

Untersuchung von Allelverlusten auf den Chromosomen 16 und 22 in
menschlichen Gehirntumoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Vorgelegt von
Yilin Vogel geb. Xu
aus Schanghai VR China
2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas von Deimling
2. Gutachter: Prof. Dr. H. P. Fischer

Tag der Mündlichen Prüfung: 30.03.2009

Aus dem Institut für Neuropathologie der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. T. Pietsch
Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. O. D. Wiestler

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver
der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online
elektronisch publiziert.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ABKÜRZUNGEN	5
2. EINFÜHRUNG	7
2.1. Intrakranielle Tumoren	7
2.1.1. Tumoren des neuroepithelialen Gewebes	7
2.1.2. Von peripheren Nerven ausgehende Tumoren	10
2.1.3. Meningeome	10
2.1.4. Lipom	11
2.1.5. Hämangioperizytome	11
2.1.6. Hämangioblastom	12
2.1.7. Metastasen	12
2.2. Molekulargenetische Grundlage der Tumorentstehung	12
2.2.1. Onkogene	12
2.2.2. Tumorsuppressorgene (TSG)	13
2.3. Erbliche Tumorerkrankungen als Modell der Krebsentstehung	13
2.3.1. Erbliches Retinoblastom – RB-Gen	14
2.3.2. Li-Fraumeni Syndrom – TP53-Gen	14
2.3.3. Neurofibromatosen – NF1- und NF2-Gen	15
2.3.4. Tuberöse Sklerosen – TSC1- und TSC2-Gen	16
2.3.5. Cowden Syndrom/Bannayan-Zonana – PTEN/MMAC11-Gen	17
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1. Geräte	19
3.2. Chemikalien und anderes Verbrauchsmaterial	20
3.3. Puffer und Lösungen	21
3.4. Prinzip des Einsatzes polymorpher Marker	23
3.5. DNS-Extraktion aus Blut und Tumorgewebe	23
3.6. Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR)	24
3.7. Agarosegel-Elektrophorese	27

3.8. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	27
3.9. Silberfärbung	28
4. ERGEBNISSE	29
4.1. Interpretation der Bandenmuster	29
4.2. Ergebnisse der LOH-Analyse	30
4.2.1. LOH-Analyse von Chromosom 22	31
4.2.2. LOH-Analyse von Chromosom 16	37
4.3. Angaben zur Heterozygotie der analysierten Marker	42
4.3.1. Angaben zur Heterozygotie der analysierten Marker von Chromosom 22	42
4.3.2. Angaben zur Heterozygotie der analysierten Marker von Chromosom 16	42
5. DISKUSSION	44
5.1. Meningeome	44
5.2. Glioblastoma multiforme (GBM)	46
5.3. Tuberöse Sklerose (TSC)	48
6. ZUSAMMENFASSUNG	50
7. HINWEIS	52
8. LITERATURVERZEICHNIS	53
9. DANKSAGUNG	60
10. LEBENSLAUF	61

1. ABKÜRZUNGEN

ARF	alternate reading frame
BCR	Breakpoint cluster region
CDK	Cyclin-dependent kinase
CIP1	CDK interacting protein 1
CML	Chronische myeloische Leukämie
DAL1	differentially expressed in adenocarcinoma of the lung
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EF	Elongationsfaktoren
Erk	extrazelluläre signalregulierende Kinase
fib	fibroblastisch
GADD45	Growth-arrest-DNA-damage-inducible
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GBM	Glioblastoma multiforme
G-Phase	Gap-Phase
HE	Hämatoxylin-Eosin
INK4a	polypeptide inhibitor of CDK4
LAM	Lymphangiomeiomyomatose
LOH	Loss of heterozygosity (Heterozygotie-Verlust)
m	milli (10^{-3})
M	molar
MDM2	Mouse double minute protein 2
men	meningothelial
MMAC1	mutated in multiple advanced cancers 1
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mult	multiple
NF	Neurofibromatose
ni	nicht informativ

p	kurzer Chromosomenarm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKD1	polyzystische Nierenerkrankung1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3.4.5)-Triphosphate
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
PTEN	phosphatase and tensin homolog
q	langer Chromosomenarm
RB1	Retinoblastom-Gen
rpm	Umdrehungen pro Minute
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
trans	transitional
TSC	Tuberöse Sklerose
TSG	Tumorsuppressorgen
Taq	Thermophilus aquaticus
TIMP3	Human tissue inhibitor of metalloproteinase 3
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
WAF1	Wild-type p53-activated fragment 1
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

.

2. Einführung

2.1. Intrakranielle Tumoren

Gemäß WHO werden die intrakraniellen Tumoren nach ihrer biologischen Wertigkeit in vier Grade eingeteilt.

WHO Grad I: Hochdifferenzierter, sehr langsam wachsender, gutartiger Tumor mit geringer Zelldichte; kaum Mitosen, kaum Zellpolymorphie.

WHO Grad II: Semimaligner Tumor mit geringer Wachstumstendenz, mäßiger Zelldichte und/oder geringer Zellpolymorphie; wenige Mitosen.

WHO Grad III: Anaplastischer Tumor, mit erhöhter Mitoseaktivität, Zelldichte und Zellpolymorphie sowie pathologischen Gefäßen.

WHO Grad IV: Hochmaligner, schnell wachsender Tumor mit geringer Differenzierung, zahlreichen Mitosen und Nekrosen.

2.1.1. Tumoren des neuroepithelialen Gewebes

2.1.1.1. Astrozytäre Gliome

Pilozytisches Astrozytom (WHO Grad I)

Vorkommen/Manifestation überwiegend bei Kindern und jungen Erwachsenen. Vorwiegende Lokalisationen: Sehnerv, dritter Ventrikel, Thalamus, mittlerer Temporallappen, Hirnstamm, Kleinhirn. Der Tumor weist ein langsames Wachstum und eine gute Abgrenzung zur Umgebung auf. Die histologischen Merkmale sind geringe Zelldichte, bipolare Fortsätze und Rosenthalfaser.

Fibrilläres/gemistozytisches /protoplasmatisches Astrozytom (WHO Grad II)

Vorkommen/Manifestation überwiegend bei Erwachsenen mit einem Altersgipfel von 40-50 Jahren und typischerweise im Bereich der Großhirnhemisphären lokalisiert. Nach einer inkompletten Resektion treten regelmäßig Rezidivtumoren auf. Sie neigen dazu, in ein anaplastisches Astrozytom oder ein Glioblastom überzugehen.

Anaplastisches Astrozytom (WHO Grad III)

Manifestation zunächst als fokaler oder diffuser maligner Tumor mit erhöhter Zellzahl, Kernpleomorphie und Mitoserate. Oft rapide Progressionstendenz, zum GBM hin fortschreitend.

Glioblastom (WHO Grad IV)

Das häufigste und zugleich bösartigste astrozytäre Gliom. Ein Glioblastom kann primär (de

novo) entstehen, oder sich aus der Progression eines ursprünglich höher differenzierten Astrozytoms niedriger Malignität oder einem anaplastischen Astrozytom (sekundär) entwickeln. Die Glioblastome häufen sich zwischen dem 45. und 60. Lebensjahr. Das Glioblastom ist vor allem in den Großhirnhemisphären lokalisiert, tritt gelegentlich auch multifokal auf. Glioblastome weisen ein infiltrierendes Wachstum ins umgebende Gewebe auf. Das schnelle Tumorwachstum und die entsprechende vermehrte Proliferation pathologischer Gefäße führen zu Nekrosen und Blutungen. Gelegentlich finden sich zahlreiche monströse Riesenzellen. Diese Variante wird Riesenzellglioblastom genannt. Sind neoplastisch-mesenchymale (Gefäß-/Fibroblastenproliferate) Formationen im Tumor vorhanden, so bezeichnet man ihn als Gliosarkom.

2.1.1.2. Oligodendrogliale Tumoren

Oligodendrogliom WHO Grad II

Das Oligodendrogliom WHO Grad II besteht überwiegend aus neoplastischen Zellen, die differenzierten Oligodendrozyten ähnlich erscheinen. Dieser langsam wachsende und gut differenzierte Tumor tritt beim Erwachsenen auf und betrifft meist die cerebrale weiße Substanz und die Basalganglien. Eine Ausdehnung in den Kortex kommt regelmäßig vor. Die Tumorzellen besitzen einen hyperchromatischen Zellkern, bienenwabemusterartig umgeben von hellem Zytoplasma. Fokale Verkalkungen sind ein häufiges Merkmal dieses Tumors.

Oligodendrogliom WHO Grad III

Oligodendrogliome mit fokaler oder diffuser Anaplasie, hoher Zelldichte mit polymorphen Zellkernen und einer erhöhten Mitoseaktivität entsprechen dem WHO Grad III.

Mischgliome (=Oligoastrozytome) WHO Grad II und III

Mischgliome weisen Merkmale von Astrozytomen und von Oligodendrogliomen auf. Entweder sind die Zelltypen untereinander vermischt oder der Tumor besteht aus zwei getrennten Abschnitten. Histologisch werden gut differenzierte Oligoastrozytome dem WHO Grad II zugeordnet. Ein Oligoastrozytom mit gesteigerter Zellzahl, Kernatypien und erhöhter Mitoseaktivität wird als anaplastisches Oligoastrozytom bezeichnet und entspricht WHO Grad III.

2.1.1.3. Ependymome (WHO Grad II und III)

Die Tumoren entwickeln sich in der Umgebung der Hirnventrikel und des Spinalkanals und weisen Differenzierungsmerkmale von Ependymzellen auf. Intrakranielle Ependymome kommen bevorzugt im Kindesalter vor und können das Ventrikellumen ausfüllen.

Ependymome des vierten Ventrikels können sich über die Foramina Luschkae und Magendii in den Subarachnoidalraum und die basale Zisterne ausbreiten. Der Tumor wächst gewöhnlich langsam und bleibt gut begrenzt. Ependymome aus gut differenzierten Zellen und niedriger Mitoseaktivität werden dem WHO Grad II zugeordnet. Dahingegen werden anaplastische Ependymome mit hoher Zelldichte und mitotischer Aktivität dem WHO Grad III zugeordnet. Histologisch finden sich typischerweise Muster mit perivaskulären Pseudorosetten und ependymalen Rosetten.

2.1.1.4. Plexus choroideus Tumoren

Der häufigste Plexus choroideus Tumor ist das Plexuspapillom, ein gutartiger WHO Grad I Tumor. Er entsteht aus Epithelien des ventrikulären Plexus choroideus. Nach kompletter chirurgischer Resektion besteht in der Regel keine Rezidivgefahr. Plexuspapillome können in seltenen Fällen als Plexuskarzinom maligne entarten und Anaplasiezeichen aufweisen.

2.1.1.5. Gangliogliome (WHO Grad I und II)

Ein benigner Tumor, der astrozytäre und neuronale Zellen aufweist. Perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate können vorkommen. Die Biologie der Neoplasie ist durch die gliale Komponente bestimmt. Histologisch sind Gangliogliome dem WHO Grad I oder II zugeordnet. Eine seltene Variante der Gangliogliome weist anaplastische Charakteristika auf: Erhöhte Zellatypie, gesteigerte mitotische Aktivität, vaskuläre Proliferation und gelegentlich Nekrosen. Anaplastische Gangliogliome werden dem WHO Grad III zugeordnet.

2.1.1.6. Embryonale Tumoren

Ependymoblastom (WHO Grad IV)

Dieser seltene, maligne embryonale Tumor mit deutlicher ependymaler Differenzierung besteht zum größten Teil aus undifferenzierten Zellen, begleitet von zahlreichen, gut ausgeformten ependymoblastischen Rosetten. Ependymoblastome sind durch eine hohe Zelldichte, eine starke mitotische Aktivität und Nekrosenstellen gekennzeichnet.

Primitive neuroektodermale Tumoren (PNET) (WHO Grad IV)

PNET sind kleinzellige, bösartige Tumoren des Kindesalters mit bevorzugter Lokalisation im Kleinhirn (Medulloblastom). Zerebrale und spinale PNET sind biologisch und morphologisch nicht vom Medulloblastom zu unterscheiden.

-Medulloblastom (WHO Grad IV)

Das Medulloblastom ist der häufigste maligne, embryonale Tumor des Kindesalters. Er

besteht aus dichtgepackten Zellen mit rundem bis ovalem oder karottenförmigem Kern und schmalen Zytoplasmasaum. Eine unterschiedliche, mitotische Aktivität und Nekroseareale kommen vor. Neuroblastische Homer-Wright-Rosetten können histologisch in etwa 10-20% der Fälle identifiziert werden. Das Medulloblastom entsteht im Kleinhirnwurm, infiltriert das umgebende Gewebe und wächst zum IV Ventrikel hin. Die entstehende Abflussbehinderung verursacht einen Okklusionshydrozephalus. Es kommt zu Liquormetastasen.

2.1.2. Von peripheren Nerven ausgehende Tumoren

Die meisten dieser Tumoren gehen von den Schwann-Zellen aus.

2.1.2.1. Neurinom (WHO Grad I)

Der bindegewebig abgekapselte und zystische Tumor geht von Schwann-Zellen kraniospinaler und peripherer Nerven aus. Zumeist sind Akustikusnerven oder Dorsalwurzeln der Spinalnerven beteiligt. Bilaterale sich entwickelnde Akustikusneurinome sind ein Hinweis auf das Vorliegen einer Neurofibromatose Typ II.

Die folgenden beiden histologischen Wachstumsmuster kommen beim Neurinom vor:

Antoni-Typ A: Die dichten Tumorareale bestehen aus elongierten Zellen, welche oft in einem palisadenförmigen Muster angeordnet sind.

Antoni-Typ B: Die Tumorareale sind zellarm, die Zellen liegen in einer mikrozystisch aufgelockerten Matrix mit gelegentlicher Verfettung.

2.1.2.2. Neurofibrom (WHO Grad I)

Das Neurofibrom ist ein umschriebener intraneuraler, oder diffus extraneuraler Tumor des peripheren Nervensystems. Es besteht aus Schwann-Zellen, Fibroblasten und perineuralen Zellen. Multiple Neurofibrome treten im Rahmen einer Neurofibromatose Typ I auf.

2.1.2.3. Maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST) (WHO Grad III-IV)

Zu dieser Gruppe gehören neurogene Sarkome, Neurofibrosarkome, anaplastische Neurofibrome und maligne Neurinome. Ein sarkomatös entartetes Neurofibrom kommt häufig bei multiplen Tumoren im Rahmen der Neurofibromatose Typ I vor.

2.1.3. Meningeome

Diese meist gutartigen Tumoren leiten sich von den Arachnoidalzellen ab und stehen in Kontakt mit der Dura. Sie treten im Erwachsenenalter, bevorzugt bei Frauen auf. Obwohl die meisten Meningeome keine Kapsel aufweisen, wachsen sie nicht invasiv. Mit zunehmender

WHO-Gradierung steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Tumoren ein aggressives Wachstumverhalten zeigen und/oder zu Rezidiven neigen.

Meningotheliales Meningeom (WHO Grad I)

Histologisch besteht dieser Subtyp der Meningeome aus einer abgegrenzten, soliden lobulierten meningothehialen Zellmasse. Zwiebschalenartige Zellanordnungen kommen auch vor.

Fibroblastisches Meningeom (WHO Grad I)

Bei diesem häufigen Meningeomtyp dominieren die spindelförmigen fibroblastenähnlichen Tumorzellen. Sie sind kollagenfaserreich. Zwiebschalenartige Zellanordnungen und Psammomkörper sind selten.

Transitionales Meningeom (WHO Grad I)

In dieser häufigen Variante zeigt der Tumor sowohl Charakteristika eines meningothehialem, als auch eines fibroblastischen Meningeoms. Solche Tumoren zeigen eine unterschiedliche Tendenz zur zwiebschalenartigen Zellanordnung, häufig um eine zentrale Kapillare herum. Wenn diese Zellhaufen von innen nach außen verkalken, entstehen geschichtete sogenannte Psammomkörper.

Atypisches Meningeom (WHO Grad II)

Der Tumor ist histologisch durch eine erhöhte mitotische Aktivität, eine zunehmende Zelldichte und kleine Zellen mit Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns charakterisiert, er neigt zu Rezidiven.

Anaplastisches Meningeom (WHO-Grad III)

Dieses zeichnet sich durch einen klinisch noch maligneren Verlauf –verglichen mit dem atypischen Meningeom– aus. Charakteristisch sind geringe Differenzierung, eine maligne Zytologie, hohe Mitoserate und erkennbare Tumornekrose.

2.1.4. Lipom

Das Lipom besteht aus hochdifferenziertem Fettgewebe mit oder ohne Fibrosierungen oder vaskulärem Anteil.

2.1.5. Hämangioperizytome

Hämangioperizytome sind seltene Tumoren. Diese uniformen zellulären Tumoren bestehen aus plumpen oder polygnalen Zellen mit charakteristischen Retikulinfasernetz. Histologisch werden sie dem WHO II und III zugeordnet. Sie neigen zu Lokalrezidiven und Metastasierung.

2.1.6. Hämangioblastom

Hämangioblastom ist ein am häufigsten im Kleinhirn lokalisierter, gut abgrenzbarer Tumor, der ausgeprägt viele Kapillaren ausbildet. Auch die Medulla oblongata oder das Rückenmark können betroffen sein. Die Zellen sind regelmäßig in einem Netz aus Kapillaren oder kavernen Gefäßen verteilt. Regelmäßig können sich Hämangioblastome im Rahmen eines von-Hippel-Lindau-Syndroms entwickeln.

2.1.7. Metastasen

Hierbei handelt es sich um Absiedelungen extrakranieller Tumoren. Die häufigsten, mit zunehmendem Lebensalter mit steigender Inzidenz auftretenden Hirnmetastasen gehen –in absteigender Häufigkeit– vom Bronchialkarzinom aus, gefolgt vom Mammakarzinom, Melanom, Nierenkarzinom, Magenkarzinom, Genitalkarzinom, Kolonkarzinom und Schilddrüsenkarzinom. Die Metastasen sind meist sehr gefäßreich und zentral nekrotisch zerfallend. Fast regelmäßig wird ein perifokales Ödem verursacht.

2.2. Molekulargenetische Grundlage der Tumorentstehung

Bei der Tumorentstehung und Tumorprogression sind multiple molekulare Veränderungen involviert, wobei Störungen des Regulationsgleichgewichts von Zellproliferation und Differenzierung eine zentrale Rolle spielen. Ein Tumor ist in der Regel das Resultat der klonalen Expansion einer einzigen mutierten Zelle (Tumorzelle) mit Wachstumsvorteil.

Jede Zellproliferation folgt den einzelnen Schritten des natürlichen Zellzyklus. An der Zellzyklus-Regulation sind die zwei Hauptzellzyklus-Kontrollkaskaden (pRb–p16INK4a–CyclinD1 und p53–p14ARF–MDM2) und intrazelluläre Signalübertragungswege (z.B. PTEN–PI3K–AKT) beteiligt. Entscheidende Schritte der Malignom-Entwicklung sind der Verlust oder die Mutation von TSG, was zum Ausschalten wichtiger Kontrollpunkte der Zellproliferation führt und/oder die Aktivierung von Onkogenen, was zu vermehrter Zellteilung und damit unkontrolliertem Wachstum führt (Marschall, 1991, Deppert, 2004).

Die Tumorprogression ist ein mehrstufiger Prozess, erkennbar an der kumulativen Anhäufung chromosomaler Veränderungen, welche mit weiterem Wachstumsvorteil und steigender Malignität assoziiert sind.

2.2.1. Onkogene

Onkogene (=Krebsgene) gehen durch Mutation aus zellulären Genen (Protoonkogenen) hervor. Die von Protoonkogenen kodierten Proteine stimulieren das Zellwachstum.

Normalerweise sind sie einer strengen Kontrolle unterworfen. Durch die Mutation sind die Zellen der Wachstumskontrolle entzogen. Es genügt beim Onkogen eine (dominante) heterozygote Allelveränderung, um bei der Transformation mitzuwirken.

Die Mechanismen, die aus einem Protoonkogen ein Onkogen entstehen lassen, sind in folgenden Beispielen dargestellt:

1. Punktmutation: Das Protoonkogen kann durch Austausch eines Nukleotides in einer wichtigen funktionellen Gen-Domäne in ein zelluläres Onkogen, wie z.B. beim ras-Onkogen bekannt, transformiert werden. Die transformierenden ras-Onkogene können aufgrund dieser Punktmutationen durch regulatorische Proteine nicht mehr inaktiviert werden (Barbacid, 1987).

2. Chromosomale Translokation: Z.B. bei der CML findet sich die Translokation (9, 22). Das veränderte Chromosom 22, das sog. Philadelphiachromosom, zeigt ein bcr-Gen-Rearrangement, verursacht durch Translokation des c-abl-Protoonkogens von Chromosom 9 in die Region des bcr-Gens auf Chromosom 22. Hierdurch entsteht das bcr-abl-Fusionsgen, welches ein Fusionsprotein mit erheblich verstärkter Tyrosinkinase-Aktivität kodiert. Dadurch wird eine Vielzahl intrazellulärer Wachstumssignale überaktiviert, die zu autonomem Wachstum und maligner Entartung führen (Huber et al, 2001).

3. Genamplifikation: Diese in Glioblastomen besonders häufige genetische Veränderung geht mit der Vervielfältigung und einer verstärkten Expression eines Onkogens einher. Bei 30% der Glioblastome spielt eine Amplifikation des Gens für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) auf Chromosom 10 eine entscheidende Rolle (von Deimling et al, 1992).

2.2.2. Tumorsuppressorgene (TSG)

Es handelt sich um eine Gruppe von Genen, deren Produkte die Zellproliferation unterdrücken und die Zelldifferenzierung fördern. Da ein Allel eines solchen Gens ausreicht, um die Wachstumskontrolle aufrechtzuerhalten, entstehen erbliche oder auch sporadisch auftretende Tumoren typischerweise erst dann, wenn beide Allele des TSG defekt sind, einer rezessiven Mutation entsprechend. Untersuchungen an Hybridzellen, familiären Karzinomen und die Darstellung von Heterozygotie-Verlusten (LOH) zeigten, dass Veränderungen in rezessiven Genen an der neoplastischen Transformation von Zellen beteiligt sind (Marshall et al, 1991).

2.3. Erbliche Tumorerkrankungen als Modell der Krebsentstehung

Gemäß Knudsons Zwei-Treffer-Modell (two-hit model) zur Krebsentstehung führt der erste

Treffer (oft eine Punktmutation) zum Funktionsverlust eines der beiden Suppressorallele. Liegt die (heterozygote) Mutation bereits in den Keimzellen vor, weisen alle Körperzellen diese Genveränderung auf, was als konstitutionelle Mutation bezeichnet wird. Entsteht die Mutation dahingegen postzygotisch in einer Körperzelle, handelt es sich um eine somatische Mutation. Der sog. zweite Treffer (immer eine somatische Mutation) betrifft dann das andere -zuvor noch intakte- Allel des TSG in einer Körperzelle, in welcher das erste Allel bereits defekt war (Strachan, 1994). Beim zweiten Treffer handelt sich häufig um größere genomische Veränderungen, wie Chromosomenverlust, Deletionen, mitotische Rekombinationen oder Genkonversionen. Solche Mutationen können oft zytogenetisch oder durch Vergleich der DNA aus Blut und Tumor eines Betroffenen mittels bestimmter genomischer Marker nachgewiesen werden: Der Tumor hat hierbei die konstitutive Heterozygotie verloren (LOH). Die wiederholte LOH-Beobachtung für definierte genomische Regionen konnte die Beteiligung verschiedener TSG bei der Entstehung bzw. Progression einzelner Tumortypen nachweisen (Carter et al, 1990).

Einige TSG sind gut charakterisiert, wie im Folgenden beschrieben.

2.3.1. Erbliches Retinoblastom – RB-Gen

Das Retinoblastom, typischerweise ein maligner Netzhauttumor im Kindesalter, mit einer Inzidenz von 1:12000-1:14000, kommt hereditär (autosomal dominant vererbtes Tumorleiden mit 90 - 95 %er Penetranz) oder sporadisch vor (Riede et al, 2004).

Das auf Chromosom 13q14 lokalisierte Retinoblastom-Gen (RB-Gen) (das erste identifizierte TSG) kodiert ein Phosphoprotein (pRb) (Lee et al, 1987), welches in fast jeder Zelle des menschlichen Körpers exprimiert ist. Die für die Einleitung der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus entscheidenden Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie werden durch Bindung an pRb in einem inaktiven Zustand gehalten. Erst wenn das pRb phosphoryliert wird, können die nun freien E2F-Faktoren ihre Funktion aufnehmen (Schlegel et al, 2004). pRb wird zellzyklusabhängig während des Übergangs von der G1 zur S-Phase phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ist vom CyclinD/CDK abhängig (Canhoto et al, 2000). Der CDK/CyclinD Komplex wird nun wiederum von spezifischen Inhibitoren kontrolliert, vor allem p16 (Gen: INK4a), p21 (Gen: WAF1) und p27 (Gen: CIP1) (Serrano et al, 1993, Schlegel et al, 2004).

2.3.2. Li-Fraumeni Syndrom – TP53-Gen

Das auf Chromosom 17p13 lokalisierte TP53-Gen stellt das in menschlichen Tumoren am häufigsten (somatisch) mutierte Gen dar: Es ist in etwa 50% aller Tumoren mutiert, z.B.

häufig in kleinzelligen Bronchialkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Astrozytomen oder Mammakarzinomen. (Takahashi et al, 1989, Nigro et al, 1989, Baker et al, 1990, von Deimling et al, 1992). Keimbahnmutationen im TP53-Gen liegen auch dem sehr seltenen erblichen Li-Fraumeni-Karzinomsyndrom zugrunde, welches u.a. zur Entwicklung von Hirntumoren und Mammakarzinomen prädisponiert (Malkin et al, 1990).

Das sequenzspezifisch DNA-bindende Protein des TP53-Gens wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Vogelstein et al, 2000). p53 entfaltet seine Kontrollfunktion am Ende der G1-Phase des Zellzyklus. Durch die verschiedenen Zielgene von p53 (z.B. p21WAF1-, GADD45-Gen), deren Transkriptionen von p53 aktiviert sind, induziert das p53 einen Zellzyklusarrest speziell in Zellen mit genomischen Defekten, solange, bis der Schaden repariert ist. In Zellen mit den irreparablen genomischen Defekten leitet p53 die Apoptose ein (Kastan et al, 1991, Shaw et al, 1992). Das p53 bildet mit dem MDM2 einen negativen Rückkopplungsmechanismus, in dem das p53 einerseits die Transkription von MDM2 reguliert. Andererseits verhindert MDM2 alle von p53 vermittelten Transkriptionen durch Bindung an TP53-Gen (Wu et al, 1993, Chen et al, 1995). An MDM2 gebundenes p53 wird ubiquitiniert und proteosomal abgebaut. Das p14 (Gen: ARF) kann diese Funktion von MDM2 durch die Bildung eines Protein-Komplexes mit MDM2 verhindern (Weber et al, 2002).

2.3.3. Neurofibromatosen – NF1- und NF2-Gen

Die Neurofibromatosen (NF) beinhalten zwei grundverschiedene Krankheiten und werden autosomal dominant vererbt.

- NF Typ 1 (Neurofibromatose von Recklinghausen) ist charakterisiert durch multiple Neurofibrome, Café-au-lait-Flecken und Iris-Hamartome. Die Inzidenz ist 1:3000. Bei Kindern entwickeln sich oft innerhalb der ersten 6. Lebensjahre niedriggradige gliale Tumoren mit Optikusbeteiligung (Gliome oder Astrozytome) (Listernick et al, 1994). Die Ursache liegt in einem Defekt des NF1-Gens auf Chromosom 17q11 (Wallace et al, 1990). Das Produkt des NF1-Gens, Neurofibromin, weist einen Abschnitt homolog zu rasGAP auf (Xu et al, 1990) und reguliert die Ras-Aktivität (Martin et al, 1990). Ca. 50% aller NF Typ 1 sind durch Neu-Mutationen bedingt.
- NF Typ 2 (zentrale NF, bilaterale Akustikus-Neurofibromatose) manifestiert sich in bilateralen Akustikus-Schwannomen (Neurinomen), multiplen Schwannomen der Spinalnervenwurzeln, Meningeomen und Ependymomen. Die Inzidenz beträgt 1:40000 (Evans et al, 1992). Das NF2-Gen wurde durch Kopplungsanalyse in NF2-Familien auf

Chromosom 22 (22q11.21-q13.1) lokalisiert (Rouleau et al, 1987, Wertelecki et al, 1988) und anschließend kloniert (Trofatter et al, 1993, Rouleau et al, 1993). Das Produkt des NF2-Gens, Merlin, wird der Protein-4.1-Familie, die auch Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) umfasst, zugeordnet (Gutmann et al, 2000). Die hemmende Wachstumsaktivität von Merlin ist abhängig von spezifischer Interaktion mit CD44, einem Zelloberflächen-Rezeptor für Hyaluronsäure. Die Inaktivierung von Merlin fördert das Zellwachstum (Bai et al, 2007, Morrison et al, 2001). Ein Merlin-Verlust durch Inaktivierung des NF2-Gens kommt in fast allen sporadischen Schwannomen und in 60% der sporadischen Meningeome vor (Ruttledge et al, 1994, Stemmer-Rachamimov et al, 1997, van Tilborg et al, 2006).

2.3.4. Tuberöse Sklerosen – TSC1- und TSC2-Gen

Der Tuberöse Sklerose Komplex (TSC) wird autosomal dominant vererbt, mit einer Prävalenz von etwa 1: 10000 und einer Penetranz von etwa 98-99%. Er gehört wie NF zu den Phakomatosen. Ca zwei Drittel sind durch dominante sporadisch auftretende Mutationen bedingt (Neumann et al, 1993, Green et al, 1994).

TSC ist charakterisiert durch die Entwicklung von Hamartomen in ZNS, Haut, Niere, Herzen, und Lunge. Hamartome sind tumorähnliche Missbildungen durch Störung der zellulären Differenzierung. Sehr typisch sind faziale Hautveränderungen in Form des Angiofibroms (Adenoma sebaceum). Manifestationen im ZNS können Krampfanfälle und geistige Retardierung verursachen. Morphologische Korrelate im ZNS sind kortikale Tubera, subependymale Knoten und Riesenzellastrozytome (Neumann et al, 1993, Green et al, 1994). TSC wird durch Inaktivierung des TSC1- oder TSC2-Gens verursacht. TSC1-Gen auf Chromosomen 9q34 (Fryer et al, 1987) und TSC2-Gen auf Chromosomen 16p13.3 (Kandt et al, 1992). TSC1- codiert für Hamartin, TSC2-Gen für Tuberin. Die Genprodukte von TSC1 und TSC2 bilden einen Komplex mit einem GTPase aktivierenden Protein. Dadurch wird das G-Protein Rheb inaktiviert, dessen Aufgabe die Hemmung von mTOR ist. Bei Mutationen in TSC1 oder TSC2 wird somit mTOR aktiviert und damit die Proliferation von Zellen gefördert. (Inoki et al, 2005). Eine Phosphorylierung von Tuberin durch eine extrazelluläre signalregulierende Kinase (Erk) führt zur Dissoziation vom Tuberin-Hamartin-Komplex und verschlechtert deutlich die Tuberin-Fähigkeit, mTOR zu hemmen. Durch diese funktionelle Inaktivierung von Tuberin kann auch TSC Mutationen in den TSC1- oder TSC2-Genen entstehen. (Ma et al, 2005).

Unmittelbar benachbart neben dem TSC2-Gen liegt das PKD1-Gen auf Chromosom 16p13.

Die chromosomalen Deletionen des TSC2- und PKD1-Gens verursachen eine TSC und eine autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD), ein sog. contiguous Gen-Syndrom (Brook-Carter, 1994).

Die primäre Lymphangioliomyomatose (LAM) kommt sporadisch oder in Assoziation mit TSC vor. LAM manifestiert sich überwiegend bei Frauen im gebärfähigen Alter. Es kommt zu einem Befall von Lunge, Nieren und lymphatischem System. Die TSC1- und TSC2-Gene spielen eine kritische Rolle in der Pathogenese der LAM (Castro et al, 1995, Smolarek et al, 1998, Urban et al, 1999, Carsillo et a, 2000, Sato et al, 2002)

2.3.5. Cowden Syndrom/Bannayan-Zonana – PTEN/MMAC11-Gen

Die Keimbahnmutationen des PTEN-Gens prädisponieren für die autosomal dominant vererbten Hamartomerkrankungen Cowden Syndrom und Bannayan-Zonana Syndrom, welche mit erhöhter Inzidenz von Mamma- und Schilddrüsenkarzinomen assoziiert sind. Sie haben unterschiedliche phänotypische Ausprägungen, obwohl sie manche klinische Überschneidungen zeigen (Shimpuku et al, 2005). PTEN-Mutationen gehören zu den am häufigsten beobachteten somatischen Mutationen unter den humanen Karzinomen. Sie sind nachgewiesen beim Prostata-, Endometrium-, Mamma- und Schilddrüsenkarzinom sowie dem GBM (Sansal et al, 2004).

Das PTEN-Gen, ein TSG, wurde auf Chromosom 10q23.3 lokalisiert (Li et al, 1997, Wang et al, 1997) und codiert eine Phosphatase, welche ein Gegenspieler von PI3K ist. Durch Dephosphorylierung von PIP3 (ein second messenger) hemmt PTEN die Aktivierung von AKT, einer Serin-/Threonin-Kinase, die Zellteilung fördert und Apoptose hemmt. PTEN reguliert somit zelluläre Prozesse, wie Zellzyklus, Translation und Apoptose (Simpson et al, 2001). In einem menschlichen Zellkulturmodell des Glioms führt die AKT-Aktivierung zur Entstehung eines anaplastischen Astrozytoms zum GBM (Sonoda et al, 2001). PTEN induziert über seine Proteinphosphatase-Aktivität durch Herunterregulierung von CyclinD1 und über seine Lipidphosphatase-Aktivität Hochregulierung von p27 einen G1-Arrest (Weng et al, 2001, Gottschalk et al, 2001).

2.4. Ziel der Arbeit

Diese Arbeit entstand als Teil eines umfangreichen Projekts zum Allelotypisierungsstudium. Grundlage dieser Studie waren die Fragen, welche TSG an der Tumorentstehung im ZNS beteiligt sind, und in welchen chromosomalen Regionen solche TSG lokalisiert sind. Um diesen Fragen nachzugehen, sollte Gewebe aus einer großen Serie von Hirntumoren auf allen

Chromosomen systematisch hinsichtlich Heterozygotie-Verlust (LOH) untersucht werden. Tumor-assoziierte Allelverluste in spezifischen chromosomalen Regionen weisen auf die ätiologische Beteiligung von TSG sowie die Lokalisation dieser TSG hin. So wird es möglich, putative TSG durch die Untersuchung auf LOH zu identifizieren (von Deimling et al, 1993). In dieser Arbeit wurden ca 400 Hirntumoren mittels je fünf polymorpher Mikrosatellitenmarker für die Chromosomen 22 und 16 auf LOH hin untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte

Gerät	Typ	Firma
Agarosegel-Elektrophoresekammer	E92	Biometra, Göttingen
Geltrockner	SE 1160	Hoefel Scientific Instruments San Francisco, USA
Heizblock	DB 3A	Techne, Cambridge, UK
Kryostat	1720 Digital	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer (heizbar)		Ikamag Rct
Membran-Vakuumpumpe	MZ2C	Vacuubrand Wertheim GmbH
Mikrotom	HM 330	Microm, Walldorf
pH-Meter	CG 840	Schott
Pipetten	P10/P20/P200/P1000	Gilson
Polaroid-Kamera	PHC 34	Hoefel Scientific Instruments
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	SE 1600	Hoefel Scientific Instruments
Reagenzglasrotator	3025	Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel
Spannungsgeräte	Desatronic 500/500	Desaga, Heidelberg
	Desatronic 3000/200	Desaga, Heidelberg
	Power-All 3000V/200mA	Serva, Heidelberg
Strudelmischer	Vortex Genie 2	Bender und Hobein AG
Thermocycler	Thermocycler 60	Bio Med
UV-Lampe	UVTM-25	Hoefel Scientific Instruments
Vakuumpumpe	MZ 2C	Vaccumbrand GmbH
Waagen	BA 200, Analytic 120S	Sartorius
Zentrifugen	5415C,	Eppendorf
	Biofuge 13,	Heraeus
	Biofuge 28 RS,	Heraeus
	Minifuge GL 4400	Heraeus

3.2. Chemikalien und anderes Verbrauchsmaterial

Chemikalien	Firma
Acrylamid (2 x kristall.)	Serva, Heidelberg
Agarose (Sea Kem LE)	Biozym Diagnostik, Hameln
Ammoniumpersulfat	Sigma
Borsäure	Sigma
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck
Dimethyl-Dichlorosilan	Sigma
DNS-Längenstandard V	Boehringer Mannheim
dNTP's	Sigma
EDTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll (Typ 400)	Sigma
Formaldehyd	Merck
Gelatine (gepulvert)	Merck
Harnstoff	ICN, Cleveland, USA
Magnesiumchlorid	Sigma
Natriumcarbonat (wasserfrei, reinst)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
N, N'-Methylenbisacrylamid (2 x)	Serva
Nonidet-P40	Sigma
Paraffin (dickflüssig)	Merck
Phenol (Kristall., reinst)	Merck
Primer-Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg
2-Propanol	Riedel de Haen
Proteinase K	Boehringer Mannheim
Salzsäure	Merck
Salpetersäure	Merck
SDS (Sodium-Dodecylsulfat)	Merck
Silbernitrat	Merck
Taq-DNS-Polymerase	Gibco
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyl-methyldiamin)	Sigma
Tris[hydroxymethyl]aminomethan	Sigma
TritonX-100 (t-Ocetylphenoxyethoxyethanol)	Sigma
Xylencyanol	Merck

3.3. Puffer und Lösungen

8 % Acrylamid Lösung,

(für LOH-Gele)

250 g	Harnstoff
38,7 g	Acrylamid
1,33 g	Bis-Acrylamid
50 ml	10 x TBE

1 x TBE ad 500 ml, bei 50°C rühren

2 x Acrylamidgel-Ladepuffer

49 ml	Formamid
12,5 mg	Bromphenolblau
12,5 mg	Xylencyanol
1,0 ml	0,5 M EDTA

bei -20°C aufbewahren

2 % Agarosegel

2,0 g	Agarose (SeaKem LE)
0,6 x TBE ad 100 ml,	kurz aufkochen
2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ ml H ₂ O)	

6 x Agarosegel-Ladepuffer

12,5 mg	Bromphenolblau
12,5 mg	Xylencyanol
7,5 ml	Ficoll

ddH₂O ad 50 ml, bei 4°C lagern

Agarosegel-Standardmix

Standard V	1,5 µl
PCR-Puffer	1,0 µl
”Dye”, unverdünnt	2,0 µl
ddH ₂ O	7,5 µl

20 % Ammoniumpersulfat

0,2 g	APS
1,0 ml	ddH ₂ O

bei 4°C aufbewahren

5 % Dimethyl-Dichlorosilan

190 ml	Chloroform
10 ml	Dimethyl-Dichlorosilan

bei 4°C lagern

10 x dNTP-Mix

2 mM	dATP
2 mM	dCTP
2 mM	dGTP
2 mM	dTTP

in ddH₂O, bei - 20 ° C aufbewahren

Essigsäure

10% in ddH₂O

Ethanol

10% in ddH₂O

Ethidiumbromidlg.

10 mg/ml in ddH₂O

Natriumkarbonatlg.

30 g	Natriumkarbonat
0,5 ml	Formaldehyd, 37%

ddH₂O ad 1000 ml

10 x PCR-Puffer

100 mM Tris-HCl (pH 8,3)
500 mM KCl
10-25 mM MgCl₂
0,1 % Gelatine
in ddH₂O, bei -20° aufbewahren

Primerlösung

20 pmol/µl in ddH₂O

2 x Saccharose-Lösung

218 g Saccharose
2,4 g Tris
2,03 g MgCl₂
20 ml Triton X-100
ddH₂O ad 1 l, mit HCl auf pH 7,6
einstellen, bei 4°C lagern

Salz-EDTA

2,19 g NaCl
4,46 g EDTA
mit 5 M NaOH auf pH 8 einstellen,
ddH₂O ad 500 ml, bei 4°C aufbewahren

10 x TBE

108 g Tris
55 g Borsäure
40 ml EDTA (0,5 M)
ddH₂O ad 1 l

Phenol-Hydroxychinolin-Lösung

1,0 kg Phenol (Kristall. Phenol bei
65° C im Wasserbad schmelzen)
1,0g Hydroxychinolin
mit Tris-HCl pH 8 (0,5 M und 100 mM)
Äquilibrieren bis pH > 7,8, bei 4°C lagern

Reduktionslösung (Silberfärbung)

60 g Na₂CO₃
1,0 ml Formaldehyd (37%)
ddH₂O ad 2 l

Salpetersäure

1 % in ddH₂O

Silbernitratlsg.

2g ad 2 l mit ddH₂O

TE-Puffer pH 8,0

1,0 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0)
1,0 ml 50 mM EDTA (pH 8,0)
48 ml ddH₂O
bei 4°C aufbewahren

TNE		TNE/SDS/Proteinase K-Lösung	
5,0 ml	1 M Tris-HCl (pH 8,0)	(für eine Probe)	
10 ml	5 M NaCl	2,7 ml	TNE
2,1 g	EDTA	0,6 ml	10 % SDS
mit 5 M NaOH auf pH 7,5 titrieren, ddH ₂ O ad 500 ml, Lagerung bei 4°C		0,2 ml	Proteinase K (10 mg/ ml)

10 x Warner-Lösung

81,1 g NaCl
3,7g KCl
0,3g MgCl₂
ddH₂O ad 1 l, bei 4°C aufbewahren

3.4. Prinzip des Einsatzes polymorpher Marker

Funktionsrelevante DNS-Polymorphismen, vorkommend verteilt über das gesamte Genom und in unterschiedlicher Häufigkeit in der Bevölkerung, sind mitverantwortlich für die individuelle Vielfalt unserer Spezies. Viele Polymorphismen haben wahrscheinlich keine funktionelle Relevanz, unterliegen keiner evolutionären Selektion und sind damit als DNS-Marker zur Identifizierung und Zuordnung von Allelen in der Population geeignet. Hierzu zählen insbesondere die polymorphen Mikrosatelliten, oft kurz repetitive DNS-Sequenzen, die ebenfalls über das ganze Genom verteilt vorkommen.

Unter den Mikrosatelliten sind Dinukleotidwiederholungen, sog. (CA)_n Repeats besonders häufig und oft hoch polymorph in der Bevölkerung. Häufig sind auch polymorphe Tri- und Tetranukleotid-Mikrosatelliten. Diese sind wegen ihrer im Vergleich zu den Dinukleotid-Mikrosatelliten größeren Längenunterschiede der Allele für bestimmte Darstellungsverfahren besser geeignet als Dinukleotide und werden deswegen bevorzugt benutzt.

3.5. DNS-Extraktion aus Blut und Tumorgewebe

DNS-Extraktion aus Blut (Sambrook et al, 1989):

Die genomische DNS wurde aus den Leukozyten von insgesamt 20 ml Vollblut gewonnen.

1. Blut wird mit der gleichen Menge 2 x Sucrose-Lösung gemischt (Geringere Mengen wurden mit 1x Werner's Lösung auf 20 ml aufgefüllt). Dann mit 500 ml Nonidet-P-40

(Lysierung der Plasmamembran) versetzt und ca 15 min. geschüttelt.

2. Das Gemisch wird für 1 Stunde mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert.

3. Mit einer Pasteurpipette wird das Sediment aus Leukozytenkernen zerkleinert, zunächst mit 2,5 ml Salz-EDTA-Lösung und dann 3,5 ml eines TNE/SDS/Proteinase-K-Gemisches versetzt. Durch Inkubation über Nacht bei 55 °C im Wasserbad werden die Zellkernmembranen aufgelöst (DSD) und das Protein hydrolysiert (Proteinase K).

4. Am nächsten Tag wird die Lösung nach Zugabe von 6 ml Phenol 15 min. auf dem Rotator geschwenkt (Proteine lösen sich in der organischen Phenolphase, die DNS verbleibt in der wässrigen Phase).

5. Nach 5 min. Zentrifugation der Lösung mit 4000 rpm bei Raumtemperatur wird der wässrige Überstand in ein frisches Röhrchen überführt, mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) versetzt, und zuletzt die organische (auch proteinhaltige) Phase mit reinem Chloroform extrahiert.

6. Der wässrige Überstand wird mit 60 µl Kaliumchlorid (1M) versetzt, und hieraus die DNS mittels gekühltem Ethanol gefällt. Die präzipitierte DNS wird mit einer über dem Bunsenbrenner ausgezogenen Pasteur-Pipette aufgenommen. Die präzipitierte DNS wird in TE-Puffer resuspendiert und bei 4 °C bewahrt.

7. Für die PCR wird je 1µl der DNS-Suspension mit 30-100 µl ddH₂O verdünnt.

DNS-Extraktion aus Tumorgewebe:

Tumorgewebe wird unmittelbar postoperativ in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert. Am Kryostat wird es in ca. 5 µm dicke Scheiben geschnitten und mit HE gefärbt. Durch histologische Untersuchungen wird sichergestellt, daß die isolierte DNS tatsächlich aus Tumorzellen stammt. Nicht-tumorhaltiges Gewebe wird entfernt. Zur DNS-Extraktion wird Tumorgewebe in flüssigen Stickstoff gegeben und 2.5 ml Salz-EDTA-Lösung zugefügt. Die restlichen Schritte werden wie bei der DNS-Extraktion aus dem Blut durchgeführt.

3.6. Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

1984 hat Mullis diese Methode entwickelt.

PCR dient zur selektiven Vermehrung (Amplifikation) definierter DNS-Fragmente aus dem Genom.

Man benötigt kurze einzelsträngige DNS-Fragmente von 20 bis 30 Nukleotiden (Oligonukleotide), deren Sequenz im Genom einmalig vorkommt und komplementär zu

flankierenden Segmenten der zu amplifizierenden DNS-Zielsequenz ist. Die Oligonukleotide (Primer) binden in der denaturierten, einzelsträngigen genomischen DNS spezifisch an die die Zielsequenz flankierenden Bereiche. Diese als Annealing bezeichnete Hybridisierung der Primer ist bevorzugt bei einer ganz speziellen Temperatur hoch spezifisch möglich, welche von der Länge der Primer und deren Nukleotid-Zusammensetzung abhängig ist.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten:

Der erste Schritt dient der Auftrennung der Doppelstrang-DNS. Hierbei lösen sich Wasserstoffbrückenbindungen der DNS-Doppelstränge bei 94°C, so dass Einzelstränge entstehen, welche als Zielsequenzen (Matrize) für die Primer dienen können.

Der zweite Schritt dient dem Primer-Annealing (Anheften) bei einer Temperatur zwischen 52 und 62 °C, so dass die Primer in der denaturierten, einzelsträngigen DNS spezifisch an die flankierenden Bereiche der Zielsequenz binden können.

Im dritten Schritt findet die Primer-Extension (Verlängerung) statt. Nach der Primeranlagerung kann eine hitzestabile DNS-Polymerase (meist Taq-Polymerase) mit den Desoxynukleotiden (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) die Primer verlängern (optimale Temperatur liegt bei 72 °C) und so einen der Zielsequenz komplementären DNS-Strang erstellen.

Nach dem Syntheseschritt werden die neu synthetisierten DNS-Stränge im nächsten Vermehrungszyklus wiederum als Matrize für die DNS-Synthese genutzt (= Kettenreaktion). Nach 30 Zyklen entstehen rechnerisch pro eingesetztem Ziel-DNS-Molekül etwa 2^{30} Kopien, in der Praxis sind es jedoch weniger.

Die in dem Versuch amplifizierten Mikrosatellitenmarker und deren spezifische PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 1- 4 (Seite 26-27) aufgelistet.

Die PCR wurde in 0,6 ml Eppendorf-Mikrozentrifugen-Röhrchen durchgeführt. Jeder PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl besteht aus folgenden Substanzen:

- 1 µl DNS-Verdünnung (entspricht 10-30 ng genomische DNS)
- 1 µl 10 x PCR-Puffer
- 1 µl 10 x dNTP-Gemisch
- 1 µl Taq-Polymerase-Verdünnung (0,5U/µl)
- 1 µl Vorwärts-Primer (20 pmol)
- 1 µl Rückwärts-Primer (20 pmol)
- 4 µl ddH₂O
- 1 Tropfen Parafinöl

Tabelle 1: Verwendete Marker von Chromosom 22

Bezeichnung	Lokus	Lokalisation	Typ	%-, angegeb.	%-Het. beobachtet	Referenz
Mfd162CA	D22 S258	22q	CA-repeat	81%	(167/208) 80%	Sanger RH Mapping
PDGFB.PCR1.1	PDGFB	22q12.3q13.1	CA-repeat	57%	(6/20) 30%	Patterson, H
GGAT3C10	D22 S445	22	Tetnuc	73%	(106/189) 56%	Murray, JC
GATA4F03	D22 S684	22q13-qter	Tetnuc	100%	(150/200) 75%	Murray, JC
GGAT3A11	D22 S444	22	Tetnuc	53%	(24/40) 60%	Murray, JC

Trinuc=Trinukleotide, Tetnuc=Tetranukleotide, angegeb.=angegeben, Het.=Heterozygotie

Tabelle 2: Verwendete Marker von Chromosom 16

Bezeichnung	Lokus	Lokalisation	Typ	%-Het. angegeb.	%-Het. beobachtet	Referenz
ATA3A07	D16S748	16p13.2-13.1	Trinuc	78%	(82/102) 80%	Murray, JC
GATA7B02	D16 S540	16q12-q13	Tetnuc	68%	(52/93) 56%	Murray, JC
GATA7E02	D16 S541	16q12.1-q13	Tetnuc	77%	(136/197) 69%	Murray, JC
MH 20-1	D16 S310	16q21	Tetnuc	67%	(109/151) 72%	Hudson, TJ
GATA11C06	D16 S539	16q24.2-q24.3	Tetnuc	60%	(81/119) 68%	Murray, JC

Tabelle 3: Die PCR-Bedingungen der Mikrosatelliten zum Nachweis von LOH auf Chromosom 22

Marker	D22S258	PDGFB	D22S445	D22S684	D22S444
[MgCl ₂]	2,0 mM	1,25mM	2,5 mM	2,0 mM	2,0 mM
Anfängliche Denaturierung	94 °C, 3'	94 °C, 3'	94 °C, 3'	94 °C, 3'	94 °C, 3'
30 Zyklen	94 °C, 30''	94 °C, 30''	94 °C, 30''	94 °C, 30''	94 °C, 30''
	54 °C, 40''	58 °C, 30''	52 °C, 40''	54 °C, 40''	51 °C, 40''
	72 °C, 30''	72 °C, 15''	72 °C, 30''	72 °C, 30''	72 °C, 30''
Abschließende Extension	72 °C, 10'	72 °C, 10'	72 °C, 10'	72 °C, 10'	72 °C, 10'

Tabelle 4: Die PCR-Bedingungen der Mikrosatelliten zum Nachweis von LOH auf Chromosom 16

Marker	D16S748	D16S540	D16S541	D16S310	D16S539
[MgCl ₂]	1,5 mM	2,0 mM	2,0 mM	1,25 mM	2,0 mM
Anfängliche Denaturierung	94 °C, 3'	94 °C, 3'	94 °C, 3'	94 °C, 3'	94 °C, 3'
30 Zyklen	94 °C, 30''	94 °C, 30''	94 °C, 30''	94 °C, 30''	94 °C, 30''
	56 °C, 40''	58 °C, 40''	60 °C, 40''	60 °C, 40''	58 °C, 40''
	72 °C, 30''	72 °C, 30''	72 °C, 30''	72 °C, 30''	72 °C, 30''
Abschließende Extension	72 °C, 10'	72 °C, 10'	72 °C, 10'	72 °C, 10'	72 °C, 10'

' = Minuten, '' = Sekunden;

3.7. Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese (2% Agarosegel in 0,6 x TBE, 7,5 µg/70 ml Ethidiumbromid) dient zur orientierenden Erfolgskontrolle der PCR vor PAGE.

3 µl PCR-Produkt werden hierzu mit 3 µl Agarosegel-Ladepuffer vermischt und auf das Agarosegel aufgeladen und über ca. 15 Min. bei 180 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten DNS-Banden lassen sich aufgrund der Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht (366 nm) ablesen. Als Standard wurde 3 µl Längenstandard V (Boehringer) verwendet.

3.8. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Analyse der PCR-Produkte zur Auftrennung der Allele erforderte die elektrophoretische Auftrennung auf hochauflösenden Acrylamidgelen.

In dieser Arbeit findet die Elektrophorese auf einem 8%igen denaturierenden, 37x41 cm großen, 0,3 mm dickem Polyacrylamidgel mit einer Taschenbreite von 0.5 oder 1 cm statt.

Vorbereitung der PAGE

Um die Abhebung einer Glasplatte für die Färbung des Gels zu erleichtern wurden die beiden Glasplatten mit 5%igen Dichlordimethylsilan in Chloroform eingerieben. Dann wurden sie dicht verklebt. 60 ml 8%iges Polyacrylamid, 180 µl 20%ige Ammoniumpersulfat-Lösung und 20 µl TEMED wurden zwischen 2 Glasplatten luftblasenfrei gegossen. Unter diesen Bedingungen polymerisiert das Gel in etwa 4 Stunden. Nach dem Polymerisieren wird der Taschenkamm vorsichtig aus dem Gel entfernt.

8 µl von jedem PCR-Ansatz wurden mit einer gleichen Menge Ladepuffer gemischt und 5 Minuten lang bei 94 °C im Heizblock denaturiert. Um die beiden Tochterstränge separiert zu erhalten, muss das denaturierte PCR-Produkt unmittelbar danach auf Eis gestellt werden.

Als Längenstandard wurde Standard V (Boehringer) benutzt. Hierzu wurde 0,3 µl Standard V mit 7,7 µl Wasser verdünnt, ebenfalls wie die PCR-Produkte mit 8 µl Ladepuffer versehen, vor dem Auftragen denaturiert und auf Eis gestellt.

Die 2 Glasplatten mit dem Gel wurden in eine Elektrophoresekammer (Pockface) gestellt und 10% TBE-Lösung hinzugefügt. Nach einer Warmlaufphase (ca 20 min. bei 70 W) und gründlicher Taschenspülung wurden die PCR Produkte aus dem Blut bzw. aus den Tumoren der Patienten - je nach Taschenbreite bis zu 30 Probenpaaren nebeneinander - aufgeladen. Bei einer Spannung von 70 Watt betrug die Laufzeit je nach Produktgröße (100 bis 240 Bp) eine bis zwei Stunden.

3.9. Silberfärbung

Die Silberfärbung dient zur Darstellung der DNS-Banden im Acrylamidgel.

Nach der Abhebung einer Glasplatte wurde die andere Glasplatte mit dem Gel auf eine Bodenplatte gelegt und mit einem Rahmen aus Holz (Bender et al, 1994) dicht fixiert (Abd. 1). Die so entstandene Kammer hat einen Boden aus einer Glasplatte mit anhaftendem Gel. In dieser Kammer werden die Lösungen zur Silberfärbung hinzugefügt. Die einzelnen Färbeschritte sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Silberfärbungsprotokoll zum Nachweis von DNS-Fragmenten

Lösung	Inkubation	Funktion
10 % Ethanol	5 min.	Fixierung der DNS
1 % HNO ₃	3 min.	Fixierung, Einstellung eines sauren pH Wertes
Aqua dest.	1 mal spülen	
0,2 % AgNO ₃	20 min.	Färbung (Anlagerung von Ag ⁺ an die DNS)
Aqua dest.	2 mal spülen	
3% Na ₂ CO ₃ mit 0,0185 % H ₂ CO	bis Banden sichtbar	Entwicklung (durch das Formaldehyd werden die von der DNS gebundenen Silberionen reduziert und sichtbar gemacht)
10 % H ₃ COOH	2-5 min.	Abbruch der Entwicklungsreaktion

Nach der Färbung wurden die Gele auf Filterpapier aufgezogen und unter Vakuum getrocknet.

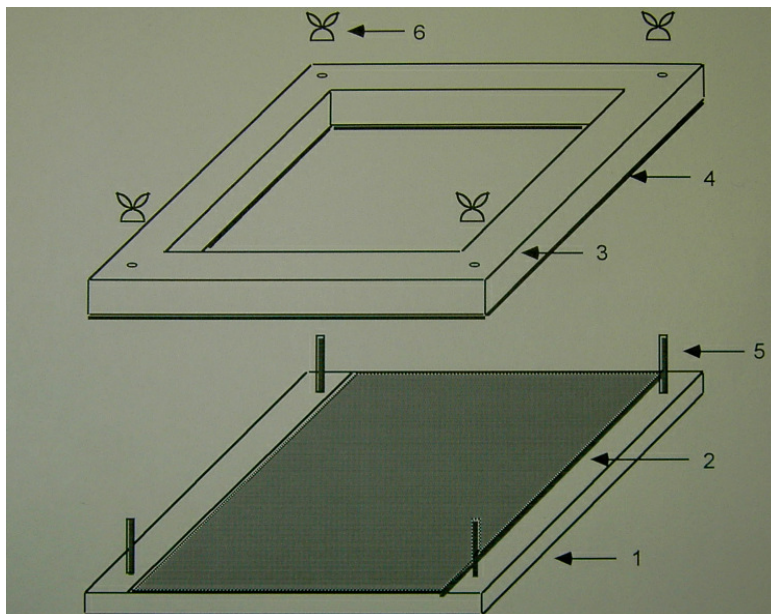


Abbildung 1: Die auf eine Bodenplatte gelegte Glasplatte mit dem Gel wird mit einem Holzrahmen fixiert. In dieser entstandenen Kammer werden die Lösungen zur Silberfärbung hinzugefügt.

1. Bodenplatte, 2. Glasplatte mit anhaftendem Gel, 3. Rahmen aus Holz, 4. Dichtung, 5. Gewindestangen, 6. Flügelschrauben

4. Ergebnisse

Die Untersuchungen auf Heterozygotie-Verluste (LOH) der Chromosomen 22 und 16 wurden mit Hilfe einer Fragmentanalyse repetitiver Marker-Sequenzen durchgeführt. Die DNS-Abschnitte jeweils 5 genetischer Marker auf Chromosom 22 und auf Chromosom 16 aus dem Blut und aus den Tumoren wurden mit der PCR amplifiziert und auf einem 8%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Dann wurden die Banden anhand der Silberfärbung sichtbar gemacht, danach getrocknet. Zum Schluß wurden die Ergebnisse abgelesen und in einer Computer-Datenbank gespeichert. Abschließend wurden die Gele nach Beschriften und Nummerierung zur Aufbewahrung archiviert.

4.1. Interpretation der Bandenmuster

Bei einem heterozygoten Patienten - solche Patienten werden als „informativ“ bezeichnet – lassen sich im Blut zwei verschiedene (elterliche) Allele des untersuchten Markers nachweisen. Die unterschiedlichen Banden entstehen dadurch, daß ein amplifiziertes Allel länger ist (eine größere Anzahl an Wiederholungseinheiten besitzt) als das andere und deshalb in der Elektrophorese in der gleichen Zeit eine kürzere Strecke zurücklegt. Wenn ebenso in der Tumor-DNS dieses Patienten zwei Banden in der Elektrophorese nachweisbar sind, bedeutet dies keinen Allelverlust in diesem Bereich, wie in Abbildung 2 darstellt.

Ein LOH liegt vor, wenn ein heterozygoter Patient in seinem Blut zwei verschiedene Allele des untersuchten Markers besitzt, in seiner Tumor-DNS jedoch nur ein Allel des untersuchten Markers besitzt, wie in Abbildung 3 gezeigt.

Bei homozygoten Patienten - solche Patienten werden als "nicht informativ" bezeichnet - ist ein LOH durch diese Untersuchungsmethode nicht zu detektieren, da der Patient zwei identische Allele des untersuchten Markers besitzt, so dass die allelischen PCR-Produkte sich in ihrer Größe nicht unterscheiden, bei der Elektrophorese die gleiche Strecke zurücklegen und die Banden sich überlagern, wie in Abbildung 4 demonstriert.

Die prinzipiell bei einem Mikrosatellitenmarker möglichen drei unterschiedlichen Ergebniskonstellationen sind in den folgenden Abbildungen 2-4 exemplarisch durch entsprechend gewählte Ausschnitte aus einem 8%igen Polyacrylamidgel dargestellt.

Blut-DNS	Tumor-DNS	Blut-DNS	Tumor-DNS	Blut-DNS	Tumor-DNS
3878	3877	3786	3785	3844	3843



Abbildung 2:
Informativ/kein LOH

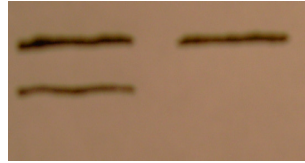


Abbildung 3:
Informativ/LOH

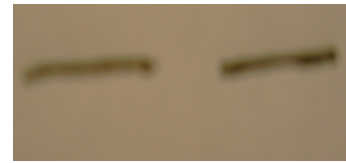


Abbildung 4
nicht informativ

4.2. Ergebnisse der LOH-Analyse

In dieser Studie wurden folgende Tumoren untersucht:

- 38 pilozytische Astrozytome WHO Grad I
- 28 Astrozytome WHO Grad II
- 39 Astrozytome WHO Grad III
- 3 Chordome
- 1 Ependymoblastom WHO Grad IV
- 6 Ependymome WHO Grad I
- 6 Ependymome WHO Grad II
- 6 Ependymome WHO Grad III
- 15 Gangliogliome WHO Grad I
- 3 Gangliogliome WHO Grad III
- 113 Glioblastome WHO Grad IV
- 4 Hämangioblastome WHO Grad I
- 4 Hämangioperizytome
- 6 Hypophysenadenome WHO Grad I
- 12 Lipome
- 15 Medulloblastome WHO Grad IV
- 65 Meningeome WHO Grad I (8 fib, 26 men, 16 trans, 13 mult, 2 histologisch nicht genau einteilbar)
- 10 Meningeome WHO Grad II
- 10 Meningeome WHO Grad III

- 1 multiples Meningeom
- 20 Metastasen
- 24 Neurinome WHO Grad I
- 4 Neurinome WHO Grad III
- 6 Neurofibrome WHO Grad I
- 21 Oligoastrozytome WHO Grad II
- 22 Oligoastrozytome WHO Grad III
- 15 Oligodendrogliome WHO Grad II
- 8 Oligodendrogliome WHO Grad III
- 1 Plexuskarzinom
- 4 primitive neuroektodermale Tumoren

4.2.1. LOH-Analyse von Chromosom 22

Alle Tumoren wurden mit fünf Markern auf Chromosom 22 analysiert: D22S258, PDGFB, D22S445, D22S684 und D22S444.

Astrozytome

Von den 27 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen (heterozygoten) Patienten mit Astrozytom WHO Grad II wiesen vier (4/27=15%) LOH auf Chromosom 22 auf (zwei der 18 für den Marker D22S258 und jeweils einer der acht für den Marker D22S684 und einer der drei für den Marker D22S444 informativen Patienten). Ein Patient war nicht informativ für alle o.g. 5 Marker

Von den 36 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Astrozytom WHO Grad III wiesen neun (9/36=25%) LOH auf Chromosom 22 auf (jeweils drei der 23 für den Marker D22S258 und drei der 14 für den Marker D22S445, zwei der 14 für den Marker D22S684 informativen Patienten und der einzige für D22S444 informative Patient). Die übrigen drei Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker.

Ependymoblastome WHO Grad IV

Der Patient mit Ependymoblastom WHO Grad IV wies LOH's für die beiden hier informativen Marker D22S445 und D22S4441 auf.

Ependymome WHO Grad II

Einer der beiden Patienten mit Ependymom WHO Grad II wies LOH für den informativen Marker D22S258, der andere für die beiden informativen Marker

D22S445 und D22S444 auf. Die übrigen vier Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker.

Glioblastome WHO Grad IV

Von den 81 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Glioblastom WHO Grad IV wiesen 20 ($20/81=25\%$) LOH auf Chromosom 22 auf (neun der 52 für den Marker D22 S258, acht der 40 für den Marker D22S445 und zwölf der 50 für den Marker D22S684 informativen Patienten). Die übrigen 32 Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker.

Hämangioblastome WHO Grad I

Einer von den vier zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Hämangioblastom WHO Grad I wies für die Marker D22S258 und D22S445 sowie Marker D22S684 jeweils LOH auf Chromosom 22 auf (bei beiden für den Marker D22S258, jeweils drei für die Marker D22S445 und D22S684 informativen Patienten). Ein Patient war nicht informativ für alle o.g. 5 Marker.

Meningeome

Von den acht zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Meningeom WHO Grad I fib wiesen sechs ($6/8=75\%$) LOH auf Chromosom 22 auf (jeweils fünf der sieben für den Marker D22 S258 und fünf der sechs für den Marker D22S684 und einer der beiden für den Marker D22S444 informativen Patienten).

Von den 25 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Meningeom WHO Grad I men. wiesen neun ($9/25=36\%$) LOH auf Chromosom 22 auf (sieben der 22 für den Marker D22S258, einer der beiden für den Marker PDGFB, zwei der 11 für den Marker D22S445 und drei der 11 für den Marker D22S684 informativen Patienten). Ein Patient war nicht informativ für alle o.g. 5 Marker.

Von den 15 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Meningeom WHO I trans wiesen 12 ($12/15=80\%$) LOH auf Chromosom 22 auf (acht der 10 für den Marker D22S258, einer der beiden für den Marker PDGFB, fünf der sechs für den Marker D22S684 und zwei der drei für den Marker D22S444 informativen Patienten). Ein Patient war nicht informativ für alle o.g. 5 Marker.

Von den neun zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Meningeom WHO Grad I mult wiesen sechs ($6/9=67\%$) LOH auf Chromosom 22 auf

(zwei der drei für den Marker D22S258, vier der sechs für den Marker D22S445 und zwei der vier für den Marker D22S684 informativen Patienten). Die übrigen vier Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Einer von den beiden zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Meningeom WHO Grad I (histologisch nicht genau einteilbar) wies für die Marker D22S445 und D22S444 jeweils einen LOH auf Chromosom 22 auf.

Von den 10 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Meningeom WHO II wies sieben ($7/10=70\%$) LOH auf Chromosom 22 auf (fünf der acht für den Marker D22S258, einer der beiden für den Marker PDGFB, jeweils zwei der drei für den Marker D22S445 und zwei der vier für den Marker D22S684 und die drei für den Marker D22S444 informativen Patienten).

Von den neun zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Meningeom WHO III wiesen acht ($8/9=89\%$) LOH auf Chromosom 22 auf (sieben der acht für den Marker D22S258 informativen Patienten, jeweils drei informative Patienten für die Marker D22S445 und D22S444 und fünf auch für den Marker D22S684). Ein Patient war nicht informativ für alle o.g. 5 Marker.

Der Patient mit multiplem Meningeom war informativ für den Marker D22S445 und wies dort LOH auf.

Metastasen

Von den 18 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Metastasen wiesen sieben ($7/18=39\%$) LOH auf Chromosom 22 auf (einer der vier für den Marker D22S258, fünf der 12 für den Marker D22S445 und drei der neun für den Marker D22S684 informativen Patienten). Die übrigen zwei Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Neurinome WHO Grad I

Von den 16 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Neurinom WHO Grad I wiesen sieben ($7/16=35\%$) LOH auf Chromosom 22 auf (drei der neun für den Marker D22S258, sechs der 10 für den Marker D22S684 und drei der sechs für den Marker D22S444 informativen Patienten). Die übrigen acht Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Oligoastrozytome WHO Grad II

Von den sechs zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Oligoastrozytom WHO Grad II wies einer aller sechs für den Marker D22S684 informativen Patienten (1/6=17%) LOH auf Chromosom 22 auf. Die übrigen 15 Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Oligoastrozytome WHO Grad III

Von den 15 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Oligoastrozytom WHO Grad III wiesen zwei (2/15=13%) LOH auf Chromosom 22 auf (jeweils zwei der sieben für den Marker D22S445 und zwei der 12 für den Marker D22S684 informativen Patienten). Die übrigen sieben Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Oligodendrogliome WHO Grad II

Von den vier zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Oligodendrogliom WHO Grad II wies einer aller vier für den Marker D22S445 informativen Patienten LOH auf Chromosom 22 auf. Die übrigen 11 Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Plexuskarzinom

Der Patient mit Plexuskarzinom war nur bzgl. eines der fünf Marker (D22S445) informativ und wies dort LOH auf.

Primitive neuroektodermale Tumoren

Von den beiden zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit primitivem neuroektodermalem Tumor wies einer der beiden für den Marker D22S684 informativen Patienten LOH auf Chromosom 22 auf. Die übrigen zwei Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Die Ergebnisse sind der Tab.6 (Seite 37) zusammengefasst zu entnehmen.

Nicht informative Patienten (alle fünf Marker sind nicht informativ) sind im Text nicht erwähnt.

Bei folgenden Tumoren aller Patienten wurden keine LOH detektiert:

- 38 pilozytische Astrozytome WHO Grad I
- 3 Chordome

- 6 Ependymome WHO Grad I
- 6 Ependymome WHO Grad III
- 15 Gangliogliome WHO Grad I
- 3 Gangliogliome WHO Grad III
- 4 Hämangioperizytome
- 6 Hypophysenadenome WHO Grad I
- 12 Lipome
- 15 Medulloblastome WHO Grad IV
- 4 Neurinome WHO Grad III
- 6 Neurofibrome WHO Grad I
- 8 Oligodendrogliome WHO Grad III

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der LOH-Untersuchungen für die Genorte auf Chromosom 22

	D22S258	PDGFB	D22S445	D22S684	D22S444	Gesamtauswertung
	22q	22q12.3-q13.1	22	22q13-qter	22	
Astrozytom WHO Grad II	2/18* (11%)			1/8* (13%)	1/3*	4/27** (15%)
Astrozytom WHO Grad III	3/23* (13%)		3/14* (21%)	2/14* (14%)	1/1*	9/36** (25%)
Ependymoblastom WHO Grad IV			1/1*		1/1*	1/1**
Ependymom WHO Grad II	1/1*		1/1*		1/1*	2/2**
Glioblastom WHO Grad IV	9/52* (17%)		8/40* (20%)	12/50* (24%)		20/81** (25%)
Hämangioblastom WHO Grad I	1/2*		1/3*	1/3*		1/4**
Meningeom WHO Grad I			1/2*		1/1*	1/2**
Meningeom WHO Grad I fib	5/7* (71%)			5/6* (83%)	1/2*	6/8** (75%)
Meningeom WHO Grad I men.	7/22* (32%)	1/2*	2/11* (18%)	3/11* (27%)		9/25** (36%)
Meningeom WHO Grad I trans	8/10* (80%)	1/2*		5/6* (83%)	2/3*	12/15** (80%)
Meningeom WHO Grad I mult	2/3*		4/6* (67%)	2/4*		6/9** (67%)
Meningeom mult			1/1*			1/1**
Meningeom WHO Grad II	5/8* (62%)	1/2*	2/3*	2/4*	3/3*	7/10** (70%)
Meningeom WHO Grad III	7/8* (88%)		3/3*	5/5*	3/3*	8/9** (89%)
Metastasen	1/4*		5/12* (42%)	3/9* (33%)		7/18** (39%)
Neurinom WHO Grad I	3/9* (33%)			6/10* (60%)	3/6* (50%)	7/16** (35%)
Oligoastrozytom WHO Grad II				1/6* (17%)		1/6** (17%)
Oligoastrozytom WHO Grad III			2/7* (29%)	2/12* (17%)		2/15** (13%)
Oligodendrogliom WHO Grad II			1/4*			1/4**
Plexuskarzinom			1/1*			1/1**
PNET				1/2*		1/2**

Weniger als 6 Fälle keine %-Angabe, * Zähler:die informativen bzw. heterozygoten Patienten; Nennen: die informativen Patienten mit LOH-Nachweis

** Alle Patienten mit mindestens einem LOH in einem Marker / Alle Patienten mit mindestens einem informativen Marker.

4.2.2. LOH-Analyse von Chromosom 16

Alle Tumoren wurden mit 5 Markern auf Chromosom 16 untersucht: D16S748, D16S540, D16S541, D16S310, D16S539.

Pilozytisches Astrozytome WHO Grad I

Von den 29 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit pilozytischem Astrozytom WHO Grad I wiesen drei ($3/29=10\%$) LOH auf Chromosom 16 auf (einer der 13 für den Marker D16S748 und zwei der 23 für den Marker D16S541 informativen Patienten). Die übrigen neun Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Astrozytome WHO Grad II

Von den 22 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Astrozytom WHO Grad II wies einer ($1/22=5\%$) LOH für die Marker D16S541 und D16S310 auf Chromosom 16 auf (bei insgesamt 13 für den Marker D16S541 und 11 für den Marker D16S310 informativen Patienten). Die übrigen sechs Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Astrozytome WHO Grad III

Einer von allen 10 bzgl. des Markers D16S539 informativen Patienten mit Astrozytom WHO Grad III wies ($1/10=10\%$) LOH auf Chromosom 16 auf. Die übrigen 29 Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Glioblastome WHO Grad IV

Von den 87 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Glioblastom WHO Grad IV wiesen 11 ($11/87=13\%$) LOH auf Chromosom 16 auf (jeweils drei der 37 für den Marker D16S748, der 24 Patienten für den Marker D16S540 und der 36 Patienten für den Marker D16S539, vier der 49 für den Marker D16S541 und sieben der 60 für den Marker D16S310 informativen Patienten). Die übrigen 26 Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Hämangioblastome

Einer von den drei für den Marker D16S539 informativen Patienten mit Hämangioblastom wies LOH auf Chromosom 16 auf. Ein Patient war nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Hämangioperizytome

Von den drei zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Hämangioperizytom wiesen zwei LOH auf Chromosom 16 auf. (Jeweils einer der drei für den Marker D16S541 und den Marker D16S539, einer der beiden für den Marker D16S310 informativen Patienten). Ein Patient war nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Medulloblastome WHO Grad IV

Von den 11 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Medulloblastom wiesen zwei ($2/11=18\%$) LOH auf Chromosom 16 auf (zwei der sechs für den Marker D16S748, einer der sechs für den Marker D16S540, einer der neun für den Marker D16S541, zwei der sechs für den Marker D16S310 und einer der sechs für den Marker D16S539 informativen Patienten). Die übrigen vier Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Meningeome WHO Grad I

Einer von den beiden für den Marker D16S541 informativen Patienten mit Meningeom WHO Grad I wies LOH auf Chromosom 16 auf. Ein Patient war nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Meningeome WHO Grad II

Von den fünf zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Meningeom WHO Grad II wies einer LOH auf Chromosom 16 auf (jeweils einer der fünf für den Marker D16S540 und der vier für den Marker D16S539 informativen Patienten). Die übrigen fünf Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Meningeome WHO Grad III

Von den acht zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Meningeom WHO Grad III wiesen drei ($3/8=38\%$) LOH auf Chromosom 16 auf (einer der sechs für den Marker D16S748, zwei der vier für den Marker D16S540, jeweils einer der vier für die Marker D16S541 und D16S310 und zwei der vier für den Marker D16S539 informativen Patienten). Die übrigen zwei Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Metastasen

Von den 20 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Metastasen wiesen sieben ($7/20=35\%$) LOH auf Chromosom 16 auf (zwei der 10 für den Marker D16S748, jeweils vier der 12 für den Marker D16S540, der 11 für den Marker D16S541 und der neun für den Marker

D16S539 und drei der neun für den Marker D16S310 informativen Patienten).

Neurinome WHO Grad I

Von den 11 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Neurinom WHO Grad I wiesen zwei ($2/11=18\%$) LOH auf Chromosom 16 auf (jeweils einer der acht für den Marker D16S541 und einer der sechs für den Marker D16S310 informativen Patienten). Die übrigen 13 Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Neurinome WHO Grad III

Der lediglich bzgl. des Markers D16S540 informative Patient mit Neurinom WHO Grad III wies LOH auf Chromosom 16 auf. Die übrigen drei Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Oligoastrozytome WHO Grad III

Von den 17 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Oligoastrozytom WHO Grad III wiesen zwei ($2/17=12\%$) LOH auf Chromosom 16 auf (einer der 14 für den Marker D16S541 und zwei der 11 für den Marker D16S310 informativen Patienten). Die übrigen fünf Patienten waren nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Oligodendrogliome WHO Grad II

Einer von den 14 zumindest bzgl. eines der fünf Marker informativen Patienten mit Oligodendrogliom WHO Grad II ($1/14=7\%$) wies LOH für die Marker D16S748 und D16S539 auf Chromosom 16 auf (bei 10 für den Marker D16S748 und sechs für den Marker D16S539 informativen Patienten). Ein Patient war nicht informativ für o.g. alle 5 untersuchten Marker

Die Ergebnisse sind der Tab.7 (Seite 41) zusammengefasst zu entnehmen.

Nicht informative Patienten (alle 5 Marker sind nicht informativ) sind im Text nicht erwähnt.

In folgenden Tumoren aller Patienten wurden keine LOH detektiert:

- 3 Chordome
- 1 Ependymoblastom WHO Grad IV
- 6 Ependymome WHO Grad I
- 6 Ependymome WHO Grad II
- 6 Ependymome WHO Grad III
- 15 Gangliogliome WHO Grad I

- 3 Gangliogliome WHO Grad III
- 6 Hypophysenadenome WHO Grad I
- 12 Lipome
- 1 multiples Meningeom
- 6 Neurofibrome WHO Grad I
- 21 Oligoastrozytome WHO Grad II
- 8 Oligodendrogliome WHO Grad III
- 1 Plexuskarzinom
- 4 Primitive neuroektodermale Tumoren

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der LOH-Untersuchungen für die Genorte auf Chromosom 16

	D16S748	D16S540	D16S541	D16S310	D16S539	Gesamtauswertung
	16p13.2-p13.1	16q12-q13	16q12.1-q13	16q21	16q24.2-q24.3	
Pilozytisches Astrozytom WHO Grad I	1/13 [*] (8%)		2/23 [*] (9%)			3/29 ^{**} (10%)
Astrozytom WHO Grad II			1/13 [*] (8%)	1/11 [*] (9%)		1/22 ^{**} (5%)
Astrozytom WHO Grad III					1/10 [*] (10%)	1/10 ^{**} (10%)
Glioblastom WHO Grad IV	3/37 [*] (8%)	3/24 [*] (13%)	4/49 [*] (8%)	7/60 [*] (12%)	3/36 [*] (8%)	11/87 ^{**} (13%)
Hämangioblastom WHO Grad I					1/3 [*]	1/3 ^{**}
Hämangioperizytom			1/3 [*]	1/2 [*]	1/3 [*]	2/3 ^{**}
Medulloblastom WHO Grad IV	2/6 [*] (33%)	1/6 [*] (17%)	1/9 [*] (11%)	2/6 [*] (33%)	1/6 [*] (17%)	2/11 ^{**} (18%)
Meningeom WHO Grad I			1/2 [*]			1/2 ^{**}
Meningeom WHO Grad II		1/5 [*]			1/4 [*]	1/5 ^{**}
Meningeom WHO Grad III	1/6 [*] (17%)	2/4 [*]	1/4 [*]	1/4 [*]	2/4 [*]	3/8 ^{**} (38%)
Metastasen	2/10 [*] (20%)	4/12 [*] (33%)	4/11 [*] (36%)	3/9 [*] (33%)	4/9 [*] (44%)	7/20 ^{**} (35%)
Neurinom WHO Grad I			1/8 [*] (13%)	1/6 [*] (17%)		2/11 ^{**} (18%)
Neurinom WHO Grad III		1/1 [*]				1/1 ^{**}
Oligoastrozytom WHO Grad III			1/14 [*] (7%)	2/11 [*] (18%)		2/17 ^{**} (12%)
Oligodendrogliom WHO Grad II	1/10 [*] (10%)				1/6 [*] (17%)	1/14 ^{**} (7%)

Weniger als 6 Fälle keine %-Angabe.

* Zähler: die informativen bzw. heterozygoten Patienten; Nennen: die informativen Patienten mit LOH-Nachweis

** Alle Patienten mit mindestens einem LOH in einem Marker / Alle Patienten mit mindestens einem informativen Marker.

4.3. Angaben zur Heterozygotie der analysierten Marker

4.3.1. Angaben zur Heterozygotie der analysierten Marker von Chromosom 22

In dieser Studie wurden fünf Marker von Chromosom 22 untersucht (D22S258, PDGFB, D22S445, D22S684 und D22 S444).

Auf dem Locus D22S258 waren 167 von 208 Patienten (80%) informativ, was annähernd der aus Literaturangaben bekannten Heterozygoten-Rate entspricht (81%). Bei 16 Patienten konnte keine interpretierbare Information erhalten werden.

Auf dem Locus PDGFB lag der Anteil der informativen Patienten mit sechs von 20 (30%) deutlich unterhalb der aus Literaturangaben bekannten Heterozygoten-Rate von 57%.

Auf dem Locus D22S445 waren 106 Patienten von 189 Patienten (56%) informativ, was etwas unterhalb der aus Literaturangaben bekannten Heterozygoten-Rate liegt (73%). Bei 17 Patienten konnte keine interpretierbare Information erhalten werden.

Auf dem Locus D22S684 waren 150 von 200 Patienten (75%) informativ, was ebenfalls unterhalb der aus Literaturangaben bekannten Heterozygoten-Rate liegt (100%). Bei 21 Patienten konnte keine interpretierbare Information erhalten werden.

Auf dem Locus D22S444 waren 24 von 40 Patienten (60%) informativ, was wenig oberhalb der aus Literaturangaben bekannten Heterozygoten-Rate liegt (53%). Bei fünf Patienten konnte keine interpretierbare Information erhalten werden.

Die Ursache für Abweichungen von den publizierten Raten von Heterozygotie liegt vermutlich in populationsbedingten Unterschieden der Allelfrequenzen. Die Ergebnisse sind der Tabelle 1 (Seite 26) zusammengefasst zu entnehmen.

4.3.2. Angaben zur Heterozygotie der analysierten Marker von Chromosom 16

Die Tumoren wurden mit fünf Markern (D16S748, D16S540, D16S541, D16S310, D16S539) auf Chromosom 16 untersucht.

Auf dem Locus D16 S748 waren 82 von 102 Patienten (80%) informativ, was annähernd der aus Literaturangaben bekannten Heterozygoten-Rate entspricht (78%). Bei neun Patienten konnte keine interpretierbare Information erhalten werden.

Auf dem Locus D16S540 waren 52 von 93 Patienten (56%) informativ, was etwas unterhalb der aus Literaturangaben bekannten Heterozygoten-Rate entspricht (68%). Bei 11 Patienten konnten keine interpretierbaren Informationen erhalten werden.

Auf dem Locus D16S541 waren 136 Patienten von 197 Patienten (69%) informativ, was der

aus Literaturangaben bekannten Heterozygoten-Rate von 77% nahe kommt. Bei 20 Patienten konnte keine interpretierbare Information erhalten werden.

Auf dem Locus D16S310 waren 109 von 151 Patienten (72%) informativ, was wiederum der aus Literaturangaben bekannten Heterozygoten-Rate von 67% recht nahe kommt. Bei 26 Patienten konnte keine interpretierbare Information erhalten werden.

Auf dem Locus D16S539 waren 81 von 119 Patienten (68%) informativ, ebenfalls ein der aus Literaturangaben bekannten Heterozygoten-Rate von 60% ähnlicher Wert. Bei 14 Patienten konnte keine interpretierbare Information erhalten werden.

Die Ergebnisse sind der Tabelle 2 (Seite 27) zusammengefasst zu entnehmen.

5. Diskussion

5.1. Meningeome

Meningeome sind häufige primäre Tumoren des ZNS mit einer jährlichen Inzidenz von 6:100000. Bei mehr als 50% der Patienten mit NF2 entwickeln sich Meningeome (Lamszus et al, 2000).

Bei einem Großteil der Meningeome mit komplettem (Monosomie 22) (Zankl und Zang, 1972) oder partiellem Verlust des Chromosom 22 in der zytogenetischen (Meese et al, 1987) oder molekulargenetischen Analyse wird die Beteiligung eines TSG auf Chromosom 22 an der Tumorentstehung vermutet, wie es in mutierter Form auch in NF2-Familien vererbt wird (Seizinger et al, 1987). Schließlich konnte das NF2-Gen auf Chromosom 22 (22q11.21-q13.1) durch Kopplungsanalyse in NF2-Familien lokalisiert (Rouleau et al, 1987, Wertelecki et al, 1988) und kloniert werden (Trafatter et al, 1993, Rouleau et al, 1993). Das Produkt des NF2-Gens, Merlin/Schwannomin, wird aufgrund von Sequenzhomologien einer Protein-4.1-Familie zugeordnet, die auch Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) einschließt. Die hemmende Wachstumsaktivität von Merlin ist abhängig von einer spezifischen Interaktion mit CD44, einem Zelloberflächen-Rezeptor für Hyaluronsäure (Bai et al, 2007). Eine Inaktivierung von Merlin fördert das Zellwachstum. Fast alle NF2-Mutationen führen zum Verlust der Merlin-Expression (Ueki et al, 1999).

Die Klonierung des NF2-Gens ermöglicht eine gezielte Untersuchung bzgl. der Beteiligung dieses Gens an der Entstehung sporadischer Meningeome. Mutationen im NF2-Gen auf Chromosom 22 verursachen nahezu 60% der sporadischen, bzw. 75% aller transitionalen und aller fibroblastischen Meningeome und sind mit dem Verlust des Chromosoms 22 assoziiert. Für die verbleibenden 40% der Meningeome ist kein kausales Gen bekannt (Ruttledge et al, 1994, Wellenreuther et al, 1995 und 1997, van Tilborg et al, 2006). Vor Kurzem wurde eine Hypermethylierung im Promotorbereich des NF2-Gens, überwiegend in den wenigen sporadischen benignen Meningeomen, festgestellt, bei denen kein Allel-Verlust und keine Mutation des NF2-Gens nachzuweisen war (Lomas et al, 2005). In dieser Arbeit konnte eine eindeutige Korrelation zwischen LOH auf Chromosom 22 und histologischen Meningeom-Subtypen festgestellt werden. Unter den meningoethelialen Meningeomen trat signifikant weniger LOH auf als in den anderen histologischen Subtypen, nämlich lediglich in 36% (9/25). Die Werte lagen für fibroblastische, transitionale Meningeome jeweils bei 75% (6/8) und 80% (12/15). Molekular distinkte Pathomechanismen zwischen Subtypen der

Meningeome können somit als gut belegt angesehen werden. In der Tumorgenese der meningothehialen Meningeome ist das NF2-Gen nicht beteiligt, wie unsere Arbeitsgruppe belegen konnte (Wellenreuther et al, 1997).

Bei einigen sporadischen Meningeomen konnten nur LOH auf Chromosom 22q, aber keine Mutationen des NF2-Gens nachgewiesen werden. Daher wurden weitere TSG auf Chromosom 22 vermutet (Rutledge et al, 1994), z.B. BAM22- (ein Mitglied der b-adaptin Genfamilie) (Peyrard et al, 1994) und MN1-Gen (Lekanne-Deprez et al, 1995), sowie das BCR-Gen (breakpoint cluster region) (Wozniak et al, 2008). Bei den fibroblastischen und transitionalen Meningeomen mit in dieser Arbeit nachgewiesenen LOH (für die Marker D22S258 und D22S445) auf Chromosom 22 wurde von unserer Arbeitsgruppe eine Mutationsanalyse des NF2-Gens in einer anderen Arbeit beschrieben: 25% der transitionalen und der fibroblastischen Meningeome wiesen keine Mutationen auf (Wellenreuther et al, 1997), was die Hypothese weiterer TSG auf Chromosom 22 in unseren Untersuchungen stützt. Ein Meningeom ist allgemein ein sporadischer solitärer Tumor. Multiple und familiäre Fälle sind sehr selten und meistens mit (hereditärer) NF2 assoziiert (Zang, 2001). Die in 13 publizierten Fällen bei multiplen Meningeomen durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen ergaben in der Mehrzahl NF2-Mutationen und LOH auf Chromosom 22. Die Chromosom-22-Aberration wurde auch als ein frühes Ereignis in der Tumorgenese der multiplen Meningeome postuliert (Lomas et al, 2002). In dieser Arbeit konnte LOH nur bei zumindest einem der untersuchten Marker für 67% der multiplen Meningeome auf Chromosom 22 nachgewiesen werden, was der Hypothese nicht widerspricht. Jedoch war die LOH-Rate im Bereich der untersuchten chromosomalen Regionen nicht vergleichbar hoch wie bei fibroblastischen (75%) und transitionalen Meningeomen (80%). Ursächlich hierfür ist u.a. möglicherweise die uneinheitliche Definition der multiplen Meningeome in der veröffentlichten Literatur. Hier finden sich multiple Meningeome aus Dissemination nach chirurgischem Eingriff, aus durch Subarachnoida metastasierendem initial solitärem gutartigem oder bösartigem Meningeom und auch multiple Meningeome mit einem multifokalen Ursprung, als eine atypische Form der NF2 (von Deimling et al, 1995, Drouet et al, 2001).

Die meisten Meningeome sind langsam wachsende gutartige Tumoren, die histologisch dem WHO Grad I entsprechen. Lediglich wenige Meningeome zeigen eine Progression zu anaplastischen Tumoren (WHO Grad II-III) und neigen zu lokalen Rezidiven nach kompletter Resektion (Louis et al, 2000). Die Chromosom-22-Aberration ist ein frühes Ereignis in der

Tumorgenese von Meningeomen (Dumanski et al, 1987, Seizinger et al, 1987). Bei der malignen Meningeom-Progression zu atypischen Meningeomen und anaplastischen Meningeomen nahm die LOH-Rate im Bereich der untersuchten chromosomalen Regionen auf Chromosom 22 mit 70% (7/10), bzw. 89% (8/9) im Vergleich zu denjenigen bei fibroblastischen und transitionalen Meningeomen nicht offenbar zu. Die Entstehung der Meningeome und ihre Progression zur Malignität sind ein mehrstufiger Prozess, der mit einer Anhäufung genetischer Mutationen an spezifischen Loci vergesellschaftet ist. Zusätzlich zum Verlust von 22q beim atypischen und anaplastischen Meningeom nimmt die Häufigkeit an chromosomalen Verlusten auf 1p, 6q, 10p, 10q, 14q und 18q sowie ein Zugewinn an Chromosomen (Polysomie) vom atypischen zum anaplastischen Meningeom zu (Simon et al, 1995, Weber et al, 1997, Boström et al, 2001, Dezamis et al, 2003). Dementsprechend fand sich in dieser Arbeit LOH auf Chromosom 16 bei zumindest einem der untersuchten Marker in 20% (1/5) bei den atypischen Meningeomen und in 38% (3/8) bei den anaplastischen Meningeomen, (eine Aussage für benigne Meningeome verbietet sich bei diesbezüglich lediglich zwei informativen Patienten). Somit bestätigt diese Arbeit die o.g. Ergebnisse aus der Literatur: Das Chromosom 16 ist an der malignen Progression der Meningeome nicht beteiligt.

LOH-Untersuchungen bzgl. der Beteiligung weiterer Chromosomen an einer malignen Progression atypischer und anaplastischer Meningeome gehörten nicht zu dieser Arbeit, wurden aber von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden LOH-Untersuchungen auf Chromosom 22 auch in anderen Hirntumoren durchgeführt: Bei seltenen Hirntumoren ist jedoch eine valide Aussage aufgrund der geringen Untersuchungszahl nicht möglich. Bis auf GBM fanden sich in weniger als 20% LOH in den übrigen Hirntumoren. In den hier untersuchten Hirntumoren spielt das NF2-Gen anhand der ermittelten Daten keine nennenswerte Rolle. Es ergab sich kein Hinweis auf ein neues TSG auf Chromosom 22. Allerdings erlaubt die geringe Zahl von nur fünf verwendeten Markern noch nicht den Ausschluss kleinerer Deletionen, welche zwischen den Markern liegende Chromosomenbereiche betreffen können.

5.2. Glioblastoma multiforme (GBM)

Glioblastome sind die häufigsten und zugleich bösartigsten menschlichen Hirntumoren (WHO Grad IV) (Ohgahi et al, 2005). Man unterscheidet das primäre hochmaligne GBM IV-de novo ohne klinischen und histopathologischen Beweis einer wenig malignen Vorläuferläsion- vom sekundären GBM IV, das sich aus einer Progression eines ursprünglich höher differenzierten

Astrozytoms niedriger Malignität oder einem anaplastischen Astrozytom entwickelt (Tohma et al, 1998).

Eine japanische Arbeitsgruppe führte eine LOH-Analyse mittels 31 polymorpher Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 22q im Astrozytom WHO Grad II, Astrozytom WHO Grad III und primären und sekundären GBM WHO Grad IV durch. Durch Nutzung einer mehr als sechsfach höheren Anzahl an Markern im Vergleich zu dieser Arbeit wurde LOH auf einem Locus oder mehreren Loci in 41% (26/64) des primären und in 82% (23/28) des sekundären GBM festgestellt. Insbesondere zeigten die sekundären GBM doppelt so häufig LOH, wie die primären. Außerdem fanden sich 22 von 23 Deletionen der sekundären GBM in der gleichen umschriebenen Region von 22q12.3, einer Region in welcher das Gen des Human-Gewebe-Inhibitors Metalloproteinase-3 (TIMP-3) lokalisiert ist (Nakamura et al, 2005). Im Gegensatz hinzu zeigte sich in dieser Arbeit nur bei 25% der GBM WHO Grad IV LOH auf Chromosom 22 bei zumindest einem der untersuchten Marker. Dieser scheinbare Widerspruch des hier nur relativ geringen Anteils der LOH's auf Chromosom 22 lässt sich durch folgende zwei Befunde erklären: Erstens standen nur wenige Untersuchungsmarker auf q22 zur Verfügung. Zweitens war der Anteil primärer GBM im Unterschied zu sekundären GBM unter den insgesamt untersuchten 81 GBM vergleichsweise hoch. Die unterschiedliche Molekulargenese der primären und sekundären GBM wird hierbei auch deutlich: In der Regel kommen primäre GBM bei älteren Patienten vor und zeigen typischerweise LOH auf Chromosom 10q und andere genetische Veränderungen, wie z.B. EGFR-Amplifikationen oder -überexpressionen, selten Mutationen des TP53-Gens, Deletionen des p16INK4a-Gens und Mutationen des PTEN-Gens. Sekundäre GBM kommen dagegen zumeist bei jüngeren Patienten vor und zeigen häufig Mutationen des TP53-Gens und LOH 10q (von Deimling et al 1993, Rasheed et al, 1992, Ng et al, 1998, Tohma et al, 1998, Benjamin et al, 2003, Ohgaki et al, 2005). Gemeinsam beim primären und sekundären GBM kommt LOH auf Chromosom 10q, distal zum PTEN Locus, vor, wo ein putatives Suppressorgen auf 10q25-qter für den Glioblastom-Phänotyp verantwortlich sein könnte (Rasheed et al, 1992, Fults et al, 1993, Ohgaki et al, 2005). Zusätzlich finden sich beim primären GBM häufig Mutationen des PTEN-Gens. Im Gegensatz hierzu weist das sekundäre GBM selten Mutationen des PTEN-Gens auf. Diese Beobachtung unterstützt das Konzept, dass sich primäre und sekundäre GBM unabhängig voneinander aus einer genetischen Vorstufe entwickeln (Tohma et al, 1998). Unter o.g. Bedingungen der japanischen Arbeitsgruppe wurde LOH auf einem Locus oder mehreren Loci in 33% (12/36) des Astrozytoms WHO Grad II und in 40% (4/10) des Astrozytoms

WHO Grad III nachgewiesen, während in dieser Arbeit LOH in 15% des Astrozytoms WHO Grad II und 25% des Astrozytoms WHO Grad III bei jeweils zumindest einem der untersuchten Marker vorlag. LOH bei Astrozytom II/III zeigte sich in dieser Arbeit verglichen mit der japanischen Arbeitsgruppe um etwa die Hälfte seltener. Die o.g. erste Erklärung gilt auch hierfür. TIMP-3 könnte als putatives TSG bezeichnet werden und erscheint ein relevanter Faktor bei der malignen Progression des sekundären GBM zu sein (Nakamura et al, 2005).

Dahingegen ergaben sich jedoch keine Hinweise einer Involvierung des NF2-Gens auf Chromosom 22q-12.2 in der Tumorgenese der GBM, obwohl NF2-Patienten ein erhöhtes Risiko der Entwicklung eines Glioms aufweisen (Watkins et al, 1996, Oskam et al, 2000).

In einem LOH-Studium zeigte GBM die größten Verluste an 1p, 6q, 8p, 9p, 10p, 10q, 11p, 13q, 17p, 17q, 18p, 18q, und 19q (Wooten et al, 1999). In dieser Arbeit konnte LOH bei zumindest einem der untersuchten Marker in nur 13% der Glioblastome auf Chromosom 16 nachgewiesen werden. Somit stimmt diese Arbeit mit der Literatur überein: Das Chromosom 16 ist in der Entstehung bzw. malignen Progression der Glioblastome nicht beteiligt.

5.3. Tuberöse Sklerose (TSC)

Die LOH-Untersuchungen auf Chromosom 16 waren aufgrund des bekannten TSG TSC2 von Bedeutung. Noch nicht bekannt ist, ob das TSC2 an der Entstehung bzw. Progression der untersuchten Hirntumoren beteiligt ist, oder ob ein noch unbekanntes TSG auf Chromosom 16 vorliegt.

Von 20 informativen Metastasen wiesen sieben (35%) LOH auf. Die LOH-aufweisenden Hirnmetastasen hatten ihren Ursprung in Mamma-, Prostata- und hepatozellulärem Karzinom. Eine Arbeitsgruppe aus Bonn zeigte die hohe Inzidenz der Allelverluste bei Metastasen eines Mammakarzinoms (70%) in einer Studie an mehr als 100 Patienten und lieferte den Beweis dafür, dass ein neues putatives TSG auf Chromosom 15q14 für die Metastasen im Spätstadium des Mammakarzinoms verantwortlich ist (Wick et al, 1996). In einer anderen Studie, in der sich eine signifikante Assoziation von LOH (47%) auf Chromosom 12 und einem organmetastasierenden Prostatakarzinom zeigte, wurde die Inaktivierung des Gens auf chromosomalem Abschnitt 12p12-13 in Bezug auf die Entstehung der Prostatametastasen als zumindest teilursächlich angeschuldigt (Kibel et al, 2000). In einer weiteren Studie ist die minimale chromosomale Deletion auf 8p23.1-22 mit einem metastasierenden hepatozellulärem Karzinom assoziiert (Lu et al, 2007). In den hier untersuchten Hirnmetastasen aus Mamma-, Prostata- und hepatozellulärem Karzinom (mit einer LOH-Rate

von 35%) spielt das Chromosom 16 für die Metastasierung offenbar keine spezifische Rolle, was auch mit den Ergebnissen der o.g. Literatur übereinstimmt. Lediglich das auf 16q22.1 gelegene E-cadherin-Gen wurde als ein TSG beim lobulären Mammakarzinom als primärem Tumor in einer LOH-Studie und Mutationsanalyse identifiziert (Bex et al, 1995, Cleton-Jansen et al, 2001). Ebenfalls identifiziert wurde der sehr häufig vorkommende LOH auf Chromosom 16q, welcher mit Rezidiv bei primärem Prostatakarzinom signifikant assoziiert ist (Harkonen et al, 2005). Auch LOH auf Chromosom 16q ist häufig mit einem hepatozellulären Karzinom assoziiert. Das E-cadherin-Gen ist bedeutsam für Tumorwachstum und -ausbreitung innerhalb der Leber beim hepatozellulären Karzinom (Lin et al, 2005, Wei et al, 2002).

In dieser Arbeit wurde die LOH-Untersuchung auf Chromosom 16 in verschiedenen Hirntumortypen mittels fünf Markern durchgeführt. Vier Hämangioperizytome wurden untersucht, drei davon waren informativ, mit Nachweis von LOH in zweien. In der Literatur wurden homozygote Deletionen des p16INK4a-Gens auf Chromosom 9 in etwa 25% (7/28) der primären Hämangioperizytome beschrieben (Ono et al, 1996). Da die untersuchte Zahl dieser seltenen Tumoren in dieser Arbeit so gering ist, ist das Ergebnis nicht aussagekräftig.

In den restlichen untersuchten Hirntumoren fanden sich jeweils weniger als 20% LOH's. Somit ergab diese Arbeit keinen sicheren Hinweis für eine Beteiligung von Chromosom 16 an der Entstehung und/oder malignen Progression der Hirntumoren.

Patienten mit TSC weisen ZNS-Beteiligungen in Form kortikaler Tubera, subependymaler Knoten und Riesenzellastrozytomen auf. In dieser Arbeit zugrundeliegenden Patientenkollektiv gab es jedoch keinen Tumor des ZNS bei Patienten mit TSC. Allelverluste finden sich häufig in TSC-assoziierten renalen Läsionen, kardialen Rhabdomyomen, und selten in kortikalen Tubera. Möglicherweise entsteht der Hirntumor hier durch andere Pathomechanismen als in der Niere und im Herzen (Henske et al, 1996, Wolf et al, 1996).

6. Zusammenfassung

Bei der Tumorbildung spielt die Inaktivierung von TSG eine zentrale Rolle. Ein gehäuftes Auftreten von Allelverlusten (LOH) in spezifischen chromosomalen Lokalisationen in einem Tumor wird als wichtiger Hinweis auf ein TSG gesehen. Obwohl bereits viele Tumorsuppressorgene -wie NF1/2, TSC1/2, RB1, TP53, PTEN u.a.- bekannt sind, sind sicher noch zahlreiche solche Gene zu entdecken.

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil eines großen Projektes, in welchem Untersuchungen zu Allelverlusten in sämtlichen 46 humanen Chromosomen an ca. 400 Tumoren des ZNS durchgeführt wurden. Die ca. 400 Tumoren wurden anhand von je 5 polymorphen Mikrosatellitenmarkern der Chromosomen 22 und 16 auf LOH untersucht.

Das Meningeom ist ein Tumor, der mit der Neurofibromatose Typ 2 (NF2) assoziiert ist. Mutationen des NF2-Gens (Lokalisation: Chromosom 22q12.2) wurden in sporadischen Meningeomen gefunden und sind mit LOH auf dem Chromosom 22 assoziiert. Das NF2-Gen codiert ein Protein, Merlin, das aufgrund von Sequenzhomologien der Protein-4.1-Familie zugeordnet ist. Die hemmende Wachstumsaktivität von Merlin ist abhängig von spezifischer Interaktion mit CD44, einem Zelloberflächen-Rezeptor für Hyaluronsäure. Die Inaktivierung von Merlin fördert das Zellwachstum. Fast alle NF2-Mutationen führen zum Verlust der Merlin-Expression. Zusätzlich fand sich eine epigenetische Veränderung durch eine Hypermethylierung im Promotorbereich des NF2-Gens in sporadischen Meningeomen.

86 von etwa 400 Tumoren des ZNS in der untersuchten Serie waren Meningeome. Hierbei waren 60 von 86 Meningeomen informativ (heterozygot) bei zumindest einem der untersuchten Marker auf dem Chromosom 22. Es konnte ein Unterschied der histologischen Subtypen hinsichtlich der LOH-Häufigkeit festgestellt werden: Fibroblastische Meningeome 75% (6/8), transitionale Meningeome 80% (12/15), meningotheleale Meningeome 36% (9/25). Das Ergebnis deutet darauf hin, daß Mutationen des NF2-Gens eine wichtige Rolle in der Entstehung der fibroblastischen und transitionalen Meningeome spielen, während in der Tumorgenese der meningothelealen Meningeome das NF2-Gen nicht beteiligt ist, wie unsere Arbeitsgruppe belegen konnte.

Bei der malignen Meningeom-Progression nahm die LOH-Rate im Bereich der untersuchten chromosomalen Regionen auf Chromosom 22 im Vergleich zu denjenigen bei fibroblastischen und transitionalen Meningeomen offenbar nicht signifikant zu: Atypische Meningeome 70% (7/10), anaplastische Meningeome 89% (8/9).

In dieser Arbeit zeigte sich nur bei 25% der GBM WHO Grad IV LOH auf Chromosom 22 bei zumindest einem der untersuchten Marker. Diese relativ niedrige LOH-Häufigkeit, insbesondere beim GBM, widerspricht dem Ergebnis eines deutlich häufigeren LOH einer anderen Arbeitsgruppe. Die Ursache dieser diskrepanten Ergebnisse ist hauptsächlich auf die hier limitierte Anzahl der untersuchten Marker zurückzuführen, sodass kleinere Deletionen, z.B. des TIMP3-Gens, möglicherweise nicht erfasst wurde.

LOH-Untersuchungen des Chromosoms 16 sind nicht nur wegen des dort lokalisierten TSC2-Gens bei Untersuchungen der Hirntumoren von Bedeutung, sondern auch wegen der erhöhten Inzidenz dieser „LOH 16“ in anderen Tumoren, z.B. beim Mammakarzinom, Prostatakarzinom und hepatozellulären Karzinom.

In dieser Arbeit gab es keine mit TSC assoziierten Hirntumoren, es wurden jedoch LOH 16-Untersuchungen in verschiedenen Hirntumortypen mittels 5 Markern durchgeführt. Am häufigsten fand sich LOH 16 im Hämangioperizytom. In diesen seltenen Tumoren gab es bei zwei von drei informativen Patienten ein LOH 16 festzustellen, was allerdings bei so einer geringen Tumorzahl jedoch nicht statistisch aussagekräftig ist.

Hirnmetastasen von dem Leber-, Prostata- und Mammakarzinomen zeigen zusammengefasst in 35% der Fälle (7/20) LOH 16 und in 39% (7/18) der Fälle LOH 22. Bei der geringen Zahl der untersuchten Hirnmetastasen können jedoch auch hier keine verallgemeinernden Schlüsse gezogen werden.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit die Frequenz chromosomaler Verluste in einem weiten Spektrum intrakranieller, intraspinaler und intraduktaler Tumoren ermittelt.

7. Hinweis

Teile der hier vorgelegten Dissertationsschrift bezüglich des Nachweises von LOH auf Chromosom 22 bei Meningeomen sind in die Publikation: Quantitative analysis of neurofibromatosis type 2 gene transcripts in meningiomas supports the concept of distinct molecular variants von Wellenreuther et al in Jahr 1997 eingeflossen, bei der ich Koautor bin.

8. Literaturverzeichnis

- Bai Y**, Liu YJ, Wang H, Xu Y, Stamenkovic I, Yu Q. Inhibition of the hyaluronan-CD44 interaction by merlin contributes to the tumor-suppressor activity of merlin. *Oncogene* 2007; 26: 836-850.
- Baker SJ**, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; 249: 912-915.
- Barbacid M**. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 779-827.
- Bender B**, Wiesler OD, von Deimling A. A device for processing large acryamidegels. *Biotechniques* 1994, 16: 204-206.
- Benjamin R**, Capparella J, Brown A. Classification of glioblastoma multiforme in adults by molecular genetics. *Cancer J* 2003; 9: 82-90.
- Berx G**, Cleton-Jansen AM, Nollet F, De Leeuw WJ, d van V, Cornelisse C, Van Roy F. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 1995, 14: 6107-6115.
- Boström J**, Meyer-Puttitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP, Reifenberger G. Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol* 2001; 159: 661-669.
- Brook-Carter Phillip T**, Peral Pelen, Ward Christopher J, Thompsn Peter, Hughes Jim, Maheshwar Magitha M, Nellist Mark, Gamble Vicki, Sampson Harris Julian R. Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease—a contiguous gene syndrome. *Nature Genetics* 1994; 8.
- Canhoto AJ**, Chestukhin A, Litovchick L, DeCaprio JA. Phosphorylation of the retinoblastoma-related protein p130 in growth-arrested cells. *Oncogene* 2000; 19: 5116-5122.
- Carsillo T**, Astrinidis A, Henske EP. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangiomyomatosis. *Proc Nat Acad Sci* 2000; 97: 6085-6090.
- Carter BS**, Ewing CM, Ward WS, Treiger BF, Aalders TW, Schalken JA, Epstein JI, Isaacs WB. Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 8751-8755.
- Castro M**, Shepherd CW, Gomez MR, Lie JT, Ryu JH. Pulmonary tuberous sclerosis. *Chest* 1995; 107: 189-195.
- Chen J**, Lin J, Levine AJ. Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol Med* 1995; 1: 142-152.
- Cleton-Jansen AM**, Callen DF, Seshadri R, Goldup S, Mccallum B, Crawford J, Powell JA, Settasatian C, van Beerendonk H, Moerland EW, Smit VT, Harris WH, Millis R, Morgan NV, Barnes D, Mathew CG, Cornelisse. Loss of heterozygosity mapping at chromosome arm 16q in 712 breast tumors reveals factors that influence delineation of candidate regions. *Cancer Res* 2001; 61: 1171-1177.
- von **Deimling A**, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Hoell T, Chung RY, Martuza RL, Schoenfeld DA, Yasargil MG, Wiestler OD, et al. Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 1992; 77: 295-301.
- von **Deimling A**, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiesler OD, Seizinger BR, Louis DN. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathology* 1993; 3: 19-26.
- von **Deimling A**, Kraus JA, Stangl AP, Wellenreuther R, Lenartz D, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD. Evidence for subarachnoid spread in the development of multiple meningiomas. *Brain Pathol*

1995; 5: 11-14.

Deppert W. Schutzengel oder Beelzebub? Die zwei Seiten des Tumorsuppressors. *Biospektrum* 2004; 10: 498-500.

Dezamis E. Sanson M. The molecular genetics of meningiomas and genotypic/phenotypic correlations. *Rev Neurol Paris* 2003; 159: 727-738.

Drouet A, Guilloton L, Pelissou-Guyotat I, Saint-Pierre G, Ribot C, Sindou M, Deruty R. Multiple intracranial and intraspinal meningiomas successively discovered in the absence of neurofibromatosis: 2 cases. *Rev Neurol Paris* 2001; 157: 1264-1269.

Dumanski JP, Carlbom E, Collins VP, Nordenskjöld M. Deletion mapping of locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Pro Natl Acad Sci* 1987; 84: 9275-9279.

Evans DGR, Huson SM, Donnai D, Neary W, Blair V, Teare D, Newton V, Strachan T, Ramsden R, Harris R. A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness and confirmation of maternal transmission effect on severity. *J Med Genet* 1992; 29: 841-846.

Fryer AE, Chalmers A, Connor JM, Fraser I, Povey S, Yates AD, Yates JRW, Osborne JP. Evidence that the gene for tuberous sclerosis is on chromosome 9. *Lancet* 1987; 1: 659-661.

Fults D, Pedone C. Deletion mapping of the long arm of chromosome 10 in glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 7: 173-177.

Gottschalk AR, Basila D, Wong M, Dean NM, Brandts CH, Stokoe D, Haas-Kogan DA. p27Kip1 is required for PTEN-induced G1 growth arrest. *Cancer Res* 2001 Mar 1; 61: 2105-2111.

Green Andrew J, Smith Moyra, Yates John RW. Loss of heterozygosity on chromosome 16p13.3 in hamartomas from tuberous sclerosis patients. *Nature Genetics* 1994; 6.

Gutmann DH, Donahoe J, Arie Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, Rempel SA, Jorge A, Gutierrez JA, Newsham IF. Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Human Molecular Genetics* 2000; 9: 1495-1500.

Harkonen P, Kyllonen AP, Nordling S, Vihko P. Loss of heterozygosity in chromosomal region 16q24.3 associated with progression of prostate cancer. *Prostate* 2005; 62: 267-274.

Henske EP, Scheithauer BW, Short M.P, Wollmann R, Nahmias I, Hornigold N, van Slechtenhorst M, Welsh CT, Kwiatkowski. Allelic Loss is Frequent in Tuberous Sclerosis Kidney Lesions but Rare in Brain Lesions. *Am. J. Hum Genet* 1996; 59: 400-406.

Huber C, Fischer T. Spezifische Tumor- und Leukämitherapie mit Signalübertragungshemmern. *Deutsches Ärzteblatt* 2001; 98: A-2345 / B-2028 / C-1880.

Inoki K, Michael N Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nature Genetics* 2005; 37: 19 – 24.

Kandt RS, Haines JL, Smith M, Northrup H, Gardner RJM, Short MP, Dumars K, Roach ES, Steingold S, Wall S, Blanton SH, Flodman P, Kwiatkowski DJ, Jewell A, Weber JL, Roses AD, Pericak-Vance MA. Linkage of an important gene locus for tuberous sclerosis to a chromosome 16 marker for polycystic kidney disease. *Nature genetics* 1992 Sept; 2.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-6311.

Kibel AS, Faith DA, Bova GS, Isaacs WB. Loss of heterozygosity at 12P12-13 in primary and metastatic

prostate adenocarcinoma *J Urol*. 2000; 164: 192-196.

Lamszus K, Vahldiek F, Mautner VF, Schichor C, Tonn J, Stavrou D, Fillbrandt R, Westphal M, Kluwe L. Allelic losses in neurofibromatosis 2-associated meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 504-512.

Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 1987; 235: 1394-1399.

Lekanne-Deprez R. H., Riegmann, P. H, van Drunen, E, Warringa, U. L, Groen, N. A, Stefanko, S. Z, Koren, J. W, Avezaat, C. J. J, Mulder, G. H, Zwarthoff, E. C. Hagemeyer, A. Cloning and characterization of MN1, a gene from chromosome 22q11, which is disrupted by a balanced translocation in a meningioma. *J. Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 224-235.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science* 1997; 275.

Lin YW, Lee HS, Chen CH, Huang GT, Lee PH, Sheu JC. Clonality analysis of multiple hepatocellular carcinomas by loss of heterozygosity pattern determined by chromosomes 16q and 13q. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 536-546.

Listernick R, Charrow J, Greenwald M, Mets M. Natural history of optic pathway tumors in children with neurofibromatosis type 1: a longitudinal study. *J Pediatr* 1994; 125: 63-66.

Lomas J, Bello MJ, Alonso ME, Gonzalez-Gomez P, Arjona D, Kusak ME, de Campos JM, Sarasa JL, Rey JA. Loss of chromosome 22 and absence of NF2 gene mutation in a case of multiple meningiomas. *Hum Pathol* 2002 Mar; 33(3): 375-378.

Lomas J, Bello MJ, Arjona D, Alonso ME, Martinez-Glez V, Lopez-Marin I, Aminosos C, de Campos JM, Isla A, Vaquero J, Rey JA. Genetic and epigenetic alteration of the NF2 gene in sporadic meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 42: 314-319.

Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ. Meningiomas. Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: Kleihues, 2000: 176-184.

Lu T, Hano H. Identification of minimal regions of deletion at 8p23.1-22 associated with metastasis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2007; 27: 782-790.

Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005; 121: 179-193.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni Jr JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250: 1233-1238.

Mandahl N, Orndal C, Heim S, Willén H, Rydholm A, Bauer HC, Mitelman F. Aberrations of chromosome segment 12q13-15 characterize a subgroup of hemangiopericytomas. *Cancer*. 1993; 71: 3009-3013.

Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; 64: 313-326.

Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 1990; 63: 843-849.

Meese E, Blin N, Zang KD. Loss of heterozygosity and the origin of meningioma. *Hum Genet* 1987; 77: 349-

351.

Morrison H, Sherman LS, Legg J, Banine F, Isacke C, Haipek CA, Gutmann DH, Ponta H, Herrlich P. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev* 2001; 15: 968-980.

Ng HK, Lam PY. The molecular genetics of central nervous system tumors. *Pathology* 1998; 30: 196-202.

Nakamura M, Ishida E, Shimada k, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, Konishi N. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2005; 85: 165-175.

Neumann HPH, Kandt RS: Klinik und Genetik der tuberösen Sklerose. *Dtsch Med Wschr* 1993; 118: 1577-1583.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342: 705-708.

Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 2005; 25: 1-7.

Ono Y, Ueki K, Joseph JT, Louis DN. Homozygous deletions of the CDKN2/p16 gene in dural hemangiopericytomas. *Acta Neuropathol* 1996; 91: 221-225.

Oskam NT, Bijleveld EH, Hulsebos TJ: A region of common deletion in 22q13.3 in human glioma associated with astrocytoma progression. *Int J Cancer* 2000; 85: 336-339.

Peyrard M, Fransson I, Xie, Y. G, Han, F. Y, Rutledge, M. H, Swahn, S, Collins, J., Dunham, I, Collins, V. P. Dumanski, J. P. Characterization of a new member of the human beta-adaptin gene family from chromosome 22q12, a candidate meningioma gene. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1393-1399.

Rasheed BK, Fuller GN, Friedman AH, Bigner DD, Bigner SH. Loss of heterozygosity for 10q loci in human gliomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 5: 75-82.

Riede UK, Schaefer HE. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart - New York: Thieme, 1993: 291.

Rouleau GA, Wertelecki W, Haines JL, Hobbs WJ, Trofatter JA, Seizinger BR, Martuza RL, Superneau DW, Conneally PM, Gusella JF. Genetic linkage of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* 1987; 329: 246-248.

Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B, Pulst SM, Lenoir G, Bijlsma E, Fashold R, Dumanski J, deJong P, Parry D, Eldridge R, Aurias A, Delattre O, Thomas G. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 1993; 363: 515-521.

Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjöld M, Collins VP, Dumanski JP, Rouleau GA. Evidence for the complete inactivation of the NF2-Gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nature Genetics* 1994; 6: 180-184.

Rutledge MH, Xie, YG, Han, FY, Shiraishi, M., Collins VP, Nordenskjöld, M, Dumanski, JP. Deletion on Chromosome 22 in Sporadic Meningioma. *Genes Chrom. Cancer* 1994; 10:122-130.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. 1989; Cold spring harbor laboratory press NY.

Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumoursuppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2954-2963.

Sato T, Seyama K, Fujii H, Maruyama H, Setoguchi Y, Iwakami S, Fukuchi Y, Hino O. Mutation analysis of the TSC1/2 genes in Japanese patients with pulmonary lymphangiomyomatosis. *J Hum Genet* 2002; 47: 20-28.

Schlegel J, Peraud A, Herms J. *WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems*. München: W.

Zuckschwerdt Verlag, 2004.

Seizinger BR, de la Monte S, Atkins L, Gusella JF, Martuza RL. Molecular genetic approach to human meningioma: Loss of genes on Chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 5419-5423.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704.

Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat S, Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p-53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 4495-4499.

Shimpuku G, Fujimoto K, Okazaki K. A case of Bannayan-Zonana syndrome. *Masui* 2005 May; 54: 535-537.

Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM Jr, Menon AG. Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 1995; 55: 4696-4701.

Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001 Mar 10; 264: 29-41.

Smolarek TA, Wessner LL, McCormack FX, Mylet JC, Menon AG, Henske EP. Evidence that lymphangiomyomatosis is caused by TSC2 mutations: chromosome 16p13 loss of heterozygosity in angiomyolipomas and lymph nodes from women with lymphangiomyomatosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 810-815.

Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, Deen DF, Berger MS, Pieper RO. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res* 2001; 61: 6674-6678.

Stemmer-Rachamimov AO, Xu L, Gonzalez-Agosti C, Burwick JA, Pinney D, Beauchamp R, Jacoby LB, Gusella JF, Ramesh V, Louis DN. Universal absence of merlin, but not other ERM family members, in schwannomas. *Am J Pathol* 1997; 151: 1649-1654.

Strachan T. Das menschliche Genom. Heidelberg Spektrum, 1994.

Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989; 246: 491-494.

van Tilborg AA, Morolli B, Giphart-Gassler M, de Vries A, van Geenen DA, Lurkin I, Kros JM, Zwarthoff EC. Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss. *J Pathol* 2006; 208: 564-573.

Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 684-689.

Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K, Haase VH, Ambrose CM, Munroe D, Bove C, Haines JL, Martuza RL, MacDonald ME, Seizinger BR, Short MP, Buckler AJ, Gusella JF. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 1993; 72: 791-800.

Ueki K, Wen-Bin C, Narita Y, Asai A, Kirino T. Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Res* 1999; 59:5995-5998.

Urban T, Lazor R, Lacronique J, Murriss M, Labrune S, Valeyre D, Cordier JF. Pulmonary lymphangioliomyomatosis: A study of 69 patients. Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies "Orphelines" Pulmonaires (GERM"O"P). *Medicine (Baltimore)* 1999; 78: 321-337.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-310.

Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A,

- Nicholson J, Mitchell AL, Brownstein BH, Collins FS: Type 1 neurofibromatosis gene. identification of a large transcript disrupted in three NF 1 patients. *Science* 1990; 249: 181-186.
- Wallace MR**, Andersen LB, Fountain JW, Odeh HM, Viskochil D, Marchuk DA, O'Connell P, White R, Collins FS. A chromosome jump crosses a translocation breakpoint in the von Recklinghausen neurofibromatosis region. *Genes Chromosomes Cancer* 1990; 2: 271-277.
- Wang SI**, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D, Parsons R. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Res* 1997; 57: 4183-4186.
- Watkins D**, Ruttledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Poisson M, Delattre JY, Rouleau GA. Loss of heterozygosity on Chromosome 22 in human gliomas does not inactivate the neurofibromatosis type 2 gene. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 92: 73-78.
- Weber RG**, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter P. Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: Toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 14719-14724.
- Weber HO**, Samuel T, Rauch P, Funk JO. Human p14(ARF)-mediated cell cycle arrest strictly depends on intact p53 signaling pathways. *Oncogene* 2002; 21: 3207-3212.
- Wei Y**, Van Nhieu JT, Prigent S, Srivatanakul P, Tiollais P, Buendia MA. Altered expression of E-cadherin in hepatocellular carcinoma: correlations with genetic alterations, beta-catenin expression, and clinical features. *Hepatology* 2002; 36: 692-701.
- Wellenreuther R**, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesch V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A. Analysis of the Neurofibromatosis 2 Gene Reveals Molecular Variants of Meningioma. *American Journal of Pathology* 1995; 4: 146.
- Wellenreuther R**, Waha A, Vogel Y, Lenartz D, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A. Quantitative analysis of neurofibromatosis type 2 gene transcripts in meningiomas supports the concept of distinct molecular variants. *Lab Invest* 1997; 77: 601-606.
- Weng LP**, Brown JL, Eng C. PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet.* 2001; 10: 599-604.
- Wertelecki W**, Rouleau GA, Superneau DW, Forehand LW, Williams JP, Haines JL, Gusella JF. Neurofibromatosis 2: Clinical and DNA Linkage Studies of a Large Kindred. *N Engl J Med* 1988; 319: 278-283.
- Wick W**, Petersen I, Schmutzler RK, Wolfarth B, Lenartz D, Bierhoff E, Hummerich J, Muller DJ, Stangl AP, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A. Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene* 1996; 12: 973-978.
- Wolf Hk**, Normann S, Green AJ, von Bakel I, Blümcke I, Pietsch T, Wiestler OD, von Deimling A. Tuberöse Sklerose-artige Läsionen in epileptogenem Neocortex weisen keinen Allelverlust im Bereich der TSC1- und TSC2-Regionen auf. *Verh Dtsch Ges Path* 1996; 80: 650.
- Wooten EC**, Fults D, Duggirala R, Williams K, Kyritsis AP, Bondy ML, Levin VA, O'Connell P. A study of loss of heterozygosity at 70 loci in anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme with implications for tumor evolution. *Neuro-oncol* 1999; 1: 169-176.
- Wozniak K**, Piaskowski S, Gresner SM, Golanska E, Bieniek E, Bigoszewska K, Sikorska B, Szybka M, Kulczycka-Wojdala D, Zakrzewska M, Zawlik I, Papierz W, Stawski R, Jaskolski DJ, Och W, Sieruta M,

Liberski PP, Rieske P. BCR expression is decreased in meningiomas showing loss of heterozygosity of 22q within a new minimal deletion region. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 183: 14-20.

Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993; 7: 1126-1132.

Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, et al. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 1990; 62: 599-608.

Zang KD. Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 93: 207-220.

Zankl, H, Zang, KD. Cytological and Cytogenetical Studies on Brain Tumors. IV. Identification of the Missing G Chromosome in Human Meningiomas as N0.22 by Flurescence Technique. *Humangenetik* 1972; 14: 167-169.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Andreas von Deimling danke ich für die stets wohlwollende Betreuung während der gesamten Arbeit.

Der gesamten Abteilung danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Frau Dr. Wellenreuther danke ich für die angenehme Zusammenarbeit.

Meinem Mann sei Dank für die technische Hilfe beim Erstellen der Arbeit.

Meinen Großeltern danke ich für Ihre Erziehung während der Kulturrevolution.

Ich bedauere sehr, daß meine Großeltern die Veröffentlichung dieser Arbeit nicht mehr erleben können.

10. Lebenslauf

Veröffentlichungen

1. Wellenreuther R, Waha A, Vogel Y, Lenartz D, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A. Quantitative analysis of neurofibromatosis type 2 gene transcripts in meningiomas supports the concept of distinct molecular variants. *Lab Invest* 1997; 77: 601-606.
2. Vogel Y, Tannapfel A, Rabsch W, Henning B. Cholangitis with hepatic microabscesses caused by *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Dtsch Med Wochenschr* 2007; 132: 1214-1218.
3. Vogel Y, Bous JC, Winnekendonk G, Henning BF. Tuberculous peritonitis in a German patient with primary biliary cirrhosis: a case report. *J Med Case Reports* 2008; 2: 32.
4. Vogel Y, Büchner N, Haverkamp T, Henning BF. Seltene Manifestation eines familiären Mittelmeerfiebers bei einem türkischen Patienten ohne Fieber bei unauffälliger Familienanamnese. *Dtsch Med Wochenschr* 2008 ; 133: 1621-1624.