-1468.
- Balesaria S, Brock C, Bower M, Clark J, Nicholson SK, Lewis P, de Sanctis S, Evans H, Peterson D, Mendoza N, Glaser MG, Newlands ES, Fisher RA (1999) Loss of chromosome 10 is an independent prognostic factor in high-grade gliomas. *Br J Cancer* 81(8):1371-1377.
- Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T, Oren M (1994) Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* 1;8(15):1739-1749.
- Barker FG 2nd, Chang SM, Larson DA, Sneed PK, Wara WM, Wilson CB, Prados MD (2001) Age and radiation response in glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 49(6):1288-1297; discussion 1297-1298.
- Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, Pham LD, Dorfman MV, Piscatelli N, Jung S, Rhee D, Louis DN (2004) Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res* 1;10(1 Pt 1):228-233.
- Baylin SB, Herman JG (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16(4):168-174.
- Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG (2001) Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 10(7):687-692.
- Belanich M, Pastor M, Randall T, Guerra D, Kibitel J, Alas L, Li B, Citron M, Wasserman P, White A, Eyre H, Jaekle K, Schulman S, Rector D, Prados M, Coons S, Shapiro W, Yarosh D (1996) Retrospective study of the correlation between the DNA repair

- protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. *Cancer Res* 15;56(4):783-788.
- Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA (1994a) Molecular analysis of genomic abnormalities in human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 73(2):122-129
- Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P (1998) Minimal size of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* 21: 172-175.
- Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H (1997a) Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(2):180-185.
- Biernat W, Debiec-Rychter M, Liberski PP (1998) Mutations of TP53, amplification of EGFR, MDM2 and CDK4, and deletions of CDKN2A in malignant astrocytomas. *Pol J Pathol.* 1998;49(4):267-271.
- Bigner SH, Burger PC, Wong AJ, Werner MH, Hamilton SR, Muhlbaier LH, Vogelstein B, Bigner DD (1988a) Gene amplification in malignant human gliomas: clinical and histopathologic aspects. *J Neuropathol Exp Neurol* 47(3):191-205.
- Bigner SH, Mark J, Burger PC, Mahaley MS Jr, Bullard DE, Muhlbaier LH, Bigner DD (1988b?) Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res* 15;48(2):405-411.
- Bigner SH, Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Mark J, Friedman HS, Bigner DD. (1990) Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 15;50:8017-8022.
- Bigner SH, Schrock E (1997) Molecular cytogenetics of brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(11):1173-1181.
- Bijleveld CG, Klomp maker IJ, van den Berg AP, Gouw AS, Hepkema BG, Haagsma EB, Verwer R, Slooff MJ (1996) Incidence, risk factors, and outcome of antithymocyte globulin treatment of steroid-resistant rejection after liver transplantation. *Transpl Int* 9(6):570-575.
- Borel F, Lohez OD, Lacroix FB, Margolis RL (2002) Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23;99(15):9819-9824.
- Bostrom J, Cobbers JM, Wolter M, Tabatabai G, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G (1998) Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res* 1;58(1):29-33.
- Boveri T (1914) *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.* Gustav Fischer Verlag, Jena
- Brabender J, Usadel H, Metzger R, Schneider PM, Park J, Salonga D, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lord RV, Takebe N, Schneider S, Holscher AH, Danenberg KD, Danenberg PV (2003) Quantitative O(6)-methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 9(1):223-227.
- Brada M, Sharpe G, Rajan B, Britton J, Wilkins PR, Guerrero D, Hines F, Traish D, Ashley S (1999) Modifying radical radiotherapy in high grade gliomas; shortening the treatment time through acceleration. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 15;43(2):287-292.
- Brada M (1999) Current approaches to radiation therapy for malignant gliomas. *Front Radiat Ther Oncol* 33:139-149.
- Brada M, Hoang-Xuan K, Rampling R, Dietrich PY, Dirix LY, Macdonald D, Heimans JJ, Zonnenberg BA, Bravo-Marques JM, Henriksson R, Stupp R, Yue N, Bruner J,

- Dugan M, Rao S, Zaknoen S (2001) Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Ann Oncol* 12(2):259-266.
- Brunner C, Jung V, Henn W, Zang KD, Urbschat S (2000) Comparative genomic hybridization reveals recurrent enhancements on chromosome 20 and in one case combined amplification sites on 15q24q26 and 20p11p12 in glioblastomas. *Cancer Genet Cytogenet* 121(2):124-127.
- Burger PC, Green SB (1987) Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 1;59(9):1617-25
- Burton EC, Lamborn KR, Feuerstein BG, Prados M, Scott J, Forsyth P, Passe S, Jenkins RB, Aldape KD (2002) Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. *Cancer Res* 1;62(21):6205-10.
- Buschhausen G, Wittig B, Graessmann M, Graessmann A (1987) Chromatin structure is required to block transcription of the methylated herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(5):1177-1181.
- Cai Y, Ludeman SM, Wilson LR, Chung AB, Dolan ME (2001) Effect of O6-benzylguanine on nitrogen mustard-induced toxicity, apoptosis, and mutagenicity in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cancer Ther* 1(1):21-28.
- Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 7;90(19):1473-1479.
- Cantley LC, Neel BG (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 13;96(8):4240-4245.
- Cayre A, Penault-Llorca F, De Latour M, Rolhion C, Feillel V, Ferriere JP, Kwiatkowski F, Finat-Duclos F, Verrelle P (2002) O(6)-methylguanine-DNA methyl transferase gene expression and prognosis in breast carcinoma. *Int J Oncol* 21(5):1125-1131.
- Chahlavi A, Kanner A, Peereboom D, Staugaitis SM, Elson P, Barnett G (2003) Impact of chromosome 1p status in response of oligodendroglioma to temozolomide: preliminary results. *J Neurooncol* 61(3):267-273.
- Chakravarti A, Delaney MA, Noll E, Black PM, Loeffler JS, Muzikansky A, Dyson NJ (2001) Prognostic and pathologic significance of quantitative protein expression profiling in human gliomas. *Clin Cancer Res* 7(8):2387-2395.
- Chakravarti A, Seiferheld W, Tu X, Wang H, Zhang HZ, Ang KK, Hammond E, Curran W Jr, Mehta M (2005) Immunohistochemically determined total epidermal growth factor receptor levels not of prognostic value in newly diagnosed glioblastoma multiforme: report from the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1;62(2):318-327.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-159.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 11;22(15):2990-2297.
- Clark SJ, Warnecke PM (2002) DNA methylation analysis in mammalian cells. *Methods* 27(2):99-100.
- Collins VP (1995) Gene amplification in human gliomas. *Glia* 15(3):289-296. Review.
- Collins VP (2004) Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75 Suppl 2:ii2-11.

- Corry J, Smith JG, Wirth A, Quong G, Liew KH (1998) Primary central nervous system lymphoma: age and performance status are more important than treatment modality. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1;41(3):615-620.
- Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK (1996) Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 15;56(10):2405-2410.
- Coulondre C, Miller JH (1977) Genetic studies of the lac repressor. III. Additional correlation of mutational sites with specific amino acid residues. *J Mol Biol* 15;117(3):525-567.
- Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P (1988) Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62(10):2152-2165.
- DeAngelis LM, Burger PC, Green SB, Cairncross JG (1998) Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol* 44(4):691-695.
- De Souza Nascimento P, Maciel CM, Kawamura MT, Oliveira JA, Teixeira A, Carvalho Mda G, Alves G (2001) Molecular analysis of CDKN2 (p16) in gliomas associated with clinical data. *Oncol Rep* 8(5):1039-1043.
- Downward J (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* 10(2):262-265.
- Deutsch M, Green SB, Strike TA, Burger PC, Robertson JT, Selker RG, Shapiro WR, Mealey J Jr, Ransohoff J 2nd, Paoletti P, et al. (1989) Results of a randomized trial comparing BCNU plus radiotherapy, streptozotocin plus radiotherapy, BCNU plus hyperfractionated radiotherapy, and BCNU following misonidazole plus radiotherapy in the postoperative treatment of malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16(6):1389-1396.
- Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C, von Deimling A (1998) PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 30;16(17):2259-2264.
- Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P & Cremer T (1993) Detection of complete and partial chromosome gain and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90, 590-610.
- Du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T (1995) Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19, 27-41.
- Eden S, Cedar H (1994) Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev* 4(2):255-259.
- Eiriksdottir G, Johannesdottir G, Ingvarsson S, Bjornsdottir IB, Jonasson JG, Agnarsson BA, Hallgrímsson J, Gudmundsson J, Egilsson V, Sigurdsson H, Barkardottir RB (1998) Mapping loss of heterozygosity at chromosome 13q: loss at 13q12-q13 is associated with breast tumour progression and poor prognosis. *Eur J Cancer* 34(13):2076-2081.
- Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP (1992) Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15;89(10):4309-4313.
- Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, Olson JJ, Liu L, Collins VP, James CD (1994) Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene* 9(8):2313-2320.

- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG (1999) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 15;59(4):793-797.
- Esteller M (2000) Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 36(18):2294-300.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 9;343(19):1350-4. Erratum in: *N Engl J Med* 2000 Dec 7;343(23):1740.
- Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG (2000) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1;60(9):2368-2371.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 15;61(8):3225-3229.
- Esteller M, Fraga MF, Paz MF, Campo E, Colomer D, Novo FJ, Calasanz MJ, Galm O, Guo M, Benitez J, Herman JG (2002) Cancer epigenetics and methylation. *Science*. 2002 Sep 13;297(5588):1807-1808.
- Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 12;21(35):5427-5440.
- Esteller M, Herman JG (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196(1):1-7.
- Esteller M (2003) Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 4(6):351-358.
- Esteller M, Herman JG (2004) Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 8;23(1):1-8. Review.
- Esteller M (2005a) Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:629-656.
- Esteller M (2005b) DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol* 17(1):55-60.
- Fan X, Munoz J, Sanko SG, Castresana JS (2002) PTEN, DMBT1, and p16 alterations in diffusely infiltrating astrocytomas. *Int J Oncol* 21(3):667-674.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 28;111(1):47-54.
- Feinberg AP, Tycko B (2004) The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4(2):143-53.
- Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC, Kirsch L, Fimmers R, Blaschke B, Schlegel U, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G (2004) Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol* 14(2):121-130.
- Fraga MF, Esteller M (2002) DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 33(3):632, 634, 636-649.
- Friedman HS, McLendon RE, Kerby T, Dugan M, Bigner SH, Henry AJ, Ashley DM, Krischer J, Lovell S, Rasheed K, Marchev F, Seman AJ, Cokgor I, Rich J, Stewart E, Colvin OM, Provenzale JM, Bigner DD, Haglund MM, Friedman AH, Modrich PL

- (1998) DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol* 16(12):3851-3857.
- Friedman HS, Pegg AE, Johnson SP, Loktionova NA, Dolan ME, Modrich P, Moschel RC, Struck R, Brent TP, Ludeman S, Bullock N, Kilborn C, Keir S, Dong Q, Bigner DD, Colvin OM (1999) Modulation of cyclophosphamide activity by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Cancer Chemother Pharmacol* 43(1):80-85.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul C (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1;89(5):1827-1831.
- Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP (1993) Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 15;71(8):2585-2597.
- Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP (1997) Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 13, 405-409.
- Fueyo J, Gomez-Manzano C, Bruner JM, Saito Y, Zhang B, Zhang W, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP (1996) Hypermethylation of the CpG island of p16/CDKN2 correlates with gene inactivation in gliomas. *Oncogene* 17;13(8):1615-1619.
- Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2000) Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 80(1):65-72.
- Fulci G, Ishii N, Van Meir EG (1998) p53 and brain tumors: from gene mutations to gene therapy. *Brain Pathol* 8(4):599-613.
- Fuller CE, Schmidt RE, Roth KA, Burger PC, Scheithauer BW, Banerjee R, Trinkaus K, Lytle R, Perry A (2003) Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in morphologically ambiguous gliomas with hybrid oligodendroglial/astrocytic features. *J Neuropathol Exp Neurol* 62(11):1118-1128.
- Fults D, Pedone CA, Thompson GE, Uchiyama CM, Gumpfer KL, Iliev D, Vinson VL, Tavtigian SV, Perry WL 3rd (1998) Microsatellite deletion mapping on chromosome 10q and mutation analysis of MMAC1, FAS, and MXI1 in human glioblastoma multiforme. *Int J Oncol* 12(4):905-910.
- Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK (1995) Genetics and malignant progression of human brain tumours. *Cancer Surv* 25:233-275.
- Galanis E, Buckner J, Kimmel D, Jenkins R, Alderete B, O'Fallon J, Wang CH, Scheithauer BW, James CD (1998) Gene amplification as a prognostic factor in primary and secondary high-grade malignant gliomas. *Int J Oncol* 13(4):717-724.
- Gamcsik MP, Dolan ME, Andersson BS, Murray D (1999) Mechanisms of resistance to the toxicity of cyclophosphamide. *Curr Pharm Des* 5(8):587-605.
- Gerson SL (2004) MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 4(4):296-307.
- Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, Nozaki M, Diserens AC, Hamou MF, Dietrich PY, Regli L, Janzer RC, Bucher P, Stupp R, de Tribolet N, Domany E, Hegi ME (2003) Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res* 15;63(20):6613-6625.
- Godfraind C, Rousseau E, Ruchoux MM, Scaravilli F, Vikkula M (2003) Tumour necrosis and microvascular proliferation are associated with 9p deletion and CDKN2A

- alterations in 1p/19q-deleted oligodendrogliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29(5):462-471.
- Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Arjona D, Lomas J, Alonso ME, De Campos JM, Vaquero J, Isla A, Gutierrez M, Rey JA (2003) Promoter hypermethylation of multiple genes in astrocytic gliomas. *Int J Oncol* 22(3):601-608.
- Goussia AC, Bruner JM, Kyritsis AP, Agnantis NJ, Fuller GN (2000) Cytogenetic and molecular genetic abnormalities in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Anticancer Res* 20(1A):65-73.
- Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B (1989) Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 83(2):155-158.
- Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A (2001) Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 1;29(13):E65-5.
- Harada K, Nishizaki T, Ozaki S, Kubota H, Ito H, Sasaki K (1998) Intratumoral cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry in human gliomas. *Cancer Res*. 1998 Oct 15;58(20):4694-4700.
- Harper JW, Adami G, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816.
- Hartmann C, Mueller W, Lass U, Stockhammer F, von Eckardstein K, Veelken J, Jeuken J, Wick W, von Deimling A (2003) No preferential loss of paternal 19q alleles in oligodendroglial tumors. *Ann Neurol* 54(2):256-258.
- Hartmann C, Mueller W, von Deimling A (2004) Pathology and molecular genetics of oligodendroglial tumors. *J Mol Med* 82(10):638-655.
- Hartmann C, Mueller W, Lass U, Kamel-Reid S, von Deimling A (2005) Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(1):10-14.
- Hashimoto N, Murakami M, Takahashi Y, Fujimoto M, Inazawa J, Mineura K (2003) Correlation between genetic alteration and long-term clinical outcome of patients with oligodendroglial tumors, with identification of a consistent region of deletion on chromosome arm 1p. *Cancer* 1;97(9):2254-2261.
- Haupt Y, Oren M (1996) p53-mediated apoptosis: mechanisms and regulation. *Behring Inst Mitt* (97):32-59.
- Hayashi Y, Ueki K, Waha A, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A (1997) Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol* 7(3):871-875.
- Hayashi H, Yazawa T, Okudela K, Nagai J, Ito T, Kanisawa M, Kitamura H (2002) Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human lung adenocarcinoma relates to high-grade histology and worse prognosis among smokers. *Jpn J Cancer Res* 93(2):184-189.
- He J, Allen JR, Collins VP, Allalunis-Turner MJ, Godbout R, Day RS 3rd, James CD (1994) CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res* 15;54(22):5804-5807.
- Heim S & Mitelman F (1995) *Cancer Cytogenetics*. Alan R. Liss, Inc. New York
- Hegi ME, zur Hausen A, Ruedi D, Malin G, Kleihues P (1997) Hemizygous or homozygous deletion of the chromosomal region containing the p16INK4a gene is associated with amplification of the EGF receptor gene in glioblastomas. *Int J Cancer* 26;73(1):57-63.
- Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, de Tribolet N, Stupp R (2004) Clinical trial substantiates the predictive value of O-

- 6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 15;10(6):1871-1874.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 10;352(10):997-1003.
- Henn W, Blin N, Zang KD (1986) Polysomy of chromosome 7 is correlated with overexpression of the erbB oncogene in human glioblastoma cell lines. *Hum Genet* Sep;74(1):104-106.
- Henn W, Blin N, Zang KD (1986) Polysomy of chromosome 7 is correlated with overexpression of the erbB oncogene in human glioblastoma cell lines. *Hum Genet* 74, 104-106.
- Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, von Deimling A, Fassbender F, Xu HJ, Benedict WF, Yandell DW, Louis DN (1994) The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann Neurol* 36(5):714-721.
- Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB (1996) Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res* 15;56(4):722-727.
- Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nister M (1992) Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 1;52(11):3213-3219.
- Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermark B, Heldin CH, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A, Nister M (1996) Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res* 1;56(1):164-171.
- Hliscs, R, Mühling P, Claussens U (1997) The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 76, 167-171.
- Hoang-Xuan K, He J, Huguet S, Mokhtari K, Marie Y, Kujas M, Leuraud P, Capelle L, Delattre JY, Poirier J, Broet P, Sanson M (2001) Molecular heterogeneity of oligodendrogliomas suggests alternative pathways in tumor progression. *Neurology* 9;57(7):1278-1281.
- Hofer S, Roelcke U, Hermann R (1999) [New aspects of interdisciplinary therapy for malignant gliomas in adults]. *Schweiz Med Wochenschr* 18;129(37):1332-1341.
- Holland EC, Hively WP, DePinho RA, Varmus HE (1998) A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes Dev* 1;12(23):3675-3685.
- Horsfall MJ, Gordon AJ, Burns PA, Zielenska M, van der Vliet GM, Glickman BW (1990) Mutational specificity of alkylating agents and the influence of DNA repair. *Environ Mol Mutagen* 15(2):107-122.
- Huhn SL, Mohapatra G, Bollen A, Lamborn K, Prados MD, Feuerstein BG (1999) Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme by comparative genomic hybridization: correlation with radiation treatment outcome. *Clin Cancer Res* 5(6):1435-1443.
- Hunter SB, Brat DJ, Olson JJ, Von Deimling A, Zhou W, Van Meir EG (2003) Alterations in molecular pathways of diffusely infiltrating glial neoplasms: application to tumor classification and anti-tumor therapy (Review). *Int J Oncol* 23(4):857-869.
- Huncharek M, Kupelnick B (2002) Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis. *Oncol Res* 12(2):107-112.

- Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP (1996) Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 5;13(5):1065-1072.
- Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP (1998) Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer* 22(1):9-15.
- Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP (2000) Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res* 15;60(2):417-424.
- Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP (2004) Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol* 70(2):137-160.
- Ino Y, Silver JS, Blazejewski L, Nishikawa R, Matsutani M, von Deimling A, Louis DN (1999) Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(8):881-885.
- Ino Y, Zlatescu MC, Sasaki H, Macdonald DR, Stemmer-Rachamimov AO, Jhung S, Ramsay DA, von Deimling A, Louis DN, Cairncross JG (2000) Long survival and therapeutic responses in patients with histologically disparate high-grade gliomas demonstrating chromosome 1p loss. *J Neurosurg* 92(6):983-990.
- Jaekle KA, Eyre HJ, Townsend JJ, Schulman S, Knudson HM, Belanich M, Yarosh DB, Bearman SI, Giroux DJ, Schold SC (1998) Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 16(10):3310-3315.
- James CD, Carlbom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK (1988) Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 1;48(19):5546-5551.
- James CD, Mikkelsen T, Cavenee WK, Collins VP (1990) Molecular genetic aspects of glial tumour evolution. *Cancer Surv* 9(4):631-644.
- James CD, Galanis E, Frederick L, Kimmel DW, Cunningham JM, Atherton-Skaff PJ, O'Fallon JR, Jenkins RB, Buckner JC, Hunter SB, Olson JJ, Scheithauer BW (1999) Tumor suppressor gene alterations in malignant gliomas: histopathological associations and prognostic evaluation. *Int J Oncol* 15(3):547-553.
- Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 15;54(24):6353-6358.
- Jenkins RB, Kimmel DW, Moertel CA, Schultz CG, Scheithauer BW, Kelly PJ, Dewald GW (1989) A cytogenetic study of 53 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 39, 253-279.
- Jeuken JW, Sprenger SH, Boerman RH, von Deimling A, Teepe HL, van Overbeeke JJ, Wesseling P (2001) Subtyping of oligo-astrocytic tumours by comparative genomic hybridization. *J Pathol* 194(1):81-87.
- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3(6):415-428.
- Jung JM, Bruner JM, Ruan S, Langford LA, Kyritsis AP, Kobayashi T, Levin VA, Zhang W (1995) Increased levels of p21WAF1/Cip1 in human brain tumors. *Oncogene* 16;11(10):2021-2028.

- Jung V, Romeike BF, Henn W, Feiden W, Moringlane JR, Zang KD, Urbschat S (1999) Evidence of focal genetic microheterogeneity in glioblastoma multiforme by area-specific CGH on microdissected tumor cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(9):993-999.
- Jung V (2001) Dissertation, Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis in solid tumors. *Science* 258, 818-821.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10, 231-243.
- Karhu R, Kähkönen M, Kuukasjärvi T, Pennanen S, Tirkkonen M, Kallioniemi O (1997) Quality control of CGH, impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization. *Cytometry* 28, 198-205.
- Karlbom AE, James CD, Boethius J, Cavenee WK, Collins VP, Nordenskjöld M, Larsson C (1993) Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum Genet* 92, 169-174.
- Kernohan JW (1949) Effects of displacement of the brain by tumors. *Arch Neurol Psychiatry*. 62(6):867.
- Keshet I, Lieman-Hurwitz J, Cedar H (1986) DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 28;44(4):535-543.
- Kim DH, Mohapatra G, Bollen A, Waldman FM, Feuerstein BG (1995) Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme tumors and glioma cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 60, 812-819.
- Kimmelman AC, Ross DA, Liang BC (1996) Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. *Genomics* 34, 250-254.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Dohner H, Lundsteen C (1999) Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer* 25, 410-413.
- Kirla R, Salminen E, Huhtala S, Nuutinen J, Talve L, Haapasalo H, Kalim H (2000) Prognostic value of the expression of tumor suppressor genes p53, p21, p16 and p18, and Ki-67 labelling in high grade astrocytomas treated with radiotherapy. *J Neurooncol* 46(1):71-80.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(3):215-25; discussion 226-229.
- Kleihues P, Cavenee WK (2000) Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. WHO Classifications. IARC Press, Lyon
- Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993) Histological typing of tumours of the central nervous system. World health organization International Classification of tumours. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer Verlag: Berlin Heidelberg
- Knuutila S, Björkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y (1998) DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 152(5):1107-1123.
- Komine C, Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Yokoyama T, Fukushima T (2003) Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA

- methyltransferase is an independent predictor of shortened progression free survival in patients with low-grade diffuse astrocytomas. *Brain Pathol* 13(2):176-184.
- Kon H, Sonoda Y, Kumabe T, Yoshimoto T, Sekiya T, Murakami Y (1998) Structural and functional evidence for the presence of tumor suppressor genes on the short arm of chromosome 10 in human gliomas. *Oncogene* 15;16(2):257-263.
- Koopmann J, Maintz D, Schild S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A (1995) Multiple polymorphisms, but no mutations, in the WAF1/CIP1 gene in human brain tumours. *Br J Cancer* 72(5):1230-1233.
- Koschny R, Koschny T, Froster UG, Krupp W, Zuber MA (2002) Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 135(2):147-159.
- Kohya N, Miyazaki K, Matsukura S, Yakushiji H, Kitajima Y, Kitahara K, Fukuhara M, Nakabeppu Y, Sekiguchi M (2002) Deficient expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase combined with mismatch-repair proteins hMLH1 and hMSH2 is related to poor prognosis in human biliary tract carcinoma. *Ann Surg Oncol* 9(4):371-379.
- Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A (1995) Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 54(1):91-95.
- Kraus JA, Glesmann N, Beck M, Krex D, Klockgether T, Schackert G, Schlegel U (2000) Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 48(2):89-94.
- Kraus JA, Wenghoefer M, Glesmann N, Mohr S, Beck M, Schmidt MC, Schroder R, Berweiler U, Roggendorf W, Dietsch S, Dietzmann K, Heuser K, Muller B, Fimmers R, von Deimling A, Schlegel U (2001) TP53 gene mutations, nuclear p53 accumulation, expression of Waf/p21, Bcl-2, and CD95 (APO-1/Fas) proteins are not prognostic factors in de novo glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 52(3):263-272.
- Kreth FW, Warnke PC, Schremet R, Ostertag CB (1993) Surgical resection and radiation therapy versus biopsy and radiation therapy in the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 78(5):762-766.
- Kroger N, Schilling G, Einsele H, Liebisch P, Shimoni A, Nagler A, Perez-Simon JA, San Miguel JF, Kiehl M, Fauser A, Schwerdtfeger R, Wandt H, Sayer HG, Myint H, Klingemann H, Zabelina T, Dierlamm J, Hinke A, Zander AR (2004) Deletion of chromosome band 13q14 as detected by fluorescence in situ hybridization is a prognostic factor in patients with multiple myeloma who are receiving allogeneic dose-reduced stem cell transplantation. *Blood* 1;103(11):4056-4061.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387(6630):299-303.
- Kunwar S, Mohapatra G, Bollen A, Lamborn KR, Prados M, Feuerstein BG (2001) Genetic subgroups of anaplastic astrocytomas correlate with patient age and survival. *Cancer Res* 61(20):7683-7688.
- Lacroix M, Abi-Said D, Fourny DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R (2001) A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95(2):190-198.
- Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW (1994) Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 81(3):427-436.

- Leenstra S, Oskam NT, Bijleveld EH, Bosch DA, Troost D, Hulsebos TJ (1998) Genetic sub-types of human malignant astrocytoma correlate with survival. *Int J Cancer* 17;79(2):159-165.
- Leitlinie „Maligne Gliome“ der Deutschen Gesellschaft für Neurologie und zugleich der Deutschen Krebsgesellschaft und ihrer Arbeitsgemeinschaften. Interdisziplinäre Leitlinien für die Diagnostik und Therapie supratentorieller Gliome des Erwachsenenalters. Fassung vom 04.06.2003.
- Lengauer C., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649.
- Lengauer C (2005) Aneuploidy and genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol* 15(1):1.
- Li X, Lee NK, Ye YW, Waber PG, Schweitzer C, Cheng QC, Nisen PD (1994) Allelic loss at chromosomes 3p, 8p, 13q, and 17p associated with poor prognosis in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 19;86(20):1524-1529.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 28;275(5308):1943-1947.
- Li YJ, Hoang-Xuan K, Zhou XP, Sanson M, Mokhtari K, Faillot T, Cornu P, Poisson M, Thomas G, Hamelin R (1998) Analysis of the p21 gene in gliomas. *J Neurooncol* 40(2):107-11.
- Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J (1985) Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *J Cell Sci Suppl.* 3:161-172.
- Loeper S, Romeike BF, Heckmann N, Jung V, Henn W, Feiden W, Zang KD, Urbschat S (2001) Frequent mitotic errors in tumor cells of genetically micro-heterogeneous glioblastomas. *Cytogenet Cell Genet* 94(1-2):1-8.
- Louis DN, von Deimling A, Chung RY, Rubio MP, Whaley JM, Eibl RH, Ohgaki H, Wiestler OD, Thor AD, Seizinger BR (1993) Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 52(1):31-38.
- Lutterbach J, Bartelt S, Momm F, Becker G, Frommhold H, Ostertag C (2005) Is older age associated with a worse prognosis due to different patterns of care? A long-term study of 1346 patients with glioblastomas or brain metastases. *Cancer* 103(6):1234-1244.
- Maintz D, Fiedler K, Koopmann J, Rollbrocker B, Nechev S, Lenartz D, Stangl AP, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A (1997) Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(10):1098-1104.
- Maruno M, Yoshimine T, Muhammad AK, Ninomiya H, Kato A, Hayakawa T (1999) Chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization (CGH) in human astrocytic tumors. *Cancer Lett* 8;135(1):61-66.
- Matsukura S, Miyazaki K, Yakushiji H, Ogawa A, Harimaya K, Nakabeppu Y, Sekiguchi M (2001) Expression and prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hepatocellular, gastric, and breast cancers. *Ann Surg Oncol* 8(10):807-816.
- Mattern J, Eichhorn U, Kaina B, Volm M (1998) O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity and sensitivity to cyclophosphamide and cisplatin in human lung tumor xenografts. *Int J Cancer* 11;77(6):919-922.

- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1(7):686-692.
- Michor F, Iwasa Y, Lengauer C, Nowak MA (2005) Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol* 15(6):484-493.
- Miettinen H, Kononen J, Sallinen P, Alho H, Helen P, Helin H, Kalimo H, Paljarvi L, Isola J, Haapasalo H (1999) CDKN2/p16 predicts survival in oligodendrogliomas: comparison with astrocytomas. *J Neurooncol* 41(3):205-211.
- Mitelman F (1994) Chromosomes, genes, and cancer. *CA Cancer J Clin* 44(3):133-135.
- Mohapatra G, Bollen AW, Kim DH, Lamborn K, Moore DH, Prados MD, Feuerstein BG (1998) Genetic analysis of glioblastoma multiforme provides evidence for subgroups within the grade. *Genes Chromosomes Cancer* 21(3):195-206.
- Mollemann M, Wolter M, Felsberg J, Collins VP, Reifenberger G (2005) Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 20;113(3):379-385.
- Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, Poustka A (1997) DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet* 17(1):32-39.
- Mollenhauer J, Holmskov U, Wiemann S, Krebs I, Herbertz S, Madsen J, Kioschis P, Coy JF, Poustka A (1999) The genomic structure of the DMBT1 gene: evidence for a region with susceptibility to genomic instability. *Oncogene* 4;18(46):6233-6240.
- Mork SJ, Halvorsen TB, Lindegaard KF, Eide GE (1986) Oligodendroglioma. Histologic evaluation and prognosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 45(1):65-78.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Muracciole X, Romain S, Dufour H, Palmari J, Chinot O, Ouafik L, Grisoli F, Branger DF, Martin PM (2002) PAI-1 and EGFR expression in adult glioma tumors: toward a molecular prognostic classification. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1;52(3):592-598.
- Myohanen S, Wahlfors J, Janne J (1994) Automated fluorescent genomic sequencing as applied to the methylation analysis of the human ornithine decarboxylase gene. *DNA Seq* 5(1):1-8.
- Nakamura M, Konishi N, Tsunoda S, Nakase H, Tsuzuki T, Aoki H, Sakitani H, Inui T, Sakaki T (2000) Analysis of prognostic and survival factors related to treatment of low-grade astrocytomas in adults. *Oncology* 58(2):108-116.
- Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001a) p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* 11(2):159-168.
- Nakasu S, Fukami T, Baba K, Matsuda M (2004) Immunohistochemical study for O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the non-neoplastic and neoplastic components of gliomas. *J Neurooncol* 70(3):333-340.
- Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, Kim TH, Newton WA, Ruymann FB, Sather HN, Hammond GD (1991) Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 325(19):1330-1336.
- Newcomb EW, Madonia WJ, Pisharody S, Lang FF, Koslow M, Miller DC (1993) A correlative study of p53 protein alteration and p53 gene mutation in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol* 3(3):229-235.

- Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL, Miller DC (1998) Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol* 8(4):655-667.
- Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2;91(16):7727-7731.
- Nishikawa R, Furnari FB, Lin H, Arap W, Berger MS, Cavenee WK, Su Huang HJ (1995) Loss of P16INK4 expression is frequent in high grade gliomas. *Cancer Res* 1;55(9):1941-1945.
- Nishizaki T, Ozaki S, Harada K, Ito H, Arai H, Beppu T, Sasaki K (1998) Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21(4):340-346.
- NOA. Deutsche Krebsgesellschaft und ihre Arbeitsgemeinschaften. Interdisziplinäre Leitlinien für die Diagnostik und Therapie supratentorieller Gliome des Erwachsenenalters. Fassung von 19.01.2002.
- Nowell PC, Hungerford DA (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132:1497.
- Nupponen NN, Hyytinen ER, Kallioniemi AH, Visakorpi T (1998) Genetic alterations in prostate cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 101(1):53-57.
- Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 2;358(6381):80-83.
- Olopade OI, Jenkins RB, Ransom DT, Malik K, Pomykala H, Nobori T, Cowan JM, Rowley JD, Diaz MO (1992) Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas. *Cancer Res* 1;52(9):2523-2529.
- Oshimo Y, Nakayama H, Ito R, Kitadai Y, Yoshida K, Chayama K, Yasui W (2003) Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma. *Int J Oncol* 23(6):1663-1670.
- Oskam NT, Bijleveld EH, Hulsebos TJ (2000) A region of common deletion in 22q13.3 in human glioma associated with astrocytoma progression. *Int J Cancer* 1;85(3):336-339.
- Parente F, Gaudray P, Carle GF, Turc-Carel C (1997) Experimental assessment of the detection limit of genomic amplification by comparative genomic hybridization CGH. *Cytogenet Cell Genet* 78(1):65-68.
- Park SH, Jung KC, Ro JY, Kang GH, Khang SK (2000) 5' CpG island methylation of p16 is associated with absence of p16 expression in glioblastomas. *J Korean Med Sci* 15(5):555-559.
- Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M (2003) A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1;63(5):1114-1121.
- Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, Garcia-Lopez JL, Piquer J, Safont MJ, Balana C, Sanchez-Cespedes M, Garcia-Villanueva M, Arribas L, Esteller M (2004) CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res* 1;10(15):4933-4938.
- Pegg AE (1990) Properties of mammalian O6-alkylguanine-DNA transferases. *Mutat Res* 233(1-2):165-175.

- Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC (1995) Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 51:167-223.
- Pepponi R, Marra G, Fuggetta MP, Falcinelli S, Pagani E, Bonmassar E, Jiricny J, D'Atri S (2003) The effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea, and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther* 304(2):661-668.
- Picksley SM, Lane DP (1993) The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays* 15(10):689-690.
- Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1995) Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1;19(1):10-26.
- Prados MD, Levin V (2000) Biology and treatment of malignant glioma. *Semin Oncol* 27(3 Suppl 6):1-10.
- Rasheed BK, Fuller GN, Friedman AH, Bigner DD, Bigner S (1992) Loss of heterozygosity for 10q loci in human gliomas. *Genes Chromosomes Cancer* 5(1):75-82.
- Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD, Bigner SH (1995) Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 1;10(11):2243-2246.
- Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH (1997) PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res* 1;57(19):4187-4190.
- Rasheed A, Herndon JE, Stenzel TT, Raetz JG, Kendelhardt J, Friedman HS, Friedman AH, Bigner DD, Bigner SH, McLendon RE (2002) Molecular markers of prognosis in astrocytic tumors. *Cancer* 15;94(10):2688-2697.
- Reavey-Cantwell JF, Haroun RI, Zahurak M, Clatterbuck RE, Parker RJ, Mehta R, Fruehauf JP, Brem H (2001) The prognostic value of tumor markers in patients with glioblastoma multiforme: analysis of 32 patients and review of the literature. *J Neurooncol* 55(3):195-204.
- Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP (1993) Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 15;53(12):2736-2739.
- Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahlon AG, Meltzer PS, Collins VP (1996) Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res* 15;56(22):5141-5145.
- Reifenberger G, Louis DN (2003) Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol* 62(2):111-26.
- Reifenberger G, Collins VP (2004) Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* 82(10):656-670.
- Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H (1998) Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. *Nucleic Acids Res* 15;26(10):2255-2264.
- Rey JA, Bello MJ, Jimenez-Lara AM, Vaquero J, Kusak ME, de Campos JM, Sarasa JL, Pestana A (1992 a) Loss of heterozygosity for distal markers on 22q in human gliomas. *Int J Cancer* 9;51(5):703-706.
- Rey JA, Pestana A, Bello MJ (1992 b) Cytogenetics and molecular genetics of nervous system tumors. *Oncol Res* 4(8-9):321-331.

- Ried T, Liyanage M, du MS, Heselmeyer K, Auer G, Macville M, Schröck E (1997) Tumor cytogenetics revisited, comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *J Mol Med* 75, 801-814.
- Rolhion C, Penault-Llorca F, Kemeny JL, Kwiatkowski F, Lemaire JJ, Chollet P, Finat-Duclos F, Verrelle P (1999) O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT) expression in human glioblastomas in relation to patient characteristics and p53 accumulation. *Int J Cancer* 20;84(4):416-420.
- Rowley JD (1973) Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukaemia. *Ann Genet* 16(2):109-112.
- Rydberg B, Spurr N, Karran P (1990) cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase. cDNA expression in *Escherichia coli* and gene expression in human cells. *J Biol Chem* 5;265(16):9563-9569.
- Salzman M (1980) Survival in glioblastoma: historical perspective. *Neurosurgery* 7(5):435-439.
- Salmon I, Dewitte O, Pasteels JL, Flament-Durand J, Brotchi J, Vereerstraeten P, Kiss R (1994) Prognostic scoring in adult astrocytic tumors using patient age, histopathological grade, and DNA histogram type. *J Neurosurg* 80(5):877-883.
- Sanson M, Leuraud P, Aguirre-Cruz L, He J, Marie Y, Cartalat-Carel S, Mokhtari K, Duffau H, Delattre JY, Hoang-Xuan K (2002) Analysis of loss of chromosome 10q, DMBT1 homozygous deletions, and PTEN mutations in oligodendrogliomas. *J Neurosurg* 97(6):1397-1401.
- Sattler HP, Rohde V, Bonkhoff H, Zwergel T, Wullich B (1999) Comparative genomic hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer. *Prostate* 39(2):79-86.
- Saxena A, Robertson JT, Ali IU (1996) Abnormalities of p16, p15 and CDK4 genes in recurrent malignant astrocytomas. *Oncogene* 1;13(3):661-664.
- Schlegel J, Scherthan H, Arens N, Stumm G, Kiessling M (1994) Detection of complex genetic alterations in human glioblastoma multiforme using comparative genomic hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(1):81-87.
- Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP (1994) CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 15;54(24):6321-6324.
- Schmidt EE, Ichimura K, Messerle KR, Goike HM, Collins VP (1997) Infrequent methylation of CDKN2A(MTS1/p16) and rare mutation of both CDKN2A and CDKN2B(MTS2/p15) in primary astrocytic tumours. *Br J Cancer* 75(1):2-8.
- Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, Mueller W, Kuklik A, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Louis DN, Fimmers R, von Deimling A (2002) Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(4):321-328.
- Schröck E, Thiel G, Lozanova T, du MS, Meffert MC, Jauch A, Speicher MR, Nurnberg P, Vogel S, Janisch W (1994) Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol* 144, 1203-1218.
- Schröck E, du MS, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273, 494-497.
- Selker RG, Shapiro WR, Burger P, Blackwood MS, Arena VC, Gilder JC, Malkin MG, Mealey JJ Jr, Neal JH, Olson J, Robertson JT, Barnett GH, Bloomfield S, Albright R, Hochberg FH, Hiesiger E, Green S; Brain Tumor Cooperative Group.(2002) The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: a randomized comparison of

- surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine. *Neurosurgery* 51(2):343-55; discussion 355-357.
- Serrano M., Hannon G.J., Beach D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 336:704-707.
- Shafqat S, Hedley-Whyte ET, Henson JW (1999) Age-dependent rate of anaplastic transformation in low-grade astrocytoma. *Neurology* 10;52(4):867-869.
- Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Mealey J Jr, Ransohff J, Mahaley MS Jr (1992) A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU, with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma. *J Neurosurg* 76(5):772-781.
- Shapiro JR (2002) Genetic alterations associated with adult diffuse astrocytic tumors. *Am J Med Genet* 30;115(3):194-201.
- Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR (1997) Supratentorial gliomas: a comparative study by grade and histologic type. *J Neurooncol* 31(3):273-278.
- Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimaru Y, Ushio Y (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 15;63(20):6962-6970.
- Silber JR, Mueller BA, Ewers TG, Berger MS (1993) Comparison of O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in brain tumors and adjacent normal brain. *Cancer Res* 15;53(14):3416-3420.
- Silber JR, Bobola MS, Ghatan S, Blank A, Kolstoe DD, Berger MS (1998) O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics. *Cancer Res* 1;58(5):1068-1073.
- Simmons ML, Lamborn KR, Takahashi M, Chen P, Israel MA, Berger MS, Godfrey T, Nigro J, Prados M, Chang S, Barker FG 2nd, Aldape K (2001) Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res* 1;61(3):1122-1128.
- Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, Kimmel D, Yates A, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB (2000a) Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol* 18(3):636-645.
- Smith JS, Jenkins RB (2000b) Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci* 1;5:D213-31.
- Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB (2001) PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* 15;93(16):1246-1256.
- Sneed PK, Prados MD, McDermott MW, Larson DA, Malec MK, Lamborn KR, Davis RL, Weaver KA, Wara WM, Phillips TL, et al. (1995) Large effect of age on the survival of patients with glioblastoma treated with radiotherapy and brachytherapy boost. *Neurosurgery* 36(5):898-903; discussion 903-904.
- Somerville RP, Shoshan Y, Eng C, Barnett G, Miller D, Cowell JK (1998) Molecular analysis of two putative tumour suppressor genes, PTEN and DMBT, which have been implicated in glioblastoma multiforme disease progression. *Oncogene* 1;17(13):1755-1757.
- Sonoda Y, Murakami Y, Tominaga T, Kayama T, Yoshimoto T, Sekiya T (1996) Deletion mapping of chromosome 10 in human glioma. *Jpn J Cancer Res* 87(4):363-367.

- Speicher MR, du Manoir S, Schrock E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T (1993) Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet* 2, 1907-1914.
- Speicher MR, Gwyn BS, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12, 368-375.
- Steck PA, Ligon AH, Cheong P, Yung WK & Pershouse MA (1995) Two tumor suppressive loci on chromosome 10 involved in human glioblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* 12, 255-261.
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV (1997) Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15(4):356-362.
- Steilen-Gimbel H, Henn W, Kolles H, Moringlane JR, Feiden W, Steudel WI, Zang KD (1996) Early proliferation enhancement by monosomy 10 and intratumor heterogeneity in malignant human gliomas as revealed by smear preparations from biopsies. *Genes Chromosomes Cancer* 16, 180-184.
- Steilen-Gimbel H, Steudel WI, Feiden W, Moringlane JR, Henn W, Zang KD (1999) Genetic heterogeneity in human astrocytomas: spatial distribution of P16 and TP53 deletions in biopsies. *Cancer Genet Cytogenet* 113(2):115-119.
- Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C, Gibson NW, Slack JA, et al. (1987) Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res.* 1987 Nov 15;47(22):5846-5852.
- Stewart LA (2002) Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 23;359(9311):1011-1018.
- Stevens MFG, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C, Gibson NW, Slack JA, Newton C, Lunt E, Fizames C, Lavelle F (1987) Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res* 47:5846-5852.
- Stupp R, Newlands E (2001a) New approaches for temozolomide therapy: use in newly diagnosed glioma. *Semin Oncol* 28(4 Suppl 13):19-23.
- Stupp R, Gander M, Leyvraz S, Newlands E (2001b) Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. *Lancet Oncol* 2(9):552-60.
- Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, Meuli R, Janzer R, Pizzolato G, Miralbell R, Porchet F, Regli L, de Tribolet N, Mirimanoff RO, Leyvraz S (2002) Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 1;20(5):1375-1382.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 10;352(10):987-996.

- Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP (1990) Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(21):8602-8606.
- Srivenugopal KS, Yuan XH, Friedman HS, Ali-Osman F (1996) Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry* 30;35(4):1328-1334.
- Tada M, Iggo RD, Ishii N, Shinohe Y, Sakuma S, Estreicher A, Sawamura Y, Abe H (1996) Clonality and stability of the p53 gene in human astrocytic tumor cells: quantitative analysis of p53 gene mutations by yeast functional assay. *Int J Cancer* 29;67(3):447-450.
- Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Nakamura H, Hirano H, Kuratsu J, Kochi M, Saya H, Ushio Y (2001) Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: correlation with patient age and survival. *J Neurosurg* 95(4):651-659.
- Tanaka S, Kobayashi I, Utsuki S, Oka H, Fujii K, Watanabe T, Nagashima T, Hori T (2003) O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression in gliomas by means of real-time quantitative RT-PCR and clinical response to nitrosoureas. *Int J Cancer* 1;103(1):67-72.
- Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RP, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J (1999) New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation, COBRA, COmbined Binary RAtio labelling. *Eur J Hum Genet* 7, 2-11.
- Tano K, Shiota S, Collier J, Foote RS, Mitra S (1990) Isolation and structural characterization of cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2):686-690. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Apr;87(8):3253.
- Taylor SM, Jones PA (1979) Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17(4):771-779.
- Terada K, Tamiya T, Daido S, Kambara H, Tanaka H, Ono Y, Matsumoto K, Ito S, Ouchida M, Ohmoto T, Shimizu K (2002) Prognostic value of loss of heterozygosity around three candidate tumor suppressor genes on chromosome 10q in astrocytomas. *J Neurooncol* 58(2):107-114.
- Thein SL, Lynch JR, Weatherall DJ, Wallace RB (1986) Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides. *Lancet* 11;1(8472):93.
- Thiel G, Losanowa T, Kintzel D, Nisch G, Martin H, Vorpahl K, Witkowski R (1992) Karyotypes in 90 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 58(2):109-120.
- Thiessen B, Maguire JA, McNeil K, Huntsman D, Martin MA, Horsman D (2003) Loss of heterozygosity for loci on chromosome arms 1p and 10q in oligodendroglial tumors: relationship to outcome and chemosensitivity. *J Neurooncol* 64(3):271-278.
- Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1998) PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(7):684-689.
- Tomatsu S, Orii KO, Islam MR, Shah GN, Grubb JH, Sukegawa K, Suzuki Y, Orii T, Kondo N, Sly WS (2002) Methylation patterns of the human beta-glucuronidase gene locus: boundaries of methylation and general implications for frequent point mutations at CpG dinucleotides. *Genomics* 79(3):363-375.
- Thomassin H, Oakeley EJ, Grange T (1999) Identification of 5-methylcytosine in complex genomes. *Methods* 19(3):465-475.

- Ueki K, Rubio MP, Ramesh V, Correa KM, Rutter JL, von Deimling A, Buckler AJ, Gusella JF, Louis DN (1994) MTS1/CDKN2 gene mutations are rare in primary human astrocytomas with allelic loss of chromosome 9p. *Hum Mol Genet* 3(10):1841-1845.
- Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN (1996) CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56(1):150-153.
- Uhlmann K, Rohde K, Zeller C, Szymas J, Vogel S, Marczynek K, Thiel G, Nurnberg P, Laird PW (2003) Distinct methylation profiles of glioma subtypes. *Int J Cancer* 10;106(1):52-59.
- van den Bent MJ, Looijenga LH, Langenberg K, Dinjens W, Graveland W, Uytendewilligen L, Sillevius Smitt PA, Jenkins RB, Kros JM (2003a) Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features. *Cancer* 1;97(5):1276-1284.
- van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Brandes AA, Menten J, Stupp R, Frenay M, Chinot O, Kros JM, van der Rijt CC, Vecht ChJ, Allgeier A, Gorlia T; European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group (2003b) Phase II study of first-line chemotherapy with temozolomide in recurrent oligodendroglial tumors: the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group Study 26971. *J Clin Oncol* 1;21(13):2525-2528.
- von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Hoell T, Chung RY, Martuza RL, Schoenfeld DA, Yasargil MG, Wiestler OD, et al. (1992a) Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 77(2):295-301.
- von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR (1992b) Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. *Cancer Res* 52(15):4277-4279.
- von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN (1993) Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol* 3(1):19-26.
- von Deimling A, Nagel J, Bender B, Lenartz D, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD (1994a) Deletion mapping of chromosome 19 in human gliomas. *Int J Cancer* 57(5):676-680.
- von Deimling A, Bender B, Jahnke R, Waha A, Kraus J, Albrecht S, Wellenreuther R, Fassbender F, Nagel J, Menon AG, et al. (1994b) Loci associated with malignant progression in astrocytomas: a candidate on chromosome 19q. *Cancer Res* 54(6):1397-1401.
- von Deimling A, Louis DN, Wiestler OD (1995) Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia* 15(3):328-338.
- von Deimling A, Fimmers R, Schmidt MC, Bender B, Fassbender F, Nagel J, Jahnke R, Kaskel P, Duerr EM, Koopmann J, Maintz D, Steinbeck S, Wick W, Platten M, Muller DJ, Przkora R, Waha A, Blumcke B, Wellenreuther R, Meyer-Puttlitz B, Schmidt O, Mollenhauer J, Poustka A, Stangl AP, Lenartz D, von Ammon K (2000) Comprehensive allelotyping and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 59(6):544-558.
- Waha A, Baumann A, Wolf HK, Fimmers R, Neumann J, Kindermann D, Astrahantseff K, Blumcke I, von Deimling A, Schlegel U (1996) Lack of prognostic relevance of alterations in the epidermal growth factor receptor-transforming growth factor-alpha pathway in human astrocytic gliomas. *J Neurosurg* 85(4):634-641.

- Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH (1998) Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 20(2):116-117.
- Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D, Parsons R (1997) Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 57(19):4183-4186.
- Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ (2002) Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* 27(2):101-107.
- Watanabe K, Tachiba O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6(3):217-23; discussion 23-24.
- Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1997) Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 3(4):523-530.
- Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Komine C, Yokoyama T (2003) Dereglulation of the TP53/p14ARF tumor suppressor pathway in low-grade diffuse astrocytomas and its influence on clinical course. *Clin Cancer Res* 9(13):4884-4890.
- Watanabe T, Katayama Y, Komine C, Yoshino A, Ogino A, Ohta T, Fukushima T (2005) O6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course. *Int J Cancer* 113(4):581-587.
- Weber RG, Sabel M, Reifenberger J, Sommer C, Oberstrass J, Reifenberger G, Kiessling M, Cremer T (1996a) Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. *Oncogene* 13(5):983-994.
- Weber RG, Sommer C, Albert FK, Kiessling M, Cremer T (1996b) Clinically distinct subgroups of glioblastoma multiforme studied by comparative genomic hybridization. *Lab Invest* 74(1):108-119.
- Weller M, Muller B, Koch R, Bamberg M, Krauseneck P; Neuro-Oncology Working Group of the German Cancer Society (2003a) Neuro-Oncology Working Group 01 trial of nimustine plus teniposide versus nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma. *J Clin Oncol* 21(17):3276-3284.
- Weller M (2003b) Primäre Hirntumoren und ZNS-Metastasen. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Interdisziplinäres Tumorzentrum, Klinikum, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Schriftenreihe „Therapieempfehlungen ITZ Tübingen ISSN 1438-8979, 4. Auflage.
- Weller M (2004) Interdisziplinäre S 2-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Gliome des Erwachsenenalters. Qualitätssicherung in der Onkologie. Koordination und Herausgeber: Informationszentrum für Standards in der Onkologie (ISTO), W. Zuckerschwerdt Verlag, München.
- Wessels PH, Twijnstra A, Kessels AG, Krijne-Kubat B, Theunissen PH, Ummelen MI, Ramaekers FC, Hopman AH (2002) Gain of chromosome 7, as detected by in situ hybridization, strongly correlates with shorter survival in astrocytoma grade 2. *Genes Chromosomes Cancer* 33(3):279-284.
- Westermarck B, Heldin CH, Nister M (1995) Platelet-derived growth factor in human glioma. *Glia* 15(3):257-263.
- Wikstrand CJ, McLendon RE, Friedman AH, Bigner DD (1997) Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res* 57(18):4130-4140.

- Wiltshire RN, Rasheed BK, Friedman HS, Friedman AH, Bigner SH (2000) Comparative genetic patterns of glioblastoma multiforme: potential diagnostic tool for tumor classification. *Neuro-oncol* 2(3):164-173.
- Wiltshire RN, Herndon JE 2nd, Lloyd A, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH, McLendon RE (2004) Comparative genomic hybridization analysis of astrocytomas: prognostic and diagnostic implications. *J Mol Diagn* 6(3):166-179.
- Wolter M, Reifenberger J, Blaschke B, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP, Reifenberger G (2001) Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16INK4a), p14ARF, and CDKN2B (MTS2, p15INK4b) tumor suppressor genes. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(12):1170-1180.
- Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B (1987) Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(19):6899-6903.
- Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1;89(7):2965-2969.
- Wong ET, Hess KR, Gleason MJ, Jaeckle KA, Kyritsis AP, Prados MD, Levin VA, Yung WK (1999) Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *J Clin Oncol* 17(8):2572-2578.
- Wood JR, Green SB, Shapiro WR (1988) The prognostic importance of tumor size in malignant gliomas: a computed tomographic scan study by the Brain Tumor Cooperative Group. *J Clin Oncol* 6(2):338-343.
- Wu JK, Ye Z, Darras BT (1993) Frequency of p53 tumor suppressor gene mutations in human primary brain tumors. *Neurosurgery* 33(5):824-30; discussion 830-831.
- Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang-Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen EY, Ando ME, Harkins RN, Francke U, et al. (1986) Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 18-24;323(6085):226-232.
- Yin D, Xie D, Hofmann WK, Zhang W, Asotra K, Wong R, Black KL, Koeffler HP (2003) DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase: promoter hypermethylation associated with decreased expression and G:C to A:T mutations of p53 in brain tumors. *Mol Carcinog* 36(1):23-31.
- Yu J, Zhang H, Gu J, Lin S, Li J, Lu W, Wang Y, Zhu J (2004) Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma. *BMC Cancer* 14;4:65.
- Yung WK, Prados MD, Yaya-Tur R, Rosenfeld SS, Brada M, Friedman HS, Albright R, Olson J, Chang SM, O'Neill AM, Friedman AH, Bruner J, Yue N, Dugan M, Zaknoen S, Levin VA (1999) Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. *J Clin Oncol* 17(9):2762-2771. Erratum in: *J Clin Oncol* 1999 Nov;17(11):3693.
- Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W, Glantz M, Greenberg H, Selker RG, Vick NA, Rampling R, Friedman H, Phillips P, Bruner J, Yue N, Osoba D, Zaknoen S, Levin VA (2000) A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer* 83(5):588-593.
- Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216:84-85.
- Zang KD (2002) Genetik von Hirntumoren des Erwachsenenalters. *Medgen* 14:186-191.

- Zauberman A, Flusberg D, Haupt Y, Barak Y, Oren M (1995) A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Res* 25;23(14):2584-2592.
- Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W (1997) Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet* 6(3):387-395.
- Ziegler A, Lange S, Bender R (2002) Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. *Dtsch Med Wochenschr* 127:T14-16.
- Ziegler A, Lange S, Bender R (2004) Überlebenszeitanalyse: Die Cox-Regression. *Dtsch Med Wochenschr* 129:T1-3.
- Zülch KJ (1964) On the definition of the polymorphous oligodendroglioma. *Acta Neurochir (Wien)* 11:SUPPL 10:166.

<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer>

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb	Abbildung
abs	absolut
ACNU	1-[(4-amino-2-methyl-pyrimidin-5-yl)methylamino]-N-(2-chloroethyl)-N-nitroso-formamid
AGT	O <sup>6</sup> -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
AIC	5-Aminoimidazol-4-carboxamid
Aqua dest	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
bio-11-dUTP	mit Biotin über eine Kohlenstoffkette verknüpftes Desoxyuridintriphosphatmolekül
β2-MG	β2-Mikroglobulin
bp	Basenpaare
BCNU	N-(2-chloroethyl)-1-(2-chloroethylamino)-N-nitroso-formamid
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCNU	1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-Nitrosurea
cen	zentromernahes Heterochromatin
cDNA	komplementäre DNA (copy DNA)
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN2A/B	Cyclin-dependent kinase inhibitor-2A/B
CGH	Vergleichende genomische Hybridisierung
cm	Zentimeter
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylidol
deion	deionisiert
d.h.	das heißt
dig-11-dUTP	mit Digoxigenin über eine Kohlenstoffkette verknüpftes Desoxyuridintriphosphatmolekül
DMBT1	Deleted in malignant brain tumors 1
dmin	double minutes
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung 9,81m/s <sup>2</sup>
GAS	Glioma amplified sequence
GLI	Glioma-associated oncogene homolog (zinc finger protein)
GBM	Glioblastoma multiforme
GS	Ziegen-Serum
GST	Glutathion-S-Transferase
GTG-Bänderung	Giensa Trypsin -Bänderung
h	Stunde

HCl	Salzsäure
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HSR	homogeneously stained regions
Hyb-Mix	Hybridisierungs-Mix
ISH	In situ- Hybridisierung
kB	Kilobasen
l	Liter
LOH	Loss of heterozygosity, Verlust eines Allels durch dessen heterozygote Deletion
M	Molar
MDM2	Mouse double minute 2
MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
mg	Milligramm
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MTIC	5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboxamid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMR	mismatch repair
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MW	Mittelwert
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NF	Neurofibromatose
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
OGAT	O <sup>6</sup> -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
O <sup>6</sup> -MeG	O <sup>6</sup> -Methylguanin
OT	Objektträger
P	kurzer Arm des Chromosoms
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
p-gp	p-Glycoprotein
PIP3	Phosphatidyl inositol phosphat
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
q	langer Arm des Chromosoms
RB1	Retinoblastoma 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SAS	Sarcoma amplified sequence
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sek	Sekunden
sGBM	sekundäres Glioblastoma multiforme
SSC	Natriumchlorid-Citrat-Puffer
ssss-DNA	single strande salmon sperm DNA
STK	Serine/Threonin Kinase
Tab	Tabelle
TM	Schmelzpunkt
TMZ	Temozolomid
TP53	Tumorsuppressorgen p53
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan

u.a.	unter anderem
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol	Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## 8.2. Material- und Herstellernachweis

### 8.2.1. Chemikalien, Enzyme, Kits, Verbrauchsmaterial

Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
anti-DIG-Rhodamin	Roche Diagnostics, Mannheim
AR-10-Solution	Biogenex, San Ramon, CA, USA
β2-Mikroglobulin sense, antisense	Operon, Köln
BCIP (Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat)	Roche Diagnostics, Mannheim
Biotin-Nick-Translation-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Bovine Serum Albumin BSA	Sigma, Taufkirchen
Colcemid	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Cot1-DNA, human (1 mg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
Cy3-dCTP	Perkin Elmer/NEN
Cy5-dCTP	Perkin Elmer/NEN
DAPI (Vectashield® with DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DNA-Leiter (50 bp)	Life-Technologies
dNTP-Mix	Amersham pharmacia, Freiburg
DIG-Nick-Translation-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Digoxigenin-alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethidiumbromid (500 ng/ml)	Merck, Darmstadt
fetales Kälberserum FCS	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Fixogum	Marabu, Tamm
GenoSensor™ Array 300	Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA
GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit	Amersham pharmacia, Freiburg
Harris modified Hematoxylin	Sigma, Taufkirchen
Marker VIII (0,25 µg/µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
MGMT-Antikörper, humanes Klon MT3.1	Chemicon, Temecula, CA, USA
MGMT sense, antisense	Operon, Köln
MultiLink®-HRP Kit	Biogenex, San Ramon, CA, USA
Nitrocellulosemembran Hybond	Amersham pharmacia, Freiburg
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsazl)	Roche Diagnostics, Mannheim
Oligo(dT <sub>18</sub> )-Primer	Operon, Köln

Pbmax	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PCR-Puffer	Amersham pharmacia, Freiburg
Penicillin	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Pepsin (2500 U/mg)	Sigma, Taufkirchen
PeqGold RNase Inhibitor Plus (10 U/μl)	PeqLab, Erlangen
Plasmid Mini Kit	Qiagen; Hilden
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1, pH 8.0	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phytohämagglutinin	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Proteinase K (30 mAnson-U/mg)	Merck, Darmstadt
Q-Lösung	Qiagen, Hilden
Omniscript® Reverse Transcriptase Kit	Qiagen, Hilden
Qiashredder®-Säulen	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNase H (100 μg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Roti®-HistoKit	Roth, Karlsruhe
RPMI, SOC-Medium	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe
2 % Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose	
Streptavidin-alkalische Phosphatase	Vector, Burlingame, CA, USA
Streptavidin-FITC	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Streptomycin	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Amersham pharmacia, Freiburg
TOPO TA Cloning® Kit for Sequenzing	Invitrogen, Karlsruhe
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega, Mannheim

Alle weiteren, hier nicht genannten Puffersalze und Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

### 8.2.2. Lösungen

Alle Lösungen wurden mit Aqua dest. unter möglichst reinen Bedingungen angesetzt. Im Folgenden sind die häufig benutzten Lösungen angegeben. Die speziellen Lösungen finden sich bei der jeweiligen Technik im Methodenteil.

Erythrozyten-Lysis-Puffer	155mM NH <sub>4</sub> Cl 10mM KHCO <sub>3</sub> 0,1mM Na EDTA pH 7,4
Ladepuffer	0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA 40 % Saccharose 1 Spatelspitze Bromphenolblau (für 10 ml)

SE-Puffer	75mM NaCl 25mM EDTA (pH8,0)
20x SSC	3M NaCl 0,3 M NaCitrat (pH 7,0)
PBS-Puffer	150mM NaCl 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2mM KCl 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH7,0)
10 x TAE-Puffer	400 mM Tris 120 mM Natriumacetat 20 mM EDTA mit HCl auf pH 8,3 einstellen
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH7,6) 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA

### 8.2.3. Geräte und Software

Brutschrank	begast	Heraeus, Hanau
CCD-Kamera	CH 250 (Kamera) CE 200A (Kühlung)	Photometrics, Tucson, Arizona, USA
Fluoreszenzmikroskop	AX 70	Olympus, Hamburg
Heizplatte	15801	Medax
Hellfeldmikroskop	BX 61	Olympus, Hamburg
ISIS Software	Version 3.1	Metasystems, Altlussheim
Kühlzentrifuge	Z233MK Rotanta/RP	Hermle, Wehingen Hettich, Tuttlingen
Power Supply	EPS 301	Pharmacia Biotech, Erlangen
RelQuant Software	Version 3.5	Roche Diagnostics, Mannheim
Spektrometer	Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Erlangen
Thermocycler	LightCycler 5.32 PTC-100™	Roche Diagnostics, Mannheim MJ Research, Inc.; Biozym Diagnostics GmbH, Hessisch Oldendorf
Thermomixer	comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Minispin Hyspin 16K	Eppendorf, Hamburg Anachem, Luton, UK
UV-Stratalinker	1800	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Waagen	H110 L2200S	Sartorius, Göttingen Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	1803	GFL, Großburgwedel
Werkbank	LaminAir	Heraeus, Hanau
Zytozentrifuge	Rotanta/P	Hettich, Tuttlingen

### 8.3. Sequenzierung der Promotorregion von *CDKN2A*(p16)

p16\_X94154 entspricht dem Datenbankeintrag der Promotorregion von *CDKN2A* mit den maximal möglichen methylierten CpG-Stellen.

Die anderen Sequenzierungsdaten entsprechen jeweils einem untersuchten Klon der entsprechenden Tumor-DNA.

Methylierte Cytosin-Reste sind dunkelgrau hinterlegt, falsch positive Cytosin-Reste hellgrau.

Die Rate der falsch positiven 5-Methyl-Cytosinreste betrug 0,174 %.

#### 1. Kontroll-DNA

Page 1.1

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
1 pro854_16	GGTGGGAGGAGTTT	AGTTTTTTTTTTT	-G	TAAATGTTGGTTTTG	GTGAGGGTTGTTTTT	GGTTGGTGTGTTTTG	GGGAGATTTAAATTTG					
2 p16_X94154	GGTGGGAGGAGTTT	AGTTTTTTTTTTTTT	TAA	CGTTGGTTTTG	CGGAGGGTTGTTTTT	CGGAGGGTTGTTTTT	CGGAGATTTAAATTTG					
3 pro850_11	GGTGGGAGGAGTTT	AGTTTTTTTTTTTTT	-G	TAA	CGTTGGTTTTG	GTGAGGGTTGTTTTT	GGTTGGTGTGTTTTG					
4 pro851_12	GGTGGGAGGAGTTT	AGTTTTTTTTTTTTT	-G	TAA	TGTTGGTTTTT	GTGAGGGTTGTTTTT	GGTTGGTGTGTTTTG					
5 pro852_13	GGTGGGAGGAGTTT	AGTTTTTTTTTTTTT	-G	TAA	TGTTGGTTTTT	GTGAGGGTTGTTTTT	GGTTGGTGTGTTTTG					
6 pro855_19	GGTGGGAGGAGTTT	AGTTTTTTTTTTTTT	-G	TAA	TGTTGGTTTTT	GTGAGGGTTGTTTTT	GGTTGGTGTGTTTTG					
7 pro853_15	GGTGGGAGGAGTTT	AGTTTTTTTTTTTTT	--G	TAA	TGTTGGTTTTT	GTGAGGGTTGTTTTT	GGTTGGTGTGTTTTG					

Page 2.1

1 pro854_16	GGGTGATTTTAGGGG	TGTTATATTTGTTAA	GTGTTTGGAGTTAAAT	AGTATTTTTTTTTCAG	TATTTGTTTATAGTG	TTTTTTTTGTTTTGGAA
2 p16_X94154	GGGCGATTTTAGGGG	TGTTATATTTGTTAA	GTGTTTGGAGTTAAAT	AGTATTTTTTTTTCAG	TATTTGTTTATAGTG	TTTTTTTTGTTTTGGAA
3 pro850_11	GGGTGATTTTAGGGG	TGTTATATTTGTTAA	GTGTTTGGAGTTAAAT	AGTATTTTTTTTTCAG	TATTTGTTTATAGTG	TTTTTTTTGTTTTGGAA
4 pro851_12	GGGTGATTTTAGGGG	TGTTATATTTGTTAA	GTGTTTGGAGTTAAAT	AGTATTTTTTTTTCAG	TATTTGTTTATAGTG	TTTTTTTTGTTTTGGAA
5 pro852_13	GGGTGATTTTAGGGG	TGTTATATTTGTTAA	GTGTTTGGAGTTAAAT	AGTATTTTTTTTTCAG	TATTTGTTTATAGTG	TTTTTTTTGTTTTGGAA
6 pro855_19	GGGTGATTTTAGGGG	TGTTATATTTGTTAA	GTGTTTGGAGTTAAAT	AGTATTTTTTTTTCAG	TATTTGTTTATAGTG	TTTTTTTTGTTTTGGAA
7 pro853_15	GGGTGATTTTAGGGG	TGTTATATTTGTTAA	GTGTTTGGAGTTAAAT	AGTATTTTTTTTTCAG	TATTTGTTTATAGTG	TTTTTTTTGTTTTGGAA

Page 3.1

```

181      195 196      210 211      225 226      240 241      255 256      270
1 pro854_16 AGATATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAAG--- 251
2 p16_X94154 AGATATCGCGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTCGGAG GGGTTTTTTTCGTTAG TATCGGAGGAAGAAA GAGGAGGGGTTG 267
3 pro850_11 AGATATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAAG--- 252
4 pro851_12 AGATATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAAG--- 251

5 pro852_13 AGATATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAAG--- 251
6 pro855_19 AGATATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAAG--- 251
7 pro853_15 AGATATCGTGGTTTT CTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAAGAA- 251

```

## 2. Tumor 820/00

Page 1.1

```

1      15 16      30 31      45 46      60 61      75 76      90
1 820p16_topo9_S23 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT-- -GTTAAAGTTGGTTT TGGTGAGGGTTGTTT TTGGTTGGTGTGTTTTT GGGGGAGATTTAATT
2 p16_X94154 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT- -GTTAAAGTTGGTTT TGGCGAGGGTTGTTT TCGGTTGGTGTGTTTTG GGGGGAGATTTAATT
3 820p16_topo1_S15 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTT -GTTAAAGTTGGTTT TGGTGAGGGTTGTTT TTGGTTGGTGTGTTTTT GGGGGAGATTTAATT
4 820p16_topo2_S16 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTT TGTAAAGTTGGTTT TGGTGAGGGTTGTTT TTGGTTGGTGTGTTTTT GGGGGAGATTTAATT
5 820p16_topo3_S17 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT- -GTTAAAGTTGGTTT TGGTGAGGGTTGTTT TTGGTTGGTGTGTTTTT GGGGGAGATTTAATT
6 820p16_topo4_S18 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT- -GTTAAAGTTGGTTT TGGTGAGGGTTGTTT TTGGTTGGTGTGTTTTT GGGGGAGATTTAATT
7 820p16_topo5_S19 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTT -GTTAAAGTTGGTTT TGGTGAGGGTTGTTT TTGGTTGGTGTGTTTTT GGGGGAGATTTAATT
8 820p16_topo6_S20 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTT- -GTTAAAGTTGGTTT TGGTGAGGGTTGTTT TTGGTTGGTGTGTTTTT GGGGGAGATTTAATT
9 820p16_topo7_S21 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT- -GTTAAAGTTGGTTT TGGTGAGGGTTGTTT TTGGTTGGTGTGTTTTT GGGGGAGATTTAATT
10 820p16_topo8_S22 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT- -GTTAAAGTTGGTTT TGGTGAGGGTTGTTT TTGGTTGGTGTGTTTTT GGGGGAGATTTAATT
11 820p16_topo10_S24 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT- -GTTAAAGTTGGTTT TGGTGAGGGTTGTTT TTGGTTGGTGTGTTTTT GGGGGAGATTTAATT

```

Page 2.1

91 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180  
 1 820p16\_topo9\_S23 TGGGGTGAATTTAGG GGTGTTATAATTTGTT AAGTGTTTGGAGTTA ATAGTATTTTTTTTTT AGTATTTGTTTATGG TGTTTTTTTGTTTTGG  
 2 p16\_X94154 TGGGGCGAATTTAGG GGTGTTATAATTTGTT AAGTGTTTGGAGTTA ATAGTATTTTTTTTTT AGTATTTGTTTATAG CGTTTTTTTTGTTTTGG  
 3 820p16\_topo1\_S15 TGGGGTGAATTTAGG GGTGTTATAATTTGTT AAGTGTTTGGAGTTA ATAGTATTTTTTTTTT AGTATTTGTTTATGG TGTTTTTTTGTTTTGG  
 4 820p16\_topo2\_S16 TGGGGTGAATTTAGG GGTGTTATAATTTGTT AAGTGTTTGGAGTTA ATAGTATTTTTTTTTT AGTATTTGTTTATGG TGTTTTTTTGTTTTGG  
 5 820p16\_topo3\_S17 TGGGGTGAATTTAGG GGTGTTATAATTTGTT AAGTGTTTGGAGTTA ATAGTATTTTTTTTTT AGTATTTGTTTATGG TGTTTTTTTGTTTTGG  
 6 820p16\_topo4\_S18 TGGGGTGAATTTAGG GGTGTTATAATTTGTT AAGTGTTTGGAGTTA ATAGTATTTTTTTTTT AGTATTTGTTTATGG TGTTTTTTTGTTTTGG  
 7 820p16\_topo5\_S19 TGGGGTGAATTTAGG GGTGTTATAATTTGTT AAGTGTTTGGAGTTA ATAGTATTTTTTTTTT AGTATTTGTTTATGG TGTTTTTTTGTTTTGG  
 8 820p16\_topo6\_S20 TGGGGTGAATTTAGG GGTGTTATAATTTGTT AAGTGTTTGGAGTTA ATAGTATTTTTTTTTT AGTATTTGTTTATGG TGTTTTTTTGTTTTGG  
 9 820p16\_topo7\_S21 TGGGGTGAATTTAGG GGTGTTATAATTTGTT AAGTGTTTGGAGTTA ATAGTATTTTTTTTTT AGTATTTGTTTATGG TGTTTTTTTGTTTTGG  
 10 820p16\_topo8\_S22 TGGGGTGAATTTAGG GGTGTTATAATTTGTT AAGTGTTTGGAGTTA ATAGTATTTTTTTTTT AGTATTTGTTTATGG TGTTTTTTTGTTTTGG  
 11 820p16\_topo10\_S24 TGGGGTGAATTTAGG GGTGTTATAATTTGTT AAGTGTTTGGAGTTA ATAGTATTTTTTTTTT AGTATTTGTTTATGG TGTTTTTTTGTTTTGG

Page 3.1

181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270  
 1 820p16\_topo9\_S23 AAAGATAATTTGGTT TTTTAAAGAGGATTTG AGGATAGGGTTTGA GGGGTTTTTTTTTGT AGTATTTGAGG-----  
 2 p16\_X94154 AAAGATAATTTGGTT TTTTAAAGAGGATTTG AGGATAGGGTTTGA GGGGTTTTTTTTTGT AGTATTTGAGGAAAGA AAGAGGAGGGTTG  
 3 820p16\_topo1\_S15 AAAGATAATTTGGTT TTTTAAAGAGGATTTG AGGATAGGGTTTGA GGGGTTTTTTTTTGT AGTATTTGAGG-----  
 4 820p16\_topo2\_S16 AAAGATAATTTGGTT TTTTAAAGAGGATTTG AGGATAGGGTTTGA GGGGTTTTTTTTTGT AGTATTTGAGG-----  
 5 820p16\_topo3\_S17 AAAGATAATTTGGTT TTTTAAAGAGGATTTG AGGATAGGGTTTGA GGGGTTTTTTTTTGT AGTATTTGAGG-----  
 6 820p16\_topo4\_S18 AAAGATAATTTGGTT TTTTAAAGAGGATTTG AGGATAGGGTTTGA GGGGTTTTTTTTTGT AGTATTTGAGG-----  
 7 820p16\_topo5\_S19 AAAGATAATTTGGTT TTTTAAAGAGGATTTG AGGATAGGGTTTGA GGGGTTTTTTTTTGT AGTATTTGAGG-----  
 8 820p16\_topo6\_S20 AAAGATAATTTGGTT TTTTAAAGAGGATTTG AGGATAGGGTTTGA GGGGTTTTTTTTTGT AGTATTTGAGG-----  
 9 820p16\_topo7\_S21 AAAGATAATTTGGTT TTTTAAAGAGGATTTG AGGATAGGGTTTGA GGGGTTTTTTTTTGT AGTATTTGAGG-----  
 10 820p16\_topo8\_S22 AAAGATAATTTGGTT TTTTAAAGAGGATTTG AGGATAGGGTTTGA GGGGTTTTTTTTTGT AGTATTTGAGG-----  
 11 820p16\_topo10\_S24 AAAGATAATTTGGTT TTTTAAAGAGGATTTG AGGATAGGGTTTGA GGGGTTTTTTTTTGT AGTATTTGAGG-----

3. Tumor 896/99

Page 1.1

1 1 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 1 pro23471\_B5 GGTGGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTG TTAATGTTGGTTTTG GTGAGGGTGTTTTTT GGTGGTGTTTTTGG GGGAGATTTAAATTTG 90  
 2 pro23525\_B6 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTG TTAATGTTGGTTTTG GTGAGGGTGTTTTTT GGTGGTGTTTTTGG GGGAGATTTAAATTTG 90  
 3 pro23473\_B8 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTG TTAATGTTGGTTTTG GTGAGGGTGTTTTTT GGTGGTGTTTTTGG GGGAGATTTAAATTTG 90  
 4 pro23475\_B10 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTG TTAATGTTGGTTTTG GTGAGGGTGTTTTTT GGTGGTGTTTTTGG GGGAGATTTAAATTTG 90  
 5 pro23467\_B1 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTG TTAATGTTGGTTTTG GTGAGGGTGTTTTTT GGTGGTGTTTTTGG GGGAGATTTAAATTTG 90  
 6 pro23474\_B9 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTG TTAATGTTGGTTTTG GTGAGGGTGTTTTTT GGTGGTGTTTTTGG GGGAGATTTAAATTTG 90  
 7 pro23470\_B4 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTG TTAATGTTGGTTTTG GTGAGGGTGTTTTTT GGTGGTGTTTTTGG GGGAGATTTAAATTTG 90  
 8 pro23472\_B7 GGTGGGAGGAGTTT AG-TTTTTTTTTTTTTTTG TTAATGTTGGTTTTG GTGAGGGTGTTTTTT GGTGGTGTTTTTGG GGGAGATTTAAATTTG 89  
 9 p16\_X94154 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTTG TTAAGTTGGTTTTG GCGAGGGTGTTTTTT GGTGGTGTTTTTGG GGGAGATTTAAATTTG 90  
 10 pro23469\_B3 GGTGGGAGGAGTTT AG--TTTTTTTTTTTTT TTAATGTTGGTTTTG GTGAGGGTGTTTTTT GGTGGTGTTTTTGG GGGAGATTTAAATTTG 88

Page 2.1

1 91 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180  
 1 pro23471\_B5 GGGTGATTTTAGGGG TGTATATATTTGTTAA GTGTTTGGAGTTAAT AGTATTTTTTTTTGAG TATTTGTTTATAGTG TTTTTTTGTTTGGAA 180  
 2 pro23525\_B6 GGGTGATTTTAGGGG TGTATATATTTGTTAA GTGTTTGGAGTTAAT AGTATTTTTTTTTGAG TATTTGTTTATAGTG TTTTTTTGTTTGGAA 180  
 3 pro23473\_B8 GGGTGATTTTAGGGG TGTATATATTTGTTAA GTGTTTGGAGTTAAT AGTATTTTTTTTTGAG TATTTGTTTATAGTG TTTTTTTGTTTGGAA 180  
 4 pro23475\_B10 GGGTGATTTTAGGGG TGTATATATTTGTTAA GTGTTTGGAGTTAAT AGTATTTTTTTTTGAG TATTTGTTTATAGTG TTTTTTTGTTTGGAA 180  
 5 pro23467\_B1 GGGTGATTTTAGGGG TGTATATATTTGTTAA GTGTTTGGAGTTAAT AGTATTTTTTTTTGAG TATTTGTTTATAGTG TTTTTTTGTTTGGAA 180  
 6 pro23474\_B9 GGGTGATTTTAGGGG TGTATATATTTGTTAA GTGTTTGGAGTTAAT AGTATTTTTTTTTGAG TATTTGTTTATAGTG TTTTTTTGTTTGGAA 180  
 7 pro23470\_B4 GGGTGATTTTAGGGG TGTATATATTTGTTAA GTGTTTGGAGTTAAT AGTATTTTTTTTTGAG TATTTGTTTATAGTG TTTTTTTGTTTGGAA 180  
 8 pro23472\_B7 GGGTGATTTTAGGGG TGTATATATTTGTTAA GTGTTTGGAGTTAAT AGTATTTTTTTTTGAG TATTTGTTTATAGTG TTTTTTTGTTTGGAA 179  
 9 p16\_X94154 GGGCGATTTTAGGGG TGTATATATTTGTTAA GTGTTTGGAGTTAAT AGTATTTTTTTTTGAG TATTCGTTTATAGCG TTTTTTTGTTTGGAA 180  
 10 pro23469\_B3 GGGTGATTTTAGGGG TGTATATATTTGTTAA GTGTTTGGAGTTAAT AGTATTTTTTTTTGAG TATTTGTTTATAGTG -TTTTTTGTTTGGAA 177

Page 3.1

```

181      195 196      210 211      225 226      240 241      255 256      270
1 pro23471_B5 AGATAATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAGG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAA----- 251
2 pro23525_B6 AGATAATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAGG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAA----- 250
3 pro23473_B8 AGATAATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAGG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAA----- 250
4 pro23475_B10 AGATAATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAGG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAA----- 252
5 pro23467_B1 AGATAATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAGG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAA----- 251
6 pro23474_B9 AGATAATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAGG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAA----- 251
7 pro23470_B4 AGATAATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAGG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAA----- 250
8 pro23472_B7 AGGTAATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAGG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAAAGAA GAGGA----- 259
9 p16_X94154 AGATAATCGCGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAGG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAAAGAA GAGGAGGGGTTGGAG 270
10 pro23469_B3 AGATAATTGTGGTTTT TTTAGAGGATTTGAG GGATAGGGTTGGAGG GGGTTTTTTTTTGTAG TATTGGAGGAAAGAA----- 251

```

4. Tumor 1488100

Page 1.1

```

1      15 16      30 31      45 46      60 61      75 76      90
1 pro23547 GGTGGGAGGAGTTTT AGTTTTTTTTTT----- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGGTTGTTTT TGGTTGGTGTTTTTTG GGGGAGATTTAAATTT 86
2 p16_X94154 GGTGGGAGGAGTTTT AGTTTTTTTTTTTT-- GTTAAAGTTGGTTTT GCGCAGGGTTGTTTT CGGTTGGTGTTTTTCG GGGGAGATTTAAATTT 89
3 pro23546-1 GGTGGGAGGAGTTTT AGTTTTTTTTTTTT-- GNTAAATGNTGGTTTT GGNNGGGTTGTTTT TGGNTGGTGTTTTTTG GGGGAGATNNAATTT 89
4 pro23548 GGTGGGAGGAGTTTT AGTTTTTTTTTTTT-- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGGTTGTTTT TGGTTGGTGTTTTTTG GGGGAGATTTAAATTT 88
5 pro23549 GGTGGGAGGAGTTTT AGTTTTTTTTTTTTTT GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGGTTGTTTT TGGTTGGTGTTTTTTG GGGGAGATTTAAATTT 90
6 pro23550 GGTGGGAGGAGTTTT AGTTTTTTTTTTTTTT-- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGGTTGTTTT C GGTGAGGGTTAAATTT 89
7 pro23551 GGTGGGAGGAGTTTT AGTTTTTTTTTTTTTT-- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGGTTGTTTT TGGTTGGTGTTTTTTG GGGGAGATTTAAATTT 89
8 pro23552 GGTGGGAGGAGTTTT AGTTTTTTTTTTTTTT-- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGGTTGTTTT TGGTTGGTGTTTTTTG GGGGAGATTTAAATTT 88
9 pro23553 GGTGGGAGGAGTTTT AGTTTTTTTTTTTTTT-- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGGTTGTTTT TGGTTGGTGTTTTTTG GGGGAGATTTAAATTT 88
10 pro23554 GGTGGGAGGAGTTTT AGTTTTTTTTTTTTTT-- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGGTTGTTTT TGGTTGGTGTTTTTTG GGGGAGATTTAAATTT 89
11 pro23555 GGTGGGAGGAGTTTT AGTTTTTTTTTTTTTT-- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGGTTGTTTT TGGTTGGTGTTTTTTG GGGGAGATTTAAATTT 88

```

## Page 2.1

91 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180  
 1 pro23547 GGGGTGATTTAGGG GTGTTATAATTTGTTA AGTGTTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTGTTTGGA 176  
 2 p16\_X94154 GGGGCGATTTAGGG GTGTTATAATTTGTTA AGTGTTCGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTCGA GTATTCGTTTATAGC GTTTTTTGTTTGGA 179  
 3 pro23546-1 GGGNGATTTAGGG GTGTTATAATTTGTTA AGTGTTTGGAGTTAA TANATAATTTTTTTGA GTATTTGNTATAGT GTTTTTTGTTTGNA 179  
 4 pro23548 GGGGTGATTTAGGG GTGTTATAATTTGTTA AGTGTTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTGTTTGGA 178  
 5 pro23549 GGGGTGATTTAGGG GTGTTATAATTTGTTA AGTGTTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTGTTTGGA 180  
 6 pro23550 GGGGTGATTTAGGG GTGTTATAATTTGTTA AGTGTTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTGTTTGGA 179  
 7 pro23551 GGGGTGATTTAGGG GTGTTATAATTTGTTA AGTGTTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTGTTTGGA 179  
 8 pro23552 GGGGTGATTTAGGG GTGTTATAATTTGTTA AGTGTTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTGTTTGGA 178  
 9 pro23553 GGGGTGATTTAGGG GTGTTATAATTTGTTA AGTGTATGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTGTTTGGA 178  
 10 pro23554 GGGGTGATTTAGGG GTGTTATAATTTGTTA AGTGTTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTGTTTGGA 179  
 11 pro23555 GGGGTGATTTAGGG GTGTTATAATTTGTTA AGTGTTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTGTTTGGA 178

## Page 3.1

181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270  
 1 pro23547 AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTGTTA GTATTTGGAGGAA-- 249  
 2 p16\_X94154 AAGATATCGGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTCGTTA GTATCGGAGGAAGAA AGAGGAGGGGTTG-- 267  
 3 pro23546-1 AAGATATTGGGTTT TTTTAGANGAATTTGN GGGATAGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTGTTA NTATTTGNNGAAAAA AGANGAGGGGTTGAA 269  
 4 pro23548 AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTGTTA GTATTTGGAGGA--- 249  
 5 pro23549 AAGATATTGTGGTTT TTTTAAAGGATTTGA GGGATAGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTGTTA GTATTTGGAG--- 249  
 6 pro23550 AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTGTTA GTATTTGGAG--- 249  
 7 pro23551 AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTGTTA GTATTTGA--- 247  
 8 pro23552 AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTGTTA GTATTTGGAGGA--- 249  
 9 pro23553 AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTGTTA GTATTTGGAGGA--- 249  
 10 pro23554 AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTGTTA --- 239  
 11 pro23555 AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTGTTA GTATTTGA--- 246

5. Tumor 1460/99

Page 1.1

1 1460p16\_topo1\_GS1 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90 90  
 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGTTGTTTT TGGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 88  
 2 p16\_X94154 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAACGTTGGTTTT GGACAGGTTGTTTT CGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 89  
 3 1460\_p16\_topo3\_Q3 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGTTGTTTT TGGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 89  
 4 1460\_p16\_topo2\_GS2 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGTTGTTTT TGGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 88  
 5 1460p16\_GS9 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGTTGTTTT TGGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 88  
 6 1460\_p16\_topo3\_Q4 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGTTGTTTT TGGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 89  
 7 1460\_p16\_topo5\_S3 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGTTGTTTT TGGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 89  
 8 1460\_p16\_topo6\_S4 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGTTGTTTT TGGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 90  
 9 1460\_p16\_topo7\_S5 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGTTGTTTT TGGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 90  
 10 1460\_p16\_topo8\_S6 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGTTGTTTT TGGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 89  
 11 1460\_p16\_topo9\_S7 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGTTGTTTT TGGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 88  
 12 1460\_p16\_topo10\_S8 GGTGGGAGGAGTTT AGTTTTTTTTTTTTTT -- GTTAAATGTTGGTTTT GGTGAGGTTGTTTT TGGTTGGTGTGTTTTG GGGAGATTTAAATTT 89

Page 2.1

91 1460p16\_topo1\_GS1 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180 180  
 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 178  
 2 p16\_X94154 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTCGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 179  
 3 1460\_p16\_topo3\_Q3 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 179  
 4 1460\_p16\_topo2\_GS2 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 178  
 5 1460\_p16\_GS9 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 178  
 6 1460\_p16\_topo3\_Q4 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 178  
 7 1460\_p16\_topo5\_S3 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 179  
 8 1460\_p16\_topo6\_S4 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 180  
 9 1460\_p16\_topo7\_S5 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 180  
 10 1460\_p16\_topo8\_S6 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 179  
 11 1460\_p16\_topo9\_S7 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 178  
 12 1460\_p16\_topo10\_S8 GGGTGATTTTATAGG GTGTTATATTTGTTA AGTGTGTTGGAGTTAA TAGTATTTTTTTTTGA GTATTTGTTTATAGT GTTTTTTTGTTTGA 179

## Page 3.1

```

181
1 1460p16_topo1_GS1 181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270
AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GTATTGGAGGAAAG-- 251
AAGATATCGCGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GTATCGGAGGAAGAA AGAGGAGGGGTTG-- 267
AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGG GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GTATTGGAGGAAGAA AGAGGAGGGGTTGAA 269
AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GTATTGGAGG----- 248

5 1460_p16_GS9 181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270
AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GTATTGGAGG----- 248
AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GTATTGGAGGAAGAA AGAGGAGGGGTTG-- 266
AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GTATTGG----- 246
AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GTATT----- 245

9 1460_p16_topo7_S5 181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270
AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GTAT----- 244
10 1460_p16_topo8_S6 181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270
AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GTATTG----- 245
11 1460_p16_topo9_S7 181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270
AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GTATTGGA----- 245
12 1460_p16_topo10_S8 181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270
AAGATATTGTGGTTT TTTTAGAGGATTTGA GGGATAGGGTTGGAG GGGGTTTTTTTTTTGTTA GT----- 241

```

## Page 4.1

```

271 285 286 300
1 1460p16_topo1_GS1 271 285 286 300
2 p16_X94154 ----- 251
3 1460_p16_topo3_Q3 GGGCGAATTCGTTTA AACC 267
4 1460_p16_topo2_GS2 ----- 288
5 1460_p16_GS9 ----- 248
6 1460_p16_topo3_Q4 ----- 266
7 1460_p16_topo5_S3 ----- 246
8 1460_p16_topo6_S4 ----- 245
9 1460_p16_topo7_S5 ----- 244
10 1460_p16_topo8_S6 ----- 245
11 1460_p16_topo9_S7 ----- 245
12 1460_p16_topo10_S8 ----- 241

```

#### 8.4. Sequenzierung der Promotorregion von *CDKN2B* (p15)

p15S75756 entspricht dem Datenbankeintrag der Promotorregion von *CDKN2B* mit den maximal möglichen methylierten CpG-Stellen. Die anderen Sequenzierungsdaten entsprechen jeweils einem untersuchten Klon der entsprechenden Tumor-DNA. Methylierte Cytosin-Reste sind dunkelgrau hinterlegt, falsch positive Cytosin-Reste hellgrau. Die Rate der falsch positiven 5-Methyl-Cytosinreste betrug 0,35 %.

##### 1. Kontroll-DNA

Page 1.1

1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
pro846_7	TGGGAAAGAAGGGAA	GAGTGTGTTAAAGTT	TATGGTTAATGGTTG	ATTATTTGGGTTGTT	GTGTGTTTGGGGGTT	GTGGAATGTGTGAGG					
pro847_8	TGGGAAAGAAGGGAA	GAGTGTGTTAAAGTT	TATGGTTAATGGTTG	ATTATTTGGGTTGTT	GTGTGTTTGGGGGTT	GTGGAATGTGTGAGG					
p15S75756	TGGGAAAGAAGGGAA	GAGTGTGTTAAAGTT	TATGGTTAATGGTTG	ATTATTTGGGTTGTT	GTGTGTTTGGGGGTT	GTGGAATGTGTGAGG					
pro845_6	TGGGAAAGAAGGGAA	GAGTGTGTTAAAGTT	TATGGTTAATGGTTG	ATTATTTGGGTTGTT	GTGTGTTTGGGGGTT	GTGGAATGTGTGAGG					
pro841_2	TGGGAAAGAAGGGAA	GAGTGTGTTAAAGTT	TATGGTTAATGGTTG	ATTATTTGGGTTGTT	GTGTGTTTGGGGGTT	GTGGAATGTGTGAGG					
pro842_3	TGGGAAAGAAGGGAA	GAGTGTGTTAAAGTT	TATGGTTAATGGTTG	ATTATTTGGGTTGTT	GTGTGTTTGGGGGTT	GTGGAATGTGTGAGG					
pro843_4	TGGGAAAGAAGGGAA	GAGTGTGTTAAAGTT	TATGGTTAATGGTTG	ATTATTTGGGTTGTT	GTGTGTTTGGGGGTT	GTGGAATGTGTGAGG					
pro844_5	TGGGAAAGAAGGGAA	GAGTGTGTTAAAGTT	TATGGTTAATGGTTG	ATTATTTGGGTTGTT	GTGTGTTTGGGGGTT	GTGGAATGTGTGAGG					
pro848_9	TGGGAAAGAAGGGAA	GAGTGTGTTAAAGTT	TATGGTTAATGGTTG	ATTATTTGGGTTGTT	GTGTGTTTGGGGGTT	GTGGAATGTGTGAGG					
pro849_10	TGGGAAAGAAGGGAA	GAGTGTGTTAAAGTT	TATGGTTAATGGTTG	ATTATTTGGGTTGTT	GTGTGTTTGGGGGTT	GTGGAATGTGTGAGG					
pr25342_11	TGGGAAAGAAGGGAA	GAGTGTGTTAAAGTT	TATGGTTAATGGTTG	ATTATTTGGGTTGTT	GTGTGTTTGGGGGTT	GTGGAATGTGTGAGG					

Page 2.1

91 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180  
 1 pro846\_7 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTTGG TTAGTGTGTGGTGT GGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 2 pro847\_8 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTTGG TTAGTGTGTGGTGT GGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 3 p15S75756 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GCGATGAGGGTTTTGG TTAGCGTGGCGGCGG GGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 4 pro845\_6 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTTGG TTAGCGTGTGGTGT GGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 5 pro841\_2 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTTGG TTAGTGTGTGGTGT GGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 6 pro842\_3 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTTGG TTAGTGTGTGGTGT GGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 7 pro843\_4 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTTGG TTGGTGTGTGGTGT GGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 8 pro844\_5 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTTGG TTAGTGTGTGGTGT GGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 9 pro848\_9 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTTGG TTAGTGTGTGGTGT GGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 10 pro849\_10 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTTGG TTAGTGTGTGGTGT GGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 11 pr25342\_11 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTTGG TTAGTGTGTGGTGT GGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180

Page 3.1

181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270  
 1 pro846\_7 TGGAAATCGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTTA ---- 251  
 2 pro847\_8 TGGAAATCGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAG --- 252  
 3 p15S75756 TGGAAATCGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATCGTTTTGGGAGGC GCGGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAGGGT TT----- 257  
 4 pro845\_6 TGGAAATCGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAG --- 252  
 5 pro841\_2 TGGAAATCGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAGGGT TTA----- 258  
 6 pro842\_3 TGGAAATCGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAG --- 252  
 7 pro843\_4 TGGAAATCGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAG --- 252  
 8 pro844\_5 TGGAAATCGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAG --- 252  
 9 pro848\_9 TGGAAATCGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGC GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAGGGT TTAAGGG- 263  
 10 pro849\_10 TGGAAATCGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAGGG- ----- 254  
 11 pro25342\_11 TGGAAATCGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAGGGT TT----- 257

2. Tumor 820/00

Page 1.1

1 pro23483\_A8 1 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 TGGGAAAGAAGGGAA GAGTGTGTTGTTAAGTT TATGGTTAAATGGTGG ATTATTTGGGTTGTT GTGTGTTTGGGGTT GTGGAATGTGTGAGG 90  
 2 p15S75756 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 TGGGAAAGAAGGGAA GAGTGTGTTGTTAAGTT TATGGTTAAATGGTGG ATTATTTGGGTTGTT GTGTGTTTGGGGTT GTGGAATGTGTGAGG 90  
 3 pro23476\_A1 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 TGGGAAAGAAGGGAA GAGTGTGTTGTTAAGTT TATGGTTAAATGGTGG ATTATTTGGGTTGTT GTGTGTTTGGGGTT GTGGAATGTGTGAGG 90  
 4 pro23477\_A2 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 TGGGAAAGAAGGGAA GAGTGTGTTGTTAAGTT TATGGTTAAATGGTGG ATTATTTGGGTTGTT GTGTGTTTGGGGTT GTGGAATGTGTGAGG 90  
 5 pro23478\_A3 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 TGGGAAAGAAGGGAA GAGTGTGTTGTTAAGTT TATGGTTAAATGGTGG ATTATTTGGGTTGTT GTGTGTTTGGGGTT GTGGAATGTGTGAGG 90  
 6 pro23479\_A4 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 TGGGAAAGAAGGGAA GAGTGTGTTGTTAAGTT TATGGTTAAATGGTGG ATTATTTGGGTTGTT GTGTGTTTGGGGTT GTGGAATGTGTGAGG 90  
 7 pro23480\_A5 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 TGGGAAAGAAGGGAA GAGTGTGTTGTTAAGTT TATGGTTAAATGGTGG ATTATTTGGGTTGTT GTGTGTTTGGGGTT GTGGAATGTGTGAGG 90  
 8 pro23481\_A6 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 TGGGAAAGAAGGGAA GAGTGTGTTGTTAAGTT TATGGTTAAATGGTGG ATTATTTGGGTTGTT GTGTGTTTGGGGTT GTGGAATGTGTGAGG 90  
 9 pro23482\_A7 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 TGGGAAAGAAGGGAA GAGTGTGTTGTTAAGTT TATGGTTAAATGGTGG ATTATTTGGGTTGTT GTGTGTTTGGGGTT GTGGAATGTGTGAGG 90  
 10 pro23484\_A9 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 TGGGAAAGAAGGGAA GAGTGTGTTGTTAAGTT TATGGTTAAATGGTGG ATTATTTGGGTTGTT GTGTGTTTGGGGTT GTGGAATGTGTGAGG 90  
 11 pro23485\_A10 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 TGGGAAAGAAGGGAA GAGTGTGTTGTTAAGTT TATGGTTAAATGGTGG ATTATTTGGGTTGTT GTGTGTTTGGGGTT GTGGAATGTGTGAGG 90

Page 2.1

91 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180  
 1 pro23483\_A8 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGCGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTGTGTTGTTGTT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 2 p15S75756 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGCGGTA GCGATGAGGGTTTGG TTAGCGTCCGGCGC GGGGATTAGTGGAGA AGGTGCGATAGTTTT 180  
 3 pro23476\_A1 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTGTGTTGTTGTT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 4 pro23477\_A2 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTGTGTTGTTGTT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 5 pro23478\_A3 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTGTGTTGTTGTT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGCGATAGTTTT 180  
 6 pro23479\_A4 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GCGATGAGGGTTTGG TTAGTGTGTTGTTGTT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 7 pro23480\_A5 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTGTGTTGTTGTT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 8 pro23481\_A6 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTGTGTTGTTGTT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 9 pro23482\_A7 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTGTGTTGTTGTT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 10 pro23484\_A9 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTGTGTTGTTGTT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 11 pro23485\_A10 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTGTGTTGTTGTT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180



Page 2.1

91 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180  
 1 pro233534 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTCTTCTGGTGT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 2 p15S75756 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GCGATGAGGGTTTGG TTAGCTCCGCCG GGGGATTAGTGGAGA AGGTGCGATAGTTTT 180  
 3 pro233526\_896p15 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTCTTCTGGTGT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 4 pro233527 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAG-CTTCTGGTGT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180

5 pro233528 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTCTTCTGGTGT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 6 pro233529 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTCTTCTGGTGT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 7 pro233530 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTCTTCTGGTGT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 8 pro233531 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTCTTCTGGTGT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 9 pro233532 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTCTTCTGGTGT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 10 pro233533 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTCTTCTGGTGT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180  
 11 pro233535 AGAATAAGGGTATGT TTAGTGGGGTGGTA GTGATGAGGGTTTGG TTAGTCTTCTGGTGT GGGGATTAGTGGAGA AGGTGTGATAGTTTT 180

Page 3.1

181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256  
 1 pro233534 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTCANTTAGGTAG TTGGGGTTT- 249  
 2 p15S75756 TGGAAAGTGGCGGG ATTTTAAATGGAGTTA ATCGTTTTGGGAGGC GCGCANTTAGGTAG TTGGGGTTT- 257  
 3 pro233526\_896p15 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTCANTTAGGTAG TTGGGGTTT- 249  
 4 pro233527 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTCGCANTTAGGTAG TTGGGG- 246  
 5 pro233528 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTCANTTAGGTAG TTGGGGTTT- 249  
 6 pro233529 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTCANTTAGGTAG TTGGGGTTT- 248  
 7 pro233530 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTCANTTAGGTAG TTGGGGTTT- 247  
 8 pro233531 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTCANTTAGGTAG TTGGGGTTT- 248  
 9 pro233532 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTCANTTAGGTAG TTGGGGTTT- 248  
 10 pro233533 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTCANTTAGGTAG TTGGGGTTT- 247  
 11 pro233535 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTCANTTAGGTAG TTGGGGTTT- 249

## 4. Tumor 1488/00

Page 1.1

1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
1 p15S75756	TGGAAAGAAAGGGAA	GAGTGT	CGTTAAAGTT	TACCGTTAA	CGGTGG	ATTANT	CGGTCGTT	CGCGT	TTGGGGTT	GCGGAATG	CGGAGG
2 pro23545	TGGAAAGAAAGGGAA	GAGTGT	CGTTAAAGTT	TATGGTTAA	TGGTGG	ATTANT	TTGGTGGT	GTGTCGTT	TTGGGGTT	GTGGAATG	TGTGAGG
3 pro23541	TGGAAAGAAAGGGAA	GAGTGT	CGTTAAAGTT	TATGGTTAA	TGGTGG	ATTANT	TTGGTGGT	GTGTCGTT	TTGGGGTT	GTGGAATG	TGTGAGG
4 pro23542	TGGAAAGAAAGGGAA	GAGTGT	CGTTAAAGTT	TATGGTTAA	TGGTGG	ATTANT	TTGGTGGT	GTGTCGTT	TTGGGGTT	GTGGAATG	TGTGAGG
5 pro23537	TGGAAAGAAAGGGAA	GAGTGT	CGTTAAAGTT	TATGGTTAA	TGGTGG	ATTANT	TTGGTGGT	GTGTCGTT	TTGGGGTT	GTGGAATG	TGTGAGG
6 pro23539	TGGAAAGAAAGGGAA	GAGTGT	CGTTAAAGTT	TATGGTTAA	TGGTGG	ATTANT	TTGGTGGT	GTGTCGTT	TTGGGGTT	GTGGAATG	TGTGAGG
7 pro23544	TGGAAAGAAAGGGAA	GAGTGT	CGTTAAAGTT	TATGGTTAA	TGGTGG	ATTANT	TTGGTGGT	GTGTCGTT	TTGGGGTT	GTGGAATG	TGTGAGG
8 pro23540	TGGAAAGAAAGGGAA	GAGTGT	CGTTAAAGTT	TATGGTTAA	TGGTGG	ATTANT	TTGGTGGT	GTGTCGTT	TTGGGGTT	GTGGAATG	TGTGAGG
9 pro23543	TGGAAAGAAAGGGAA	GAGTGT	CGTTAAAGTT	TATGGTTAA	TGGTGG	ATTANT	TTGGTGGT	GTGTCGTT	TTGGGGTT	GTGGAATG	TGTGAGG
10 pro23536	TGGAAAGAAAGGGAA	GAGTGT	CGTTAAAGTT	TATGGTTAA	TGGTGG	ATTANT	TTGGTGGT	GTGTCGTT	TTGGGGTT	GTGGAATG	TGTGAGG
11 pro23538	TGGAAAGAAAGGGAA	GAGTGT	CGTTAAAGTT	TATGGTTAA	TGGTGG	ATTANT	TTGGTGGT	GTGTCGTT	TTGGGGTT	GTGGAATG	TGTGAGG

Page 2.1

1	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180
1 p15S75756	AGAAATAAGGGTATGT	TTAGTGGGG	CGGTA	CGGATGAGGGTTTGG	TTAGCGT	CGGCGC	GGGATTTAGTGGAGA	AGGTC	CGATAGTTTT	180		
2 pro23545	AGAAATAAGGGTATGT	TTAGTGGGGTGGTA	GTGATGAGGGTTTGG	TTAGTGGTTGGTGT	GGGATTTAGTGGAGA	AGGTCGATAGTTTT	180					
3 pro23541	AGAAATAAGGGTATGT	TTAGTGGGGTGGTA	GTGATGAGGGTTTGG	TTAGTGGTTGGTGT	GGGATTTAGTGGAGA	AGGTCGATAGTTTT	180					
4 pro23542	AGAAATAAGGGTATGT	TTAGTGGGGTGGTA	GTGATGAGGGTTTGG	TTAGTGGTTGGTGT	GGGATTTAGTGGAGA	AGGTCGATAGTTTT	180					
5 pro23537	AGAAATAAGGGTATGT	TTAGTGGGGTGGTA	GTGATGAGGGTTTGG	TTAGTGGTTGGTGT	GGGATTTAGTGGAGA	AGGTCGATAGTTTT	180					
6 pro23539	AGAAATAAGGGTATGT	TTAGTGGGGTGGTA	GTGATGAGGGTTTGG	TTAGTGGTTGGTGT	GGGATTTAGTGGAGA	AGGTCGATAGTTTT	180					
7 pro23544	AGAAATAAGGGTATGT	TTAGTGGGGTGGTA	GTGATGAGGGTTTGG	TTAGTGGTTGGTGT	GGGATTTAGTGGAGA	AGGTCGATAGTTTT	180					
8 pro23540	AGAAATAAGGGTATGT	TTAGTGGGGTGGTA	GTGATGAGGGTTTGG	TTAGTGGTTGGTGT	GGGATTTAGTGGAGA	AGGTCGATAGTTTT	180					
9 pro23543	AGAAATAAGGGTATGT	TTAGTGGGGTGGTA	GTGATGAGGGTTTGG	TTAGTGGTTGGTGT	GGGATTTAGTGGAGA	AGGTCGATAGTTTT	180					
10 pro23536	AGAAATAAGGGTATGT	TTAGTGGGGTGGTG	GTGATGAGGGTTTGG	TTAGTGGTTGGTGT	GGGATTTAGTGGAGA	AGGTCGATAGTTTT	180					
11 pro23538	AGAAATAAGGGTATGT	TTAGTGGGGTGGTA	GTGATGAGGGTTTGG	TTAGTGGTTGGTGT	GGGATTTAGTGGAGA	AGGTCGATAGTTTT	180					

Page 3.1

181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270

1 p15S75756 TGGAAAGTGGCGCGG ATTTTAAAGGAGTTA ATCGTTTGGGAGGC CCGGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAGGGT TT 257

2 pro233545 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTT----- 249

3 pro233541 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTT----- 249

4 pro233542 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTT----- 249

5 pro233537 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTT----- 249

6 pro233539 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTT----- 250

7 pro233544 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTT----- 249

8 pro233540 TGGAGGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTT----- 249

9 pro233543 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTTAGG--- 253

10 pro233536 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTT----- 250

11 pro233538 TGGAAAGTTGGTGTGG ATTTTAAATGGAGTTA ATTGTTTTGGGAGGT GTGTGATTTAGGTAG TTGGGGTTTT----- 249

## 5. Tumor 1460199

Page 1.1

1 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90

1 pro25340\_Klon2 TGGGAAAAGAGGGAA GAGTGTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTTGGGTTGT TGTGTTTTGGGGGT TGTGGAATGTGTGAG

2 p15S75756 TGGGAAAAGAGGGAA GAGTGTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTGGGTTGT TCGGTTTTGGGGGT TCGGAAATGCGGAG

3 1460\_topo4\_QS10 TGGGAAAAGAGGGAA GAGTGTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTTGGGTTGT TGTGTTTTGGGGGT TGTGGAATGTGTGAG

4 1460\_topo6\_S11 TGGGAAAAGAGGGAA GAGTGTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTTGGGTTGT TGTGTTTTGGGGGT TGTGGAATGTGTGAG

5 1460\_topo8\_S12 TGGGAAAAGAGGGAA GAGTGTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTTGGGTTGT TGTGTTTTGGGGGT TGTGGAATGTGTGAG

6 1460\_topo10\_S14 TGGGAAAAGAGGGAA GAGTGTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTTGGGTTGT TGTGTTTTGGGGGT TGTGGAATGTGTGAG

7 pro25339\_Klon1 TGGGAAAAGAGGGAA GAGTGTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTTGGGTTGT TGTGTTTTGGGGGT TGTGGAATGTGTGAG

8 pro25341\_Klon7 TGGGAAAAGAGGGAA GAGTGTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTTGGGTTGT TGTGTTTTGGGGGT TGTGGAATGTGTGAG

9 1460\_topo9\_S13 TGGGAAAAGAGGGAA GAGTGTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTTGGGTTGT TGTGTTTTGGGGGT TGTGGAATGTGTGAG

10 pro232591\_S13 TGGGAAAAGAGGGAA GAGTGTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTTGGGTTGT TGTGTTTTGGGGGT TGTGGAATGTGTGAG

11 1460\_p15\_topo5\_Q2 -----TTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTTGGGTTGT TGTGTTTTGGGGGT TGTGGAATGTGTGAG

12 1460\_p15\_topo3\_Q1 TGGGAAAAGAGGGAA GAGTGTGTTAAGTT TATGGTTAATGGTGG ATTA-TTTGGGTTGT TGTGTTTTGGGGGT TGTGGAATGTGTGAG



## 8.5. Sequenzierung der Promotorregion von *MGMT*

MGMT\_X61657 entspricht dem Datenbankeintrag der Promotorregion von *MGMT* mit den maximal möglichen methylierten CpG-Stellen.

Die anderen Sequenzierungsdaten entsprechen jeweils einem untersuchten Klon der entsprechenden Tumor-DNA.

Methylierte Cytosin-Reste sind dunkelgrau hinterlegt, falsch positive Cytosin-Reste hellgrau.

Die Rate der falsch positiven 5-Methyl-Cytosinreste betrug 1,16 %.

### 1. Kontroll-DNA

Page 1.1

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
1 pro24472_K1	TGATAGGGTTTTTGT	TGGTTTGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA
2 MGMT_X61657	TGATAGGGTTTTTGT	TGGTTTGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA
3 pro24669_K3	TGATAGGGTTTTTGT	TGGTTTGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA
4 pro24670_K5	TGATAGGGTTTTTGT	TGGTTTGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGTGG	TATCAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA
5 pro24671_K8	TGATAGGGTTTTTGT	TGGTTTGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA
6 pro24672_K9	TGATAGGGTTTTTGT	TGGTTTGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA
7 pro24476_K10	TGATAGGGTTTTTGT	TGGTTTGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGTGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA
8 ro24475_K7	TGATAGGGTTTTTGT	TGGTTTGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA
9 pro24474_K6	TGATAGGGTTTTTGT	TGGTTTGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA
10 pro24473_K4	TGATAGGGTTTTTGT	TGGTTTGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA
11 pro24948_11	TGATAGGGTTTTTGT	TGGTTTGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA	GATTGGGTTTCGGG	TTTTAGGAGGGGAGA

Page 2.1

91 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180  
 1 pro24472\_K1 TTGAGTAGGATTTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTTGTTTTATGAT TTTTGTGTTGTTTTTA GGATTAATTTGGGTAT GTGGTAGGTTGTTTTG 180  
 2 MGMT\_X61657 TCGAGTAGGATTTGGG ATTTTTATTAAGCGG CGTCCGTTTTAAGAT TTTTCCCGGTTTTTA GGATTAATTTGGGTAT GTGGTAGGTTGTTTTG 180  
 3 pro244669\_K3 TTGAGTAGGATTTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTTGTTTTATGAT TTTTGTGTTGTTTTTA GGATTAATTTGGGTAT GTGGTAGGTTGTTTTG 180  
 4 pro244670\_K5 TTGAGTAGGATTTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTTGTTTTATGAT TTTTGTGTTGTTTTTA GGATTAATTTGGGTAT GTGGTAGGTTGTTTTG 180  
 5 pro244671\_K8 TTGAGTAGGATTTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTTGTTTTATGAT TTTTGTGTTGTTTTTA GGATTAATTTGGGTAT GTGGTAGGTTGTTTTG 180  
 6 pro244672\_K9 TTGAGTAGGATTTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTTGTTTTATGAT TTTTGTGTTGTTTTTA GGATTAATTTGGGTAT GTGGTAGGTTGTTTTG 180  
 7 pro244476\_K10 TTGAGTAGGATTTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTTGTTTTATGAT TTTTGTGTTGTTTTTA GGATTAATTTGGGTAT GTGGTAGGTTGTTTTG 180  
 8 ro244475\_K7 TTGAGTAGGATTTGGG ATTTTTATTAAGCGG GTGTTGTTTTATGAT TTTTGTGTTGTTTTTA GGATTAATTTGGGTAT GTGGTAGGTTGTTTTG 180  
 9 pro24474\_K6 TTGAGTAGGATTTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTTGTTTTATGAT TTTTGTGTTGTTTTTA GGATTAATTTGGGTAT GTGGTAGGTTGTTTTG 180  
 10 pro24473\_K4 TTGAGTAGGATTTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTTGTTTTATGAT TTTTGTGTTGTTTTTA GGATTAATTTGGGTAT GTGGTAGGTTGTTTTG 180  
 11 pro24948\_I1 TTGAGTAGGATTTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTTGTTTTATGAT TTTTGTGTTGTTTTTA GGATTAATTTGGGTAT GTGGTAGGTTGTTTTG 180

-

Page 3.1

181 195 196 210 211 225  
 1 pro24472\_K1 TATGTTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 2 MGMT\_X61657 TACGTTCCGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 3 pro244669\_K3 TATGTTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 4 pro244670\_K5 TATGCCITTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 5 pro244671\_K8 TATGTTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 6 pro244672\_K9 TATGTTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 7 pro244476\_K10 TATGTTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 8 ro244475\_K7 TATGTTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 9 pro244474\_K6 TATGTTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 10 pro244473\_K4 TATGTTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 11 pro24948\_I1 TATGTTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214

2. Tumor 820/00

Page 1.1

1 TGATAGGGTTTTTTTGT 15 16 TGGTTTTGGGGGTTTTT 30 31 TGATTAGGGGAGCGG 45 46 TTTTAGAGGGGAGA 60 61 GATTCGCGTTTTCGGG 75 76 TTTAGCGTAGTCGTT 90  
 2 MGMT\_X61657 TGATAGGGTTTTTTTGT 15 16 TGGTTTTGGGGGTTTTT 30 31 TGATTAGGGGAGCGG 45 46 TTTTAGAGGGGAGA 60 61 GATTCGCGTTTTCGGG 75 76 TTTAGCGTAGTCGTT 90  
 3 pr679\_820\_10 TGATAGGGTTTTTTTGT 15 16 TGGTTTTGGGGGTTTTT 30 31 TGATTAGGGGAGCGG 45 46 TTTTAGAGGGGAGA 60 61 GATTCGCGTTTTCGGG 75 76 TTTAGCGTAGTCGTT 90  
 4 pr478\_820\_3 TGATAGGGTTTTTTTGT 15 16 TGGTTTTGGGGGTTTTT 30 31 TGATTAGGGGAGCGG 45 46 TTTTAGAGGGGAGA 60 61 GATTCGCGTTTTCGGG 75 76 TTTAGCGTAGTCGTT 90  
 5 pr678\_820\_9 TGATAGGGTTTTTTTGT 15 16 TGGTTTTGGGGGTTTTT 30 31 TGATTAGGGGAGCGG 45 46 TTTTAGAGGGGAGA 60 61 GATTCGCGTTTTCGGG 75 76 TTTAGCGTAGTCGTT 90  
 6 pr952\_820\_2 TGATAGGGTTTTTTTGT 15 16 TGGTTTTGGGGGTTTTT 30 31 TGATTAGGGGAGCGG 45 46 TTTTAGAGGGGAGA 60 61 GATTCGCGTTTTCGGG 75 76 TTTAGCGTAGTCGTT 90  
 7 pr674\_820\_5 TGATAGGGTTTTTTTGT 15 16 TGGTTTTGGGGGTTTTT 30 31 TGATTAGGGGAGCGG 45 46 TTTTAGAGGGGAGA 60 61 GATTCGCGTTTTCGGG 75 76 TTTAGCGTAGTCGTT 90  
 8 pr675\_820\_6 TGATAGGGTTTTTTTGT 15 16 TGGTTTTGGGGGTTTTT 30 31 TGATTAGGGGAGCGG 45 46 TTTTAGAGGGGAGA 60 61 GATTCGCGTTTTCGGG 75 76 TTTAGCGTAGTCGTT 89  
 9 pr676\_820\_7 TGATAGGGTTTTTTTGT 15 16 TGGTTTTGGGGGTTTTT 30 31 TGATTAGGGGAGCGG 45 46 TTTTAGAGGGGAGA 60 61 GATTCGCGTTTTCGGG 75 76 TTTAGCGTAGTCGTT 90

Page 2.1

91 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180  
 1 pr673\_820\_4 TCGAGTAGGATTGGG ATTTTTATTAAGCGG GCGTCGTTTTTACGAT TATCGCGCGTTTTTA GGATTATTCGGGTAC GTGGTAGGTCGTTTG 180  
 2 MGMT\_X61657 TCGAGTAGGATTGGG ATTTTTATTAAGCGG GCGTCGTTTTTACGAT TTTTCGCGCGTTTTTA GGATTATTCGGGTAC GTGGTAGGTCGTTTG 180  
 3 pr679\_820\_10 TCGAGTAGGATTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTCGTTTTTACGAT TTTTCGCGCGTTTTTA GGATTATTCGGGTAC GTGGTAGGTCGTTTG 180  
 4 pr478\_820\_3 TCGAGTAGGATTGGG ATTTTTATTAAGCGG GCGTCGTTTTTACGAT TATCGGTGCGTTTTTA GGATTATTCGGGTAT GTGGTAGGTCGTTTG 180  
 5 pr678\_820\_9 TCGAGTAGGATCGGG ATTTTTATTAAGCGG GCGTCGTTTTTACGAT TATCGCGCGTTTTTA GGATTATTCGGGTAT GTGGTAGGTCGTTTG 180  
 6 pr952\_820\_2 TCGAGTAGGATTGGG GTTTTTATTAAGCGG GCGTCGTTTTTACGAT TGTTCGTGCGTTTTTA GGATCATTTCGGGTAT GTGGTAGGTCGTTTG 180  
 7 pr674\_820\_5 TCGAGTAGGATTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTTGTTTTTATGAT TTTTGTGTGTTTTTA GGATTATTCGGGTAT GTGGTAGGTCGTTTG 180  
 8 pr675\_820\_6 TCGAGTAGGATTGGG ATTTTTATTAAGTGG GTGTTGTTTTTATGAT TTTTGTGTGTTTTTA GGATTATTCGGGTAT GTGGTAGGTCGTTTG 179  
 9 pr676\_820\_7 TCGAGTAGGATTGGG ATTTTTATTAAGCGG GCGTCGTTTTTATGAT TTTTGTGCGTTTTTA GGATTATTCGGGTAT GTGGTAGGTCGTTTG 180

Page 3.1

181 195 196 210 211 225

1 pr673\_820\_4 TACGTTTGGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214

2 MGMT\_X61657 TACGTTGCGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214

3 pr679\_820\_10 TACGTTGCGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214

4 pr478\_820\_3 TACGTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214

5 pr678\_820\_9 TACGTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214

6 pr952\_820\_2 TACGTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214

7 pr674\_820\_5 TATGTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214

8 pr675\_820\_6 TATGTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 213

9 pr676\_820\_7 TATGTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214

### 3. Tumor 896/99

Page 1.1

1 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90

1 25337\_896\_11 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGCGTAGTTGTT 90

2 MGMT\_X61657 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGCGTAGTTGTT 90

3 24477\_896\_10 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGTGTAGTTGTT 90

4 24680\_896\_1 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGCGTAGTTGTT 90

5 24681\_896\_2 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGCGTAGTTGTT 90

6 24682\_896\_3 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGTGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGTGTAGTTGTT 90

7 24684\_896\_5 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGTGTAGTTGTT 90

8 24685\_896\_6 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGCGTAGTTGTT 90

9 24686\_896\_7 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGCGTAGTTGTT 90

10 24687\_896\_8 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGCGTAGTTGTT 90

11 24949\_896\_12 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGCGTAGTTGTT 90

12 24950\_896\_13 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGTGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGTGTAGTTGTT 90

13 25338\_896\_4 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTGGGGTTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTGGGAGGGGAGA GATTCGCGTTTTCGGG TTTAGCGTAGTTGTT 90

Page 2.1

1	25337_896_11	TTGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGTGG	GTGTTGTTTTTATGAT	TTTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
2	MGMT_X61657	TGGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGCGG	GCGTTCGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAC	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
3	24477_896_10	TTGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGTGG	GTGTTGTTTTTATGAT	TTTTGTGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
4	24680_896_1	TTGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGTGG	GTGTTGTTTTTATGAT	TTTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
5	24681_896_2	TTGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGTGG	GTGTTGTTTTTATGAT	TTTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
6	24682_896_3	TTGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGTGG	GTGTTGTTTTTATGAT	TTTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
7	24684_896_5	TTGAGTAGGATTGGG	ATTTCTATTAAAGCGG	GCGTTCGTTTTTATGAT	TTTTGTGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
8	24685_896_6	TTGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGTGG	GTGTTGTTTTTATGAT	TTTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
9	24686_896_7	TTGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGTGG	GTGTTGTTTTTATGAT	TTTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
10	24687_896_8	TGGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGTGG	GTGTTGTTTTTATGAT	TTTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
11	24949_896_12	TTGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGTGG	GTGTTGTTTTTATGAT	TTTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
12	24950_896_13	TTGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGTGG	GTGTTGTTTTTATGAT	TTTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180
13	25338_896_4	TTGAGTAGGATTGGG	ATTTTTATTAAAGTGG	GTGTTGTTTTTATGAT	TTTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180

Page 3.1

1	25337_896_11	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
2	MGMT_X61657	TACGTTCCGGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
3	pro24477_896_10	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
4	pro24680_896_1	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
5	pro24681_896_2	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
6	pro24682_896_3	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
7	pro24684_896_5	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
8	pro24685_896_6	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
9	pro24686_896_7	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
10	pro24687_896_8	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
11	pro24949_896_12	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
12	pro24950_896_13	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214
13	25338_896_4	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTGATAGGAA	AAGG	214

## 4. Tumor 1460/99

Page 1.1

	1	15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90
1	25345_1460_4	TGATAGGGTTTTTGT	TGATAGGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGTGG	TATAGGAGGGGAGA	GATTTGTGTTTTGGG	TTTAGCGTAGTTGTT
2	MGMT_X61657	TGATAGGGTTTTTGT	TGATAGGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TATAGGAGGGGAGA	GATTTGCGTTTTGGG	TTTAGCGTAGTCGTT
3	25015_1460_1	TGATAGGGTTTTTGT	TGATAGGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TATAGGAGGGGAGA	GATTTGCGTTTTGGG	TTTAGCGTAGTCGTT
4	25016_1460_5	TGATAGGGTTTTTGT	TGATAGGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TATAGGAGGGGAGA	GATTTGCGTTTTGGG	TTTAGCGTAGTCGTT
5	5018_1460_7	TGATAGGGTTTTTGT	TGATAGGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TATAGGAGGGGAGA	GATTTGCGTTTTGGG	TTTAGCGTAGTCGTT
6	5020_1490_9	TGATAGGGTTTTTGT	TGATAGGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TATAGGAGGGGAGA	GATTTGCGTTTTGGG	TTTAGCGTAGTCGTT
7	5021_1460_10	TGATAGGGTTTTTGT	TGATAGGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TATAGGAGGGGAGA	GATTTGCGTTTTGGG	TTTAGCGTAGTCGTT
8	1460_2_revko	TGATAGGGTTTTTGT	TGATAGGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TATAGGAGGGGAGA	GATTTGCGTTTTGGG	TTTAGCGTAGTCGTT
9	5017_1460_6	TGATAGGGTTTTTGT	TGATAGGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TATAGGAGGGGAGA	GATTTGCGTTTTGGG	TTTAGCGTAGTCGTT
10	5019_1460_8	TGATAGGGTTTTTGT	TGATAGGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TATAGGAGGGGAGA	GATTTGCGTTTTGGG	TTTAGCGTAGTCGTT
11	25344_1460_3	TGATAGGGTTTTTGT	TGATAGGGGGTTTTT	TGATAGGGGAGCGG	TATAGGAGGGGAGA	GATTTGCGTTTTGGG	TTTAGCGTAGTTGTT

Page 2.1

	91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180
1	25345_1460_4	TTGAGTAGGATCGGG	ATTTTTATTAAGCGG	GCGTCGTTTTACCGAT	TTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTCGGGTAC	GTGGTAGGTCGTTTG
2	MGMT_X61657	TGAGTAGGATCGGG	ATTTTTATTAAGCGG	GCGTCGTTTTACCGAT	TTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTCGGGTAC	GTGGTAGGTCGTTTG
3	5015_1460_1	TTGAGTAGGATCGGG	ATTTTTATTAAGCGG	GCGTCGTTTTACCGAT	TTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTCGGGTAC	GTGGTAGGTCGTTTG
4	5016_1460_5	TGAGTAGGATCGGG	ATTTTTATTAAGTGG	GCGTCGTTTTACCGAT	TTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTCGGGTAC	GTGGTAGGTCGTTTG
5	5018_1460_7	TTGAGTAGGATCGGG	ATTTTTATTAAGCGG	GCGTCGTTTTACCGAT	TTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTCGGGTAC	GTGGTAGGTCGTTTG
6	5020_1460_9	TGAGTAGGATCGGG	ATTTTTATTAAGTGG	GCGTCGTTTTACCGAT	TTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTCGGGTAC	GTGGTAGGTCGTTTG
7	5021_1460_10	TGAGTAGGATCGGG	ATTTTTATTAAGCGG	GCGTCGTTTTACCGAT	TTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTCGGGTAC	GTGGTAGGTCGTTTG
8	1460_2_revko	TTGAGTAGGATCGGG	ATTTTTATTAAGCGG	GCGTCGTTTTACCGAT	TTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTCGGGTAC	GTGGTAGGTCGTTTG
9	5017_1460_6	TGAGTAGGATCGGG	ATTTTTATTAAGTGA	GTGTCGTTTTATGAT	TTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTCGGGTAC	GTGGTAGGTCGTTTG
10	5019_1460_8	TGAGTAGGATCGGG	ATTTTTATTAAGTGG	GTGTCGTTTTATGAT	TTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTCGGGTAC	GTGGTAGGTCGTTTG
11	25344_1460_3	TTGAGTAGGATCGGG	ATTTTTATTAAGTGG	GTGTCGTTTTATGAT	TTTGTGTGTTTTTA	GGATTATTCGGGTAT	GTGGTAGGTCGTTTG

Page 3.1

181 195 196 210 211 225  
 1 25345\_1460\_4 TACGTTCCGGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 2 MGMT\_X61657 TACGTTCCGGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 3 pro25015\_1460\_1 TACGTTCCGGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 4 pro25016\_1460\_5 TACGTTCCGGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 5 pro25018\_1460\_7 TACGTTCCGGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 6 pro25020\_1490\_9 TACGTTCCGGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 7 pro25021\_1460\_10 TACGTTCCGGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 8 1460\_2\_revkomp TACGTTCCGGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 9 pro25017\_1460\_6 TATGTTCCGGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 10 pro25019\_1460\_8 TATGTTCCGGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214  
 11 25344\_1460\_3 TATGTTTGTGGATTA TTTTGTGATAGGAA AAGG 214

## 5. Tumor 1488/00

Page 1.1

1 1 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90  
 1 MGMT\_X61657 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTTGGGGTTTT TGATTAGGGGAGCGG TTTTAGGAGGGGAGA GATTCCGGTTTTCCGG TTTAGCGTAGTCCGTT 90  
 2 5022\_1488\_1 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTTGGGGTTTT TGATTAGGGGAGCGG TATTAGGAGGGGAGA GATTCCGTGTTTTGGG TTTAGCGTAGTCCGTT 90  
 3 5023\_1488\_2 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTTGGGGTTTT TGATTAGGGGAGCGG TATTAGGAGGGGAGA GATTTGTGTTTTCCGG TTTAGCGTAGTCCGTT 90  
 4 5024\_1488\_3 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTTGGGGTTTT TGATTAGGGGAGCGG TATTAGGAGGGGAGA GATTCCGGTTTTCCGG TTTAGCGTAGTCCGTT 90  
 5 5025\_1488\_5 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTTGGGGTTTT TGATTAGGGGAGCGG TATTAGGAGGGGAGA GATTCCGGTTTTCCGG TTTAGCGTAGTCCGTT 90  
 6 5026\_1488\_6 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTTGGGGTTTT TGATTAGGGGAGCGG TATTAGGAGGGGAGA GATTCCGGTTTTCCGG TTTAGCGTAGTCCGTT 90  
 7 5027\_1488\_7 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTTGGGGTTTT TGATTAGGGGAGCGG TATTAGGAGGGGAGA GATTTGTGTTTTCCGG TTTAGCGTAGTCCGTT 90  
 8 5028\_1488\_8 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTTGGGGTTTT TGATTAGGGGAGCGG TATTAGGAGGGGAGA GATTTGTGTTTTCCGG TTTAGCGTAGTCCGTT 90  
 9 5029\_1488\_9 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTTGGGGTTTT TGATTAGGGGAGCGG TATTAGGAGGGGAGA GATCTGTGTTTTCCGG TTTAGCGTAGTCCGTT 90  
 10 5030\_1488\_10 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTTGGGGTTTT TGATTAGGGGAGCGG TATTAGGAGGGGAGA GATTTGTGTTTTCCGG TTTAGCGTAGTCCGTT 90  
 11 25346\_1488\_4 TGATAGGGTTTTTGT TGGTTTTGGGGTTTT TGATTAGGGGAGCGG TATTAGGAGGGGAGA GATCTGTGTTTTCCGG TTTAGCGTAGTCCGTT 90

Page 2.1

1	MGMT_X61657	TCGAGTAGGATTGGG	ATTTTTTAAAGCGG	CGTTCGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAC	GTGGTAGGTTGTTTTG	165	166	180
2	5022_1488_1	TCGAGTAGGATCGGG	ATTTTTTAAAGCGG	CGTTCGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAC	GTGGTAGGTTGTTTTG	180		
3	5023_1488_2	TCGAGTAGGATCGGG	ATTTTTTAAAGCGG	CGTTCGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180		
4	5024_1488_3	TCGAGTAGGATCGGG	ATTTTTTAAAGCGG	CGTTCGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180		
5	5025_1488_5	TCGAGTAGGATTGGG	ATTTTTTAAAGCGG	CGTTCGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180		
6	5026_1488_6	TCGAGTAGGATCGGG	ATTTTTTAAAGTGG	CGTTGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180		
7	5027_1488_7	TTGAGTAGGATCGGG	ATTTTTTAAAGCGG	CGTTCGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180		
8	5028_1488_8	TCGAGTAGGATCGGG	ATTTTTTAAAGCGG	CGTTCGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180		
9	5029_1488_9	TCGAGTAGGATCGGG	ATTTTTTAAAGCGG	CGTTCGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180		
10	5030_1488_10	TCGAGTAGGATCGGG	ATTTTTTAAAGCGG	CGTTCGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180		
11	25346_1488_4	TCGAGTAGGATCGGG	ATTTTTTAAAGCGG	CGTTCGTTTTACGAT	TTTTCGCGCGTTTTTA	GGATTATTTGGGTAT	GTGGTAGGTTGTTTTG	180		

Page 3.1

1	MGMT_X61657	TACGTTCCGGGATTA	TTTTTTGTATAGGAA	AAGG--	214	225	226
2	pro25022_1488_1	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTATAGGAA	AAGGAA	216		
3	pro25023_1488_2	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTATAGGAA	AAGG--	214		
4	pro25024_1488_3	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTATAGGAA	AAGG--	214		
5	pro25025_1488_5	TATGTTCCGGGATTA	TTTTTTGTATAGGAA	AAGG--	214		
6	pro25026_1488_6	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTATAGGAA	AAGG--	214		
7	pro25027_1488_7	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTATAGGAA	AAGG--	214		
8	pro25028_1488_8	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTATAGGAA	AAGG--	214		
9	pro25029_1488_9	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTATAGGAA	AAGG--	214		
10	pro25030_1488_10	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTATAGGAA	AAGG--	214		
11	25346_1488_4	TATGTTTTGTGGATTA	TTTTTTGTATAGGAA	AAGG--	214		

## 9. Danksagung

Prof. Zang danke ich für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit, die vielen anregenden Diskussionen und seine stete und engagierte Unterstützung, ständige Diskussionsbereitschaft, die konstruktive Kritik und detaillierten Korrekturvorschläge.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Steffi Urbschat für ihre sehr engagierte Betreuung und die überaus wertvollen Anregungen, sowie ihre unermüdliche und vielfältige Unterstützung in wissenschaftlichen und privaten Fragen und für ein Arbeitsklima, das besser nicht sein könnte.

Dem Vorstand der Hedwig-Stalter Stiftung für das entgegengebrachte Vertrauen bei der Vergabe des Promotionsstipendiums

Bei Prof. Steudel bedanke ich mich für sein großes Interesse an meinem Thema und die Möglichkeit nach Ablauf des Stipendiums trotz Schwangerschaft meine Arbeiten an der Neurochirurgischen Klinik fortsetzen zu können.

Dr. Ralf Ketter sowohl für sein bemerkenswertes berufliches als auch privates Engagement, welches seinesgleichen sucht und ohne das diese Arbeit und unsere Publikation nicht möglich gewesen wären.

Herrn Dr. Jörg Rahnenführer und Herrn Dr. Niko Beerenwinkel für die fruchtbare und unkomplizierte Zusammenarbeit bei der statistischen Auswertung.

Frau Dr. Alexandra Klein, Frau Dr. Alexandra Prowald, Herrn Dr. Jörg Drumm und Frau Dipl. Biol. Sabine Keller für ihre produktive Unterstützung im Labor und eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Prof. Meese für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit, Geräte mitzunutzen sowie allen Mitarbeitern der Humangenetik für das gute Arbeitsklima.

Ebenfalls großen Dank gilt den ehemaligen Mitgliedern der Humangenetik aus Gebäude 68 und der „Chirurgie“, jetzt Praxis für Humangenetik bzw. IGD Saar, für die weiterhin bestehende sehr gute Zusammenarbeit und das überaus freundliche Verhältnis.

Weiterhin möchte ich Herrn PD. Dr. Bernhard Schick sowie Frau Ulrike Bechtel für die Hilfsbereitschaft und eine überaus angenehme Zusammenarbeit danken, welche so oft über die Erwartungen dieser Kooperation hinaus gingen.

Großen Dank an meine Eltern für ihre immerwährende Unterstützung und Aufmunterung, meiner Mutter insbesondere noch für das Korrekturlesen, und dass sie immer für Lara da waren und sind.

Meinem Mann Dirk danke ich für seine Unterstützung und Geduld, und meiner Tochter Lara für die kurzweilige Abwechslung und Aufmunterung, mit der sie mein Leben bereichert und das sie so unkompliziert meine Abwesenheit toleriert.

## **Veröffentlichungen der Ergebnisse dieser Dissertation:**

### **Artikel:**

Patients with high-grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment.

Wemmert S, Ketter R, Rahnenführer J, Beerenwinkel N, Strowitzki M, Feiden W, Hartmann C, Lengauer T, Stockhammer F, Zang KD, Meese E, Steudel WI, von Deimling A, Urbschat S. Neoplasia. 2005 Oct;7(10):883-93.

### **Tagungsbeiträge:**

#### Eigener Vortrag:

Age-related response of high grade glioma patients to Temozolomide treatment.

Wemmert S, Ketter R, Rahnenführer J, Zang KD, Steudel WI, von Deimling A, Urbschat S. International Journal of Molecular Medicine, Vol 16, Suppl 1, 2005

10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine, 13.-15. Oktober, 2005, Kreta

#### Vorträge:

Patients with high grade gliomas harboring deletions of chromosome 10q benefit from temozolomide treatment.

Urbschat S, Wemmert S, Zang KD, König J, Feiden W, Steudel WI, Ketter R. International Journal of Molecular Medicine, Vol 14, Suppl 1, 2004

9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular Medicine, 14.-16. Oktober, 2004, Kreta

Patients with high grade gliomas harboring deletions of chromosome 10q benefit from temozolomide treatment.

Ketter R, Wemmert S, Henn W, Steudel WI, Urbschat S

12th European Congress of Neurosurgery, EANS, 7.-12.09.2003, Lissabon

#### Poster:

Diffuse high grade Gliome mit Deletion 10q profitieren von Temozolomid-Therapie.

Wemmert S, Ketter R, Feiden W, Steudel WI, Zang KD, Urbschat S.

Verleihung des Posterpreises auf der 2. Tübinger Tagung in Kooperation mit der Neuro-Onkologischen Arbeitsgemeinschaft (NOA) der Deutschen Krebsgesellschaft. „Therapie maligner Gliome: Standards und neue Perspektiven“, State of the Art Symposium, 28.-29.03.2003, Tübingen