

Aus dem
CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
mit Perinatalzentrum und Humangenetik
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. Günter Henze

Habilitationsschrift

**Die Rolle des Tumorsuppressors und epigenetischen Regulators
"Inhibitor of Growth 1" (ING1) bei der Biologie von Gliomen und
als molekulares Target für epigenetische Therapieansätze
in der pädiatrischen Neuroonkologie**

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Gesche Tallen
geboren am 01.08.1967 in Oldenburg/Niedersachsen

Eingereicht: Dezember 2010
Dekanin: Frau Prof. Dr. med. A. Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. H. Jürgens, Päd. Onkologie/Hämatologie
Westf. Wilhelms-Universität Münster
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. S. Rutkowski, Päd. Onkologie/Hämatologie
Universität Hamburg

*Allen
krebskranken Kindern und Jugendlichen
und ihren Familien
gewidmet.*



"Wir müssen unser Bestes tun. Das ist unsere heilige menschliche Verantwortung."

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungen | 4 |
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 Gliome im Kindes- und Jugendalter: Epidemiologie, Biologie und therapeutische Herausforderungen | 5 |
| 1.1.1 Gliome niedrigen Malignitätsgrades | 5 |
| 1.1.2 Hochgradig maligne Gliome | 6 |
| 1.2 Epigenetik und Onkogenese | 7 |
| 1.2.1 Die neuroonkologische Relevanz epigenetischer Phänomene | 8 |
| 1.2.2 Von molekularen Veränderungen in Gliomen zu klinisch relevanten Markern | 10 |
| 1.2.3 Epigenetische Therapieansätze in der Neuroonkologie | 12 |
| 1.3 Die Proteinfamilie "Inhibitor of Growth" (ING) | 13 |
| 1.3.1 Tumorsuppressorfunktionen von ING-Proteinen | 15 |
| 1.3.2 Epigenetische Funktionen von ING-Proteinen | 17 |
| 2. Eigene Arbeiten: Die Untersuchung der Tumorsuppressorfunktion des epigenetischen Regulators ING1 in Gliomen | 18 |
| 2.1 Status des Tumorsuppressorgens <i>ING1</i> in Gliomen | 19 |
| 2.1.1 Keine <i>ING1</i> -Mutationen in humanen ZNS-Tumoren, jedoch reduzierte <i>ING1</i> -Expression in Astrozytomen höheren Malignitätsgrades | 19 |
| 2.2 Der Einfluss von <i>ING1</i> auf Apoptose, Angiogenese und Chemosensitivität von Gliomen | 24 |
| 2.2.1 Die Expression von p33 ^{<i>ING1b</i>} mRNA und die Chemosensitivität in Hirntumorzellen | 24 |
| 2.2.2 Erniedrigte Expression des Tumorsuppressors "Inhibitor of Growth 1" (<i>ING1</i>) sensitiviert p53-defiziente Glioblastomzellen für die Cisplatin-induzierte Apoptose | 30 |
| 2.2.3 Die "Inhibitor of Growth 1" (<i>ING1</i>)-Proteine supprimieren die Angiogenese und regulieren die Angiopoietin-Expression in Glioblastomzellen | 39 |
| 2.2.4 Der "Inhibitor of Growth 1" (<i>ING1</i>) ist in die TSA-induzierte Apoptose und den FADD/Caspase 3-Signaltransduktionsweg in humanen Glioblastomzellen involviert | 51 |
| 3. Diskussion | 64 |
| 4. Zusammenfassung | 70 |
| 5. Literaturangaben aus dem freien Text | 71 |
| Danksagung | 81 |
| Erklärung | 82 |

Abkürzungen*

| | |
|-----------------|---|
| Ang | Angiopoietin |
| BRAF | Serin/Threonin-Proteinkinase B-Raf |
| CAM | Chorioallantoide Membran |
| CDDP | Cisplatin |
| CpG | Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotid |
| GBM | Glioblastoma multiforme |
| HAT | Histonacetyltransferase |
| HDAC(i) | Histondeacetylase (Inhibitor) |
| IDH | Isozitat-Dehydrogenase 1 |
| IL-8 | Interleukin 8 |
| ING | "Inhibitor of Growth" |
| LOH | "Loss of heterozygosity" |
| MAPK | "microtubule-associated-protein"-Kinase |
| MGMT | O(6)-Methylguanin-DNS-Methyltransferase |
| miRNS | mikro-RNS |
| PHD | "plant homeodomain" |
| SAHA | Suberoylanilid-Hydroxaminsäure |
| siRNS | "small interfering" RNS |
| SWI/SNF-Komplex | "SWItch/Sucrose NonFermentable"-Komplex |
| TSA | Trichostatin A |
| WHO | "World Health Organisation" |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

* die im freien Text öfter als einmal verwendet wurden

1. Einleitung

1.1 Gliome im Kindes- und Jugendalter: Epidemiologie, Biologie und therapeutische Herausforderungen

Primäre Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) sind die häufigsten soliden Tumoren im Kindes- und Jugendalter und nach der akuten lymphoblastischen Leukämie mit mehr als 20% die häufigste Krebserkrankung in dieser Altersgruppe [1]. Gliome gehören darunter zu den häufigsten Entitäten. Obwohl der zelluläre Ursprung dieser Tumoren beim Menschen noch nicht identifiziert ist, deuten Untersuchungen an der Maus auf neoplastisch transformierte neurale Stamm- oder Progenitorzellen als Ursprungszellen für die Initiation von Gliomen hin [2]. Die Gruppe der Gliome umfasst zahlreiche histologische Untergruppen und Malignitätsgrade, die nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) klassifiziert werden [3].

1.1.1 Gliome niedrigen Malignitätsgrades

Niedriggradig maligne Gliome (WHO Grade I und II) sind mit einem Anteil von 40% die häufigsten ZNS-Tumoren bei Kindern und Jugendlichen [1]. Im Allgemeinen zeigen sie ein langsames Wachstum mit intermittierenden Phasen des Wachstumsstillstands, bei manchen Kindern jedoch auch einen Übergang in aggressives lokales Wachstum oder Dissemination. Aus diesem unterschiedlichen biologischen Verhalten, den Besonderheiten der Lokalisation (z. B. intraaxiale, tiefliegende Tumoren wie Tumoren der Sehbahn, des Di- oder Mesencephalon und disseminierte Läsionen), der konsekutive unterschiedlichen neurochirurgischen Resektabilität, sowie der Assoziation mit Tumordispositionssyndromen (Neurofibromatose Typ 1, Tuberöse Sklerose) und abhängig vom Alter des Patienten ergibt sich eine Plethora an klinischen Verlaufsformen und an Behandlungsstrategien mit grossen Herausforderungen an den Index adjuvanter Therapieoptionen. Entsprechend bestehen individuell auch erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Prognose. Diese konnte in den letzten Jahren zwar insgesamt dank kontinuierlich optimierter standardisierter Behandlungsprotokolle, technischer Fortschritte in bildgebender Diagnostik und Mikroneurochirurgie, sowie verbesserter Supportivtherapie auf 78% gesteigert werden [4], jedoch wurde noch nicht für alle Subgruppen ein optimales Management etabliert. Das

liegt insbesondere daran, dass das gegenwärtige Spektrum an entscheidenden molekularen Faktoren, die das biologische Verhalten von Gliomen niedrigen Malignitätsgrades steuern. Basierend auf der individuellen Konstellation solcher molekularen Marker könnten das Progressionsrisiko besser definiert und entsprechend die Patientengruppen identifiziert werden, bei denen eine Intensivierung der Therapie durch Chemo- und Strahlentherapie gerechtfertigt, oder sogar eine tumorspezifische molekulare Therapie möglich ist (s. 1.2.2).

1.1.2 Hochgradig maligne Gliome

Hochgradig maligne Gliome (WHO Grade III und IV) machen etwa 20% aller ZNS-Tumoren bei Kindern und Jugendlichen aus [1]. Die Klassifikation der verschiedenen Subgruppen orientiert sich grundsätzlich an der astrozytären oder oligodendrogialen Differenzierung der Tumorzellen sowie an deren Malignitätsmerkmalen wie zelluläre Anaplasie, hohe Zelldichte, Angiogenese, Apoptosefiguren und Nekrosen [3]. Diese histomorphologischen Charakteristika haben hohe prognostische Relevanz. Die Gruppe der Hirnstammgliome stellt in diesem Zusammenhang allerdings eine Ausnahme dar: Aufgrund der Lokalisation dieser Neoplasien ist das operative Morbiditätsrisiko hoch und die prognostische Relevanz der Histomorphologie gering [5]. Stattdessen basiert ihre Klassifikation auf radiomorphologischen Kriterien. Hochgradig maligne Gliome wachsen schnell und infiltrativ. Sie metastasieren selten. Der Therapieerfolg hängt insgesamt auch entscheidend vom Ausmass der neurochirurgischen Tumorresektion ab [6, 7].

Mittlerweile ist die Wirksamkeit von Therapieelementen wie Radio- und Polychemotherapie bei malignen Gliomen zwar belegt, doch werden für Patienten mit diffusen intrinsischen Ponsgliomen auch nach maximaler Therapie mediane Überlebenszeiten von lediglich einem Jahr berichtet. Bei malignen Gliomen anderer Lokalisation sind nach multimodaler Therapie Fünfjahres-Überlebensraten von circa 50% beschrieben [5]. Die Therapie ist aufgrund der insgesamt schlechten Prognose teilweise noch experimentell. Immuntherapeutische Ansätze wie beispielsweise eine aktive Tumorkvakzination zeigen erste Erfolge in der Rezidivsituation [8]. Während ein Nachweis der antitumoralen Wirksamkeit antiangiogenetischer Substanzen *in vivo* bisher bei

Gliomen im Kindes- und Jugendalter noch fehlt, zeigen epigenetische Konzepte wie die Induktion von Tumordifferenzierung und Chromatinmodifikation erste Erfolge (s. 1.2.3).

Um die Überlebenschancen und auch die Lebensqualität von Kindern und Jugendlichen mit Gliomen in Zukunft weiter zu verbessern, kommt es allerdings nicht nur darauf an, neue Medikamente einzuführen, sondern die Therapie auch so zu gestalten, dass mögliche Langzeitnebenwirkungen berücksichtigt werden. Dazu könnte eine Verfeinerung von Substanzkombinationen bezogen auf das Individuum beitragen, die auf einer Miteinbeziehung von individuellen molekularen, das heißt genetischen und epigenetischen, Charakteristika in die Behandlungsplanung basiert.

1.2 Epigenetik und Onkogenese

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms 2001 [9] war ein Meilenstein im Verständnis des genetischen Ursprungs des Menschen. Dazu gehörte auch die Erkenntnis, dass ein großer Anteil unseres Erbmaterials nicht für die Codierung von Proteinen, sondern für regulatorische Aufgaben reserviert ist. Seither gewinnt eine biologische Querschnittsdisziplin, die das Spannungsfeld zwischen genetischer Veranlagung und der Reaktion auf Umwelteinflüsse untersucht, zunehmende Bedeutung als übergeordnete Regulationsebene der Genaktivität in der Entwicklungs- und Systembiologie sowie in der Onkologie: Die Epigenetik.

Die Idee von einem "Epigenotyp" wurde bereits vor über 60 Jahren als "kausale Interaktion zwischen Genen und ihren Produkten zur Emergenz des Phänotyps" im Zusammenhang mit der Embryonalentwicklung publiziert [10]. Mittlerweile beinhaltet der Begriff der Epigenetik die Identifikation und Analyse von erblichen Regulationsmechanismen des Genoms, die ohne eine Veränderung der DNS-Sequenz auftreten und Gene "an-" oder "abschalten" können. Dazu wird die Zugang zur DNS für die für die Transkription zuständigen Enzymkomplexe durch Modifikation von Histonproteinen in den Chromatin-Verpackungseinheiten, den Nukleosomen, entweder zugelassen oder verwehrt. Nukleosome bestehen jeweils aus einem Histonoktamer, um das sich beim Menschen die

DNS auf einer Länge von 146 Basenpaaren 1.7-mal herumwindet. Das Muster dieser Histon-Modifikationen, der "epigenetische Code" oder "Histon-Code", variiert je nach inneren und äusseren Bedingungen und ist entsprechend individuell unterschiedlich [11]. Epigenetische Vorgänge (s. 1.2.1) regulieren die Aktivität der ca. 23.000 menschlichen Gene in unterschiedlichen Geweben zu verschiedenen Zeitpunkten [11, 12].

Da die überwiegende Anzahl aller Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen auf Probleme bei der Genregulation zurückzuführen ist, haben epigenetische Phänomene eine besondere Relevanz in der pädiatrischen Onkologie. Durch ein zunehmend besseres Verständnis dieser Phänomene wird ein Weg zu einer innovativen onkologischen Diagnostik sowie zu neuen antitumoralen Behandlungsstrategien geöffnet, die sich grundlegend von der konventionellen Chemotherapie unterscheiden, diese möglicherweise jedoch synergistisch ergänzen können.

1.2.1 Die neuroonkologische Relevanz epigenetischer Phänomene

Krebszellen akkumulieren genetische und epigenetische Alterationen, die Genexpressionsmuster verändern, und führen dadurch zur Initiation und Progression von Tumoren [12]. Wie genetische Alterationen sind auch epigenetische Veränderungen erblich und fördern die Onkogenese durch Modifikation fundamentaler zellulärer Programme wie Proliferation, Zellzyklusregulation, Apoptose und DNS-Reparatur. Grundlegende Mechanismen der Epigenetik, die in vielen verschiedenen Malignomen aus grösstenteils noch unbekannter Ursache dysreguliert sind und entsprechend auch im Zusammenhang mit der Entstehung und der Behandlung von Gliomen im Kindes- und Jugendalter relevant sein können, werden im folgenden erläutert.

Das Phänomen der *Nukleosom-Modifizierung* wird durch Umpositionierungen von Nukleosomen in den Promoterregionen von Genen definiert [13]. Diese Prozesse benötigen die Aktivität des ATPase-abhängigen "SWItch/Sucrose NonFermentable" (SWI/SNF)-Komplexes. Funktionsstörungen des SWI/SNF-Komplexes in Assoziation mit Kanzerogenese sind vielfältig beschrieben [14].

Nicht-kodierende Mikro-RNS (miRNS) regulieren Genexpression, indem sie durch eine Gruppe von RNS-induzierten "Silencing"-Komplexen" (RISCs) bestimmte Gene posttranskriptionell stilllegen [15, 16]. Zu diesen Genen gehören sowohl Tumorsuppressor- als auch Protoonkogene. Daher können miRNAs sowohl syn- als auch antagonistische Effekte bei der Kanzerogenese haben [16] und ein entsprechend hohes therapeutisches Potenzial aufweisen, das in der pädiatrischen Onkologie noch auf seinen klinischen Einsatz wartet.

Aberrante DNS-Methylierungsmuster betreffen zahlreiche biologische Prozesse, deren Störungen mit maligner Transformation assoziiert sind: Differenzierung, Entwicklung, "Imprinting" und X-Chromosom-Inaktivierung [17, 18]. So führen DNS-Hypo- oder Demethylierungen, meist in Regionen nicht-kodierender DNS-Sequenzen, durch Induktion von pathologischer Chromosomeninstabilität und von transkriptionalen Dysregulationen zur Onkogenese [19]. DNS-Methylierungen finden hauptsächlich im Bereich von DNS-Abschnitten statt, die reich an Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Dinukleotiden sind. Diese bilden ungefähr 60% der hoch-konservierten Promoterregionen des menschlichen Genoms [20]. Indem sie verschiedenen Transkriptionsfaktoren den Zugang zur DNS verwehren oder auch durch Rekrutierung zusätzlicher Proteine, die mit der Stilllegung von Genen assoziiert sind, gehören Promoter-Hypermethylierungen zu den Hauptursachen für die Inaktivierung von Tumorsuppressor- und anderen wachstumsregulatorischen Genen in menschlichen Malignomen [19], auch in Gliomen [21]. Beispielsweise kommen Hypermethylierungen des Gens für die Cyclin-abhängige Kinase p16^{INKa} in zahlreichen menschlichen Tumoren, auch in Gliomen, vor [21]. Weitere mit der Initiation, Progression und Prognose von Gliomen assoziierte Gene mit hypermethylierten Promotern und konsekutive verminderter Expression sind das Gen für das DNS-Reparatur-Enzym O(6)-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (*MGMT*) (s. 1.2.2) sowie das Retinoblastomgen *RB1* in anaplastischen Astrozytomen und in Glioblastoma multiforme (GBM), das "large tumor suppressor gene 1 (*LATS1*)", *LATS2*, *RASSF1A* und letzterem benachbarte Gene, sowie Anteile des "protocadherin-gamma subfamily A11 (*PCDH-gamma-A11*)"-Gens in Astrozytomen unterschiedlichen Malignitätsgrades [21].

Durch posttranslationale kovalente *Histon-Modifikationen* findet eine Feinabstimmung fundamentaler Prozesse wie Transkription, DNS-Reparatur und -Replikation statt [22]: Acetylierungen und Methylierungen von Lysinresten an den Kernhistonen H3 und H4 verändern die Nukleosomstruktur, wobei je nach Lysinrest und Ausmass der Modifikation (Mono-, Di- oder Trimethylierung) eine Aktivierung oder Repression der Transkription erfolgen kann. Diese Prozesse werden durch das regulierte Zusammenspiel zweier Enzym-Gruppen, den Histonacetyltransferasen (HAT) und den Histondeacetylasen (HDAC), generiert. Entsprechend können Imbalancen dieser Homöostase zu einer inadäquaten Expression von Protoonkogenen oder einer Stilllegung von Tumorsuppressorgenen und konsekutive zu Initiation, Progression und Metastasierung von Malignomen führen [11]. Verschiedene Studien lassen bereits annehmen, dass Gliompatienten von einer Behandlung mit HDAC-Inhibitoren (HDACi) profitieren können [23, 24]: durch Auflockerung der Chromatinstruktur als Folge von Histonacetylierung kann möglicherweise die Effektivität von DNS-schädigenden Zytostatika und auch von Strahlentherapie, insbesondere bei Patienten mit Chemo- oder Strahlenresistenz, gesteigert werden (s. 1.2.3).

1.2.2 Von molekularen Veränderungen in Gliomen zu klinisch relevanten Markern

Innerhalb der letzten Jahre sind zahlreiche genetische [25] und auch einige epigenetische [21] Alterationen in Gliomen identifiziert worden. Eine Designation als "Gliom-Biomarker" ist für die meisten dieser Veränderungen jedoch nicht gerechtfertigt, da sie die Eigenschaften eines solchen, das heisst die Vermittlung von eindeutigen diagnostischen, prognostischen oder prädiktiven Informationen, die über die der histologischen Klassifikation hinausgehen und eine distinkte Risikostratifikation zur individuellen Therapieplanung möglich machen, nicht erfüllen [25]. Vor diesem Hintergrund ist die Zahl der derzeit klinisch relevanten Biomarker für Gliome derzeit noch auf einige wenige genetische und epigenetische Veränderungen beschränkt, die im folgenden erläutert werden sollen:

Eine *aberrante Aktivierung des Gens für die Serin/Threonin-Proteinkinase B-Raf*, des Protoonkogens *BRAF*, auf Chromosom 7q34 findet sich oft in pilozytischen Astrozytomen,

den häufigsten Gliomen niedrigen Malignitätsgrades im Kindes- und Jugendalter [25]. Das Protein ist in die Regulation des "microtubule-associated-protein-kinase (MAPK)"/"extracellular signal-regulated kinases (ERK)"-Signaltransduktionswegs involviert, der unter anderem Mechanismen der Zellteilung und der Zelldifferenzierung steuert. Erst kürzlich wurden *BRAF*-Aberrationen, meist verursacht durch Genduplikation oder -Fusion, als *die* charakteristische genetische Veränderung in pilozytischen Astrozytomen identifiziert und mit deren Entstehung assoziiert, während sie in den ebenfalls niedriggradig malignen, jedoch diffus-infiltrierenden Astrozytomen dieser Altersgruppe eher selten vorkommen [26, 27]. Entsprechend könnte die Untersuchung des *BRAF*-Status bei der manchmal schwierigen differenzialdiagnostischen Abgrenzung dieser beiden Gliomentitäten hilfreich sein [28]. Die Inhibierung des MAPK-Signalweges bei der Behandlung pädiatrischer Gliompatienten hat bereits Erfolg gezeigt [29].

Mutationen des Gens der Isozitat-Dehydrogenase 1 (IDH1), seltener der Isozitat-Dehydrogenase 2 (IDH 2), kommen zwar in niedriggradig malignen, diffus-infiltrierenden Astrozytomen des Kindes- und Jugendalters vor [25], sind jedoch - verglichen mit Gliomen von Erwachsenen, bei denen sie signifikant mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert sind [30] - bei jungen Patienten insgesamt selten [25].

Kombinierte *Deletionen auf den chromosomalen Armen 1p und 19q* in oligodendroglialen Tumoren haben sich im Rahmen zahlreicher Studien als prognostischer Marker für das Ansprechen der Erkrankung auf Radio- und die Therapie mit genotoxischen Substanzen wie Alkylanzien etabliert [25].

Die in malignen Gliomen häufig zu findende *Promotermethylierung von MGMT*, einem DNS-Reparaturgen, prädiziert gutes Ansprechen auf alkylierende Substanzen [31], Temozolomid [32], sowie eine Kombinationstherapie mit beiden Substanzgruppen [33]. Ausserdem sensitiviert sie Gliomzellen mit verminderter Caspase-8-Expression für die Behandlung mit "tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand" (TRAIL) [34] und ist mit einer längeren Überlebenszeit von GBM-Patienten nach alleiniger Strahlentherapie assoziiert [35].

1.2.3 Epigenetische Therapieansätze in der Neuroonkologie

Epigenetische Alterationen bieten attraktive Angriffspunkte und erfolgsversprechende Methoden für die Krebstherapie, da der epigenetische Code personenspezifisch ist und seine Veränderungen im Gegensatz zu genetischen Defekten reversibel sind. Zudem sind Zellen mit geringer Teilungsrate weniger sensibel gegenüber epigenetisch wirksamen Substanzen, wodurch sich günstige Dosierungsfenster öffnen könnten [36]. Weil die epigenetische Stilllegung von Tumorsuppressor- und anderen wachstumsregulatorischen Genen eine funktionelle ist, sie deren physische Genstruktur also unberührt lässt, bietet die Reaktivierung dieser so stillgelegten Gene neue antitumorale, darunter auch anti-angiogenetische Therapieansätze [11, 19, 37]. Durch Promotermethylierung oder Histon-Deacetylierung stillgelegte Tumorsuppressoren können mittels demethylierender Substanzen wie Decitabin (5-aza-2'-Deoxycytidin, 5-Aza-dC) oder HDACi wie Suberoylanilid-Hydroxaminsäure (SAHA) und Trichostatin A (TSA) erfolgreich reaktiviert werden [36, 38]. HDACi erzeugen eine Relaxation der Chromatinstruktur, wodurch einerseits die Transkription zuvor stillgelegter Tumorsuppressorgene wieder möglich, andererseits auch der Zugang zur DNS für genotoxische Substanzen erleichtert wird [24].

Erfolge in *in vitro*- und auch Phase I und II-Studien zur Behandlung myelodysplastischer und anderer, darunter auch pädiatrisch-onkologischer Erkrankungen mit epigenetisch wirksamen Substanzen sind bereits beschrieben [39-47]. Auch für Patienten mit Gliomen zeigt die therapeutische Umkehrung von epigenetischen Phänomenen entweder als Mono- oder kombiniert mit konventioneller Chemotherapie zur *MGMT*-Inhibierung, zur Reaktivierung neuroonkologisch relevanter Tumorsuppressoren (s. 1.2.2), und auch zur Differenzierungsinduktion erste vielversprechende Ergebnisse *in vitro* [34, 48-50] und *in vivo* [32, 51, 52]. Dennoch muss beim Einsatz epigenetischer Substanzen davon ausgegangen werden, dass sowohl die Demethylierung als auch die Hemmung von HDAC nicht Gen-spezifisch ist. Stattdessen ist mit einem jeweils globalen Effekt auf den gesamten Histon-Code zu rechnen. Deshalb werden die Einschränkungen in der Anwendung epigenetischer Substanzen insbesondere bei pädiatrischen Patienten derzeit noch durch deren mögliche Toxizität, Mangel an Spezifität und Resistenzentwicklung geprägt [11, 19, 21].

Vor diesem Hintergrund und berücksichtigend, dass die unterschiedlichen Krebserkrankungen, sowie die einzelnen Gliom-Subentitäten bei Kindern und Jugendlichen eine hohe genomische und epigenomische Variabilität aufweisen, benötigt die Validierung der bereits vielversprechenden Ergebnisse zu epigenetischen Behandlungsansätzen in der pädiatrischen (Neuro-)Onkologie unbedingt ein erweitertes Verständnis von epigenetischen Phänomenen. Dazu gehört auch die Identifikation von epigenetisch regulierten oder -regulierenden Markern, mittels derer die molekularen Signalwege und Faktoren, die für das Ansprechen auf HDACi sowie verschiedene Resistenzmechanismen verantwortlich sein könnten, aufgeklärt werden können.

1.3 Die Proteinfamilie "INhibitor of Growth" (ING)

Tumorsuppressorgene werden als eine Gruppe von Genen definiert, die Proteine kodieren, deren Expression durch Stress induzierbar ist und die durch Regulation grundlegender biologischer Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Seneszenz und DNS-Reparatur Zellwachstum hemmen [53]. Man unterscheidet zwei Klassen von Tumorsuppressorgenen: Die "Wächter" des Genoms (Klasse I), meist DNS-Reparaturgene, die das Genom vor Mutationen schützen und in malignen Zellen oft mutiert sind, und die "Pförtner" (Klasse II), welche direkte Effekte auf das Zellwachstum haben, und die in Tumoren selten mutiert, jedoch oft reduziert exprimiert oder anderweitig inaktiviert sind [54].

ING-Proteine bilden eine Familie von Typ-II-Tumorsuppressoren, die in allen bisher untersuchten eukaryontischen Spezies angetroffen wird [55]. ING-Proteine werden von 5 verschiedenen Genen kodiert (*ING1-ING5*), die durch alternatives Spleissen multiple Isoformen generieren (Abbildung 1a). Alle ING-Isoformen enthalten ein evolutionär hochkonserviertes Motiv ("plant homeodomain (PHD)-Finger"), das für diverse ihrer tumorsuppressorischen und epigenetischen Funktionen verantwortlich ist.

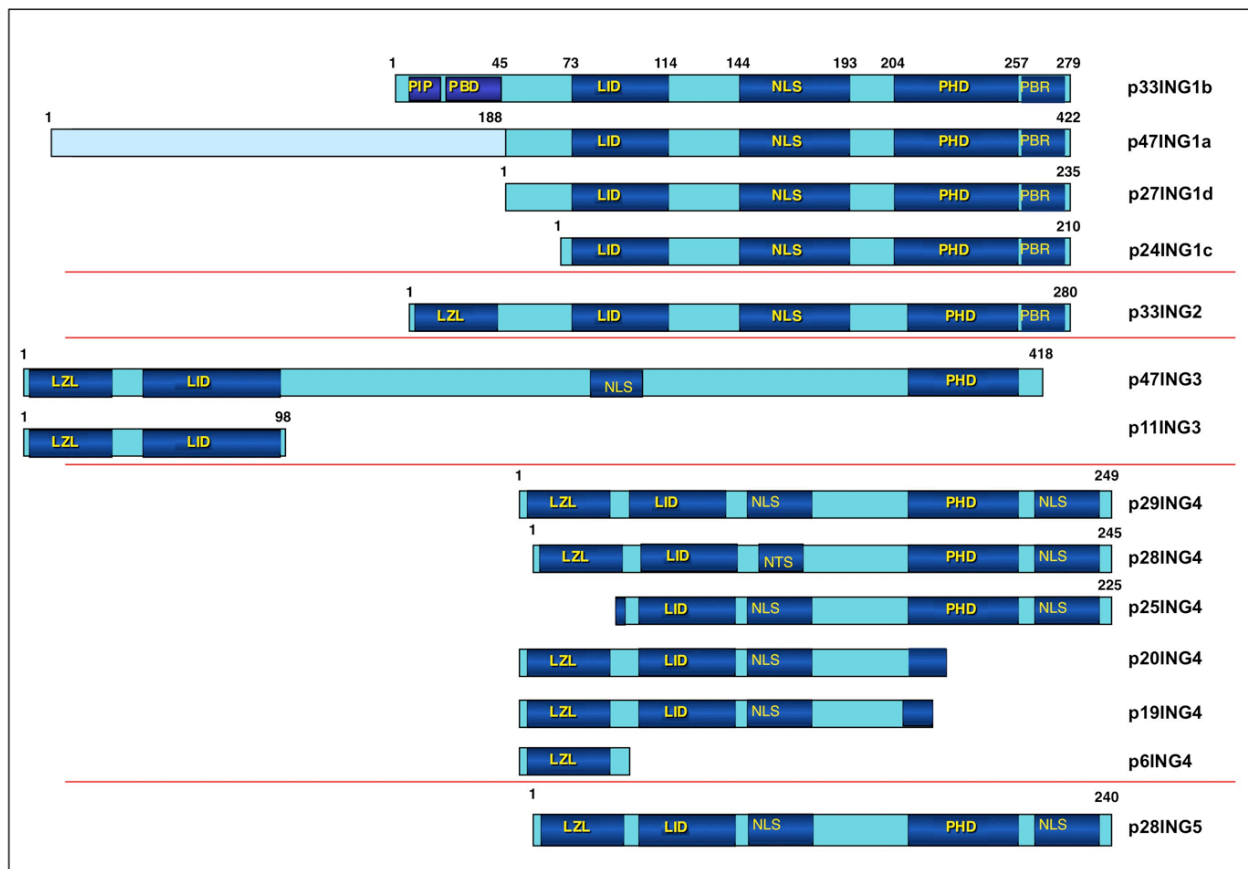


Abbildung 1a) Struktur der bisher identifizierten ING-Proteine (angelehnt an [57]). Die Zahlen beziehen sich auf die Grenzen der verschiedenen Proteinsequenz-Motive, deren Funktionen in Abbildung 1b) erläutert werden. Abkürzungen: LID - "Lamin-interaction-domain", LZL - "leucine-zipper-like" Region, NLS - nukleäre Lokalisations-Sequenz, NTS - nukleoläre Translokations-Sequenz, PBD - Sequenz mit partieller Homologie zu Bromodomänen, PBR - polybasische Region, PHD - "plant homeodomain finger"-Motiv, PIP - "PCNA-interacting-protein motif". Viele der Interaktionen zwischen ING und anderen wachstumsregulatorischen Proteinen, z. B. p53, finden über die NLS statt (s. Abbildung 1b)).

Seit der Erstbeschreibung von ING1 vor 15 Jahren [56] haben die Kenntnisse von den biologischen Funktionen der ING-Proteine, ihrer Beziehung zum Tumorsuppressor p53, ihrer Aktivierung durch bioaktive Phospholipide und der Schlüsselrolle ihrer PHD bei der Interpretation des Histon-Codes kontinuierlich zugenommen. Aufgrund ihrer mittlerweile etablierten Tumorsuppressor- und epigenetischen Funktionen (s. 1.3.1, 1.3.2), und weil ING-Proteine auch in zahlreiche Stress-Signaltransduktionswege involviert sind, ist die Definition ihrer Rolle bei der Biologie von Malignomen sowie für konventionelle und epigenetische Therapieansätze von hoher onkologischer Relevanz.

1.3.1 Tumorsuppressorfunktionen von ING-Proteinen

Während *ING*-Mutationen in Tumoren eher selten vorkommen, wird *ING* in zahlreichen Malignomen reduziert exprimiert [57]. Veränderte Methylierungsmuster für den *ING1*-Promoter wurden bisher für Ovarial-Karzinome und chronische lymphatische Leukämien publiziert [58, 59]. Die zuerst und meist beschriebene *ING*-Variante ist *ING1*. Das *ING1*-Gen wurde initial durch subtraktive Hybridisierung von Brust-Epithel- und Mamma-Karzinomzellen in Kombination mit einem *in vivo*-Screening identifiziert [56] und kurz danach auf Chromosom 13q33-34 lokalisiert [60]. *ING1* kodiert mindestens 3 Protein-Isoformen, die durch alternatives Spleissen entstehen (Abbildung 1a). *ING1b* ist die Haupt-Isoform in humanen proliferierenden Zellen, während *ING1a* in diesen vergleichsweise gering exprimiert wird [57].

In Einklang mit seiner Rolle als Tumorsuppressor geht ein Verlust der *ING1*-Funktion mit einer gesteigerten Inzidenz von B-Zell-Lymphomen in murinen *ING1*-"Knockout"-Modellen einher [61, 62]. Kurz nachdem die Tumorsuppressorfunktion der *ING*-Proteine erstmals beschrieben war [56], wurde ihre Rolle bei Apoptose [63, 64], Seneszenz [65, 66] und DNS-Reparatur [67, 68] definiert. Diese ist zum Teil - auch in Gliomen - von einer Interaktion mit dem Tumorsuppressor p53 abhängig [57, 69]. *ING1b* übt seine tumorsuppressorischen Funktionen auch noch über Interaktionen mit zahlreichen anderen wachstumsregulatorischen Proteinen und Proteinkomplexen aus [57] (Abbildung 1b). Ausserdem tragen Dysregulationen von *ING1*-Interaktionen mit der 170-Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes (s. 1.2.1) sowie mit nukleären Lamin-Proteinen zur Ausprägung des Phänotyps von Hutchinson-Gilford-Progerie bei [70]. Des weiteren wird aufgrund der UV-induzierten Bindung von *ING1b* mit "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)" [67], welches eine Schlüsselfunktion bei der DNS-Replikation und -Reparatur hat, eine Rolle für *ING1b* bei der Antwort auf DNS-Schäden postuliert [57].

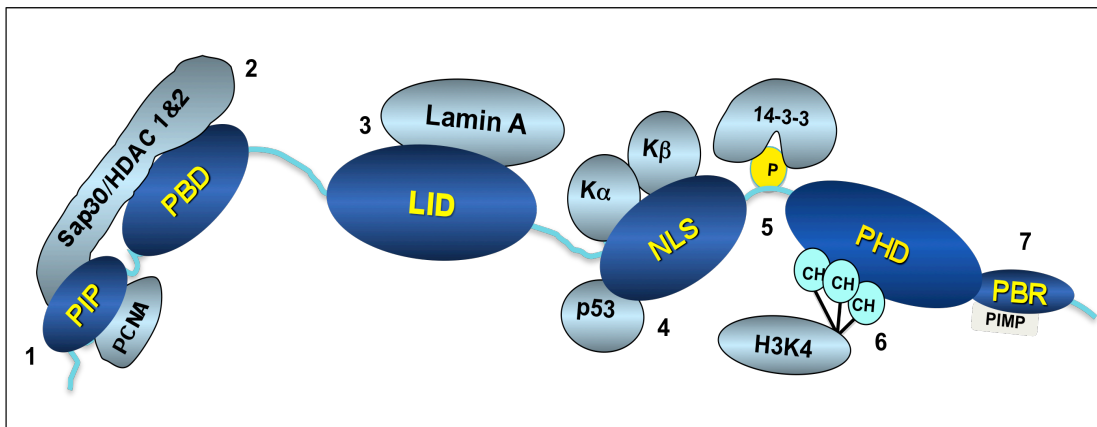


Abbildung 1b) ING1 Protein-Domänen und Protein-Partner (angelehnt an [57]). (1) Das "Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)"-interagierende Motiv von ING1b (PIP) bindet UV-induziert spezifisch an PCNA [67] und fördert so die ING1b-vermittelte Apoptose. (2) Die Region mit Sequenzhomologien zu Bromeodomänen (PBD) bindet das Transkriptions-regulierende Protein Sap30 im mSin3-Histondeacetylase (HDAC)1-Komplex. Dadurch werden HDAC- und möglicherweise auch Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivitäten zur Chromatin-Modifikation rekrutiert. (3) Alterierte Lamin A-Expression oder Lamin A-Mutationen, respektive defiziente ING-Funktionen oder ING-Dyslokation (i.e. zytoplasmatische statt nukleärer Lokalisation) führen zum Verlust der Lamin A-ING-Interaktion über die ING-spezifische "lamin-interaction domain" (LID) und induzieren laminopathische Phänotypen wie den der Hutchinson-Gilford-Progerie [70]. (4) Die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) ist in den meisten ING-Proteinen konserviert und befördert diese durch Bindung an Karyopherin- α und - β -Transportproteine in den Zellkern. Die NLS vermittelt auch Interaktionen zwischen ING-Proteinen und p53 [57]. Nukleoläre Translokationssequenzen (NTS) befinden sich in der NLS. Stress-induziert befördern sie ING1 in den Nukleolus. (5) Die ING1-Isoformen enthalten ein "14-3-3"-Erkennungsmotiv, an welches die Zellzyklus-regulatorischen Proteine der 14-3-3-Familie binden, wenn ING1 an Serin 199 phosphoryliert ist. Diese Bindung resultiert in einer Translokation von ING1 aus dem Zellkern ins Zytoplasma, wodurch es zur Hemmung der ING1b-vermittelten $p21^{WAF1}$ -Expression nach DNS-Schädigung kommt [71]. (6) Das "plant-homeodomain (PHD)"-Finger-Motiv ist in allen ING-Proteinen und in allen diesbezüglich untersuchten Spezies, von Hefen zu Menschen, konserviert [57]. Die ING-PHD-Region bindet das Kernhiston H3K4 in Abhängigkeit von seinem Methylierungsstatus. Durch diese Bindung wird dann durch Regulierung von sowohl HAT-als auch HDAC-Aktivität die Acetylierung benachbarter Lysin-Residuen induziert, wodurch die Chromatinstruktur verändert und so die Transkription an spezifischen Genloci beeinflusst wird. (7) Die polybasische Region (PBR) von ING1 und ING2 ist der PHD unmittelbar benachbart und notwendig zur stress-induzierten Vermittlung und Aktivierung von Interaktionen zwischen ING-Proteinen und bioaktiven Phospholipiden, insbesondere mit Phosphatidylinositol-Monophosphaten (PIMP) [73]. Diese Interaktionen führen möglicherweise zu den zuvor beschriebenen subzellulären Translokationen von ING-Proteinen sowie zu ihren zahlreichen Protein-Protein-Interaktionen mit anderen wachstumsregulatorischen Proteinen.

Insgesamt wurden bis heute zwei Mechanismen identifiziert, die den Tumorsuppressorfunktionen der ING-Proteine zugrunde liegen: (i) die Transduktion von Stress-Signalen durch Bindung von ING an bioaktive Phospholipiden [72-74], und (ii) Chromatin-Modifikation durch Bindung von ING-Proteinen an methylierte Histone und anschließende Rekrutierung von HAT und HDAC [75-78].

1.3.2 Epigenetische Funktionen von ING-Proteinen

Die stress-induzierte Bindung an bioaktive Phospholipide aktiviert ING-Proteine [72-74], jedoch sind die detaillierten Kenntnisse dazu, wie aktivierte ING-Proteine Stress-Signale umsetzen, trotz beschriebener Assoziationen von ING- mit p53-Effektorgenen [66, 77, 79-81], Hormonrezeptoren [82, 83], und Transkriptionsfaktoren [81, 84-86], noch limitiert. Bisher identifizierte Mechanismen der ING-vermittelten Transduktion von Stress-Signalen sind die selektive Bindung der PHD-Region von aktivierten ING-Proteinen an trimethylierte Histone (H3K4me3, H3K36me3) [75-78] sowie an spezifische HAT- [66] und HDAC-Komplexe [87-93] (Abbildung 2): Die Bindung von ING-Homologen an methylierte, und auf diese Weise "markierte" Histone führt zunächst zur Rekrutierung von HAT- und HDAC-Aktivität, anschliessend zur Acetylierung oder Deacetylierung der markierten Histone, die sich wiederum Chromatin-modulierend und konsekutive hemmend oder aktivierend auf die Transkription bestimmter Gene auswirkt [74, 76, 94].

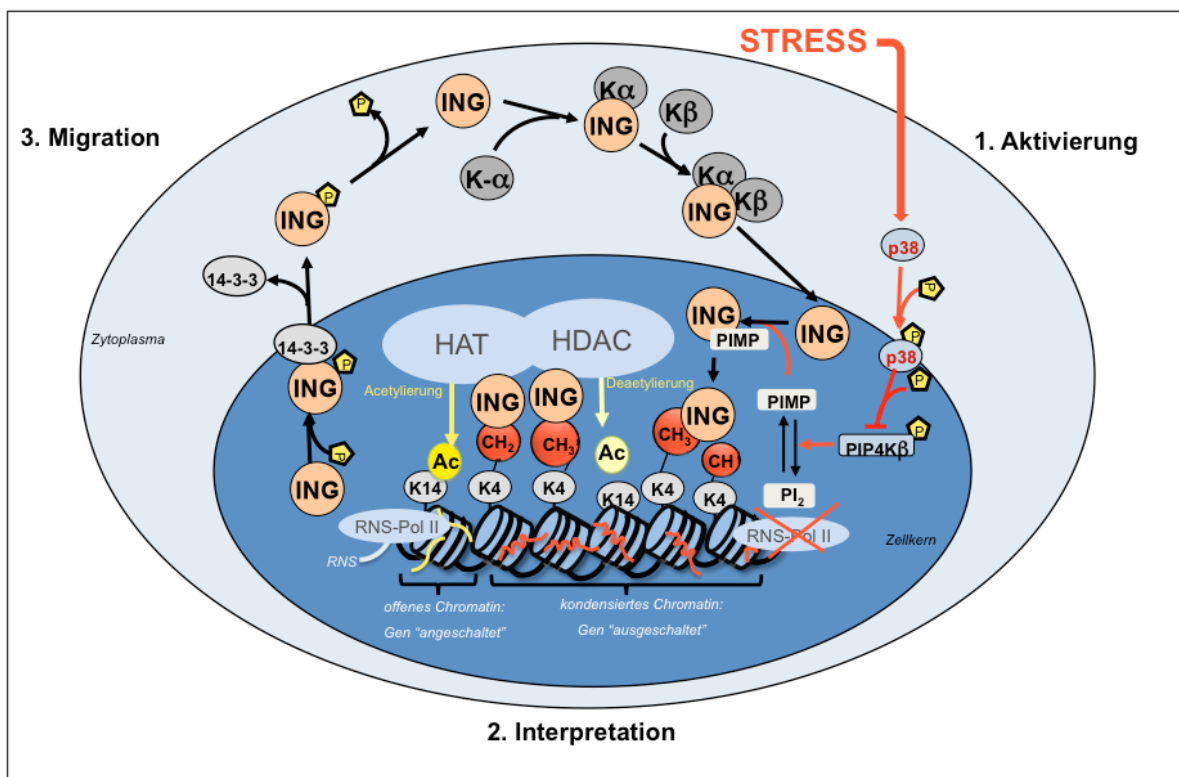


Abbildung 2 Stress-Signaltransduktion und Chromatinregulation durch ING-Proteine (angelehnt an [57]). (1) Aktivierung: Nach intra- oder extrazellulärer Stressexposition wird die p38-"microtubule-associated-protein-kinase (MAPK)" aktiviert, die daraufhin in den Zellkern wandert und dort die Phosphatidylinositol-5-P 4-Kinase Typ 2 beta (PIP4k β) phosphoryliert. Dadurch wird deren Aktivität gehemmt, und es kommt zu erhöhten Phosphatidylinositol-Monophosphat (PIMP)-Spiegeln im Zellkern. PIMP binden ING1 und ING2 [72-74]. Die auf diese Weise aktivierten ING-Proteine binden daraufhin an methylierte Histone [75-78] sowie an spezifische Histonacetyltransferase (HAT)- [66] und Histondeacetylase (HDAC)-Komplexe [87-93]. Ob und wie PIMP dissoziieren, nachdem die ING-Chromatinbindung stattgefunden hat, ist derzeit noch nicht geklärt. **(2) Interpretation:** ING-Proteine binden spezifisch an bi- und trimethyliertes Histon H3K4, wodurch ING-assoziierte Chromatin-Modifikationskomplexe [66, 87-93] zu verschiedenen Chromatin-Regionen und möglicherweise auch zu bestimmten Genloci rekrutiert werden. Diese Komplexbildung führt zu unterschiedlichen posttranslationalen Histonmodifikationen wie Acetylierung und Deacetylierung, dadurch zur "An-" respektive "Abschaltung" wachstumsregulatorischer Gene und entsprechend zu verschiedenen biologischen Auswirkungen wie Apoptose, Zellzyklusarrest oder DNS-Reparatur. **(3) Migration:** Nach Realisierung der durch sie vermittelten Transkriptions-Aktivierung oder -Repression verlassen die ING-Proteine den Zellkern und werden wahrscheinlich inaktiviert. Einer der Mechanismen, die an diesem Translokationsprozess beteiligt sind, ist die phosphorylierungsabhängige Bindung von ING- an 14-3-3-Proteine [71]. **Abkürzungen:** Ac - Acetylgruppe, CH - Methylgruppe, CH₂ - Dimethylgruppe, CH₃ - Trimethylgruppe, HAT - Histonacetyltransferase, HDAC - Histondeacetylase, K α /K β - Karyopherin- α und - β -Transportproteine, K4/K14 - Kernhiston-Untereinheiten, P - Phosphat, PI - Phosphatidylinositol, PIMP - Phosphatidylinositol-Monophosphat, RNS-Pol II - RNS-Polymerase II, PIP4k β - Phosphatidylinositol-5-P 4-Kinase Typ 2 beta.

Aufgrund ihrer stressinduzierten Beteiligung an epigenetischen Vorgängen lässt sich annehmen, dass ING-Proteine eine synergistische Wirkung sowohl mit konventionellen Zystatika als auch mit epigenetisch wirksamen Substanzen bei der Behandlung verschiedener Malignome, möglicherweise auch der von Gliomen, haben.

2. Eigene Arbeiten: Die Untersuchung der Tumorsuppressorfunktion des epigenetischen Regulators ING1 in Gliomen

Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist, zum besseren molekularen Verständnis von Gliomen und dadurch zur Optimierung von Behandlungskonzepten für Kinder und Jugendliche mit diesen Tumoren beizutragen. Dazu bedarf es der Identifizierung therapeutisch beeinflussbarer molekularer, beispielsweise epigenetisch regulierter und -regulierender Faktoren, sowie die Definition von deren Rollen in der Gliom-Biologie. Aufgrund seiner tumorsuppressorischen (s. 1.3.1) und epigenetischen Funktionen (1.3.2) ist ING1 ein Kandidat, der in diesem Zusammenhang relevant sein könnte. Entsprechend gingen dieser Arbeit folgende Fragestellungen voran:

- 1) Ist *ING1* in humanen Gliomen dysreguliert?
- 2) Ist *ING1* in die Biologie von Gliomen involviert?
- 3) Beeinflusst eine alterierte *ING1*-Expression das Ansprechen von Gliomen auf konventionelle Zytostatika oder epigenetisch wirksame Substanzen?

2.1 Status des Tumorsuppressorgens *ING1* in Gliomen

2.1.1 Keine *ING1*-Mutationen in humanen ZNS-Tumoren, jedoch reduzierte *ING1*-Expression in hochgradigen Astrozytomen

Gesche Tallen, Ines Kaiser, Sonja Krabbe, Ulrike Lass, Christian Hartmann, Günter Henze, Karl Riabowol und Andreas von Deimling; *Int J Cancer* 2004, 109: 476-479.

Zur Untersuchung des genetischen Status von *ING1* in menschlichen ZNS-Tumoren wurde eine "Loss of Heterozygosity (LOH)"-Analyse des *ING1*-Locus mit Mutationsanalyse der gesamten kodierenden *ING1*-Sequenz, einschliesslich der Intron-Exon-Übergänge, in insgesamt 100 Operationspräparaten von humanen ZNS-Tumoren, darunter 14 pilozytische Astrozytome, 4 diffuse Astrozytome, 5 anaplastische Astrozytome, 34 GBM, 9 oligodendrogliale Tumoren, und 2 Gangliogliome sowie die zugehörigen Lymphozyten der erwachsenen und pädiatrischen Patienten durchgeführt.

Keiner der ZNS-Tumoren wies eine somatische *ING1*-Mutation auf. Die daraufhin durchgeführte semiquantitative Expressionsanalyse des konservierten *ING*-Exons sowie der Exone *ING1a* und *ING1b* (s. Abbildung 1) im gesamten Tumormaterial zeigte jedoch höhere Expressionsspiegel von *ING1b* in niedriggradig als in hochgradig malignen Läsionen. Diese Korrelation war in einer Subgruppe von 37 astrozytären Gliomen (WHO Grade I-IV) signifikant.

Schlussfolgerung: *ING1* könnte in initiatorische und Progressionsmechanismen von Gliomen involviert sein.

2.2 Der Einfluss von ING1 auf Apoptose, Angiogenese und Chemosensitivität von Gliomen

2.2.1 Die Expression von p33^{ING1b} mRNA und die Chemosensitivität in Hirntumorzellen

Gesche Tallen, Karl Riabowol und Johannes E. A. Wolff; *Anticancer Res* 2003, 23: 1631-1636

Mutationen und erniedrigte Expression von Tumorsuppressorgenen können sowohl zur Onkogenese als auch zur Chemoresistenz beitragen. Der Tumorsuppressor ING1 hat wachstumshemmende und pro-apoptotische Effekte und spielt eine Rolle bei der DNS-Reparatur. Im Rahmen dieses Projektes sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen *ING1b* (gemäß der Nomenklatur in 2003: "p33^{ING1}") -mRNA-Expression in ZNS-Tumoren und deren Chemosensitivität besteht.

Dazu wurden vier verschiedene Zelllinien von malignen Gliomen und eine Medulloblastom-Linie hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber den DNS-schädigenden Substanzen Cisplatin, Etoposid, und Doxorubizin sowie den Mitose-Inhibitoren Paclitaxel und Vincristin getestet und die Zytotoxizitätsdaten anschliessend mit der jeweiligen *ING1b*-Expression der Zelllinien korreliert. Verglichen mit normalen Zellen zeigten Medulloblastomzellen die niedrigste *ING1b*-Expression. Durch den Vergleich aller Zelllinien konnte eine signifikante Korrelation zwischen *ING1b*-Expression und Vincristin-Resistenz demonstriert werden.

Schlussfolgerung: Die Bestimmung der *ING1b*-Expression könnte zur Voraussage der Vincristinsensitivität von Hirntumorzellen beitragen.

2.2.2 Erniedrigte Expression des Tumorsuppressors "Inhibitor of Growth 1" (ING1) sensitiviert p53-defiziente Glioblastomzellen für die Cisplatin-induzierte Apoptose

Ute Gesche Tallen*, Matthias Truss*, Frank Kunitz, Sven Wellmann, Brad Unryn, Brigitte Sinn, Ulrike Lass, Sonja Krabbe, Nikola Holtkamp, Christian Hagemeyer, Reinhard Wurm, Günter Henze, Karl T. Riabowol, Andreas von Deimling;
J Neurooncol 2008, 86: 23-30. *Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen

Dysregulierte Tumorsuppressorfunktionen wie beispielsweise p53-Defizienz sind charakteristisch für GBM und können Resistenz gegenüber DNS-schädigenden Substanzen wie Cisplatin erzeugen.

Vor dem Hintergrund unserer vorangehenden Ergebnisse, die eine erniedrigte Expression von *ING1* in malignen Gliomen, eine Korrelation der reduzierten *ING1*-Expression in Gliomen mit deren Malignitätsgrad sowie eine Assoziation von *ING1*-Expression mit der Chemosensitivität von malignen Hirntumorzellen gezeigt haben, wurde im Rahmen dieses Projektes der potenzielle Einfluss von *ING1* auf die Antwort von GBM-Zellen auf unterschiedliche Mechanismen von DNS-Schädigung untersucht.

In GBM-Zellen mit *TP53*-Mutationen induzierten DNS-Schädigungen durch Cisplatin oder durch ionisierende Strahlung eine gesteigerte *ING1*-Expression. Dabei wurde *ING1a*, die Isoform, die auch an HDAC-Prozessen beteiligt ist, fünfzig-fach stärker als die Isoform *ING1b*, die Komplexe mit HAT bildet, induziert. Ausserdem führte ein *ING1*-"Knockdown" durch "small interfering RNA (siRNA)" zu einem akzelerierten Zellzyklusprogress und zu einem beschleunigten Eintreten der mit Cisplatin behandelten Zellen in die Apoptose.

Schlussfolgerung: Reduzierte *ING1*-Expressionsspiegel in malignen Gliomen sind mit erhöhter Cisplatinsensitivität assoziiert. Möglicherweise resultiert insbesondere die Repression von *ING1a* zu weniger Histondeacetylierung und konsekutive zu einer gesteigerten Formation von Euchromatin in der DNS, wodurch diese besser zugänglich für die zerstörenden Adduktbildungen mit Cisplatin wird.

2.2.3 Die "Inhibitor of Growth 1 (ING1)"-Proteine supprimieren die Angiogenese und regulieren die Angiopoietin-Expression in Glioblastomzellen

Gesche Tallen*, Sonja Farhangi*, Mona Tamannai, Nikola Holtkamp, Dorothea Mangoldt, Sitar Shah, Keiko Suzuki, Matthias Truss, Günter Henze und Andreas von Deimling; Oncology Research 2009, 18: 95-105. *Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

Untersuchungen zum ING1-Homolog ING4 in murinen Gliomzellen sowie in multiplen Myelomen haben gezeigt, dass ING4 die Angiogenese negativ reguliert. Studien zu einer möglichen Assoziation von ING1 mit Angiogenese waren zum Zeitpunkt unseres Projektvorhabens nicht publiziert. Unsere Vorarbeiten hatten allerdings gezeigt, dass *ING1* in GBM, einem der am stärksten vaskularisierten Malignome, reduziert exprimiert wird. Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Studie, den potenziellen Einfluss der Haupt-Isoformen von ING1, ING1a und ING1b, auf die durch Gliomzellen induzierte Angiogenese zu untersuchen.

Wir benutzten Chorioallantoide Membran (CAM)-Essays, um zu testen, ob humane GBM-Zellen der Linie LN229 Neoangiogenese induzieren können, und ob Alterationen der ING1-Expression durch "Knockdown" mittels *ING1*-siRNS respektive durch ektope Überexpression mittels *ING1a*- und *ING1b*-Transfektions-Konstrukten diesen Prozess beeinflussen können.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass eine erhöhte ING1-Expression die LN229-induzierte Angiogenese in der CAM signifikant supprimiert. *ING1a*-, jedoch nicht *ING1b*-Expression resultierte ausserdem in erhöhten Proteinspiegeln der Angiopoietine (Ang) 1 und 4, während die Expression der proangiogenetischen Faktoren VEGF und IL-8 sowie Ang2 von einer alterierten ING1-Expression unbeeinflusst blieben.

Schlussfolgerung: ING1-Proteine supprimieren, möglicherweise durch Regulation von Angiopoietinen, die Neoangiogenese in GBM.

2.2.4 Der "Inhibitor of Growth 1" (ING1) ist in die TSA-induzierte Apoptose und den FADD/Kaspase-3-Signaltransduktionsweg in humanen Glioblastomzellen involviert

Mona Tamannai, Sonja Farhangi, Matthias Truss, Brigitte Sinn, Reinhard Wurm, Pinaki Bose, Günter Henze, Karl Riabowol, Anderas von Deimling, **Gesche Tallen**, *Oncol Res* 2010, 18: 469-480

Die Prognose für Patienten mit GBM ist ungünstig. Epigenetische Behandlungsansätze mit HDACi wie TSA bieten vielversprechende Alternativen zu konventionellen Therapiekonzepten. Dysregulierte Tumorsuppressorfunktionen wie *TP53*-Mutationen oder *INK4A*-Deletionen sind für GBM charakteristisch und können Resistenzen gegenüber DNS-schädigenden Substanzen wie Cisplatin und HDACi wie TSA erzeugen. Der Typ-II-Tumorsuppressor ING1 ist in die zelluläre Antwort auf DNS-Schädigung und in Mechanismen der Histon-Modifikation involviert. Wir haben zuvor gezeigt, dass ING1 in GBM reduziert exprimiert wird, dass eine reduzierte ING1-Expression maligne Gliomzellen für die Cisplatin-induzierte Apoptose sensitivieren kann, sowie mit einer gesteigerten pathologischen Angiogenese von Gliomen einhergeht.

Darauf aufbauend sollte in dieser Studie untersucht werden, ob TSA Einfluss auf die ING1-Expression hat und auch, ob Alterationen der ING1-Expression die TSA-induzierte Apoptose in malignen Gliomzellen mit defizienten p53- und p14^{ARF}/p16^{INK4A}-Funktionen beeinflussen.

Wir konnten zeigen, dass TSA die Hauptisoform der ING1-Proteine, ING1b, in GBM-Zellen mit *TP53*-Mutationen und *INK4A*-Deletionen induziert und sowohl zu gesteigerter Expression von acetylierten Histonen als auch zu gesteigerten Apoptoseraten in diesen Zellen führt. Hingegen resultierte ein *ING1*-"Knockdown" mittels siRNA in einer Resistenz dieser Zellen gegenüber TSA. Ausserdem kam es in mit TSA behandelten *ING1*-"Knockdown"-Zellen zu einer verminderten Kaspase-3-Aktivierung und Suppression des vorgeschalteten Adaptormoleküls "Fas-Associated protein with Death Domain (FADD)".

Schlussfolgerung: ING1 verhält sich, möglicherweise über den FADD/Caspase-3-Signalweg, synergistisch bei der TSA-induzierten Apoptose in GBM mit p53- und p14^{ARF}/p16^{INK4A}-Dysregulationen.

3. Diskussion

Die biologischen Funktionen von Tumorsuppressorproteinen sind definiert als die Hemmung der Zellteilung durch Repression von Genen, die den Zellzyklus vorantreiben, die Detektion von DNS-Schädigungen, die Initiation von DNS-Reparatur oder Apoptose, die Regulation von Protein-Ubiquitinierung und -Degradation, von Zelldifferenzierung und -Migration sowie von Tumor-Angiogenese [95].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des Tumorsuppressors und epigenetischen Regulators "Inhibitor of Growth 1 (ING1)" in humanen Gliomen untersucht mit dem Ziel, zur Identifikation neuer, beispielsweise durch epigenetisch wirksame Substanzen beeinflussbarer, molekularer Faktoren in Gliomen beizutragen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass ING1 bei verschiedenen grundlegenden biologischen Mechanismen von Gliomen eine Rolle spielt.

ING1 wird in malignen Gliomen reduziert exprimiert. Die Mutationsanalyse von *ING1* in Gliomen ergab keinen Hinweis auf somatische Mutationen. Jedoch zeigten sich in der semiquantitativen Analyse höhere *ING1a*- und *ING1b*-Expressionen in niedriggradig als in hochgradig malignen Gliomen (s. 2.1.1). In GBM-Präparaten waren *ING1*-Transkripte kaum noch oder gar nicht nachweisbar. Der Mechanismus, durch den diese transkriptionale *ING1*-Repression entstehen könnte, ist bisher nicht identifiziert. Allerdings ist *ING1* in vier Sequenzabschnitten reich an CpG-Dinukleotiden [57] und damit wie *P16^{INKa}* oder *MGMT* [21] prädestiniert für DNS-Methylierungsprozesse (s. 1.2.1). Aberrante Methylierungsmuster des *ING1*-Promoters wurden bisher für Ovarial-Karzinome und chronische lymphatische Leukämien [58, 59], jedoch noch nicht für Gliome, publiziert. Zukünftige Untersuchungen werden klären, ob aberrante Methylierungsmuster zur reduzierten Expression von *ING1* in Gliomen beitragen. Da ING1 den Tumorsuppressor p53, auch in Gliomen, reguliert [79, 96, 97], könnte eine reduzierte *ING1*-Expression ursächlich an der malignen Transformation, insbesondere auch von Gliomen mit intakter p53-Funktion, beteiligt sein. Die Klärung dieser Hypothese, beispielsweise durch Untersuchungen von *ING1*-Funktionen in Gliomzellen mit defizienter oder intakter p53-Funktion, wie sie zum Teil in dieser Arbeit vorgenommen wurden, könnte besonders

relevant für pädiatrische Patienten sein, denn im Vergleich zu Erwachsenen kommen *TP53*-Mutationen in Gliomen von Kindern und Jugendlichen eher selten vor [25]. Ein weiterer Mechanismus, durch den ING1b seine biologischen Funktionen ausübt, ist seine durch DNS-Schädigung induzierte Bindung an PCNA über das ING1b-spezifische PIP-Motiv (s. 1.3.1, Abb. 1a), b)). Dadurch werden die üblicherweise an PCNA bindenden DNS-Reparaturproteine wie GADD45 oder p21^{WAF1} verdrängt und die PCNA-Funktion so verändert, dass es weniger zu DNS-Replikation und -Reparatur als zu Apoptose kommt [67]. Da der Anstieg des Markierungsindex von PCNA signifikant mit dem des histologischen Grades von astrozytären Gliomen korreliert [98], könnte die zusätzliche Bestimmung der ING1b-Expression in Gliomen dazu beitragen, deren Kapazität zu DNS-Reparatur *versus* Apoptose, und entsprechend zur Resistenz gegenüber DNS-schädigenden Zytostatika oder Strahlentherapie *versus* Therapiesensitivität, vorauszusagen. Diese Vorstellung von ING1 als einem Indikator für das individuelle Ansprechen von Gliompatienten auf die konservative Chemotherapie, bei der sowohl DNS-schädigende Substanzen als auch Spindelgifte zum Einsatz kommen, wird durch weitere Daten dieser Arbeit unterstützt, die im folgenden erläutert werden.

ING1 ist in die zelluläre Stressantwort in malignen Gliomen involviert. In Gliomzellen, die ING1 exprimierten, fand sich eine signifikante Korrelation zwischen hohen *ING1*-Expressionsspiegeln und Resistenz gegenüber einer Behandlung mit letalen Konzentrationen (d. h. Substanzkonzentrationen, durch die 50% der Zellen abgetötet werden konnten; LC₅₀) von Mitose-Inhibitoren wie Vincristin (2.2.1). Dieser Zusammenhang lässt sich durch die Rolle von ING1 bei der Zellproliferation erklären: das intakte ING1b-Protein kann synergistisch mit p21^{WAF1} einen Wachstumsarrest in der G₁-Phase des Zellzyklus initiieren [79]. Entsprechend würde Vincristin in Gliomzellen mit hohen ING1-Expressionsspiegeln statt eines letalen Zellschadens lediglich einen mitotischen Arrest erzeugen, dem weder normale Proliferation, noch Nekrose folgt [99]. Vor diesem Hintergrund könnte die Bestimmung der *ING1*-Expressionsspiegel im Tumorpräparat eines Gliompatienten dabei helfen, individuell abzuschätzen, ob eine Therapie mit Vinkaalkaloiden eher zur Induktion einer stabilen Resterkrankung als zur Tumorverkleinerung beiträgt.

Vergleichbar mit einer Studie an Melanomen, im Rahmen derer es zu einer tumorspezifischen, UV-induzierten ING1-Aktivierung kam [69], zeigten weitere Ergebnisse dieser Arbeit eine isoform-spezifische, p53-unabhängige Induktion von ING1a in malignen Gliomzellen nach DNS-Schädigung durch Cisplatin oder γ -Strahlung (2.2.2), möglicherweise im Sinne eines spezifischen, ING1a-vermittelten Effekts auf die DNS zum Schutz gegenüber diesen Stressformen. ING1b bildet mit HAT Komplexe, während die ING1a-Isoform an HDAC-Proteine bindet und so deren Aktivität fördert [87]. Dadurch kommt es zu vermehrter Histondeacetylierung und konsekutive gesteigerter Formation von heterochromatischen Regionen in der DNS, wodurch diese wiederum schlechter zugänglich für die zerstörenden Adduktbildungen mit Cisplatin wird. Entsprechend führte eine reduzierte *ING1(a)*-Expression in unserem Modell zu einer Sensibilisierung von GBM-Zellen mit *TP53*-Mutation für die Behandlung mit Cisplatin. Somit könnte, unabhängig vom p53-Status der Zelle, die individuelle Bestimmung der ING1a/ING1b-Ratio oder auch der absoluten ING1a-Spiegel in malignen Gliomen deren individuelle Sensibilität gegenüber einer Cisplatinbehandlung voraussagen.

ING1 agiert synergistisch bei der HDACi-induzierten Apoptose in malignen Gliomzellen. Die molekularen Mechanismen, die den wachstumshemmenden Effekten von HDACi wie TSA zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig identifiziert. Bisher wurden in diesem Zusammenhang insbesondere die durch Histondeacetylierung verursachte transkriptionale Aktivierung von p21^{WAF1} [100], von p53- [101] und/oder p14^{ARF}/p16^{INK4a}-abhängigen Signalwegen [102, 103] sowie von Kaspasen [101] - auch in Gliomen [104] - beschrieben. Diese Signaltransduktionswege sind allerdings in malignen Gliomen, einschliesslich der GBM-Zellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, regelmässig defekt [105-108]. Dennoch konnten durch TSA hohe Apoptoseraten sowie eine gesteigerte Expression von acetylierten Histonen erreicht werden (s. 2.2.4), so dass sich auch p53- und p14^{ARF}/p16^{INK4a}-unabhängige Wirkmechanismen von TSA vermuten lassen. In der Tat führte die *ING1*-Suppression mittels siRNS zu einer stark verminderten Wirksamkeit von TSA in GBM-Zellen, und die anschliessende Untersuchung der Kaspase-vermittelten Apoptosewege, die bekanntlich durch TSA aktiviert werden können [101], ergab in Einklang mit anderen Tumormodellen [109-111] Hinweise auf eine ING1-

vermittelte Regulation von Kaspase-3 und vorgeschalteten Faktoren wie FADD. Die Mechanismen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, sind allerdings noch nicht geklärt. Aufgrund bisher fehlender Hinweise für eine transkriptionale Regulation von FADD- oder Kaspase-3-Aktivität durch ING1 [110, 112], sind hier neben epigenetischen auch posttranslationale Prozesse, beispielsweise eine ING1-vermittelte Hemmung von proteasomaler FADD- und/oder Kaspase-3-Degradation, wie bereits für p53 beschrieben [96], anzunehmen. Unabhängig von den Details der möglicherweise zugrundeliegenden Apoptosewege suggerieren unsere Ergebnisse einen synergistischen Effekt von ING1 bei der TSA-induzierten Apoptose in GBM-Zellen mit *TP53*-Mutationen und $p14^{ARF}/p16^{INK4a}$ -Dysfunktionen.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass das ING1-Homolog ING2 massgeblich am Wirkmechanismus des HDAC-Inhibitors SAHA beteiligt ist: SAHA induziert die Ablösung der ING2-PHD-Region vom Sin3-Deacetylase-Komplex, wodurch dessen Bindung an den $p21^{WAF1}$ -Promoter zerstört und dieser wieder aktiviert wird [113]. Wie SAHA wirkt auch TSA wachstumsinhibierend über eine Promoteracetylierung und konsekutive Aktivierung des *P21/WAF1/CIP1*-Gens [100]. Vor diesem Hintergrund und basierend auf unseren Beobachtungen zu den synergistischen Effekten von ING1 und TSA liegt es nahe, dass ING1 für die Wirksamkeit von TSA und möglicherweise auch anderen HDAC-Inhibitoren mitverantwortlich ist und entsprechend als molekularer Marker bei der individuellen Gestaltung epigenetischer Therapieansätze für Gliompatienten in Frage kommt.

ING1a und ING1b supprimieren die Angiogenese von malignen Gliomen. Kausale Zusammenhänge zwischen der Funktion von Tumorsuppressoren wie p53 oder dem ING1-Homolog ING4 und der Neoangiogenese von Gliomen sind beschrieben [85, 114, 115]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die ING1-Isoformen ING1a und ING1b die Neoangiogenese von malignen Gliomen inhibieren (2.2.3). Während ING4 die Angiogenese primär über eine Regulation von Interleukin-8 (IL-8) beeinflusste [85, 114], waren in unserem Modell andere Mechanismen, vermutlich eine teilweise durch ING1a vermittelte Regulation des Angiopoietin/Tie-Rezeptorsystems, verantwortlich.

Die Rolle der bisher identifizierten Angiopoietine (Ang-1, -2, -4) bei der Tumoriangiogenese

wird zum Teil noch kontrovers diskutiert. Sowohl pro- als auch antiangiogenetische Funktionen werden beschrieben. In unserem Modell hemmen ING1a und ING1b die Angiogenese von Gliomen. ING1a induziert außerdem Ang-1 und Ang-4, ganz im Gegensatz zu einer erst neulich erschienenen Studie an Mamma-Karzinomen, im Rahmen derer es durch *ING4*-Gentransfer zu Tumor- und Ang1-Suppression kam [116]. Diese Diskrepanz lässt sich am ehesten durch die verschiedenen ING-Homologe erklären, die untersucht wurden, und vermutlich ebenso durch die unterschiedlichen Stadien anderer Wachstumsfaktoren in den verschiedenen Tumorzellmodellen. Unsere Beobachtungen repräsentieren jedoch die vorbeschriebenen antiangiogenetischen Funktionen von Ang-1 [117] und Ang-4 [118], an deren Vermittlung die ING1a-Isoform offenbar beteiligt ist. Eine Regulation der Angiopoietin-mRNA-Expression durch ING1-Proteine konnte in unserem Modell nicht nachgewiesen werden, so dass hier zunächst posttranskriptionale oder posttranslationale Prozesse, beispielsweise eine ING1a-vermittelte Angiopoietin-Stabilisierung, als Regulationsmechanismen in Frage kommen, ähnlich, wie sie für die Beziehung zwischen ING1b und p53 bereits beschrieben wurden [96]. Allerdings induziert ING1b in normalen diploiden Fibroblasten "Sonic hedgehog (*Drosophila*) homolog (SHH)" [110], welches wiederum Ang-1 für vaskuläre Entwicklungsprozesse rekrutiert [119]. Daher sollten zukünftige Untersuchungen zeigen, ob auch eine epigenetische Regulation von SHH durch ING1a besteht, und wenn ja, inwieweit diese Einfluss auf die Neoangiogenese in Gliomen hat.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass ING1 in Gliomen epigenetisch reguliert wird, bei deren maligner Transformation und der Antwort auf DNA-Schädigung eine Rolle spielt, sowie Angiogenese inhibiert und mit HDACi synergistisch bei der Apoptoseinduktion wirkt. Vor diesem Hintergrund und weil ING1a und ING1b die HDAC- und HAT-Aktivität unterschiedlich beeinflussen können [87], lässt sich annehmen, dass durch ING-Proteine Chromatinmodifikationen und konsekutive eine alterierte Expression bestimmter Gene in Gliomen erzeugt werden kann, welche spezifisch zur Apoptose der Tumor-, nicht aber gesunder Zellen führt. Deshalb muss zukünftig geprüft werden, inwieweit eine gesteigerte *ING1*-Expression, allein oder sogar in Kombination mit HDACi, mit einer transkriptionalen Aktivierung anderer proapoptotisch wirksamer Faktoren

in Gliomen assoziiert ist. Auf diese Weise lässt sich die Rolle von ING1 *a)* bei der Biologie von Gliomen, *b)* als molekularer Faktor, der im Rahmen epigenetischer Behandlungskonzepte für Kinder und Jugendliche mit Gliomen genutzt werden kann und *c)* als antineoplastisches Agenz, insbesondere in Kombination mit anderen epigenetisch wirksamen Substanzen, weiter spezifizieren.

4. Zusammenfassung

Die Prognose von Kindern und Jugendlichen mit Gliomen wurde in den letzten Jahren dank technischer Fortschritte in den diagnostischen Verfahren und in der Mikroneurochirurgie, sowie durch Polychemo- und Strahlentherapie im Rahmen standardisierter Behandlungsprotokolle deutlich verbessert. Zu den Herausforderungen in der pädiatrischen Neuroonkologie gehören jetzt zum einen die weitere Steigerung der Heilungsquantität, das heisst eine Anhebung der Langzeitüberlebensraten auch für die Patienten, die heute noch eine ungünstige Prognose haben, zum anderen eine Verbesserung der Heilungsqualität, das heisst das Erreichen einer bestmöglichen Lebensqualität. Insofern ist nun eine optimierte Kombination von konservativen und neuen Therapieelementen notwendig, damit die Behandlung so gestaltet werden kann, dass sowohl die akuten als auch die Langzeitnebenwirkungen so gering wie möglich bleiben. In diesem Zusammenhang zeigen epigenetische Therapieansätze zwar bereits vielversprechende Ergebnisse in der pädiatrischen Neuroonkologie, jedoch ist der Einsatz epigenetisch wirksamer Substanzen bei jungen Gliompatienten derzeit aufgrund von möglicher Toxizität, Mangel an Spezifität bei hoher genomischer und epigenomischer Variabilität der einzelnen Gliom-Subentitäten und von Resistenzentwicklung noch limitiert. Entsprechend müssen epigenetisch regulierte oder -regulierende Biomarker identifiziert werden, die dazu beitragen, ein individuelles Therapieansprechen vorauszusagen.

Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit die Rolle des Tumorsuppressors und epigenetischen Regulators "Inhibitor of Growth 1 (ING1)" bei der Biologie humaner Gliome an Tumorpräparaten und *in vitro* untersucht.

Die Ergebnisse zeigen eine Beteiligung von ING1 an verschiedenen Basismechanismen der Gliombiologie und suggerieren, dass der Tumorsuppressor in diesen Tumoren einerseits epigenetisch reguliert wird und andererseits epigenetisch regulieren kann: ING1 ist in Gliomen nicht mutiert, wird jedoch korrelierend mit deren Malignitätsgrad reduziert exprimiert. ING1 hemmt Neoangiogenese von Gliomzellen und ist in deren Antwort auf DNS-Schädigungen involviert. ING1-Alterationen beeinflussen die Sensitivität von Gliomzellen gegenüber Mitosehemmern, DNS-schädigenden Agenzien und Histondeacetylase-Inhibitoren.

Somit repräsentiert ING1 einen Kandidaten für einen molekularen Faktor, der zukünftig im Rahmen epigenetischer Behandlungskonzepte für Kinder und Jugendliche mit Gliomen, beispielsweise als Marker für das individuelle Ansprechen auf die Therapie oder auch als antineoplastisch wirksames Agens, genutzt werden kann.

5. Literaturangaben aus dem freien Text

1. Kaatsch P, Spix C (2009). Jahresbericht 2008 des Deutschen Kinderkrebsregisters. Mainz: Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik. Buchdruckerei Johannes Krüger OHG Berlin.
2. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **423**: 396-401, 2004.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. (2007). WHO classification of tumours of the central nervous system, 3rd edn. IARC Press, Lyon, 2007.
4. Gnekow AK, Kaatsch P, Kortmann R, et al. (2000). HIT-LGG: Effektivität von Carboplatin-Vincristin bei progredienten Gliomen niedrigen Malignitätsgrades im Kindesalter - Zwischenbericht. *Klin Pädiatr* **212**: 177-184.
5. Wagner S, Warmuth-Metz M, Emser A, et al. (2006). Treatment options in childhood pontine gliomas. *J Neurooncol* **79(3)**: 281-287.
6. Kramm CM, Wagner S, Van Gool S, et al. (2006). Improved survival after gross total resection of malignant gliomas in pediatric patients from the HIT-GBM studies. *Anticancer Res* **26(5B)**: 3773-3779.
7. Wisoff JH, Boyett JM, Berger MS, et al. (1998). Current neurosurgical management and the impact of the extent of resection in the treatment of malignant gliomas of childhood: a report of the Children's Cancer Group Trial no. CCG-945. *J Neurosurg* **89(1)**: 52-59.
8. De Vleeschouwer S, Fieuws S, Rutkowski S, et al. (2008). Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* **14(10)**: 3098-3104.
9. Venter C, Adams MD, Myers EW, et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291 (5507)**: 1304-1351.
10. Waddington, CH (1942). The epigenotype. *Endeavour* **1**: 18-20.
11. Chi P, Allis CD, Wang GG (2010). Covalent histone modifications- miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nature Rev Cancer* **10**: 457-469.
12. Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31 (1)**: 27-36.
13. Jiang C and Pugh BF (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nature Rev Genetics* **10**: 161-172.

14. Weissman B and Knudsen KE (2009). Hijacking the chromatin remodeling machinery: impact of SWI/SNF perturbations in cancer. *Cancer Res* **69**: 8223-8230.
15. Zhang B, Pan X, Cobb GP et al. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology* **302**: 1-12.
16. Ventura A and Jacks T (2009). MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* **136**: 586-591.
17. Suzuki MM and Bird A (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Rev Genetics* **9**: 465-476.
18. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory (2002). *Genes & Development* **16**: 6-21.
19. Yang X, Lay F, Han H et al. (2010). Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends Pharmacol Sci* (im Druck).
20. Wang Y and Leung FC (2004). An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics* **20**: 1170-1177.
21. Müller WC and von Deimling A (2009). Gene regulation by methylation. In: Andreas von Deimling (Ed.), *Gliomas*, Recent Results in Cancer Research 171, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 217-239.
22. Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693-705.
23. Chinnaiyan P, Vallabhaneni G, Armstrong E et al. (2005). Modulation of radiation response by histone deacetylase inhibition. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **62 (1)**: 223-229.
24. Kim MS, Blake M, Baek JH et al. (2003). Inhibition of histon deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res* **63 (21)**: 7291-7300.
25. Riemenschneider MJ, Jeuken JWM, Wesseling P et al. (2010). Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* (im Druck)
26. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L et al. (2008). Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res* **68**: 8673-8677.
27. Pfister S, Janzarik WG, Remke M et al. (2008). BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest* **118 (5)**: 1739-1749.

28. Korshunov A, Meyer J, Capper D et al. (2009). Combined molecular analysis of BRAF and IDH distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. *Acta Neuropathol* **118**: 401-405.
29. Rokes CA, Remke M, Guha-Thakurta N et al. (2010). Sorafenib plus valproic acid for infant spinal glioblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* (im Druck)
30. Parsons DW, Jones S, Zhang X et al. (2008). An integrated analysis of glioblastoma multiforme. *Science* **321**: 1807-1812.
31. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E et al. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343**: 1350-1354.
32. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**: 997-1003.
33. Herrlinger U, Rieger J, Koch D et al. (2006). Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. *J Clin Oncol* **24**: 4412-4417.
34. Fulda S, Debatin KM (2006). 5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN-gamma cooperate to sensitize for TRAIL-induced apoptosis by upregulating caspase-8. *Oncogene* **25 (37)**: 5125-5133.
35. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR et al. (2010). MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol* **12**: 116-121.
36. Kristensen LS, Nielsen HM and Hansen LL (2009). Epigenetics and cancer treatment. *European J Pharmacol* **625 (1-3)**: 131-142.
37. Mottet D, Castronovo V (2010). Histone deacetylases: Anti-angiogenic targets in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* (im Druck).
38. Samlowski WE, Leachman SA, Wade M et al. (2005). Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation. *J Clin Oncol* **23 (17)**: 3897-3905.
39. Oki Y, Issa JP (2007). Treatment options in advanced myelodysplastic syndrome, with emphasis on epigenetic therapy. *Int J Hematol* **86 (4)**: 306-314.
40. Blattmann C, Oertel S, Ehemann V et al. (2010). Enhancement of radiation response in osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **78(1)**: 237-245.

41. Flotho C, Claus R, Batz C et al. (2009). The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **23 (6)**: 1019-1028.
42. Mühlisch J, Schwering A, Grotzer M et al. (2006). Epigenetic repression of RASSF1A but not CASP8 in supratentorial PNET (sPNET) and atypical teratoid/rhabdoid tumors (AT/RT) of childhood. *Oncogene* **25 (7)**: 1111-1117.
43. Furchert SE, Lanvers-Kaminsky C, Jürgens H et al. (2007). Inhibitors of histone deacetylases as potential therapeutic tools for high-risk embryonal tumors of the nervous system of childhood. *Int J Cancer* **120 (8)**: 1787-1794.
44. Graham C, Tucker C, Creech J et al. (2006). Evaluation of the antitumor efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the histone deacetylase desipeptide in childhood cancer models in vivo. *Clin Cancer Res* **12**: 223-234.
45. Häcker S, Dittrich A, Mohr A et al. (2009). Histone deacetylase inhibitors cooperate with IFN-gamma to restore caspase-8 expression and overcome TRAIL resistance in cancers with silencing of caspase-8. *Oncogene* **28(35)**: 3097-3110
46. George RE, Lahti JM, Adamson PC et al. (2010). Phase I study of decitabine with doxorubicin and cyclophosphamide in children with neuroblastoma and other solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer* **55 (4)**: 629-638.
47. Ecke I, Petry F, Rosenberger A et al. (2009). Antitumor effects of a combined 5-Aza-2'Deoxyctidine and valproic acid treatment in medulloblastoma in Ptch mutant mice. *Cancer Res* **69**: 887-895.
48. Entin-Meer M, Rephaeli A, Yang X et al. (2007). AN-113, a novel prodrug of 4-phenylbutyrate with increased anti-neoplastic activity in glioma cell lines. *Cancer Lett* **18**: 253 (2): 205-214.
49. Svechnikova I, Almqvist PM, Ekstroem TJ (2008). HDAC inhibitors effectively induce cell type-specific differentiation in human glioblastoma cell lines of different origin. *Int J Oncol* **32 (4)**: 821-827.
50. Morita K, Gotohda T, Arimochi H et al. (2009). Histone deacetylase inhibitors promote neurosteroid-mediated cell differentiation and enhance serotonin-stimulated brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat C6 glioma cells. *J Neurosci Res* **87 (11)**: 2608-2614.
51. Masoudi A, Elope M, Amini E et al. (2008). Influence of valproic acid on outcome of high-grade gliomas in children. *Anticancer Res* **28 (4C)**: 2437-2442.

52. Wolff JE, Kramm C, Kortmann RD et al. (2008). Valproic acid was well tolerated in heavily pretreated pediatric patients with high-grade glioma. *J Neurooncol* **90** (3): 309-314.
53. Weinberg RA (1988). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Trans Stud Coll Physicians Phila* **10** (1-4): 83-94.
54. Kinzler KW, Vogelstein B (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science* **280**: 1036-1037.
55. He GH, Helbing CC, Wagner MJ et al. (2005). Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 104-116.
56. Garkavtsev I, Lazarov A, Gudkov A et al. (1996). Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* **14** (4): 415-420.
57. Soliman MA, Riabowol K (2007). After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends Biochem Sci* **32**(11): 509-519.
58. Shen DH, Chan KY, Khoo US et al. (2005). Epigenetic and genetic alterations of p33ING1b in ovarian cancer. *Carcinogenesis* **26** (4): 855-863.
59. Tong WG, Wierda WG, Lin E et al. (2010). Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics* **5**(6) (im Druck).
60. Zeremski M, Horrigan SK, Grigorian IA et al. (1997). Localization of the candidate tumor suppressor gene ING1 to human chromosome 13q34. *Somat Cell Mol Genet* **23** (3): 233-236.
61. Kichina JV, Zeremski M, Aris L et al. (2006). Targeted disruption of the mouse ing1 locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene* **25**: 857-866.
62. Coles AH, Liang H, Zhu Z et al. (2007). Deletion of p37Ing1 in mice reveals a p53-independent role for Ing1 in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. *Cancer Res* **67**: 2054-2061.
63. Helbing CC, Veillette, C, Riabowol, K et al. (1997). A novel candidate tumor suppressor, ING1, is involved in the regulation of apoptosis. *Cancer Res* **57**: 1255-1258.
64. Shah S, Smith H, Feng X et al. (2009). ING function in diverse model systems. *Biochemistry & Cell Biology* **87**: 117-125.

65. Garkavtsev I and Riabowol K (1997). Extension of the Replicative Lifespan of Human Diploid Fibroblasts by Inhibition of the p33^{ING1} Candidate Tumor Suppressor. *Mol Cell Biol* **17**: 2014-2019.
66. Pedeux R, Sengupta S, Shen JC et al. (2005). ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* **25**: 6639-6648.
67. Scott M, Bonnefin P, Vieyra D et al. (2001). UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci* **114**: 3455-3462.
68. Cheung KJ Jr. and Li G (2002). p33(ING1) enhances UVB-induced apoptosis in melanoma cells. *Exp Cell Res* **279**: 291-298.
69. Shinoura N, Muramatsu Y, Nishimura M et al. (1999). Adenovirus-mediated transfer of p33^{ING1} with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res* **59(21)**: 5521-5528.
70. Han X, Feng X, Rattner JB et al. (2008). Tethering of the ING1 PHD protein to lamin A is required for ING1 stability and function in apoptosis. *Nature Cell Biol* **10**: 1333-1340.
71. Gong W, Russel M, Suzuki K et al. (2006). Subcellular Targeting of p33^{ING1b} by Phosphorylation-Dependent 14-3-3 Binding Regulates p21^{WAF1} Expression. *Mol Cell Biol* **26 (8)**: 2947-2954.
72. Gozani O, Karuman P, Jones DR et al. (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **114(1)**: 99-111.
73. Kaadige MR, Ayer DE (2006). The polybasic region that follows the plant homeodomain zinc finger 1 of Pf1 is necessary and sufficient for specific phosphoinositide binding. *J Biol Chem* **281(39)**: 28831-2836.
74. Huang W, Zhang H, Davrazou F et al. (2007). Stabilized phosphatidylinositol-5-phosphate analogues as ligands for the nuclear protein ING2: chemistry, biology, and molecular modeling. *J Am Chem Soc* **129(20)**: 6498-6506.
75. Martin DGE, Baetz K, Shi X et al. (2006). The Yng1p PHD finger is a methyl-histone binding module that recognizes lysine 4 methylated histone H3. *Mol Cell Biol* **26**: 7871 – 7879.
76. Pena PV, Davrazou F, Shi X et al. (2006). Molecular mechanism of H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* **442**: 100–103.

77. Shi X, Hong T, Walter KL et al. (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**: 96–99.
78. Palacios A, Garcia P, Padro D et al. (2006). Solution structure and NMR characterization of the binding to methylated histone tails of the plant homeodomain finger of the tumour suppressor ING4. *FEBS Lett* **580**: 6903–6908.
79. Garkavtsev I, Grigorian IA, Ossovskaya VS et al. (1998). The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* **391** (6664): 295-298.
80. Nagashima M, Shiseki M, Miura K et al. (2001). DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98(17)**: 9671-9676.
81. Kataoka H, Bonnefin P, Vieyra D et al. (2003). ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. *Cancer Res* **63(18)**: 5785-5792.
82. Wagner MJ and Helbing CC (2005). Multiple variants of the ING1 and ING2 tumour suppressors are differentially expressed and thyroid hormone-responsive in *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol* **144**: 38-50.
83. Toyama T and Iwase H (2004). p33ING1b and estrogen receptor (ER) alpha. *Breast Cancer* **11(1)**: 33-37.
84. Ozer A, Wu LC, Bruick RK (2005). The candidate tumor suppressor ING4 represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF). *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7481-7486.
85. Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, et al. (2004). The candidate tumor suppressor ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature* **428**: 328–332.
86. Nagashima M, Shiseki M, Pedoux RM et al. (2003). A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* **22(3)**: 343-350.
87. Vieyra D, Loewith R, Scott M et al. (2002). Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. *J Biol Chem* **277(33)**: 29832-29839.
88. Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM et al. (2003). p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res* **63(10)**: 2373-2378.
89. Doyon Y, Cayrou C, Ullah M et al. (2006). ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* **21(1)**: 51-64.

90. Kuzmichev A, Zhang Y, Erdjument-Bromage H et al. (2002). Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol* **22**(3): 835-848.
91. Loewith R, Meijer M, Lees-Miller SP et al. (2000). Three yeast proteins related to the human candidate tumor suppressor p33(ING1) are associated with histone acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol* **20**: 3807-3816.
92. Skowyrza D, Zeremski M, Neznanov N et al. (2001). Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J Biol Chem* **276**(12): 8734-8739.
93. Nourani A, Howe L, Pray-Grant MG et al. (2003). Opposite role of yeast ING family members in p53-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem* **278**(21): 19171-19175.
94. Taverna SD, Ilin S, Rogers RS et al. (2006). Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Mol Cell* **24**(5): 785-796.
95. Sherr CJ (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* **116** (2): 235–246.
96. Leung KM, Po LS, Tsang FC et al. (2002). The candidate tumor suppressor ING1b can stabilize p53 by disrupting the regulation of p53 by MDM2. *Cancer Res* **62**: 4890-4893.
97. Vieyra D, Toyama T, Hara Y et al. (2002). ING1 isoforms differentially affect apoptosis in a cell age-dependent manner. *Cancer Res* **62**: 4445-4452.
98. Lafuente JV, Alkiza K, Garibi JM et al. (2000). Biologic parameters that correlate with the prognosis of human gliomas. *Neuropathology* **20**: 176-183.
99. Lengsfeld AM, Schulze B, Maurer W (1981). Time-lapse studies on the effect of vincristine on HeLa cells. *Eur J Cancer* **17**: 307-319.
100. Sowa Y, Orita T, Minamikawa-Hiranabe S et al. (1999). Sp3, but not Sp1, mediates the transcriptional activation of the p21/WAF1/Cip1 gene promoter by histone deacetylase inhibitor. *Cancer Res* **59**: 4266-4270.
101. Henderson C, Mizzau M, Paroni G et al. (2003). Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J Biol Chem* **278**: 12579-12589.
102. Zhou C, Qiu L, Sun Y et al. (2006). Inhibition of EGFR/PI3K/AKT cell survival

- pathway promotes TSA's effect on cell death and migration in human ovarian cancer cells. *Int J Oncol* **29**: 269-278.
103. Munro J, Barr NI, Ireland H et al. (2004). Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp Cell Res* **295**: 525-538.
 104. Wetzel M, Premkumar DR, Arnold B et al. (2005). Effect of trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, on glioma proliferation in vitro by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *J Neurosurg* **103** (suppl): 549-556.
 105. Knobbe CB, Trampe-Kieslich A, Reifenberger G (2005). Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* **31**: 486-490.
 106. Louis DN (1993). The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* **53**: 11-21.
 107. Bello MJ, Rey JA (2006). The p53/Mdm2/p14ARF cell cycle control pathway genes may be inactivated by genetic and epigenetic mechanisms in gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* **164**: 172-173.
 108. Ishii N, Maier D, Merlo A et al. (1999). Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* **9**: 469-479.
 109. Wang Y, Li G (2006). ING3 promotes UV-induced apoptosis via Fas/caspase-8 pathway in melanoma cells. *J Biol Chem* **281**: 11887-11893.
 110. Feng X, Bonni S, Riabowol K (2006). HSP70 induction by ING1 proteins sensitizes cells to TNF- β receptor mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **26**: 9244-9255.
 111. Cai L, Zheng S, Wang Y et al. (2009). Inhibitor of growth 4 is involved in melanomagenesis and induces growth suppression and apoptosis in melanoma cell line M14. *Melanoma Res* **19**: 1-7.
 112. Takahashi M, Seki N, Ozaki T et al. (2002). Identification of the p33 (ING1)-regulated genes that include cyclin B1 and proto-oncogene DEK by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NMuMG. *Cancer Res* **62**: 2203-2209.
 113. Smith K, Martin-Brown SA, Florence L et al. (2010). Deacetylase inhibitors dissociate the histone-targeting ING2 subunit from the sin3 complex. *Chemistry & Biology* **17**: 65-74.

114. Tse V, Yung Y, Santarelli JG et al. (2004). Effects of tumor suppressor gene (p53) on brain tumor angiogenesis and expression of angiogenic modulators. *Anticancer Res* **24**: 1-10.
115. Colla S, Tagliaferri S, Morandi F et al. (2007). The new tumor-suppressor gene inhibitor of growth family member 4 (ING4) regulates the production of proangiogenic molecules by myeloma cells and suppresses hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) activity: involvement in myeloma-induced angiogenesis. *Blood* **110**: 4464-4475.
116. Li Z, Xie Y, Sheng W et al. (2010). Tumor-suppressive effect of adenovirus-mediated inhibitor of growth 4 gene transfer in breast carcinoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Biother Radiopharm* **25**: 427-37.
117. Reiss Y, Machein MR, Plate KH (2005). The role of angiopoietins during angiogenesis in gliomas. *Brain Pathol* **15**: 311–317.
118. Olsen MWB, Ley CD, Junker N et al. (2006). Angiopoietin-4 inhibits angiogenesis and reduces interstitial fluid pressure. *Neoplasia* **8**: 364-372.
119. Lamont RE, Vu W, Carter AD (2010). Hedgehog signaling via angiopoietin1 is required for developmental vascular stability. *Mechanisms of Development* **127**: 159-168.

Danksagung

Mein tiefer Dank gilt allen, die meinen beruflichen, akademischen und dadurch auch persönlichen Weg entscheidend beeinflusst haben:

mein Doktorvater, Herr Prof. Wolfgang Saeger in der Neuropathologie in Hamburg, der mich die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens und Denkens gelehrt und mich immerzu motiviert hat, niemals damit aufzuhören,

mein erster Chef als Assistenzärztin in der Neurochirurgie der Charité, Herr Prof. Wolfgang Lanksch, der meine Leidenschaften für die Medizin, Neuroanatomie und -chirurgie, Kunst und Kinder noch weiter verstärkt und mich auch in herausfordernden Lebenslagen immerfort unterstützt und gefördert hat,

mein "Mentoren-Team" während des "Postdoctoral Fellowships" in der Kinderonkologie in Calgary, Kanada, Herr Prof. Johannes Wolff, Herr Dr. Ronald Anderson, Herr Prof. Maarten Egeler und Herr Prof. Max Coppes, unter deren hochengagierte Supervision ich diese Arbeit beginnen durfte,

mein Mentor in der Neuropathologie der Charité, Herr Prof. Andreas von Deimling - ohne die enge Zusammenarbeit mit ihm, sowie mit seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern in seinem Institut, ohne seine grosse Unterstützung, sein persönliches Engagement und seine sichere, kreative Führung wäre ein Grossteil dieser Arbeit nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich meine Doktoranden, Frau Dipl. Biotech. Sonja Farhangi, geb. Krabbe, Frau Dr. Annegret und Herrn Frank Kunitz, sowie Frau Dr. Mona Tamannai hervorheben und ihnen innigen Dank für ihre unermüdliche Ausdauer und hervorragende Arbeit aussprechen,

mein Chef in der Kinderklinik der Charité, grosses Vorbild als Kinderonkologe, Herr Prof. Günter Henze, dem ich nicht nur meine Weiterbildung zur Kinderärztin und diese Arbeit verdanke, sondern auch eine aussergewöhnliche, ununterbrochene, und liebe Unterstützung dabei, meine beruflichen und akademischen Ziele weiter intensiv zu verfolgen und dabei gleichzeitig leidenschaftlich Mutter zu sein.

Meiner Familie möchte ich ebenso danken, insbesondere meinem Mann Karl und unseren Kinder Kelvin und Gia - für die Liebe.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift