

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Analyse des Methylierungs- und Expressionsstatus
von *EMP3* und Evaluierung als putatives Tumorsuppressorgen
auf 19q13.3 in humanen Gliomen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

VON

Annegret Kunitz
aus Potsdam-Babelsberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Andreas von Deimling
 2. Prof. Dr. med. Werner Paulus
 3. Prof. Dr. med. Manfred Dietel

Datum der Promotion: 17.10.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONSPROMOTION	4
1.1	Einleitung	4
1.2	Material und Methoden	5
1.3	Ergebnisse	7
1.4	Diskussion	10
1.5	Literaturverzeichnis	14
2	KURZZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	18
3	ABSTRACT	19
4	AUSWEISUNG DES EIGENANTEILS	20
4.1	Publikation 1	20
4.2	Publikation 2	21
4.3	Publikation 3	22
4.4	Publikation 4	23
5	PUBLIKATIONSLISTE	24
6	LEBENS LAUF	25
7	DANKSAGUNG	26
8	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	27
9	PUBLIKATIONEN	28

1 Zusammenfassung der Publikationspromotion

1.1 Einleitung

Eine in diffusen Gliomen häufige genetische Alteration ist der Verlust des langen Armes des Chromosom 19 (19q), welcher in ca. 80 % der oligodendroglialen (OG) und 20 % der hochgradigen astrozytären Gliome (AG) nachgewiesen wird.^{31; 32; 41} In OG ist der 19q Verlust ein initiales Ereignis, so dass das putative, bis jetzt nicht identifizierte¹³ Tumorsuppressorgen (TSG) wohl eine Tumor-initiiierende Funktion hat.^{4; 32} In AG hingegen finden sich 19q Verluste häufiger in höher- als in niedergradigen Tumoren, so dass über eine progressionsassoziierte Funktion spekuliert wird.^{40; 41; 43} In OG kommen 19q Deletionen zumeist in Kombination mit 1p Verlusten vor und betreffen jeweils den gesamten Arm.^{10; 32} Diese 1p/19q Kodeletion wird u. a. durch eine Translokationen t(1;19)(q10;p10) in OG, nicht aber in AG, verursacht.^{9; 17} Entsprechend finden sich nur selten 1p/19q Kodeletionen in AG^{10; 32; 41}, man beobachtet weiterhin auch interstitielle Deletionen.^{10; 32} Hingegen zeigen Oligoastrozytome (OA) entweder eine 1p/19q Kodeletion oder eine *TP53* Mutation, die typisch für AG ist.^{25; 32} Deletionen von 19q sieht man häufiger in primären (pGBM) als sekundären Glioblastomen (sGBM).²⁸ Eine 1p/19q Kodeletion kommt weder in pGBM noch sGBM oft vor.^{28; 41} Interessanterweise zeigen Tumore mit 1p/19q Kodeletionen ein besseres Ansprechen auf Bestrahlung und/oder Chemotherapie.^{3; 38}

Bisher konnten keine Mutationen in putativen 19q TSG identifiziert werden.^{10; 42; 43} Deshalb wird über abberante Methylierungen der Promotorregion von somit abgeschalteten TSG spekuliert. In der Tat fanden sich 19q Gene wie z. B. *ZNF342*¹⁵, und *PEG3*³⁶, die in OG solche Alterationen aufwiesen. Ebenfalls wurde in malignen AG und Neuroblastomen (NB), die interstitielle 19q Deletionen aufweisen,^{24; 31; 41} eine Promotor-Hypermethylierung von *EMP3* mit reduzierter Expression gezeigt. Nach *EMP3* Demethylierung konnte eine *in vitro* Reexpression mit reduziertem Wachstum der NB-Zelllinien induziert werden.¹ NB-Patienten mit Promotor-Hypermethylierung von *EMP3* wiesen zudem eine schlechtere Prognose auf.¹ Die Funktion von *EMP3* (epithelial membrane protein 3) ist nicht bekannt. Aufgrund der Homologie zu *PMP22* wird eine Funktion des Proteins in Zellproliferation und Apoptose angenommen.³³

Wir konnten bereits mittels Expressionschips zeigen, dass von allen untersuchten 19q Genen *EMP3* die größte Expressionsdifferenz zwischen Gliomen mit und ohne 1p/19q Kodeletion aufwies und damit ein attraktiver TSG Kandidat ist.³⁴

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die beobachteten Expressionsdifferenzen zu validieren, genetische und epigenetische *EMP3* Alterationen zu identifizieren und mit klinischen Verlaufsdaten zu korrelieren. Um eine ausreichende Zahl an Tumorfällen zu analysieren, wurde die Arbeit in Kooperation mit dem Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

1.2 Material und Methoden

Die verwendeten Tumorproben entstammen den Instituten für Neuropathologie Berlin und Düsseldorf und wurden entsprechend histologischen Kriterien der WHO-Klassifikation durch erfahrene Neuropathologen evaluiert.¹⁸ Das Material wurde direkt nach Entnahme auf -80°C schockgefroren und vor den Aufarbeitungen des Gewebes durch Schnellschnittüberprüfung auf einen Tumorzellgehalt von >80 % analysiert. Die DNS- bzw. RNS-Extraktion erfolgte wie anderweitig beschrieben.³⁹

Für die Analyse des Deletionsstatus der Tumore verwendeten wir 5 Mikrosatellitenmarker (D19S433, D19S431, D19S718, D19S559, D19S601 bzw. D19S396, D19S219, D19S1182, D19S572, D19S210), die auf nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Silberfärbung visualisiert wurden.^{8; 12}

Zehn Oligodendrogliome WHO °II (OII), 21 anaplastische Oligodendrogliome WHO °III (OIII), 2 Oligoastrozytome WHO °II (OAI), 8 anaplastische Oligoastrozytome WHO °III (OAI), 9 Astrozytome WHO °II (AI), 10 Astrozytome WHO °III (AIII), 9 pGBM und 9 sGBM wurden einer Expressionsanalyse unterzogen. Als Gewebekontrollen fungierten kommerzielle Kontroll-RNS (BD Biosciences, St. Jose, CA, USA) und RNS aus operativ bzw. autopsisch entnommenem Gewebe aus tumorfreien Gehirnen. Die quantitative Bestimmung des RNS-Gehaltes von *EMP3* und *ARF1* erfolgte durch kontinuierliche Messungen des Transkripts in einer RT-PCR Reaktion unter Verwendung von komplementärer DNS und SYBR Green durch Interkalierung des Farbstoffs mit doppelsträngiger DNS. Die Werte wurden einem Abgleich gegen die Expressionsrate von *ARF1* (NCBI GenBank Accession No. M36340) unterzogen. Die Primärsequenzen und PCR Bedingungen wurden initialen *EMP3* Publikationen entnommen.^{1; 7}

Weiterhin wurden 132 Gliome (28 OII, 33 OIII, 5 OAI, 31 OAI, 7 AI, 15 AIII, 13 pGBM) auf Mutationen in den 4 kodierenden Exonen von *EMP3* unter Verwendung der „SSCP Methode“ (single strand conformation polymorphism) untersucht. Die jeweils generierten PCR-Produkte wurden auf 8 % bzw. 14 % denaturierende Polyacrylamidgele elektrophoretisch separiert und durch Silberfärbung visualisiert. Abberante Banden wurden mit dem ABI Prism 377 DNS Sequencer (Applied Biosystems) bidirektional sequenziert.¹¹

Wir analysierten 162 Gliome (bestehend aus 22 OII, 36 OIII, 5 OAI, 11 OAI, 24 AI, 25 AIII, 30 pGBM, 9 sGBM) und 3 Kontrollgewebe (2 Proben entstammen der Temporallappen von Epilepsiepatienten, eine Probe aus der Okzipitalregion bei frontalem GBM, histopathologisch tumorfrei) im Bereich der 5'-Promotorregion des *EMP3*-Gens auf abberante Methylierung unter Verwendung der publizierten Primersequenzen.¹ Es wurden zum Einen 89 Tumore nach Bisulfitmodifikation der methylierungsspezifischen PCR zugeführt (MS-PCR) und die 16 enthaltenen

CpG sites direkt sequenziert.¹⁴ Zum Anderen wurde Tumor-DNS von 73 Gliomen nach Einbettung in Agarose-Kügelchen bisulfitmodifiziert, amplifiziert und das PCR-Produkt in den M13-Vektor ligiert. Anschließend erfolgte nach Ausstreichen auf Agarplatten die Amplifikation positiver Bakterienklone, die Vektoraufreinigung und die Sequenzierung des M13-Vektortranskriptes.²⁹ Zum Vergleich der beiden Verfahren erfolgte eine Überprüfung an 9 Tumoren durch beide Methoden unter Konstanz der Resultate.

Das Einstufen des Methylierungsgrads erfolgte durch Abmessen des Cytosin-Thymidin Spitzensignals im Rahmen der Sequenzierungsreaktion unter Vergabe dieser Skalierung:

- 0 – kein Anhalt auf Vorliegen einer Methylierung der CpG site,
- 1 – schwache Methylierung, d. h. Cytosinpeak kleiner $\frac{1}{3}$ des Thymidinpeaks,
- 2 – moderate Methylierung, d. h. Cytosinpeak zwischen $\frac{1}{3}$ und $\frac{2}{3}$ des Thymidinpeaks,
- 3 – starke Methylierung, d. h. Cytosinsignal größer als $\frac{2}{3}$ des Thymidinsignals.

Eine entsprechende Skalierung wurde auch für die klonierten PCR Fragmente für jede CpG site vergeben:

- 0 – kein Nachweis einer Methylierung in 10 Klonen,
- 1 – schwache Methylierung, d. h. in 1 – 3 Klonen Methylierungsnachweis der CpG site,
- 2 – moderate Methylierung, d. h. 4 – 6 Klone zeigen eine Methylierung der CpG site,
- 3 – starke Methylierung, d. h. in mehr als 6 Klonen Nachweis einer Methylierung der CpG site.

Aufgrund dieser Einteilung erfolgte eine Subklassifikation der untersuchten Tumore in zwei Gruppen:

- Gruppe 1 repräsentierte die Tumore mit geringer *EMP3*-Hypermethylierung, d. h. weniger als 50 % Methylierung der 16 CpG sites und
- Gruppe 2 enthielt Tumore mit hoher *EMP3* Hypermethylierung, d.h. mehr als 50 % methylierte CpG sites.

Ebenfalls wurden die jeweils ermittelten Skalierungswerte der einzelnen CpG sites addiert und eine numerische Einteilung der Tumore vorgenommen.

Für die statistische Aufarbeitung der Daten wurde neben dem „t-Test“ zum paarweisen Vergleich von *EMP3* Methylierung und *EMP3* Expression in zwei unabhängigen Gruppen auch der „Fisher’s exact Test“ zur Analyse des zweidimensionalen Kontingenzintervalls verwendet. Ebenfalls verwendeten wir den „log rank Test“ zum paarweisen Vergleich der Überlebensverteilung.

Die graphische Darstellung der Überlebensdaten erfolgte durch Kaplan Meier Kurven mittels GraphPad Prism 4.

In die multivariante Analyse der Überlebenszeit nach dem „Cox's proportional hazards regression Model“ flossen neben dem *EMP3* Methylierungsstatus auch der 1p/19q Deletionsstatus, der WHO Grad und das Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation ein. Die multivariante Analyse erfolgte unter Verwendung von „R, Version 2.4.1“.³⁰ Alle angegebenen p-Werte sind zweiseitig und wurden als signifikant gewertet, wenn sie gleich bzw. kleiner 0,05 waren.

1.3 Ergebnisse

Ein Allelverlust von 19q ließ sich bei 16/22 OII (73 %), 24/35 OIII (69 %), 3/5 OAI (60 %), 5/11 OAIII (45 %), 6/20 AII (30 %), 8/23 AIII (35 %), 15/30 pGBM (50 %) und 3/8 sGBM (37,5 %) in einem oder mehreren Mikrosatellitenmarkern nachweisen.

In den 132 untersuchten Gliomen konnten in den kodierenden Genabschnitten von *EMP3* keine Mutationen gezeigt werden. Lediglich zwei Polymorphismen in Exon 5 wurden bei 4 Patienten nachgewiesen und sind in der SNP Datenbank dokumentiert (SNP DB rs4893 and SNP-DB rs 11671746; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

Insgesamt 41 OG und 37 AG wurden auf Expressionsunterschiede von *EMP3* quantitativ durch RT-PCR überprüft. In 16/41 OG konnte eine Reduktion des mRNA-Gehalts von *EMP3* um 50 % – verglichen mit der mRNA-Menge in Normalhirngewebe – gezeigt werden. Hingegen zeigten nur 4/37 AG eine Expressionsreduktion von *EMP3* um 50 %.

Interessanterweise zeigte sich weiterhin, dass die mRNA Expression von *EMP3* in OII/OIII mit 19q Deletion signifikant niedriger war als in OII/OIII mit intaktem 19q Status (mittleres Expressionslevel 0,83 (n = 27) vs. 9,97 (n = 13), p = 0,01, „Student's t-Test“). Dies konnte bei AG nicht nachgewiesen werden. Hier lagen die Expressionsniveaus von Tumoren mit 19q Deletion ähnlich denen ohne Deletion (mittleres relatives Expressionsniveau 38,34 (n = 12) vs. 10,36 (n = 18), p = 0,08, „Student's t-Test“). Weiter zeigten pGBM – verglichen mit sGBM – eine signifikant höhere mRNA Expression von *EMP3* (mittleres relatives Expressionsniveau 60,44 (n = 9) vs. 5,01 (n = 9), p = 0,008) oder AII (mittleres Expressionsniveau 1,21 (n = 9), p = 0,005) oder AIII (mittleres Expressionsniveau 6,60 (n = 10), p = 0,009, jeweils „Student's t-Test“). Die 34 untersuchten OII/OIII mit *EMP3* Hypermethylierung in der Promotorregion zeigten signifikant niedrigere (p = 0,006, „Student's t-Test“) und generell reduziertere (p = 0,03, „Fisher's exakt Test“) *EMP3*-mRNA Mengen als OII/OIII ohne *EMP3* Hypermethylierung (n = 7). Auch für AG konnte gezeigt werden, dass mit Nachweis einer *EMP3* Hypermethylierung (n = 25) die mRNA Transkriptmenge von *EMP3* niedriger (p = 0,005, „Student's t-Test“) als in Tumoren ohne Hypermethylierung von *EMP3* (n = 12) war.

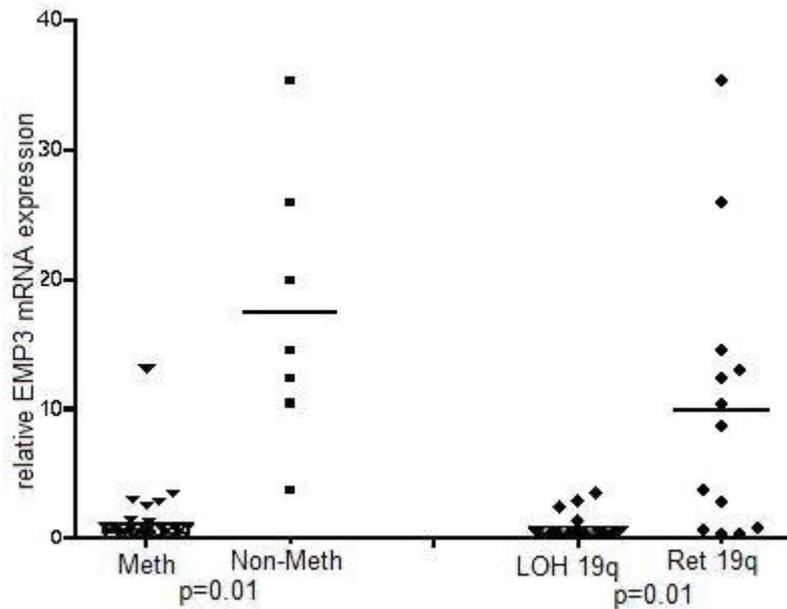


Abbildung 1

Links: *EMP3* Expressionsniveau in OG mit (n = 34) und ohne (n = 7) *EMP3* Hypermethylierung (links: meth. = *EMP3* Hypermethylierung, non-meth. = *EMP3* nicht hypermethyliert).

Rechts: *EMP3* Expressionsniveau in OG mit (n = 27) bzw. ohne (n = 13) genetischen Verlust von 19q (links: LOH = chromosomaler Verlust von 19q, RET = kein chromosomaler Verlust).

Hypermethylierung – definiert als > 50 % Methylierung in den 16 untersuchten CpG sites – wurde in 16/22 OII (73 %), 28/36 OIII (78 %), 4/5 OA II (80 %), 8/11 OAIII (73 %), 20/24 AII (83 %), 21/25 AIII (84 %), 5/30 pGBM (17 %) und 8/9 sGBM (89 %) nachgewiesen. Die untersuchten Kontrollgewebe zeigten keine *EMP3* Hypermethylierung. Die numerische Punktezahl in OG (OII, OIII, OAII, OAIII) mit 19q Deletion, berechnet durch Addition der jeweiligen Methylierungswerte der einzelnen CpG sites, war signifikant größer als in der vergleichbaren Gruppe ohne 19q Deletion („t-Test“: OII p = 0,01, OIII p < 0,001, OAII + OAIII p = 0,02). Eine Korrelation konnte bei astrozytären Tumoren nicht gezeigt werden. Die Häufigkeit („Fisher’s exact Test“, p < 0,001) und das Ausmaß an *EMP3*-Hypermethylierung („t-Test“, p < 0,001) in sGBM waren signifikant höher als in pGBM, die in fast keinem CpG eine Methylierung aufwiesen, wohingegen sGBM eine Methylierung fast aller CpG sites in den Tumoren zeigten. In 3 der 5 pGBM mit *EMP3* Hypermethylierung konnte ebenfalls eine 1p/19q Kodeletion nachgewiesen werden. Eine nachträgliche histologische Reevaluation dieser pGBM zeigte Tumorbereiche mit oligodendroglialer Differenzierung, so dass hier Glioblastome mit oligodendroglialen Anteilen retrospektiv diagnostiziert werden müssen.²²

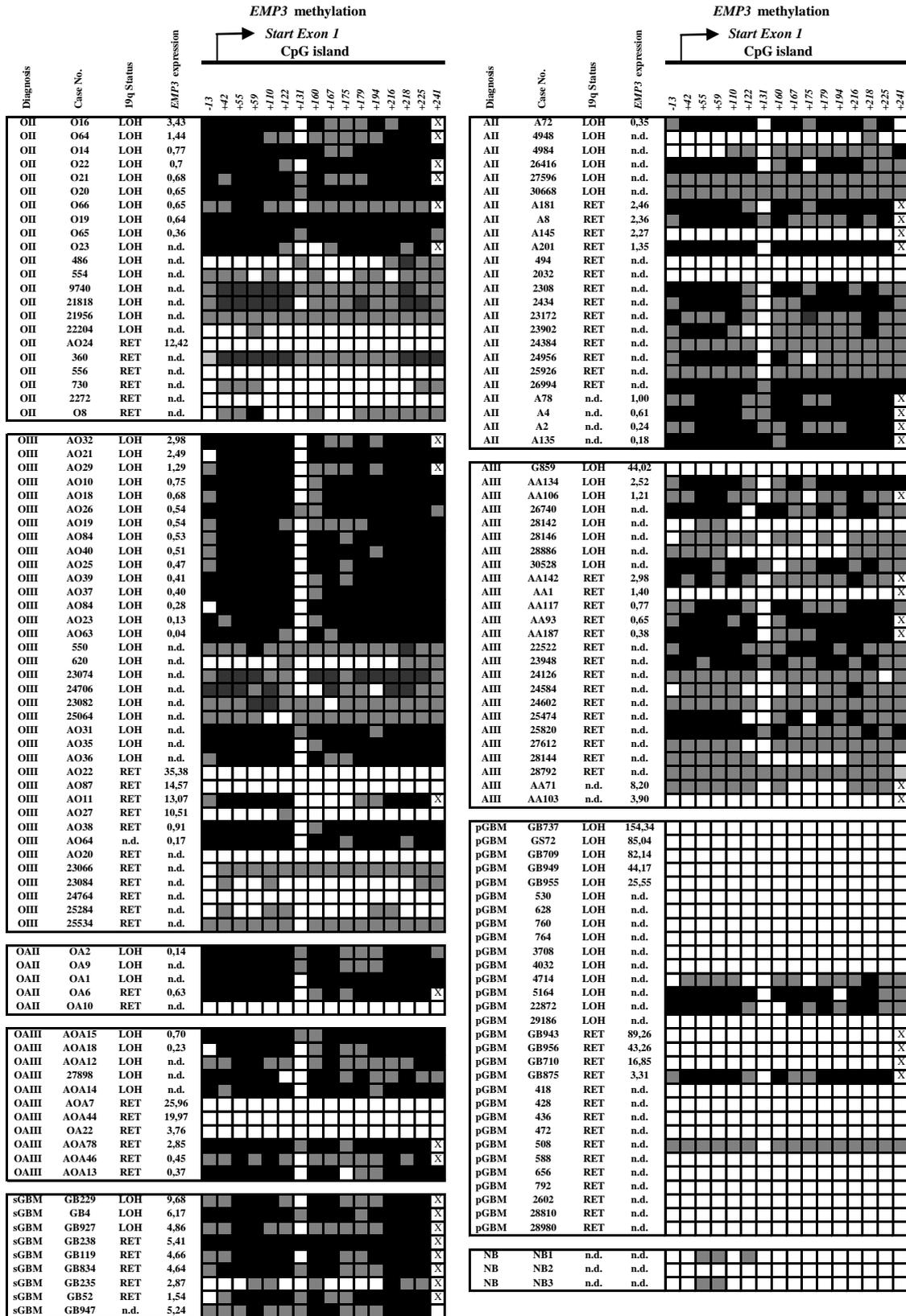


Abbildung 2

Darstellung des *EMP3* Methylierungsstatus und Expressionsniveaus in den 162 untersuchten Gliomen und 3 Normalgewebekontrollen, Lokalisation der 16 untersuchten CpG sites in Abhängigkeit vom Startkodon. *EMP3* Expressionsniveau in Korrelation zum Expressionsniveau von *ARF1* und Abgleich zum Normalgewebe.

0 (weiß): keine Methylierung, 1 (hellgrau): schwache Methylierung, 2 (grau): moderate Methylierung, 3 (schwarz): starke Methylierung. n.d.: nicht analysiert.

Eine Korrelation der molekulargenetischen Veränderungen konnte für insgesamt 46 Patienten (21 OII- und 25 OIII-Patienten) bei verfügbaren Überlebensdaten durchgeführt werden. In der univarianten Analyse zeigte sich eine *EMP3* Hypermethylierung als prognostisch günstiger Faktor für 46 Patienten ($p = 0,0323$). Dagegen wurde in der multivarianten Analyse (unter Verwendung des „Cox’s proportional hazard regression Model“) die 1p/19q Kodeletion ($p = 0,04$) als unabhängigen Indikator für eine bessere Prognose für Patienten identifiziert. Eine *EMP3* Hypermethylierung zeigte hierbei keine Signifikanz ($p = 0,81$). Auch konnte in einer weiteren univarianten Analyse gezeigt werden, dass bei OIII der 1p/19q Kodeletionsstatus einen signifikanteren Einfluss auf die Prognose des Patienten hat als der *EMP3* Methylierungsstatus ($p = 0,44$).

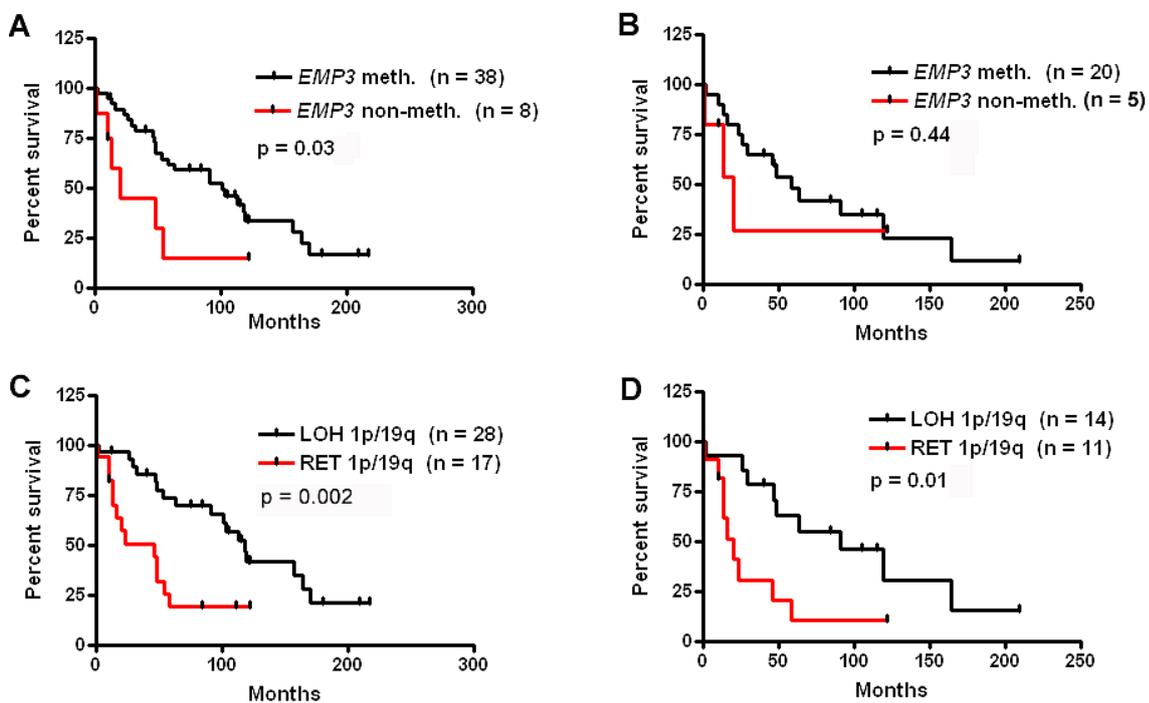


Abbildung 3

Analyse der Beziehung zwischen *EMP3* Hypermethylierung (A, B) bzw. allelischem Verlust von 1p/19q (C, D) und dem Gesamtüberleben von Patienten mit OG.

A, B. Kaplan Meier Überlebenskurve in Bezug auf *EMP3* Methylierungsstatus bei 46 Patienten [21 Patienten OII und 25 Patienten OIII] (A), Subgruppenanalyse von 25 Patienten mit OIII (B).

C, D. Kaplan Meier Überlebenskurve der 45 Patienten [20 OII und 25 OIII] in Korrelation zum 1p/19q LOH Status der Tumore für das gesamte Patientenkollektiv (C), Subgruppenanalyse der Patienten mit OIII (D) (meth. = *EMP3* Hypermethylierung; non-meth. = keine *EMP3* Hypermethylierung; LOH = loss of heterozygosity; RET = kein chromosomaler Verlust).

1.4 Diskussion

Bereits in mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass 19q Deletionen in OG ein genetisches Charakteristikum dieser Tumore darstellt. Das putative 19q TSG konnte bis dato jedoch nicht identifiziert werden.¹³

In einer früheren Arbeit wurde *EMP3* – neben verschiedenen anderen Genen – als ein hoch interessantes Kandidatengen identifiziert, welches differentiell exprimiert in Gliomen mit bzw. ohne Nachweis einer 1p/19q Kodeletion³⁴ ist. In 39 % der untersuchten AG wurde von Alaminos et al eine Hypermethylierung von *EMP3* angegeben.¹ Auch funktionell konnte belegt werden, dass nach Re-Expression von *EMP3* durch Behandlung von NB-Zelllinien mit 5-aza-2'-deoxycytidine eine verminderte Kolonieformierung von Tumorzellverbänden bei vermindertem Tumorwachstum feststellbar war.¹

Aufgrund dieser Ausgangssituation analysierten wir eine größere Zahl von 162 Gliomen hinsichtlich genetischer, epigenetischer und transkriptioneller Veränderungen von *EMP3* im Hinblick auf Mutationen in kodierenden Genregionen, Methylierung der DNS und Expressionsdifferenzen. Erneut konnten wir eine signifikante Reduktion der mRNA-Menge von *EMP3* in Tumoren mit 19q Deletionen – verglichen mit Tumoren ohne 19q Deletion – nachweisen und somit die bereits erhobenen Microarraydaten validieren. Wir zeigten, dass in OG mit 19q Deletionen eine *EMP3* Hypermethylierung und Reduktion der mRNA Expression vorliegt. Aufgrund dieser Daten kann eine biallelische Inaktivierung des *EMP3* Gens in OG postuliert werden. Die eine Kopie von *EMP3* geht durch chromosomalen Verlust im Sinne eines LOH (loss of heterozygosity), die andere bezüglich ihrer Transkriptionsfähigkeit durch epigenetische Veränderung der Promotorregion verloren. Dies unterstützt die Hypothese, dass *EMP3* das 19q TSG in OG ist.⁵

Li et al wies eine abberante Hypermethylierung von *EMP3* in OG nach, jedoch keine Assoziation zwischen dem Methylierungs- und Deletionsstatus.²¹ Die Arbeitsgruppe ermittelte bei der Mehrzahl der OG mit 19q Deletion eine reduzierte *EMP3* Expressionsrate, eine *EMP3* Überexpression lag bei Tumoren ohne 19q Verlust vor.²¹

In der vorliegenden Arbeit wiesen wir nach, dass strukturelle Veränderungen der DNS von *EMP3* in der kodierenden Sequenz i. S. einer Mutation in OG und AG nicht nachzuweisen sind. Es ist eher anzunehmen, dass *EMP3* einer wachsenden Gruppe von TSG angehört, die durch epigenetische Modifikationen verändert sind.

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass TSG wie *CTMP* auf 1q22 in GBM,²⁰ *CITED4* auf 1q34 in OG,³⁵ *RASSF1* auf 3p21.3 in Gliomen¹⁶ und *PCDHGA11* auf 5q31 ist AG⁴⁴ bei Fehlen von Mutationen und Nachweis epigenetischer Veränderungen eben dieser Gruppe von TSG angehören. Verschiedene Studien ergaben, dass bekannte TSG wie *CDKN2A*, *CDKN2B*, *p14ARF*, *RBI* und andere Gene wie *DAPK1*, *ESR1*, *TIMP3* und *MGMT* durch Hypermethylierung der Promotorregion in OG modifiziert sind.^{2; 6; 23; 45}

Hinsichtlich der Bedeutung einer *EMP3* Hypermethylierung konnte Alaminos et al bei NB-Patienten eine ungünstige prognostische Rolle zeigen.¹ Patienten mit Oligodendrogliomen und Nachweis einer 19q Deletion haben – verglichen mit Tumorpatienten ohne 19q Deletion – bei gleichzeitigem Verlust von 1p eine günstigere Prognose hinsichtlich Ansprechen auf Chemotherapie und/oder Strahlentherapie.^{3; 38}

Patienten mit Nachweis einer 19q Deletion im Tumorgewebe zeigten eine Hypermethylierung der Promotorregion von *EMP3* und eine resultierende verminderte Genexpression, so dass hier von einer prognostisch günstigen Rolle der *EMP3* Hypermethylierung auszugehen ist. In einer univarianten Analyse bei 46 Patienten zeigten wir, dass in OII/OIII eine Korrelation zwischen längerem Patientenüberleben und *EMP3* Hypermethylierung besteht. Multivarianten Analysen ergaben jedoch, dass eine *EMP3* Hypermethylierung keinen prognostisch unabhängigen Marker hinsichtlich des overall survival in den 25 untersuchten Patienten mit OIII darstellt. Vermutlich ist die Zahl untersuchter Tumore zu klein, um eine Signifikanz zu beobachten.

Auch in AG konnte eine *EMP3* Hypermethylierung mit konsekutiv erniedrigter Expression gezeigt werden. Diese war jedoch unabhängig vom 19q Deletionsstatus. In AG lag das Expressionsniveau von *EMP3* deutlich über dem der Vergleichsgruppe aus normalem Gehirngewebe. Diese Diskrepanz könnte sich durch die Tatsache erklären, dass es sich bei dem Kontrollgewebe um ein Homogenisat verschiedenster Zelltypen handelt und nicht der reinen Vorläuferzelle eines Astrozytoms gleicht. In 80 % der AII, AIII und sGBM konnte eine *EMP3* Hypermethylierung nachgewiesen werden, so dass eher von einer frühen epigenetischen Veränderung als von einer progressionsassoziierten Modifikation ausgegangen werden kann. Tatsächlich ist eine *EMP3* Hypermethylierung häufiger in AG nachweisbar als eine *TP53* Mutation oder ein Zugewinn von Chromosom 7, der in 60 % bzw. 50 % der Fälle nachgewiesen wird.³¹ Interessanterweise konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass 19q Deletionen als progressionsassoziierte Veränderungen in AII und AIII anzusehen sind.^{40; 41; 43} In der aktuell untersuchten Tumorgruppe wiesen wir in AG einen ähnlichen Trend nach, der Prozentsatz von 19q Deletionen in AII mit 30 % lag leicht höher als früher angegeben. Es ist davon auszugehen, dass auf 19q mindestens ein bzw. mehrere TSG lokalisiert sind, die bei der Progression von Astrozytomen involviert sind.

Ein weiteres wesentliches Ergebnis unserer Untersuchung ist die Differenz der *EMP3* Hypermethylierung in AII, AIII und sGBM (83 % – 89 %) verglichen mit pGBM (17 %). Der Unterschied wäre noch gravierender, wenn man die pGBM mit 1p/19q Kodeletion aus der Analyse entfernen würde. Dann würden nur 2/27 pGBM (7 %) eine *EMP3* Hypermethylierung aufweisen. In diesen Tumoren ist eine erhöhte *EMP3* Expression bei erhöhter mRNA Menge im Vergleich zum verwendeten Referenzgewebe nachzuweisen. Diese Beobachtung einer verminderten Expression von *EMP3* in AII, AIII und sGBM im Vergleich zu pGBM wurde durch eine weitere expressionschip-

basierte Arbeit an pGBM und sGBM nachgewiesen.³⁷ Die Unterschiede von *EMP3* Methylierungsstatus und Expression können u. a. dadurch bedingt sein, dass pGBM *de novo* durch völlig andere molekulare Veränderungen entstehen als sGBM, die durch Progression aus AII und AIII entstehen.¹⁹

Unsere Daten implizieren, dass eine *EMP3* Hypermethylierung als Differenzierungsmerkmal zwischen pGBM und sGBM verwendet werden kann. Auch in anderen Arbeiten konnten Unterschiede des Methylierungsstatus von Genen zwischen pGBM und sGBM, u. a. *HRK* und *TIMP3*, gezeigt werden.^{26;27}

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine *EMP3* Hypermethylierung als frühe epigenetische Veränderung in AG und OG anzusehen ist. In OG mit 19q Deletionen ist eine deutlich höhere Methylierungsfrequenz der *EMP3* Promotorregion mit verminderter Transkription von *EMP3* nachzuweisen als in Tumoren ohne 19q Verlust. In AG konnte in 80 % der untersuchten AII, AIII und sGBM eine *EMP3* Hypermethylierung bei reduzierter Expression nachgewiesen werden, während die Mehrzahl der pGBM bei verminderter *EMP3*-Promotormethylierung höhere Transkriptionsraten von *EMP3* aufwiesen.

1.5 Literaturverzeichnis

1. Alaminos M, Davalos V, Ropero S et al. EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Res.* 2005;65:2565-2571.
2. Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas. *Cancer Genet.Cytogenet.* 2003;144:134-142.
3. Cairncross G, Berkey B, Shaw E et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J.Clin.Oncol.* 2006;24:2707-2714.
4. de Stahl TD, Hartmann C, de BC et al. Chromosome 22 tiling-path array-CGH analysis identifies germ-line- and tumor-specific aberrations in patients with glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes.Cancer* 2005;44:161-169.
5. Devilee P, Cleton-Jansen AM, Cornelisse CJ. Ever since Knudson. *Trends Genet.* 2001;17:569-573.
6. Dong SM, Pang JC, Poon WS et al. Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 2001;60:808-816.
7. Ehrbrecht A, Muller U, Wolter M et al. Comprehensive genomic analysis of desmoplastic medulloblastomas: identification of novel amplified genes and separate evaluation of the different histological components. *J.Pathol.* 2006;208:554-563.
8. Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC et al. Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol.* 2004;14:121-130.
9. Griffin CA, Burger P, Morsberger L et al. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 2006;65:988-994.
10. Hartmann C, Mueller W, von Deimling A. Pathology and molecular genetics of oligodendroglial tumors. *J.Mol.Med.* 2004;82:638-655.

11. Hartmann C, Mueller W, von DA. Pathology and molecular genetics of oligodendroglial tumors. *J.Mol.Med.* 2004;82:638-655.
12. Hartmann C, Numann A, Mueller W et al. Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytoma. *Int.J.Cancer* 2004;108:839-844.
13. Hartmann C, von Deimling A. Oligodendrogliomas: impact of molecular genetics on treatment. *Neurol.India* 2005;53:140-148.
14. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:9821-9826.
15. Hong C, Bollen AW, Costello JF. The contribution of genetic and epigenetic mechanisms to gene silencing in oligodendrogliomas. *Cancer Res.* 2003;63:7600-7605.
16. Horiguchi K, Tomizawa Y, Tosaka M et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene* 2003;22:7862-7865.
17. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* 2006;66:9852-9861.
18. Kleihues P, Cavenee WK. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. *Pathology and genetics of tumours of the nervous system.* Lyon 2000:22-69.
19. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro.Oncol.* 1999;1:44-51.
20. Knobbe CB, Reifenberger J, Blaschke B, Reifenberger G. Hypermethylation and transcriptional downregulation of the carboxyl-terminal modulator protein gene in glioblastomas. *J.Natl.Cancer Inst.* 2004;96:483-486.
21. Li KK, Pang JC, Chung NY et al. EMP3 overexpression is associated with oligodendroglial tumors retaining chromosome arms 1p and 19q. *Int.J.Cancer* 2007;120:947-950.
22. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114:97-109.

23. Mollemann M, Wolter M, Felsberg J, Collins VP, Reifenberger G. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. *Int.J.Cancer* 2005;113:379-385.
24. Mora J, Cheung NK, Chen L, Qin J, Gerald W. Loss of heterozygosity at 19q13.3 is associated with locally aggressive neuroblastoma. *Clin.Cancer Res.* 2001;7:1358-1361.
25. Mueller W, Hartmann C, Hoffmann A et al. Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. *Am.J.Pathol.* 2002;161:313-319.
26. Nakamura M, Ishida E, Shimada K et al. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2005;85:165-175.
27. Nakamura M, Ishida E, Shimada K et al. Frequent HRK inactivation associated with low apoptotic index in secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2005;110:402-410.
28. Nakamura M, Yang F, Fujisawa H et al. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 2000;59:539-543.
29. Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:5064-5066.
30. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0. Available at: <http://www.R-project.org> (accessed April 2007). 2007
31. Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J.Mol.Med.* 2004;82:656-670.
32. Reifenberger G, Louis DN. Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 2003;62:111-126.
33. Taylor V, Suter U. Epithelial membrane protein-2 and epithelial membrane protein-3: two novel members of the peripheral myelin protein 22 gene family. *Gene* 1996;175:115-120.
34. Tews B, Felsberg J, Hartmann C et al. Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int.J.Cancer* 2006;119:792-800.

35. Tews B, Roerig P, Hartmann C et al. Hypermethylation and transcriptional downregulation of the CITED4 gene at 1p34.2 in oligodendroglial tumours with allelic losses on 1p and 19q. *Oncogene* 2007;26:5010-5016.
36. Trouillard O, Guirre-Cruz L, Hoang-Xuan K et al. Parental 19q loss and PEG3 expression in oligodendrogliomas. *Cancer Genet.Cytogenet.* 2004;151:182-183.
37. Tso CL, Freije WA, Day A et al. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res.* 2006;66:159-167.
38. van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J.Clin.Oncol.* 2006;24:2715-2722.
39. van den Boom D, Wolter M, Kuick R et al. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am.J.Pathol.* 2003;163:1033-1043.
40. von Deimling A, Bender B, Jahnke R et al. Loci associated with malignant progression in astrocytomas: a candidate on chromosome 19q. *Cancer Res.* 1994;54:1397-1401.
41. von Deimling A, Fimmers R, Schmidt MC et al. Comprehensive allelotyping and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 2000;59:544-558.
42. von Deimling A, Louis DN, von AK et al. Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. *Cancer Res.* 1992;52:4277-4279.
43. von Deimling A, Nagel J, Bender B et al. Deletion mapping of chromosome 19 in human gliomas. *Int.J.Cancer* 1994;57:676-680.
44. Waha A, Guntner S, Huang TH et al. Epigenetic silencing of the protocadherin family member PCDH-gamma-A11 in astrocytomas. *Neoplasia.* 2005;7:193-199.
45. Wolter M, Reifenberger J, Blaschke B et al. Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16INK4a), p14ARF, and CDKN2B (MTS2, p15INK4b) tumor suppressor genes. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 2001;60:1170-1180.

2 Kurzzusammenfassung der Arbeit

Hintergrund

In molekulargenetischen Untersuchungen zeigen mehr als die Hälfte oligodendroglialer Tumore und ca. ein Drittel astrozytärer Tumore einen chromosomalen Verlust (loss of heterozygosity = LOH) des langen Armes von Chromosom 19 (19q). Das hierbei putative Tumorsuppressorgen (TSG) auf 19q konnte trotz intensiver Forschungsarbeit jedoch nicht identifiziert werden. Wir unterzogen Gliome mit 19q LOH und ohne 19q LOH einer cDNA-microarray-Analyse. Neben verschiedenen differentiell exprimierten Genen zeigte *EMP3* die deutlichsten Expressionsunterschiede zwischen den Tumorguppen. Weiterhin konnten bereits in Neuroblastomen und Astrozytomen Expressionsunterschiede von *EMP3* bei Nachweis epigenetischer Veränderungen identifiziert werden, so dass dieses Gen als interessantes Tumorsuppressorkandidateng auf 19q13.3 in Gliomen anzusehen ist.

Material und Methoden

Wir untersuchten eine Tumorgruppe von 162 Gliomen, bestehend aus Astrozytomen, Oligodendrogliomen sowie primären und sekundären Glioblastomen, auf genetische und epigenetische Veränderungen von *EMP3*. Hierbei analysierten wir 132 Gliome auf Mutationen in den kodierenden Exonen, 162 Tumore auf den Methylierungsstatus der putativen Promotorregion und 78 Tumore auf den Expressionsstatus von *EMP3*.

Ergebnisse

In den 132 untersuchten Gliomen konnten wir keine somatischen Mutationen von *EMP3* in den kodierenden Exonen nachweisen. Weiterhin zeigte sich eine abberante Methylierung der putativen Promotorregion des Gens bei verminderter Expression in sowohl oligodendroglialen als auch in astrozytären Tumoren. Im Gegensatz zu den untersuchten Oligodendrogliomen zeigten astrozytäre Tumore jedoch keine Korrelation zwischen der verminderten Expression von *EMP3* und dem 19q Status. In Astrozytomen und sekundären Glioblastomen konnten wir bei abberanter Methylierung eine verminderte Expression von *EMP3* nachweisen, wohingegen primäre Glioblastome bei Vorliegen keiner Hypermethylierung der Promotorregion eine Überexpression des Gens aufweisen.

Schlussfolgerung

Mit dieser Arbeit konnten wir demonstrieren, dass durch abberante Methylierung der Promotorregion von *EMP3* in oligodendroglialen und astrozytären Tumoren eine verminderte Genexpression nachzuweisen ist. Weiterhin konnten wir unterschiedliche epigenetische Veränderungen von *EMP3* in primären und sekundären Glioblastomen nachweisen, die – neben verschiedenen genetischen Veränderungen – z. T. als ursächlich in der Tumorentstehung anzusehen sind.

Schlüsselwörter: *EMP3*, 1p/19q LOH, Gliom, Methylierung, Tumorsuppressorgen.

3 Abstract

Background

Allelic losses on 19q are found in the majority of oligodendroglial tumors and approximately one-third of diffuse astrocytomas. However, the tumor suppressor genes (TSG) on 19q are still elusive.

Material and Methods

Using cDNA microarray expression profiling, *EMP3* at 19q13.3 was among those genes showing the most pronounced expression differences. In line with this, other authors reported *EMP3* as being epigenetically silenced in neuroblastomas and astrocytomas. To further investigate *EMP3* as a TSG candidate on 19q13.3, we performed molecular analysis of this gene in 162 human gliomas. Mutation analysis did not reveal *EMP3* alteration in 132 gliomas.

Results

In oligodendroglial tumors, we found that aberrant methylation in the 5'-region of *EMP3* was significantly associated with reduced mRNA expression and LOH 19q. In astrocytomas, *EMP3* hypermethylation was also paralleled by reduced expression but was independent of the 19q status. *EMP3* hypermethylation was detected in more than 80% of diffuse, anaplastic astrocytomas and secondary glioblastomas. Primary glioblastomas, however, mostly lacked *EMP3* hypermethylation and frequently overexpressed *EMP3*.

Discussion

Our data corroborate that oligodendroglial and astrocytic gliomas often show *EMP3* hypermethylation and aberrant expression. Furthermore, our findings suggest that primary and secondary glioblastomas are not only characterized by distinct genetic profiles but also differ in their epigenetic aberrations.

Keywords: *EMP3*, 1p/19q LOH, methylation, glioma, tumor suppressor gene.

4 Ausweisung des Eigenanteils

Die Promovendin hatte folgenden Anteil an den eingereichten Publikationen:

4.1 Publikation 1

Mueller W (40%), Hartmann C (15%), **Hoffmann A (15%)**, Lanksch W (1%), Kiwit J (1%), Tonn J (1%), Veelken J (1%), Schramm J (1%), Weller M(1%), Wiestler OD (2%), Louis DN (2%), von Deimling A (20%).

Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets.

Am J Pathol. 2002 Jul;161(1):313-9.

IF: 6.750

15 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Frau Kunitz (geb. Hoffmann) fertigte Kryostat-Schnellschnitte von Tumoren an, extrahierte DNS und führte zusammen mit der MTA Frau Laß die PCR-basierten Untersuchungen durch. Sie sichtete die Daten und interpretierte diese.

Während der Umsetzung des Projektes brachte Frau Kunitz eine Vielzahl konstruktiver Ideen ein. Frau Kunitz wirkte bei der Erstellung des Manuskriptes aktiv mit. Sie überarbeitete neben anderen die ersten Textversionen und brachte sehr hilfreiche Vorschläge ein.

Ort, Datum

Prof. Dr. med. A. von Deimling

A. Kunitz

4.2 Publikation 2

Tews B (30%), Felsberg J (10%), Hartmann C (10%), **Kunitz A (10%)**, Hahn M (3%), Toedt G (2%), Neben K (2%), Hummerich L (3%), von Deimling A (5%), Reifenberger G (5%), Lichter P (20%).

Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling.

Int J Cancer. 2006;119(4):792-800.

IF: 4.693

10 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Frau Kunitz erstellte zunächst eine Karte aller Gene der Region 19q13.3 mittels etablierter Algorithmen und annotierte diese Gene. Anschließend generierte sie cDNS Bibliotheken aus multiplen Geweben. Mittels der Bibliotheken erstellte sie mehr als 150 gen-spezifischer PCR Produkte. Dabei entwickelte sie selbstständig die benötigten PCR Primer und optimierte die Reaktionsbedingungen. Zudem extrahierte Frau Kunitz RNS aus einem Teil der Gliome, welche in diesem Projekt untersucht wurden.

Weiterhin extrahierte sie DNS und genotypisierte diese hinsichtlich Deletionen auf den chromosomalen Armen 1p und 19q. Während der Umsetzung des Projektes war Frau Kunitz in die Entscheidungsprozesse direkt involviert und brachte wesentliche konzeptionelle Ideen ein. Die Ausarbeitung des Manuskripts und das Review-Verfahren begleitete sie kritisch und brachte Vorschläge zur Optimierung ein.

Zusammengefasst wäre die Durchführung dieses Projektes ohne die aktive Mitarbeit von Frau Kunitz nicht möglich gewesen.

Ort, Datum

Prof. Dr. med. A. von Deimling

A. Kunitz

4.3 Publikation 3

Kunitz A (30%), Wolter M (30%), van den Boom J (2%), Felsberg J (2%), Tews B (2%), Hahn M (2%), Benner A (2%), Sabel M (2%), Lichter P (2%), Reifenberger G (3%), von Deimling A (3%), Hartmann C (20%).

DNS hypermethylation and Abberant Expression of the *EMP3* Gene at 19q13.3 in Human Gliomas.

Brain Pathol. 2007;17(4):363-70.

IF: 5.274 (2006)

Besonderheit: shared first authorship

30 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Bei diesem Studie handelt es sich um das zentrale Projekt der NGFN I Förderung für das Institut für Neuropathologie der Charité.

Die für diese Publikation, die in Kooperation mit dem Institut für Neuropathologie Düsseldorf durchgeführt wurde, notwendigen DNS-Proben (73 Proben) wurden von Frau Kunitz z. T. aus nativem Tumorgewebe extrahiert und auf abberante Methylierung der *EMP3*-Promotorregion analysiert. Dies beinhaltete u. a. Bisulfitmodifikation der DNS-Proben, PCR-Amplifikation und Klonieren der Proben, Aufreinigen der Klone, Sequenzierung der PCR-Inserts und Auswertung der Sequenzier-Ergebnisse. Weiterhin erfolgte – so die Befunde noch nicht vorlagen – die Analyse des LOH-Status der untersuchten Tumorentitäten, u. a. in Astrozytomen, Glioblastomen, Oligodendrogliomen. Sie arbeitete die beiden MTAs Gesine Bartels und Claire Gehlhaar ein und war die zuständige Betreuerin. Unter Frau Kunitz' Anleitung und ihrer aktiven Mitarbeit wurde die Mutationsanalyse der kodierenden Exone des *EMP3*-Gens durchgeführt. Dabei entwickelte sie selbstständig die benötigten PCR Primer und optimierte die Reaktionsbedingungen. Frau Kunitz wertete die Daten statistisch aus und erstellte selbstständig Interpretationen ihrer Resultate. Bei der Erstellung des Manuskripts war sie vorangig beteiligt und konnte durch eine Vielzahl kritischer Einwände und Ideen die Qualität des Textes steigern. Sowohl bei der Umsetzung des Projekts als auch bei der Erstellung des Manuskriptes war Frau Kunitz aktiv in der Interaktion mit der kooperierenden Düsseldorfer Arbeitsgruppe eingebunden.

Zusammengefasst wäre die Durchführung dieses Projektes ohne die aktive Mitarbeit von Frau Kunitz nicht möglich gewesen.

4.4 Publikation 4

Tews B (30%), Roerig P (10%), Hartmann C (10%), Hahn M (5%), Felsberg J (5%), Blaschke B (5%), Sabel M (5%), **Kunitz A (5%)**, Toedt G (1%), Neben K (1%), Benner A (1%), Deimling A (1%), Reifenberger G (1%), Lichter P (20%).

Hypermethylation and transcriptional downregulation of the *CITED4* gene at 1q34.2 in oligodendroglial tumours with allelic losses on 1p and 19q.

Oncogene. 2007;26(34):5010-6.

IF: 6.582 (2006)

5 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Frau Kunitz generierte Teile der DNS Proben, welche in diesem Projekt zur Analyse des *CITED4* Genes herangezogen wurden. Sie erstellte viele der cDNS Proben, auf deren Basis die Expressionsanalysen dieses Projektes beruhten.

Frau Kunitz war aktiv an der Erstellung und späteren Überarbeitung des Manuskriptes beteiligt.

Weiterhin beschäftigte sich Frau Kunitz (geb. Hoffmann) im Zuge ihres wissenschaftlichen Interesses mit anderen potentiellen Tumorsuppressorgen-Kandidaten auf 19q13.3 in diffusen Gliomen. Einen Teil dieser Daten stellte sie selbst in einem Vortrag auf dem Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie in Berlin im Jahr 2003 vor (Evaluation of *p190aRhoGap* as putative 19q13.3 tumor suppressor gene in oligodendroglial tumours. Hoffmann A, Hartmann C, Laß U, Kunitz F, Plösser M, von Deimling A. Acta Neuropathol (2003) 106:389-417).

5 Publikationsliste

Publikationen

Kunitz A, Wolter M, van den Boom J, Felsberg J, Tews B, Hahn M, Benner A, Sabel M, Lichter P, Reifenberger G, von Deimling A, Hartmann C. DNA hypermethylation and Abberant Expression of the EMP3 Gene at 19q13.3 in Human Gliomas. *Brain Pathol.* 2007;17(4):363-70. IF 5.274

Tews B, Roerig P, Hartmann C, Hahn M, Felsberg J, Blaschke B, Sabel M, Kunitz A, Toedt G, Neben K, Benner A, Deimling A, Reifenberger G, Lichter P. Hypermethylation and transcriptional downregulation of the CITED4 gene at 1q34.2 in oligodendroglial tumours with allelic losses on 1p and 19q. *Oncogene.* 2007;26(34):5010-6. IF 6.582

Tews B, Felsberg J, Hartmann C, Kunitz A, Hahn M, Toedt G, Neben K, Hummerich L, von Deimling A, Reifenberger G, Lichter P. Identification of novel oligodendrogloma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int J Cancer.* 2006;119(4):792-800. IF 4.693

Mueller W, Hartmann C, Hoffmann A, Lanksch W, Kiwit J, Tonn J, Veelken J, Schramm J, Weller M, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A. Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. *Am J Pathol.* 2002;161(1):313-9. IF 6.750

Vorträge

Hoffmann A, Hartmann C, Laß U, Kunitz F, Plösser M, von Deimling A. Evaluation of *p190aRhoGap* as putative 19q13.3 tumor suppressor gene in oligodendroglial tumors. DGNN Meeting, Berlin, 2003 (Präsentation)

Tews B, Hoffmann A, Felsberg J, Hartmann C, Hahn C, Toedt G, Neben K, Hummerich L, von Deimling A, Reifenberger G, Lichter P. Identification of a minimal set of transcripts from 1p and 19q involved in tumorigenesis of oligodendrogloma, containing *cPLA2gamma*, *MGC4399* and *RPL18*. NOA2004: Progress in Molecular and Transitional Neuro-Oncology, Düsseldorf, 2004 (Präsentation)

Posterbeiträge

Hartmann C, Hoffmann A, Spingies C, Holtkamp N, Hahn M, von Deimling A. Towards the identification of oligodendrogloma-associated tumor suppressor genes on chromosomal arm 19q. NGFN Cancer Net Meeting, Frankfurt, 2002 (Poster & Präsentation)

6 Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht mit veröffentlicht werden.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Vielen danken:

Zum Einen danke ich Herrn Prof. Dr. med. A. von Deimling, dem Leiter des Institutes für Neuropathologie, Berlin, für die Möglichkeit, dass ich die vorliegende Promotion an seinem Institut in der mir eigenen Art und Weise durchführen konnte. Er hat mich in meinen Bemühungen und Bestrebungen unterstützt und mir mit seiner konstruktiven Kritik oft gezeigt, dass ich die Arbeiten immer noch etwas besser machen kann.

Zum Anderen gilt mein Dank Herrn PD Dr. med. C. Hartmann für seine Mithilfe bei dieser Arbeit, seinen Anregungen im Verlaufe des Entstehens der Promotion und seiner unerlässlichen Hilfe bei der Erstellung des Manuskriptes.

Auch danke ich Ulrike Laß, Christine Spingies, Gesine Bartels und Claire Gelhaar, die mir während meiner Zeit im Labor oft mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir mein Medizinstudium ermöglicht und mir den nötigen Rückhalt in allen Situationen gegeben hat. Mehr als einmal haben sie mir mit unermüdlicher Geduld geholfen und viele meiner Eigenheiten großzügig übersehen.

Frank – in Liebe und Dankbarkeit.

8 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Annegret Kunitz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Analyse des Methylierungs- und Expressionsstatus von *EMP3* und Evaluierung als putatives Tumorsuppressorgen auf 19q13.3 in humanen Gliomen“ selbst verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch keine (auszugsweisen) Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Ort, Datum

Unterschrift

9 Publikationen

An dieser Stelle folgen die in diese Arbeit eingehenden Originalarbeiten, die jeweiligen bibliographischen Hinweise entnehmen Sie bitten den Seiten 20 – 23.