

**Mutations- und Expressionsanalyse des  
*Patched 2 (PTCH2)*- Gens in meningealen und glialen  
Tumoren**

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

vorgelegt von  
Teresa Christina Paus  
aus Bonn

2007

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Pietsch
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Herrlinger

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2007

Aus dem Institut für Neuropathologie der Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. T. Pietsch

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

Meiner Familie



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Einführung .....</b>	<b>9</b>
1.1. Histopathologie und Klinik glialer Tumoren .....	9
1.1.1. Histopathologie und Klinik der astrozytären Tumoren .....	9
1.1.2. Histopathologie und Klinik der oligodendroglialen Tumoren .....	12
1.1.3. Histopathologie und Klinik der Mischgliome .....	14
1.2. Histopathologie und Klinik des Meningeoms .....	15
1.3. Molekularbiologische Modelle zur Pathogenese maligner Tumoren .....	17
1.3.1. Aktivierung von Protoonkogenen .....	18
1.3.2. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen .....	18
1.3.3. Funktionsverlust von DNS-Reparaturgenen .....	19
1.3.4. Der Sonic Hedgehog/Patched-Signaltransduktionsweg .....	20
1.4. Das <i>PTCH2</i> -Gen auf Chromosom 1p .....	22
1.5. Ziel dieser Arbeit .....	24
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.1. Untersuchungskollektiv .....	25
2.2. Geräte .....	29
2.3. Chemikalien und anderes Verbrauchsmaterial .....	30
2.4. Puffer und Lösungen .....	32
2.5. Isolierung von genomischer DNS .....	36
2.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	37
2.7. Agarose-Gelelektrophorese .....	44
2.8. SSCP-Analyse .....	44
2.9. Silberfärbung der Polyacrylamidgele .....	46
2.10. Bearbeitung der Fragmente mit aberrantem Migrationsverhalten .....	47
2.10.1. Isolierung mutierter Einzelstrang-DNS und Reamplifikation durch PCR .....	47
2.10.2. Aufreinigung der PCR-Produkte .....	47
2.11. DNS-Sequenzierung .....	48
2.12. cDNS-Synthese .....	49
2.13. Expressionsanalyse .....	50

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
3.1. Mutationsanalyse des <i>PTCH2</i> -Gens .....	52
3.1.1. SSCP-Analyse.....	52
3.1.2. Sequenzierung .....	53
3.1.3. Häufigkeit der Polymorphismen und Allelverteilung.....	62
3.2. Expressionsanalyse .....	63
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>66</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>72</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>90</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Astrozytom
AA	Acrylamid
ang	angiomatös
AO	anaplastisches Oligodendrogliom
AOA	anaplastisches Oligoastrozytom
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua deion.	deionisiertes Wasser
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
BA	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
° C	Grad Celsius
cDNS	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CGH	komparative genomische Hybridisierung
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethyl diamintetraacetat
fib	fibrös
g, g	Gramm, Wert der Schwerebeschleunigung ( $9,81m/s^2$ )
GBM	Glioblastoma multiforme
h	Stunde
ID-Nr.	Identifizierungsnummer
kb	Kilobase
Konz.	Konzentration
l	Liter
LOH	loss of heterozygosity, Verlust der Heterozygotität
Lsg.	Lösung
M	Meningeom
men	meningothelial
μ	Mikro
m	milli ( $10^{-3}$ )
mA	Milliampere
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min.	Minute
mRNS	Messenger- Ribonukleinsäure
n	nano ( $10^{-9}$ )
n.u.	nicht untersucht
NaOH	Natronlauge
O	Oligodendrogliom
OA	Oligoastrozytom
PBS	phosphat buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
r	Rezidiv

RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
SSCP	Single strand confirmation polymorphism
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris- Borsäure- EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetraethylmethyldiamin
trans	transitional
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

## **1. Einführung**

### **1.1. Histopathologie und Klinik glialer Tumoren**

Unter Gliomen wird die Gruppe von Hirntumoren zusammengefaßt, die aus Zellen der sogenannten Neuroglia hervorgehen. Zu den häufigen Formen der Gliome im Erwachsenenalter zählen astrozytäre und oligodendrogliale Tumoren und das Ependymom. Gliome sind in der Regel gekennzeichnet durch ein infiltratives Wachstum, hohe Rezidivneigung, sowie die Tendenz zu maligner Progression. Sie werden nach der WHO-Klassifikation für Gehirntumoren entsprechend ihrer Histogenese und biologischen Wertigkeit eingeordnet (Kleihues und Cavenee, 2000).

#### **1.1.1. Histopathologie und Klinik der astrozytären Tumoren**

Astrozytäre Tumoren umfassen eine große Gruppe von Neoplasien, die sich in der Lokalisation, Alters- und Geschlechtsverteilung, Wachstumsverhalten, morphologischen Kriterien, Progression und dem klinischen Verlauf unterscheiden. Allgemein kann man folgende Untergruppen unterscheiden: Zu der Gruppe der diffus infiltrierenden Astrozytome zählen das diffuse Astrozytom (WHO-Grad II), das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III), sowie das Glioblastoma multiforme mit verschiedenen Varianten (WHO-Grad IV). Demgegenüber stehen das pilozytische Astrozytom (WHO-Grad I) als vornehmlich kindlicher, bei entsprechender Lokalisation kurabler Tumor und seltene Entitäten, wie das pleomorphe Xanthoastrozytom, das desmoplastische infantile Astrozytom und das subependymale Riesenzellastrozytom. Die Graduierung der diffusen Gliome gemäß WHO-Klassifikation erfolgt anhand festgelegter Indikatoren für Anaplasie, wie Kernatypien, mitotische Aktivität, Zellularität, Gefäßproliferation und dem Vorliegen von Nekrosen.

Diffus infiltrierende Astrozytome haben einige Gemeinsamkeiten. Hierzu zählen das Vorkommen an jeder Stelle des ZNS mit Bevorzugung der Großhirnhemisphären, der Altersgipfel im Erwachsenenalter, ein großes Spektrum histopathologischer Differenzierungsformen und biologischen Verhaltens, sowie die diffuse Infiltrationsneigung.

Außerdem zeigen sie eine ausgeprägte Tendenz zur malignen Progression. Diffus infiltrierende Astrozytome sind mit mehr als 60% die häufigsten primären intrakraniellen Neoplasien des Erwachsenenalters.

Die Überlebensraten liegen für Astrozytome WHO-Grad II bei >5 Jahren, WHO-Grad III bei 2-5 Jahren und WHO-Grad IV < 1 Jahr (Burger et al., 1985, Daumas-Duport et al., 1988; Kim et al., 1991).

Die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung gilt als Risikofaktor für die Entstehung von Gliomen. So wurde beispielsweise bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) gezeigt, daß diese nach prophylaktischer ZNS-Bestrahlung im Rahmen der Therapie ein erhöhtes Risiko haben, diffus infiltrierende Astrozytome zu entwickeln (Brat et al., 1999; Brüstle et al., 1992; Cavin et al., 1990; Edwards et al., 1986; Salvati et al., 1991).

Astrozytome treten jedoch zumeist sporadisch, seltener im Rahmen angeborener Tumorsyndrome, wie dem Li-Fraumeni-Syndrom, Turcot-Syndrom, der tuberösen Sklerose oder der Neurofibromatose Typ 1 auf (Frappaz et al., 1999; Van Nielen und de Jong, 1999). Eine Reihe molekulargenetischer Veränderungen konnte bei astrozytären Tumoren identifiziert werden, die in der Entstehung oder auch Tumorprogression eine Rolle spielen. Hierzu gehören insbesondere *TP53*- Mutationen (Fults et al., 1992; Mercer et al., 1990; Sidransky et al., 1992; Van Meir et al., 1994; Von Deimling et al., 1992a; Wu et al., 1994). Weitere wichtige genetische Alterationen, die auch mit maligner Progression in Zusammenhang gebracht werden konnten, betreffen eine erhöhte PDGF-Expression (*platelet-derived growth factor*, Hermanson et al., 1992), *CDKN2a*- und *RB*-Mutationen (Henson et al., 1994; James et al., 1988), *CDK4*- Amplifikationen (Nishikawa et al., 1995; Reifenberger et al., 1994a), *PTEN*- Mutationen (*phosphatase and tensin homology*, Wang et al., 1997), LOH von 10q und 22q (Bigner und Vogelstein, 1990; James et al., 1988) und Mutationen von *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*, Fuller und Bigner, 1992) und *MDM2* (Biernat et al., 1997).

Diffuse Astrozytome (WHO-Grad II) umfassen ca. 10-15% der astrozytären Tumoren (Davis und Preston-Martin, 1998). Sie haben einen Inzidenzgipfel im 30.-40. Lebensjahr. Männer sind minimal häufiger betroffen als Frauen (1,18:1). Astrozytome sind primär in der weißen Substanz lokalisiert. Ca. zwei Drittel der Fälle treten supratentoriell auf, hier bevorzugt in Frontal- und Temporallappen. Ein Drittel liegt infratentoriell, insbesondere in Hirnstamm und Rückenmark.

Makroskopisch erscheinen diese Tumoren häufig homogen und umschrieben, infiltrieren jedoch diffus das umliegende Gehirnparenchym und bilden gelegentlich Zysten und Verkalkungen aus.

Histopathologisch sind diffuse Astrozytome zumeist aus gut differenzierten fibrillären oder gemistozytischen neoplastischen Astrozyten aufgebaut. Dazu kommt eine lose strukturierte, oft mikrozystische Tumormatrix. Die Zellularität ist mäßiggradig erhöht und vereinzelt lassen sich Kernatypien nachweisen. Generell fehlt eine signifikant erhöhte mitotische Aktivität, und Nekrosen oder mikrovaskuläre Proliferationen dürfen nicht nachweisbar sein. Immunhistochemisch läßt sich bei den diffusen Astrozytomen eine variabel ausgeprägte GFAP-Expression (*glial fibrillary acidic protein*) nachweisen.

Häufige klinische Initialsymptome sind epileptische Anfälle, Zeichen des erhöhten Hirndruckes oder auch Wesensveränderungen. Das mittlere Überleben liegt bei 6-8 Jahren und ist insbesondere durch die Rezidivneigung und Tendenz zur malignen Progression in ein anaplastisches Astrozytom bestimmt. Ein Rezidiv ist in 50-75% der Fälle mit einer Entdifferenzierung assoziiert. Niedriges Lebensalter des Patienten und eine ausgedehnte Tumorresektion sind mit verzögerter Rezidiv- und geringerer Progressionsneigung assoziiert (Peraud et al., 1998; Shafqat et al., 1999).

Der Altersdurchschnitt des anaplastischen Astrozytoms liegt etwas höher als beim diffusen Astrozytom und auch in Hinblick auf die maligne Progression zum Glioblastom nimmt das anaplastische Astrozytom eine Mittelstellung ein. Es kann sich typischerweise aus einem diffusen Astrozytom WHO-Grad II entwickeln. Eine *de novo* Entstehung ist selten. Diese Gruppe umfaßt ca. ein Drittel aller Astrozytome. Die Progression in ein sekundäres Glioblastom ist häufig. Anaplastische Astrozytome zeigen histopathologisch eine erhöhte Zellularität, sowie deutliche mitotische Aktivität und Kernatypien. Das Vorliegen von mikrovaskulärer Proliferation oder Nekrosen weist bereits auf das Vorliegen eines Glioblastoms hin. Eine GFAP-Expression ist häufig nachweisbar. Die Therapie besteht in der Resektion mit anschließender Bestrahlung und ggf. Chemotherapie. Das mediane Überleben liegt bei etwa 3 Jahren und ist ebenso insbesondere vom Zeitintervall bis zum Rezidiv mit maligner Progression bestimmt (Donahue et al., 1997).

Das Glioblastoma multiforme als Form der astrozytären Tumoren mit höchster Malignität ist der häufigste Gehirntumor des Erwachsenenalters (12-15% aller intrakraniellen Tumoren; 50-60% aller Astrozytome, Zülch, 1986). Glioblastome entstehen zumeist primär (*de novo*), seltener sekundär (Progression von niedriggradigerem Astrozytom) (Ohgaki et al., 2004). Neben ausgeprägten Kernatypien, hoher mitotischer Aktivität und schlechter Differenzierung der Tumorzellen, weisen die meisten Glioblastome eine starke Vaskularisierung auf und zeigen häufig Einblutungen und Nekrosen, welche als diagnostische Kriterien dienen. Häufig wachsen Glioblastome über den Balken in die kontralaterale Hemisphäre und zeigen das Bild eines sogenannten „Schmetterlings-Glioms“. Hämatogene Metastasierung hingegen ist extrem selten. Der Altersgipfel liegt bei 45-70 Jahren und Männer sind häufiger betroffen als Frauen (1,5:1) (Zülch, 1986). Die Prognose ist schlecht und insbesondere durch die unaufhaltsame Progression gekennzeichnet. Die Patienten sterben meist innerhalb von 9-12 Monaten (Scott et al., 1998). Therapeutisch wird, falls möglich eine Resektion bzw. ein Tumordebulking angestrebt, gefolgt von einer Bestrahlung ggf. kombiniert mit einer Chemotherapie.

### **1.1.2. Histopathologie und Klinik der oligodendroglialen Tumoren**

Oligodendrogliome sind in der Regel gut differenzierte, langsam wachsende, jedoch ebenfalls diffus infiltrierende Tumoren des mittleren Erwachsenenalters (50-60. Lebensjahr). Sie sind typischerweise in den Großhirnhemisphären lokalisiert und vorwiegend aus Zellen aufgebaut, die histopathologisch Merkmale der Oligodendroglia besitzen. Sie umfassen ca. 5-10% aller primären Hirntumoren und ca. 5-25% aller Gliome (Mork et al., 1985). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (2:1 bis 3:2).

Histologisch umfassen die oligodendroglialen Tumoren ein Spektrum von gut differenzierten bis zu anaplastischen Typen, welches zu einer Einteilung in WHO-Grad II für gut differenzierte und WHO-Grad III für die anaplastischen Oligodendrogliome führte. Das Grading dieser Tumoren ist ein signifikanter Prediktor in Bezug auf die Überlebensraten (Dehghani et al., 1998; Hagel et al., 1999; Wharton et al., 1998).

Oligodendrogliome entstehen in der Mehrheit supratentoriell und scheinen oft neuroradiologisch besser abgegrenzt.

Am häufigsten ist der Frontallappen betroffen (50-65%), aber auch Temporal-, Parietal- oder Okzipitallappen können in abfallender Häufigkeit befallen werden (Kros et al., 1994). Das Vorkommen im Bereich der hinteren Schädelgrube ist selten.

In etwa 50 bis über 80% der oligodendroglialen Tumoren findet man in molekulargenetischen Untersuchungen einen Allelverlust von 19q (Bello et al., 1995; Kraus et al., 1995; Reifenberger et al., 1994b; Von Deimling et al., 1992b). Am zweithäufigsten finden sich Allelverluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 mit Inzidenzen von 40 bis über 90% (Bello et al., 1994; Felsberg et al., 2004; Kraus et al., 1995; Reifenberger et al., 1994b). Häufig liegen diese Verluste auch kombiniert vor. Ein kleiner Anteil der Oligodendrogliome zeigt Mutationen im *CDKN2C*-Gen (*cyclin dependent kinase inhibitor gene*) auf 1p32 (Husemann et al., 1999; Pohl et al., 1999). Daneben lassen sich auch EGFR- und PDGF/PDGFR-Überexpressionen nachweisen (Reifenberger et al., 1996; Di Rocco et al., 1998).

Der Anteil der anaplastischen Tumoren unter allen Oligodendrogliomen liegt bei 20-51% (Nijjar et al., 1993). Neben den auch bei den WHO-Grad II Oligodendrogliomen vorkommenden Allelverlusten von 1p und 19q, findet man in den höhergradigen Tumoren auch LOH des kurzen Armes von Chromosom 9 und/oder Chromosom 10 (Reifenberger et al., 1994b; Wu et al., 1993).

Oligodendrogliome zeigen häufig Verkalkungen, zystische Veränderungen und Einblutungen. Sie können expansiv wachsen und auch zu einer Erosion des Schädelknochens führen.

Histopathologisch zeigen die Oligodendrogliome eine mäßige bis höhere Zellularität mit hellzelligen, honigwabenartigen Elementen. Oligodendrogliome können ein dichtes Netzwerk aus verzweigten Kapillaren enthalten. Es zeigen sich Mikrokalzifikationen und zystisch degenerative Veränderungen. Kernatypien und vereinzelte Mitosen können mit einem WHO Grad II vereinbart werden, wohingegen eine signifikante mitotische Aktivität, mikrovaskuläre Proliferation und Nekrosen bereits einen WHO-Grad III anzeigen.

Ein spezifischer diagnostischer immunohistochemischer Marker existiert nicht, aber Oligodendrogliome zeigen wie andere neuroektodermale Tumoren erhöhte Expressionen verschiedener glialer Proteine, wie beispielsweise des S-100-Proteins (Nakagawa et al., 1986).

Die klinischen Symptome sind meist unspezifisch. Oft zeigen die Patienten eine relativ lange Befundanamnese.

Im Vordergrund stehen hier Kopfschmerzen und epileptische Anfälle, welche in Zusammenhang mit einer diffusen Infiltration des Kortex stehen (Chin et al., 1980). Die operative Resektion ist, falls funktionell möglich, die Therapie der Wahl. Bei anaplastischen Tumoren schließt sich zumeist eine postoperative adjuvante Chemotherapie und/oder eine Radiotherapie an. Lokalrezidive sind sehr häufig und eine maligne Progression ist möglich. Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen bei ca. 50%, wobei das mediane postoperative Überleben von 3-5 Jahren reicht. Es konnte gezeigt werden, daß Tumoren, welche Allelverluste von 1p und/oder 19q zeigen, insgesamt eine bessere Prognose haben, da sie in der Regel auf die Chemotherapie deutlich besser ansprechen (Cairncross et al., 1998).

### 1.1.3. Histopathologie und Klinik der Mischgliome

Eine weitere Untergruppe der glialen Tumoren sind die sogenannten Mischgliome, die aus zwei unterschiedlichen neoplastischen Tumorzellarten bestehen. Hier sind in erster Linie das Oligoastrozytom (WHO Grad II) und das anaplastische Oligoastrozytom (WHO Grad III) zu nennen, welche oligodendrogliale und diffuse astrozytäre neoplastische Zellarten enthalten. Diese Komponenten erscheinen in der Regel gegeneinander abgegrenzt; sie können jedoch auch in durchmischter Form auftreten. Die Häufigkeiten in Tumorkollektiven glialer Tumoren variiert zwischen 1,8 und 19% (Helseth und Mork, 1989; Jaskolsky et al., 1987). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (1,7:1; Beckmann und Prayson, 1997). 30-50% der Oligoastrozytome zeigen LOH von 1p und 19q (Kraus et al., 1995; Maintz et al., 1997; Reifenberger et al., 1994b). Ungefähr 30% der Oligoastrozytome zeigen Mutationen im *TP53*- Gen und/oder LOH bei 17p, die auch häufig in Astrozytomen nachgewiesen werden (Maintz et al., 1997; Reifenberger et al., 1994b). Zusätzlich treten beim höhergradigen anaplastischen Oligoastrozytom auch LOH von 9p, 10p, 11p oder Mutationen im *CDKN2A*-Gen auf (Reifenberger et al., 1994b). Klinik, Lokalisation, mikroskopische Befunde und die Immunhistochemie unterscheiden sich nicht wesentlich von den reinen Tumorformen. Die Prognose der Oligoastrozytome entspricht weitgehend derjenigen von rein astrozytären Gliomen. So ist die Prognose des anaplastischen Oligoastrozytoms mit einer mittleren Überlebenszeit von 2,8 Jahren ungünstig, wenn auch nicht so kurz wie die des Glioblastoms. Die 5- bzw. 10-Jahresüberlebensraten beim anaplastischen Oligoastrozytom liegen bei 36% und 9% (Shaw et al., 1994).

## 1.2. Histopathologie und Klinik des Meningeoms

Meningeome sind im allgemeinen langsam wachsende benigne Tumoren des erwachsenen Menschen im Bereich der Dura mater und entstehen aus meningoethelialen (arachnoidalen) Zellen. Frauen sind häufiger betroffen als Männer (ca. 2:1). Meningeome stellen ca. 13-26% aller primären intrakraniellen Neoplasien dar (Lantos et al., 1996). Das Vorkommen multipler Meningeome findet sich häufig bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 2 (NF2). Atypische Meningeome umfassen 4,7-7,2% der Meningeome, während anaplastische Meningeome nur in ca. 1,0-2,8% der Fälle vorkommen. Die überwiegende Mehrheit der Meningeome entsteht intrakraniell, im Bereich der Orbita oder im Spinalkanal. Die intrakraniellen Tumoren liegen bevorzugt parasagittal im Bereich der Konvexität, oft in engem Kontakt zur Falx cerebri (Burger und Scheithauer, 1994). Andere häufige Lokalisationen sind im Bereich der Olfaktoriusrinne, der Keilbeinflügel, des Nervus opticus und parasellär. Spinale Meningeome finden sich am häufigsten im Thoraxbereich.

Makroskopisch stellen sich die Meningeome meist als scharf abgrenzbare, runde/lobulierte oder *en plaque* durabasierte Raumforderungen dar, die oft Verkalkungen aufweisen. Häufig kann man eine nicht-tumoröse Verdickung der Dura, das sogenannte „dural-tail“-Zeichen nachweisen. Eine Hyperostose der Kalotte bzw. auch Kalotteninvasion findet sich häufig, eine Invasion des Hirnparenchyms hingegen ist jedoch eher selten (Burger et al., 1991; Burger und Scheithauer, 1994; Lantos et al., 1996; Russell und Rubinstein, 1989).

Meningeome zeigen eine Vielzahl histopathologischer Subtypen. Am häufigsten sind hier, um nur einige zu nennen, das meningoetheliale, das fibröse, das angiomatöse und das transitionale Meningeom (alle WHO-Grad I). Daneben finden sich atypische Meningeome mit erhöhten Mitoseraten, Strukturverlust und erhöhter Zellularität, die einem WHO-Grad II entsprechen, und die anaplastischen (malignen) Meningeome (WHO-Grad III). Die Rezidivgefahr eines Meningeoms steigt mit dem Malignitätsgrad und anaplastische Meningeome können metastasieren.

Die meisten Meningeome zeigen eine Immunreaktivität mit Antikörpern gegen EMA (*epithelial membrane antigen*), die jedoch mit zunehmender Malignität abnimmt. Eine positive Reaktion auf Vimentin ist regelhaft für Meningeome.

Meningeome können durch Bestrahlung induziert werden, beispielsweise bei einer Niedrigdosisbestrahlung bei *Tinea capitis* (Harrison et al., 1991). Die bestrahlungsinduzierten Meningeome zeigen häufiger ein atypisches oder aggressives, z.T. multifokales Wachstumsverhalten mit hoher Proliferationsrate und treten in jüngeren Altersgruppen auf.

Meningeome kommen regelhaft im Rahmen der Neurofibromatose Typ 2 vor und zeigen hier eine Verbindung mit dem *NF2*-Locus auf Chromosom 22q. Es finden sich jedoch auch Familien mit dem gehäuften Vorkommen von Meningeomen ohne diese Grunderkrankung, so daß davon ausgegangen wird, daß noch weitere prädisponierende Loci existieren (Pulst et al., 1993).

Das Meningeom war eine der ersten Tumorentitäten, bei denen man zytogenetische Veränderungen nachweisen konnte. Hier sind insbesondere Verluste von Chromosom 22, dem kurzen Arm von Chromosom 1 und Chromosom 14 zu nennen (Boström et al., 1997; Kolles et al., 1995; Schneider et al., 1995; Zang, 1982). In etwa der Hälfte der Meningeome findet man in molekulargenetischen Untersuchungen einen Allelverlust von 22q12 (Dumanski et al., 1990). Zusätzlich zeigen atypische und anaplastische Meningeome häufig Allelverluste von 1p, 6q, 9q, 10q, 14q, 17p und 18q, so daß hier Gene vermutet werden, die eine Rolle bei der Meningeom-Progression spielen (Menon et al., 1997; Rempel et al., 1993). Bislang konnte jedoch nur das *NF2*-Gen auf 22q als ein spezifisches Tumorsuppressorgen identifiziert werden. Mutationen im *NF2*-Gen findet man in bis zu 60% der sporadischen Meningeome (Papi et al., 1995; Wellenreuther et al., 1995).

Viele, insbesondere kleine Meningeome bleiben asymptomatisch. Die typischen klinischen Beschwerden sind neben Kopfschmerz und epileptischen Anfällen, v.a. durch den Kompressionseffekt auf anliegende Strukturen je nach Lokalisation des Tumors bestimmt.

Die Therapie der Meningeome besteht in der operativen Resektion. Der Tumorgrad ist der hilfreichste histologische Prediktor für die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rezidives. Während die benignen Meningeome Rezidivraten von 7-20% haben, steigt die Rate bei den atypischen auf 29-40% und den anaplastischen Meningeomen bis zu 50-78% an (Maier et al., 1992; Perry et al., 1999). Patienten mit anaplastischen Varianten werden deshalb postoperativ einer Strahlentherapie zugeführt.

### 1.3. Molekularbiologische Modelle zur Pathogenese maligner Tumoren

Wachstum und Differenzierung von Zellen sind alternative zelluläre Programme, die durch genetische Regulationsmechanismen gesteuert werden. Im gesunden Gewebe werden Wachstum und Differenzierung von Zellen durch extra- und intrazelluläre Signale reguliert. Fehlfunktionen in sogenannten proliferationsassoziierten Genen können das Entstehen und Wachstum von Neoplasien verursachen. Hierbei unterliegt das Tumorstadium nicht mehr den physiologischen Kontrollmechanismen, sondern erfolgt autonom. Es wird davon ausgegangen, daß die Tumorentstehung ein mehrstufiger Prozeß ist, in deren Verlauf ein initiales Ereignis die folgenden begünstigt (Fearon und Vogelstein, 1990). Die verschiedenen Schritte umfassen die Tumor-Initiation, Tumor-Promotion, Tumor-Progression sowie gegebenenfalls die Metastasierung. Zum kompletten Kontrollverlust des physiologischen Zellzyklus bedarf es einer Reihe von Veränderungen in verschiedenen Genen, wobei gesichert ist, daß insbesondere Onkogene und Tumorsuppressorgene Ziele der Noxen sind, die Alterationen initiieren können (Böcker et al., 1997). Weitere identifizierte Faktoren, die für die Tumorentstehung eine Rolle spielen, sind Wachstumsfaktoren, Proliferationsmarker oder auch Zelladhäsionsmoleküle.

Für die Tumorentstehung entscheidende Gene lassen sich in drei Gruppen untergliedern: sogenannte Protoonkogene, Tumorsuppressorgene und DNS-Reparaturgene.

Durch molekulare Analysen konnten bereits eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die ursächlich an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligt sind.

Insgesamt geht man davon aus, daß zur kompletten Transformation und Progression in Tumoren, Defekte in verschiedenen Genen auftreten müssen und sowohl aktivierte Onkogene als auch inaktivierte Tumorsuppressorgene beteiligt sind.

### 1.3.1. Aktivierung von Protoonkogenen

Onkogene sind Gene, die auf die Förderung der Zellproliferation ausgerichtet sind. Ihre Expressionsprodukte steuern wesentliche physiologische Zellfunktionen wie Signalerkennung, Signaltransduktion oder Differenzierung. Aktive Onkogene entstehen aus zelleigenen Genen (Protoonkogenen) durch molekulargenetische Alterationen wie Translokationen, Mutationen oder Amplifikationen. Aktive Onkogene sind in der Lage, Zellen der Wachstumskontrolle zu entziehen und die veränderte Genkopie des Protoonkogens verhält sich dominant gegenüber der anderen. Das bedeutet, daß bereits die Mutation in einem der Allele eines Onkogens ausreicht, um das Wachstumsverhalten einer Zelle entscheidend zu verändern.

Als Beispiel für ein in Gliomen häufig aktiviertes Protoonkogen wäre beispielsweise das *EGF*(Epidermal Growth Factor)-*Rezeptor*-Gen zu nennen, dessen Produkt- der EGF-Rezeptor- eine Proteinkinase ist und bei Stimulation durch den Wachstumsfaktor EGF eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt. Amplifikationen und strukturelle Mutationen in diesem Gen konnten in Glioblastomen gehäuft nachgewiesen werden (Ekstrand et al., 1991; Wong et al., 1987).

### 1.3.2. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen

Im Gegensatz zu den Onkogenen werden unter Tumorsuppressorgenen die Gene zusammengefaßt, die unter physiologischen Bedingungen die Zellproliferation hemmen. Die Proteine der Tumorsuppressorgene haben wichtige regulatorische Funktionen bei Wachstum und Differenzierung von Zellen.

Die allgemeine Hypothese zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wurde erstmals von Knudson (1971) aufgrund epidemiologischer Studien bei Patienten mit Retinoblastom aufgestellt und konnte später durch molekulargenetische Analysen bestätigt werden. Tumorsuppressorgene vermögen über einen rezessiven Wirkungsmechanismus die maligne Transformation zu verhindern. Daher bedarf es zwei aufeinanderfolgender Mutationen, um ein Tumorsuppressorgen auszuschalten. In der Regel wird ein Allel durch eine kleinere genetische Veränderung, wie eine Punktmutation, und das andere durch eine größere molekulare Aberration, beispielsweise eine Deletion, in der Funktion eingeschränkt.

Letztere läßt sich molekulargenetisch als Verlust chromosomalen Materials, sogenannten Allelverlust (loss of heterozygosity; LOH) nachweisen.

Es können jedoch auch beide Allele durch eine homozygote Deletion verloren gegangen sein oder Mutationen in beiden Allelen auftreten. Außerdem kann die Expression von Tumorsuppressorgen durch epigenetische Mechanismen, wie z.B. die Hypermethylierung der Promotorregion negativ reguliert werden. Das gehäufte Auftreten von Allelverlusten in einem bestimmten chromosomalen Bereich gibt Hinweis auf ein dort lokalisiertes Tumorsuppressorgen.

Als Beispiel für ein Tumorsuppressorgen ist das *TP53*-Gen zu nennen, welches bei geschädigten Zellen die Apoptose hervorrufen kann. Mutationen und begleitende Allelverluste im *TP53*-Gen konnten in Astrozytomen gehäuft nachgewiesen werden (Wu et al., 1994).

### 1.3.3. Funktionsverlust von DNS-Reparaturgenen

Die Enzymprodukte von DNS-Reparaturgenen (*mismatch repair genes*; MMR) vermögen es, Veränderungen in der DNS, die durch exogene Noxen oder während der Replikationsphase entstanden sind, in einem gewissen Umfang zu korrigieren (Kolodner, 1995).

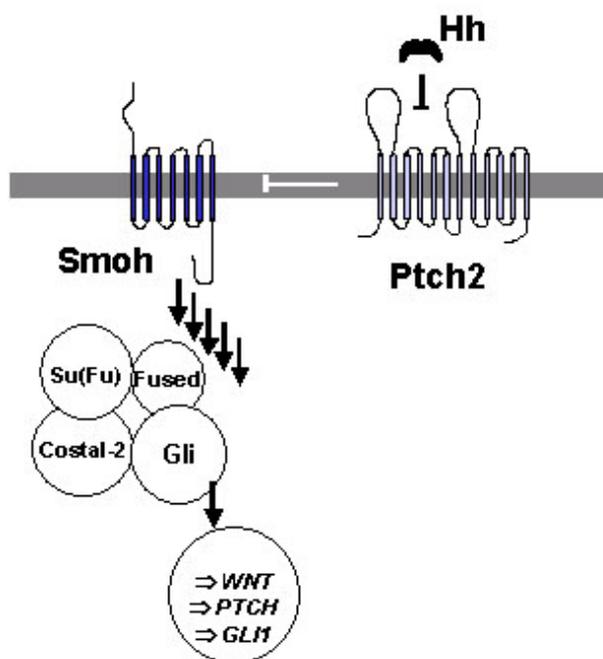
Der Reparaturmechanismus umfaßt mehrere Schritte. Zunächst wird die Stelle mit der geänderten Sequenz in der DNS lokalisiert und im Anschluß daran entfernt. Es folgt die Neusynthese eines komplementären DNS-Stranges (Rhyu, 1996). Ein Beispiel für eine Erkrankung, die durch den Funktionsverlust einzelner MMR-Gene hervorgerufen wird ist das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), auch Lynch-Syndrom genannt.

#### 1.3.4. Der Sonic Hedgehog/Patched-Signaltransduktionsweg

Der *Sonic Hedgehog/Patched*-Signaltransduktionsweg, der für zahlreiche Entwicklungsprozesse grundlegend ist, ist von der Fliege zu den Vertebraten konserviert (Goodrich et al., 1996; Hahn et al., 1996a; Hammerschmidt et al., 1997; Perrimon, 1995). Ein Hauptbestandteil dieses Signaltransduktionsweges ist das Genprodukt des *Patched*-Gens (*PTCH*), welches als Tumorsuppressorgen fungiert und einen Transmembranrezeptor für die Mitglieder der Hedgehog-Morphogenfamilie kodiert (Marigo et al., 1996; Stone et al., 1996). Diese sezernierten Proteine (Sonic-(Shh), Desert- (Dhh) und Indian-(Ihh) Hedgehog) sind an der Entwicklung und Ausbildung der Polarität und Segmentierung von *Drosophila* beteiligt (Bitgood et al., 1996; Perrimon, 1995; Vortkamp et al., 1996). Das humane Patched-Protein enthält 12 hydrophobe Transmembrandomänen und zwei hydrophile extrazelluläre Schleifen (Johnson et al., 1996). Durch die Bindung von Shh an Patched wird dessen inhibierende Wirkung auf das sieben Transmembrandomänen enthaltende Protein Smoothed (Smoh) aufgehoben (Goodrich et al., 1997). Ptch kopiert einen Membrantransporter; eine direkte Interaktion Ptch-Smoh scheint es nicht zu geben (Taipale et al., 2002). Smoh ist für die durch Shh ausgelöste Signalweitergabe verantwortlich. Im weiteren Verlauf wird das Signal auf einen weiteren Komplex übertragen. Dieser besteht aus der Serin/Threonin Kinase Fused (fu, Preat et al., 1990), dem Proteinsuppressor von Fused ([Su (Fu)], Monnier et al., 1998), dem Kinesin-ähnlichen Protein costal 2 (cos-2, Sisson et al., 1997) und einem Zinkfinger Transkriptionsfaktor Cubitus interruptus (ci, Orenic et al., 1990), der Homologie zur Vertebraten Gli-Proteinfamilie zeigt (Robbins et al., 1997). Aktivierung des Signalweges führt zur Translokation der ci/Gli-Proteine in den Nukleus und Bindung an bestimmte Promotorsequenzen. Diese Signalübertragung resultiert schließlich in einer Induktion verschiedener Gene wie *wingless (wg)* aus der WNT-Genfamilie, *decapentaplegic (dpp)*, sowie *PTCH* selber (Marigo et al., 1996; Stone et al., 1996).

Mutationen im *PTCH*-Gen können in einem Funktionsverlust des Ptch-Proteins in Hinblick auf die Inhibition von Smoh resultieren, was eine unkontrollierte Aktivierung des Sonic Hedgehog-Signalweges nach sich zieht und zur Entstehung verschiedener Neoplasien, wie z.B. sporadischer und familiärer Basalzellarzinome (Hahn et al., 1996b; Johnson et al., 1996) oder desmoplastischer Medulloblastome (Pietsch et al., 1997; Raffel et al., 1997; Wolter et al., 1997) führen kann. Auch können Mutationen im *Smoh*- und *Su(fu)*-Gen zur Aktivierung des Signalweges führen (Barnfield et al., 2005; Reifenberger et al., 2005; Taylor et al., 2004).

Abbildung 1 zeigt schematisch den Sonic Hedgehog/Patched-Signaltransduktionsweg.



**Abbildung 1** Der Sonic Hedgehog/Patched-Signaltransduktionsweg

#### 1.4. Das *PTCH2*-Gen auf Chromosom 1p

Ein Homolog des humanen *Patched*-Gens wurde identifiziert und *Patched2* (*PTCH2*) genannt. Das humane *PTCH2*-Gen ist auf Chromosom 1p34.1 lokalisiert, einer Region, in deren Nähe bei verschiedenen Gehirntumorentitäten eine hohe Inzidenz von Allelverlusten (20-80%) beobachtet wurde. Das Gen beinhaltet 22 kodierende Exone und umfasst etwa 15 kb genomische DNS (Smyth et al., 1999). Es kodiert für einen 1203 Aminosäuren-enthaltenden Transmembranrezeptor, der mit einer ähnlichen Affinität wie *Patched* mit den Proteinen der Hedgehog-Familie zu interagieren vermag (Carpenter et al., 1998; Smyth et al., 1999). Ausserdem wirkt *Patched2* ähnlich wie *Patched1* auf *Smoothed* (Carpenter et al., 1998). Die Sequenzidentität zwischen *ptc2* und *ptc* beträgt 57% und 91,5% im murinen System. Der Sequenzunterschied zwischen *PTCH* und *PTCH2* liegt vornehmlich im Bereich der hydrophilen Region zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7. *Ptch2* wird vornehmlich in der Haut und im Hoden exprimiert, wo sein Genprodukt mit *Dhh* interagieren kann, welches in der Keimzellentwicklung eine Rolle spielt (Carpenter et al., 1998, Zaphiropoulos et al., 1999).

Mutationen im *PTCH*-Gen konnten in einer Reihe von Tumoren nachgewiesen werden, so unter anderem auch in Neoplasien des ZNS. Somit scheint der Sonic Hedgehog/*Patched*-Signaltransduktionsweg eine Relevanz für die Entstehung von verschiedenen Tumorentitäten zu haben (Gailani et al., 1996; Pietsch et al., 1997; Wicking et al., 1997).

Die biologische Funktion von *PTCH2* ist noch nicht abschließend aufgeklärt. Die hohe Transkriptionsaktivität von *PTCH2* sowohl in familiären, als auch sporadischen Basalzellkarzinomen ist ähnlich der Expression von *PTCH*. Sie deutet auf eine Interaktion mit dem Sonic Hedgehog/*Patched*-Signalweg hin (Unden et al., 1997; Vorechovsky et al., 1997; Zaphiropoulos et al., 1999). Diese Untersuchungen legen nahe, dass *PTCH2* dem *PTCH* sowohl ähnliche, als auch unterschiedliche funktionelle Charakteristika umfaßt (Zaphiropoulos et al., 1999). Eine initiale Mutationsanalyse in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen konnte eine trunkierende Mutation in einem Medulloblastom, sowie eine Veränderung in einer Splice site in einem Basalzellkarzinom zeigen (Smyth et al., 1999). *PTCH2* als Homolog des *PTCH* stellt somit ein Gen mit einer möglichen Tumorsuppressorfunktion dar, das an der Pathogenese verschiedener intrakranieller Tumoren beteiligt sein könnte.

Allelverluste auf den Chromosomen 1p und 19q konnten in 50-80% der Oligodendrogliome (Bello et al., 1995; Felsberg et al., 2004; Reifenberger et al., 1994b; Zhu et al., 1998), sowie in 20-50% der Oligoastrozytome (Kraus et al., 1995; Maintz et al., 1997; Reifenberger et al., 1994b) nachgewiesen werden.

Umfangreiche Untersuchungen zur Deletionskartierung in Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen führten zu einer genaueren Lokalisation potentieller Oligodendrogliom-assoziiertes Tumorsuppressorgenenloci. Es konnten zwei Kandidatengenregionen mit häufigem Allelverlust bei 1p36.3 und 1p34-p35 identifiziert werden (Husemann et al., 1999).

Die Mutations- und Expressionsanalyse des *Cyclin dependent kinase inhibitor*-Gens (*CDKN2C*) (Guan et al., 1994), eines potentiellen Tumorsuppressorgens auf 1p32 zeigte nur eine seltene Veränderung durch genetische Alterationen in Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen. Das weist darauf hin, daß noch weitere Tumorsuppressorgene auf 1p in der Pathogenese von Oligodendrogliomen beteiligt sein sollten (Husemann et al., 1999).

Untersuchungen haben gezeigt, daß anaplastische Oligodendrogliome mit LOH von 1p, bzw. Kombinationen von Verlusten auf 1p und 19q, typischerweise auf eine Chemotherapie nach dem PCV-Schema (Procarbazin/Lomustin (CCNU)/Vincristin) besonders sensitiv reagieren. So kann man bei diesen Tumoren in ungefähr der Hälfte der Fälle neuroradiologisch ein vollständiges Ansprechen auf die Therapie nachweisen (Cairncross et al., 1998). Auf der anderen Seite sprechen nur ca. 25% der Fälle ohne diese genetischen Veränderungen auf die Chemotherapie mit PCV an, und ein komplettes Therapieansprechen ist äußerst selten. Patienten mit diesen genetischen Veränderungen zeigen daneben auch signifikant bessere Überlebensraten.

Für Meningeome konnten CGH-Studien (*Comparative genomic hybridization*) und LOH-Studien zeigen, daß ein Verlust von 1p und anderen Loci in einer signifikanten Zahl der Meningeome vom WHO-Grad II und III, jedoch nicht im Grad I vorkommen (Boström et al., 1997; Lindblom et al., 1994; Rempel et al., 1993; Simon et al., 1995; Weber et al., 1997). Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Beteiligung von Tumorsuppressorgenen auf 1p in der malignen Progression von Meningeomen hin.

### 1.5. Ziel dieser Arbeit

Molekulargenetische Analysen konnten eine hohe Rate an Allelverlusten auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p) in verschiedenen intrakraniellen Tumoren zeigen, u.a. in 50-80% der Oligodendrogliome und 20-50% der Oligoastrozytome (Bello et al., 1995; Felsberg et al., 2004; Kraus et al., 1995; Maintz et al., 1997; Reifenberger et al., 1994b; Zhu et al., 1998). Der Verlust genetischen Materials von 1p ist auch typisch für die maligne Progression von Meningeomen (Boström et al., 1997; Lindblom et al., 1994; Rempel et al., 1993; Simon et al., 1995; Weber et al., 1997). Diese Daten deuten auf das Vorliegen eines oder mehrerer Tumorsuppressorgene in dieser Gegend hin, welche in der Pathogenese dieser Tumoren involviert sind.

Das *PTCH2*-Gen als neu identifiziertes Homolog von *PTCH*, ist auf 1p34.1 lokalisiert. Mutationen im *PTCH2*-Gen konnten in Vorarbeiten in Basalzell-Karzinomen und Medulloblastomen nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des potentiellen Tumorsuppressorgens *PTCH2* mit Lokalisation auf 1p34.1 in der Pathogenese einer Reihe verschiedener Hirntumorentitäten, die in der überwiegenden Zahl LOH von 1p zeigten, untersucht. Hierfür stand DNA von insgesamt 109 Tumorproben zur Verfügung. Das Kollektiv umfasste 35 meningeale und 74 gliale Tumore (Tabelle 1).

Ziel der Arbeit war es, die Mutationsfrequenz und veränderte mRNA-Expression in Hirntumoren mit gehäuftem 1p-Allelverlusten zu analysieren. Dazu wurde das gesamte *PTCH2*-Gen mit der SSCP-Technik und nachfolgender Sequenzierung auf Mutationen, sowie durch die semiquantitative Expressionsanalyse auf veränderte Genexpressionsprofile untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Untersuchungskollektiv**

In der vorliegenden Arbeit wurden für die molekulargenetischen Untersuchungen insgesamt 109 zerebrale Tumorproben aus den Gewebebanken der Institute für Neuropathologie Bonn und Düsseldorf untersucht. Alle Tumoren wurden gemäß der WHO-Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems (Kleihues und Cavenee, 2000) histopathologisch charakterisiert und bezüglich eines Allelverlustes auf Chromosom 1p analysiert. Die in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Tumorproben wurden vor der DNS-Extraktion sorgfältig auf Kontamination mit Normalgewebe oder Nekrosen überprüft. Das Kollektiv umfasste 12 Oligodendrogliome WHO-Grad II, 29 anaplastische Oligodendrogliome WHO-Grad III, 5 Astrozytome WHO-Grad III, 6 Glioblastoma multiforme WHO-Grad IV, 9 Oligoastrozytome WHO-Grad II, 13 anaplastische Oligoastrozytome WHO-Grad III, 13 Meningeome WHO-Grad I, 16 Meningeome WHO-Grad II, sowie 6 Meningeome WHO-Grad III. Zusätzlich lag von einem weiteren Oligoastrozytom nur cDNS vor (Nr. 86). Konstitutionelle DNS aus peripheren Blutleukozyten der Tumorpatienten diente als Kontrolle. Zusätzlich dienten DNS-Proben von 80 Kaukasiern ohne Tumoranamnese oder bekannte Erkrankung des ZNS als Kontrollkollektiv. Als Kontrollgewebe für die Expressionsanalyse in den Meningeomen diente leptomeningeeales Normalgewebe.

Für eine Übersicht der Daten siehe Tabelle 1.

Proben-Nr.	Geschlecht	Alter (in Jahren)	WHO-Klassifikation	LOH 1p	cDNS vorhanden
1	w	75	M I men	+	-
2	w	72	M I trans	+	-
3	m	53	M I men	+	-
4	m	65	M I men r2	-	-
5	m	42	M I fib	-	-
6	m	49	M I trans	-	+
7	m	74	M I men	+	+
8	w	69	M I men r	-	+
9	w	55	M I fib	+	+
10	w	52	M I fib	+	+
11	w	73	M I trans	+	+
12	m	47	M I ang	-	+
13	w	53	M I fib	-	+
14	m	70	M II r	+	+
15	w	66	M II	+	+
16	w	78	M II	+	+
17	m	44	M II	+	+
18	w	71	M II	-	+
19	w	71	M II	+	+
20	w	58	M II	-	+
21	m	47	M II r4	+	+
22	m	68	M II	+	+
23	w	72	M II	-	+
24	w	74	M II	+	+
25	w	74	M II r	+	+
26	w	76	M II r2	+	+
27	w	90	M II	+	+
28	w	43	M II	+	+
29	m	38	M II r2	+	+
30	w	51	M III	+	-
31	m	55	M III	+	+
32	w	55	M III	+	+
33	w	78	M III	+	+
34	m	6	M III	-	+
35	w	70	M III	+	+
36	m	34	O II	+	-
37	w	47	O II	+	-
38	m	35	O II r	+	-
39	m	24	O II	-	-
40	w	38	O II	+	-
41	m	36	O II r	+	-
42	w	49	O II	+	+
43	m	60	O II	+	+
44	w	72	O II r	+	+

45	w	53	O II	+	+
46	w	56	O II r	+	+
47	m	46	O II-III	+	+
48	m	47	AO IIIr	+	-
49	m	47	AO III r2	+	-
50	m	58	AO III	+	-
51	w	61	AO III r	+	-
52	m	62	AO III	+	-
53	m	29	AO III	-	+
54	w	55	AO III r2	-	+
55	m	32	AO III	-	+
56	m	57	AO III	+	+
57	m	47	AO III r	+	+
58	w	57	AO III	-	-
59	m	61	AO III r2	+	+
60	w	64	AO III	-	+
61	m	48	AO III	+	+
62	w	57	AO III r	-	+
63	m	36	AO III	+	+
64	w	61	AO III	+	+
65	m	60	AO III r	-	+
66	m	42	AO III r	+	-
67	w	59	AO III	+	+
68	w	59	AO III r2	-	+
69	w	52	AO III r2	+	+
70	m	42	AO III	+	+
71	w	50	AO III	-	+
72	m	70	AO III	+	+
73	w	34	AO III r2	+	+
74	m	37	AO III	+	+
75	m	29	AO III	+	+
76	m	59	AO III	+	+
77	w	30	OA II	+	-
78	w	59	OA II	+	-
79	m	25	OA II	+	-
80	w	18	OA II	+	-
81	m	59	OA II	+	-
82	m	41	OA II r	+	-
83	m	50	OA II r	-	+
84	w	65	OA II r	-	+
85	w	70	OA II	-	+
86	m	45	OA II	n.a.	+
87	m	46	AOA III	+	-
88	w	30	AOA IIIr	+	-
89	m	36	AOA III	+	-
90	m	55	AOA III	+	-
91	m	30	AOA III	+	-
92	m	38	AOA III	+	-

93	m	42	AOA III r2	+	-
94	w	51	AOA III r	+	-
95	m	50	AOA III	-	+
96	m	56	AOA III r	-	+
97	w	45	AOA III	+	-
98	m	68	AOA III r2	+	+
99	m	33	AOA III r3	+	+
100	m	39	A III	+	-
101	m	43	A III	+	-
102	m	39	A III r	+	-
103	w	53	A III	+	-
104	m	16	A III	+	-
105	m	17	GBM IV	+	-
106	m	67	GBM IV	+	-
107	w	41	GBM IV	+	-
108	w	70	GBM IV	+	-
109	m	56	GBM IV	+	-
110	W	77	GBM IV	+	-

**Tabelle 1** Daten aller untersuchten Tumorproben (m, männlich; w, weiblich; r, Rezidiv; M, Meningeom; O, Oligodendrogliom; AO, anaplastisches Oligodendrogliom; OA, Oligoastrozytom; AOA, anaplastisches Oligoastrozytom; A, Astrozytom; GBM, Glioblastoma multiforme; ang, angiomatös; fib, fibrös; men, meningothelial; trans, transitional)

## 2.2. Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
DNS-Sequenzierautomat	373A	Applied Biosystems
DNS-Sequenzierautomat	Li-COR L-4200 S-1	MWG Biotech
Elektrophoresekammer (Agarosegele)	E 92	Biometra
Elektrophoresekammer (Polyacrylamidgele)	Multigel-Long G47	Biometra
Gel-Trockner	Slab Gel Dryer SE 1160	Hoefer Scientific Instruments
Heizblock	Test Tube Heater SHT 2D	Stuart Scientific
Heizschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
Magnetrührer (heizbar)	RCT Basic	IKA Labortechnik
Netzgerät	Standard Power Pack P25	Biometra
PCR-Thermocycler	Gene Amp 9600	Perkin Elmer
PCR-Thermocycler	Uno-Thermoblock	Biometra
PCR-Thermocycler	Tri-Thermoblock	Biometra
Pipetten	P10/P20/P200/P1000	Gilson
Strudelmischer	Vortex Genie 2 <sup>TM</sup>	Bender und Hobein AG
Tischzentrifuge	5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus
Ultrazentrifuge	Rotor SW 41	Beckmann
Vakuumpumpe	MZ 2C	Vaccubrand GmbH
Vakuumbzentrifuge	Speed Vac <sup>®</sup> SC 110	Savant
Waage	Laboratory LC 420	Sartorius

### 2.3. Chemikalien und anderes Verbrauchsmaterial

Substanz	Hersteller
Acrylamid	Life Technologies
Agarose	Life Technologies
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma
Bisacrylamid	Life Technologies
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform	Sigma
Desoxynucleotidtriphosphat	MBI Fermentas
DNS-Längenstandard V	Boehringer
EDTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll Typ 400	Pharmacia
Formaldehyd	Merck
Formamid	Merck
Glycerol	Roth
Harnstoff	Life Technologies
Magnesiumchlorid	Life Technologies
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Paraffin	Merck
PBS	GibcoBRL
PCR-Aufreinigungs- kit (QIAquick™ PCR Purification Kit)	Qiagen
PCR-Puffer (10x, ohne Mg)	Gibco
Phenol	Sigma
Primer für SSCP-Analyse	MWG Biotech
Fluoreszenzmarkierte Expressionsanalyse Primer für	MWG Biotech
Proteinase K	Boehringer Mannheim

---

Rnase	Boehringer Mannheim
Reverse Transkriptase (Superscript)	Life Technologies
SAC-I (Restriktionsenzym)	Promega GmbH Mannheim
Salpetersäure	Merck
SDS	Merck
Sequenzierungskit (ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit)	Perkin-Elmer
Silbernitrat	Serva
STR-Marker (cDNA-Längenstandard)	Li-Cor Biotechnology Division
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Gibco
TEMED	BioRad
Tris	Sigma
Xylencyanol	Merck

## 2.4. Puffer und Lösungen

### Acrylamid-Gellösung für SSCP (Bsp.)

12%, Vernetzung AA:BA 1: 49

40% Acrylamid 58,8 ml

2% Bisacrylamid 24 ml

10 x TBE 10 ml

ggf. 10% Glycerol

aq. bidest. ad 200 ml

### 6%-iges Acrylamidgel für die Expressionsanalyse

Harnstoff 30 g

Acrylamid 40% 9 ml (19:1)

1 x TBE 24 ml

aq. bidest. 5,5 ml

### 6%-iges Acrylamidgel für die Sequenzierung

Harnstoff 30 g

Acrylamid 40% 9 ml (19:1)

10 x TBE 6 ml

aq. bidest. 23,5 ml

### 2%-iges Agarosegel

Agarose 2 g

0,5 x TBE-Puffer 100 ml

### Agarosegel-Ladepuffer

Bromphenolblau 0,025%

Xylencyanol 0,025%

Ficoll 15%

(in aq. bidest.)

2:5 mit aq. bidest. verdünnt

**Agarosegel-Längenstandard**

DNS-Längenstandard V (250 µg/ml) 10µl

Agarosegel-Ladepuffer unverdünnt 20 µl

H<sub>2</sub>O 75 µl

**Blut-Lysispuffer**

155 mM NH<sub>4</sub>Cl

10 mM KHCO<sub>3</sub>

0,1 mM EDTA

pH 7,4; autoklavieren

**dNTP-Mix**

dATP (100 mM) 10 µl

dCTP (100 mM) 10 µl

dGTP (100 mM) 10 µl

dTTP (100 mM) 10 µl

aq. bidest. 460 µl

**Essigsäure**

10 % in aq. deion.

**Ethanol**

10% in aq. deion.

**Ethidiumbromid-Lsg.**

Ethidiumbromid 50 mg

aq. bidest. 50 ml

**Kern-Lysispuffer**

10 mM Tris-Cl (pH 8,0)

0,1 mM EDTA

0,5% SDS

**Li-Cor-Ladepuffer**

98% Formamid (Sigma)

0,25 % Bromphenolblau (Sigma)

**Natriumkarbonatlösung**

Natriumkarbonat 150 g

Formaldehyd (35%-ig) 2,5 ml

aq. deion. ad 5000 ml

**Salpetersäure**

Salpetersäure (65%-ig) 38,5 ml

aq. deion. ad 2500 ml

**Sequenziergel-Ladepuffer**

Formamid 98% und EDTA 50 mM, pH 8,0 im Verhältnis 5:1

**Silbernitratlösung**

Silbernitrat 4 g

aq. deion. ad 2000 ml

**SSCP- Ladepuffer**

Formamid 45 ml

10 x TBE 5 ml

EDTA (0,5 ml) 100 µl

SDS 0,05 g

Bromphenolblau 0,125 g

Xylencyanol 0,125 g

NaOH (5 M) 600 µl

**SSCP-Längenstandard**

DNS-Längenstandard V 5 µl

aq. bidest. 75 µl

SSCP-Ladepuffer (ohne NaOH) 80 µl

**10 x TBE-Puffer (Stammlösung für****1 x TBE und 0,5 x TBE)**

TRIS 108 g

Borsäure 55 g

EDTA (1,5 M) 40 ml

aq. bidest. ad 1000 ml

**TE( $10^{-4}$ )-Puffer**

1 ml 1M Tris-HCl (pH 7,5)

20  $\mu$ l 0,5M EDTA (pH 8,0)

aq. bidest. ad 100 ml

steril filtrieren und autoklavieren

## 2.5. Isolierung von genomischer DNS

Die Extraktion von hochmolekularer genomischer DNS aus Blut wurde nach der Methode von Blin und Stafford (1976) durchgeführt.

10 ml Frischblut wurden mit 30 ml kaltem Blut-Lysispuffer versetzt, geschüttelt und zur Lyse 15-30 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 12 min bei 250 g. Für die DNS-Extraktion erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 200 µl PBS. Danach wurden 6 ml Kernlysispuffer zugesetzt. Nachdem sich das Pellet vollständig gelöst hatte, erfolgte eine RNase-Behandlung (100 µg/ml) für 1 Std. bei 37°C. Anschließend wurde 60 µl Proteinase K (100 µg/ml) zugegeben und bei 50°C über Nacht inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Aufreinigung, zunächst unter Zusatz von 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch. Die Proben wurden 30 min gemischt und 10 min bei 1080 g zentrifugiert. Nach Abnahme der wässrigen, DNS-haltigen Phase wurde erneut 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch zugegeben und wie zuvor verfahren. Es folgte eine zweimalige Extraktion der wässrigen Phase mit 1 Vol. Chloroform. Durch Zugabe von 0,2 Vol. 3 M NH<sub>4</sub>Ac pH 5,3 und 2,5 Vol. 100% Ethanol wurde die DNS präzipitiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Resuspension der getrockneten DNS in 300-500 µl TE-Puffer erfolgte die Bestimmung der DNS-Konzentration durch eine photometrische Messung bei 260 nm (OD 1 = 50 mg/ml).

Von dem in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Tumormaterial wurden zunächst Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden histologisch überprüft, um Normalgewebe oder nekrotisches Gewebe von Tumorgewebe zu differenzieren. Ausschließlich Tumorgewebe wurde anschließend in 10 µm dicke Schnitte am Mikrotom geraspelt und bis zur Weiterverarbeitung bei – 80°C aufbewahrt. Das so vorbereitete Gewebe wurde dann in Kern-Lysispuffer suspendiert und weiterverarbeitet wie Blut.

Die in dieser Arbeit untersuchten Blut- und Tumorgewebeproben wurden als DNS-Verdünnungen mit einer Konzentration von ca. 10 ng/µl eingesetzt.

## 2.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki et al., 1988) lassen sich kurze DNS-Abschnitte exponentiell vervielfältigen. Dazu werden einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die komplementär zu den Endbereichen der zu amplifizierenden Sequenz sind. In zyklisch wiederkehrenden Schritten wird nun die DNS bei 94 °C denaturiert, die Primer an diese einzelsträngige DNS angelagert (Annealing) und die Primer anschließend verlängert (Extension). Katalysiert wird diese zyklische Reaktion durch die sogenannte Taq-Polymerase, eine aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* stammende DNS-Polymerase, die sich durch eine besondere Hitzestabilität auszeichnet und deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt.

Die PCR-Reaktionen wurden in Volumina von 10 µl durchgeführt. In den Reaktionsansätzen waren jeweils 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 0,01 % Gelatine; 1,0-2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, jeweils 200 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, jeweils 50-100 nM Forward- und Reverse-Primer, 0-10% DMSO sowie 0,05 µl Taq-Polymerase und ca. 10-50 ng DNS enthalten. Die einzelnen PCR-Ansätze, in Eppendorf-Reaktionsgefäßen oder Mikrotiterplatten, wurden mit jeweils einem Tropfen Mineralöl beschichtet, um ein Verdunsten des Reaktionsansatzes während der PCR zu verhindern.

Die verwendeten Primer- und PCR-Bedingungen sind in nachfolgender Tabelle 2 angegeben. Zur Kontrolle wurden die PCR-Produkte auf 2%-igen Agarosegelen analysiert, die Ethidiumbromid (3,5 µl/100 ml Gellösung) enthielten. Dazu wurden je 10 µl PCR-Ansatz mit 5 µl Ladepuffer versetzt. Zur Abschätzung der Größen der PCR-Produkte wurden 6 µl eines entsprechenden Größenstandards aufgetragen.

<b>Exon</b>	<b>Produktgröße Primer-Paar (Sequenz 5'—3')</b>	<b>PCR- Bedingungen</b>	<b>SSCP-Gelbedingungen (Acrylamidkonzentration, Vernetzungsgrad, +/- Glycerol, Temperatur)</b>
1	102 bp  Forward: ATG AAT CGA TCG C  Reverse: CTT CCT TCT TCC AGC TCC C	94°C, 30 sec  68-60°C, 45 sec  72°C, 30 sec  68°C, 66°C, 64°C, 62°C je 4 Zyklen  60°C 30 Zyklen  1.5 mM MgCl <sub>2</sub>	10%, 1:99, + Glycerol, RT
2	192 bp  Forward: ATC CTA GCT GGG AGC CT  Reverse: TTC TAC CCA GAG CTG TTC C	40 Zyklen  94°C, 30 sec  55°C, 30 sec  72°C, 30 sec  1.5 mM MgCl <sub>2</sub>	14%, 1:99, + Glycerol, RT
3	189 bp  Forward: CTT CAG AGT TAG AAG CCC CCT TC  Reverse: ATT CCC ACT CCA GAA CCC CCA CAG C	38 Zyklen  94°C, 30 sec  55°C, 45 sec  72°C, 30 sec  1,0 mM MgCl <sub>2</sub>	12%, 1:89, + Glycerol, RT  10%, 1:99, + Glycerol, RT
4	69 bp  Forward: CCT TCT TCT GCT GAT CTC CTA TGC  Reverse: TAA GGG GGC AAA TTG CAG GC	39 Zyklen  94°C, 30 sec  58°C, 35 sec  72°C, 30 sec  1.5 mM MgCl <sub>2</sub>  10% DMSO	14%, 1:99, Ø Glycerol, RT  12%, 1:89, + Glycerol, RT
5	92 bp  Forward: CAA AGG GCA TCC TAC AAA GGT TG  Reverse: AGC GGG AGA TGA AGC AGG G	38 Zyklen  94°C, 30 sec  58°C, 35 sec  72°C, 30 sec  1,0 mM MgCl <sub>2</sub>	14%, 1:99, Ø Glycerol, RT  10%, 1:79, Ø Glycerol, RT

<b>Exon</b>	<b>Produktgröße Primer-Paar (Sequenz 5'—3')</b>	<b>PCR- Bedingungen</b>	<b>SSCP-Gelbedingungen (Acrylamidkonzentration, Vernetzungsgrad, +/- Glycerol, Temperatur)</b>
6	196 bp Forward: AGA TAA GAG GAG GGT GGG GTA CAG Reverse: TCC CCC AGA ACA CAG GAG TAT G	39 Zyklen 94°C, 30 sec 58°C, 35 sec 72°C, 30 sec 1,0 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO	14%, 1:99, + Glycerol, RT 10%, 1:29, + Glycerol, 4°C
7	122 bp Forward: TAC ACT CCA GCC CTA CTG AGC TTC Reverse: TGA ACA GAG TCC CCT CAC CAA C	39 Zyklen 94°C, 30 sec 58°C, 35 sec 72°C, 30 sec 1,0 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO	12%, 1:49, + Glycerol, RT 10%, 1:29, + Glycerol, RT
8	148 bp Forward: GAG TTG GTG AGG GGA CTC TGT TC Reverse: TGG AGA AAC AGG GTG GAT AGG AG	39 Zyklen 94°C, 30 sec 58°C, 35 sec 72°C, 30 sec 1,0 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO	14%, 1:99, Ø Glycerol, RT 10%, 1:79, Ø Glycerol, RT
9	132 bp Forward: CGG TAT GGA CAA GGA CAA GGG Reverse: CAA GGT GCC AGG TGC AAG AC	38 Zyklen 94°C, 30 sec 55°C, 30 sec 72°C, 20 sec 1,0 mM MgCl <sub>2</sub>	14%, 1:99, Ø Glycerol, RT 10%, 1:29, Ø Glycerol, RT
10	156 bp Forward: ACC TCC AAC CAG TGC CCA CC Reverse: CGA TTC CCA GAG CCA AGA AGG	35 Zyklen 94°C, 40 sec 54°C, 50 sec 72°C, 50 sec 1,0 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO	14%, 1:99, + Glycerol, RT 10%, 1:99, + Glycerol, RT

<b>Exon</b>	<b>Produktgröße Primer-Paar (Sequenz 5'—3')</b>	<b>PCR- Bedingungen</b>	<b>SSCP-Gelbedingungen (Acrylamidkonzentration, Vernetzungsgrad, +/- Glycerol, Temperatur)</b>
11	93 bp Forward: TCG GCG TGG ATG ACG TAT TC Reverse: GGG GCA GTC ATA ACA CAG TGG C	38 Zyklen 94°C, 30 sec 58°C, 35 sec 72°C, 30 sec 1,0 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO	10%, 1:99, + Glycerol, RT 12%, 1:49, + Glycerol, RT
12A	126 bp Forward: TCC CCT TCA CTC CAC TTT G Reverse: GGA CGG ACA GGA GGG GAA TG	38 Zyklen 94°C, 30 sec 55°C, 45 sec 72°C, 30 sec 1,0 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO	14%, 1:99, Ø Glycerol, RT 10%, 1:29, Ø Glycerol, RT
12B	119 bp Forward: GCT TCA TCC AGC CTT CAT TCC Reverse: TGA CAG GTC TGT GCC TTG AAA TG	38 Zyklen 94°C, 30 sec 55°C, 45 sec 72°C, 30 sec 1,0 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO	12%, 1:89, + Glycerol, RT 10%, 1:29, + Glycerol, RT
13	349 bp Forward: CCC CTC ACC AGC ATT TCA AGG Reverse: TAA GCC CTC TCT GCC CTT CTG G	94°C, 30 sec 68-60°C, 45 sec 72°C, 30 sec 68°C, 66°C, 64°C, 62°C je 4 Zyklen 60°C 30 Zyklen 1,0 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO	12%, 1:49, + Glycerol, RT 10%, 1:29, Ø Glycerol, RT

Exon	Produktgröße Primer-Paar (Sequenz 5'—3')	PCR- Bedingungen	SSCP-Gelbedingungen (Acrylamidkonzentration, Vernetzungsgrad, +/- Glycerol, Temperatur)
14	313 bp Forward: AAG GGC AGA GAG GGC TTA GCT G Reverse: GAC CAG GAT AGG GTT CTA TTA GCT G	38 Zyklen 94°C, 30 sec 55°C, 45 sec 72°C, 30 sec 1,0 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO	14%, 1:99, Ø Glycerol, RT 10%, 1:29, Ø Glycerol, RT
15	143 bp Forward: TGG CTA CAG GGT GAG AGG CG Reverse: GAG GCA GAG AGG GCT GAA GG	94°C, 30 sec 68-60°C, 45 sec 72°C, 30 sec 68°C, 66°C, 64°C, 62°C je 4 Zyklen 60°C 30 Zyklen 1,0 mM MgCl <sub>2</sub>	14%, 1:99, + Glycerol, RT 10%, 1:29, + Glycerol, RT
16	181 bp Forward: AGG TTG GGA GAG AGG GCT GGA G Reverse: AGG CTC AGG GCT TGT GTG TGG G	94°C, 30 sec 68-60°C, 45 sec 72°C, 30 sec 68°C, 66°C, 64°C, 62°C je 4 Zyklen 60°C 30 Zyklen 1,0 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO	14%, 1:99, Ø Glycerol, RT 12%, 1:49, + Glycerol, RT
17	281 bp 17A: Forward: ACA AGC CCT GAG CCT GAG GC Reverse: GCC CAG ATA CTG TTC CCA GAA GAG	38 Zyklen 94°C, 30 sec 55°C, 45 sec 72°C, 30 sec 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO	12%, 1:49, + Glycerol, RT 14%, 1:99, Ø Glycerol, RT

<b>Exon</b>	<b>Produktgröße Primer-Paar (Sequenz 5'—3')</b>	<b>PCR- Bedingungen</b>	<b>SSCP-Gelbedingungen (Acrylamidkonzentration, Vernetzungsgrad, +/- Glycerol, Temperatur)</b>
17	281 bp  17B: Forward: GGA GTT TGC CCA GTT CCC Reverse: TGG CAG GAG GGA TGA CAG G	94°C, 30 sec  68-60°C, 45 sec  72°C, 30 sec  68°C, 66°C, 64°C,  62°C je 4 Zyklen  60°C 30 Zyklen  1,0 mM MgCl <sub>2</sub>  10% DMSO	12%, 1:49, + Glycerol, RT  10%, 1:99, + Glycerol, RT
18	138 bp  Forward: TGA GTG CTT GCA GGA GTG G Reverse: CCT AGC ACA TAG TAG GGG CTT GAA C	38 Zyklen  94°C, 30 sec  55°C, 45 sec  72°C, 30 sec  1,0 mM MgCl <sub>2</sub>  10% DMSO	14%, 1:99, + Glycerol, 4°C  10%, 1:29, + Glycerol, 4°C
19	340 bp  Forward: TAG TTC ACC CAG CCT TTG GTG GG Reverse: CCA GGC CTG TCA TGA GCC	39 Zyklen  94°C, 30 sec  58°C, 35 sec  72°C, 30 sec  1.5 mM MgCl <sub>2</sub>  10% DMSO	10%, 1:59, + Glycerol, RT  14%, 1:99, Ø Glycerol, RT
20	220 bp  Forward: TGA CTC CCC CCA CAC CCT AC Reverse: TGT CCC TTC CCT TGC CTC TC	39 Zyklen  94°C, 30 sec  58°C, 35 sec  72°C, 30 sec  1,0 mM MgCl <sub>2</sub>  10% DMSO	12%, 1:49, + Glycerol, RT  12%, 1:29, Ø Glycerol, RT

Exon	Produktgröße Primer-Paar (Sequenz 5'—3')	PCR- Bedingungen	SSCP-Gelbedingungen (Acrylamidkonzentration, Vernetzungsgrad, +/- Glycerol, Temperatur)
21	284 bp  Forward: TGT CTC CCC ACA GGT GAT AC  Reverse: TCT CTG TGC TTC AGC TGC TC	94°C, 30 sec  68-60°C, 45 sec  72°C, 30 sec  68°C, 66°C, 64°C, 62°C je 4 Zyklen  60°C 30 Zyklen  1.5 mM MgCl <sub>2</sub>	12%, 1:49, + Glycerol, RT  10%, 1:59, Ø Glycerol, RT

**Tabelle 2** Produktlängen, Primer-Sequenzen, PCR-Bedingungen und SSCP-Gelbedingungen, die bei der SSCP-Analyse verwendet wurden. Für jede PCR gilt: erste Denaturierung bei 94°C für 3 min; finale Extension bei 72°C für 10 min.

## 2.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese beruht auf dem Prinzip der Beweglichkeit geladener Teilchen im elektrischen Feld. Unter den Bedingungen der Elektrophorese sind die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren ionisiert und bewegen sich als Polyanionen von der Kathode zur Anode. Die Beweglichkeit der Nukleinsäuren ist dabei sowohl von ihrer Größe als auch von ihrer Konformation abhängig.

Zur Herstellung der verwendeten 2%-igen Agarosegele wurden die beschriebenen Bestandteile des Ansatzes (siehe 2.4) durch Aufkochen zur vollständigen Lösung gebracht. Nach Abkühlen der Lösung auf eine Temperatur von etwa 50°C wurde 1 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben und das Gel in eine Kammer gegossen. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNS und fluoresziert unter UV-Licht-Bestrahlung. Nach Polymerisierung des Gels wurden die zu untersuchenden Proben mit verdünntem Agarosegel-Ladepuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und für etwa 10 min bei 200 V mit 0,5 x TBE als Laufpuffer gegen einen Agarosegel-Längenstandard aufgetrennt. Mit Hilfe dieses Längenstandards kann die Größe der zu untersuchenden DNS-Fragmente überprüft werden.

## 2.8. SSCP-Analyse

Zum Nachweis von Mutationen im *PTCH2*-Gen wurde die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Methode (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) benutzt (Orita et al., 1989a). Grundlage dieser Methode ist, daß die zu untersuchende Zielsequenz zunächst durch eine PCR amplifiziert wird und dann nach Denaturierung als Einzelstränge auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel durch Elektrophorese getrennt wird. Mutationen zeigen ein gegenüber dem Wildtyp-Allel verändertes Migrationsverhalten (Shift), ausgelöst durch die veränderte Konformation der Einzelstränge, die neben der Länge entscheidend für das Laufverhalten ist. Eine Reihe von Parametern, wie die Temperatur des Gels, der Vernetzungsgrad der Polymere, der Zusatz von Glycerol oder die Ionenstärke von Gel- und Laufpuffer beeinflussen die Konformation des Einzelstranges und somit das Wanderungsverhalten. Diese Methode erreicht bei Fragmenten von weniger als 300 Basenpaaren eine Sensitivität von über 80% (Hayashi und Yandell, 1993), und es kann schon eine einzige veränderte Base nachgewiesen werden (Orita et al., 1989b).

Bei PCR-Produkten über 350 bp Länge ist es notwendig, das Amplifikat zunächst durch ein Restriktionsenzym zu zerschneiden und dann zu analysieren (in der vorliegenden Arbeit wurde dies bei Exon 13 mit Hilfe des Restriktionsenzymes *Sac-I* durchgeführt).

Zunächst müssen optimale Gelbedingungen für jedes einzelne Fragment gefunden werden. Um die Detektion der Shifts zu erhöhen, wird jedes Fragment unter wenigstens zwei verschiedenen dieser optimierten Gelbedingungen analysiert.

Zur Herstellung der Elektrophoresegele wurde die entsprechende Lösung (siehe 2.4) angefertigt und diese nach Hinzufügen der Polymerisationsstarter 10%-iges APS (200 µl/20 ml Gellösung) und TEMED (20 µl/20 ml Gellösung) zwischen die zwei Glasplatten des Elektrophoresesystems gegossen (Elektrophorese-Kammer-System Multigel-Long G47™).

Die PCR-Produkte wurden mit SSCP-Ladepuffer im Verhältnis 1:1 versetzt, bei 94°C für 5 min denaturiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Polyacrylamidgele mit den Tumorproben, einem SSCP-Längenstandard, sowie einer Wasserprobe zur Aufdeckung einer eventuellen DNS-Kontamination des Reaktionsansatzes, geladen. Als SSCP-Laufpuffer diente 0,5 x TBE.

Allein durch das veränderte Laufverhalten von PCR-Produkten können keine Rückschlüsse auf die Art oder Position der Mutation in einem DNS-Strang gezogen werden (Hayashi, 1992a,b; Hayashi und Yandell, 1993). Deshalb schließt sich daher eine Sequenzierung dieser Proben an.

Tabelle 2 gibt Aufschluß über die verwendeten Elektrophorese-Versuchsbedingungen, sowie verwendeten Primer, Produktgrößen und PCR-Bedingungen.

## 2.9. Silberfärbung der Polyacrylamidgele

Nach der Elektrophorese werden die DNS-Banden durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Färbung beruht auf der Eigenschaft der Nukleinsäuren, im sauren Milieu Silberionen zu komplexieren. Durch die Reduktion der Silberionen mit Natriumkarbonat wird die DNS als schwarze Bande im Gel sichtbar gemacht (Budowle et al., 1991).

Zunächst erfolgt die Fixierung der Nukleinsäuren in der Gelmatrix durch eine 5-minütige Behandlung in Ethanol. Danach werden die Gele 1 min mit Salpetersäure behandelt und anschließend in aqua dest. gespült. Es folgt eine mindestens 20-minütige Färbung in Silbernitratlösung mit anschließender erneuter Spülung in aqua dest. Durch Zugabe der Entwicklerlösung werden die komplexierten Silberionen reduziert und die Banden somit unter Ausfällung metallischen Silbers sichtbar. Der Entwicklungsprozeß wird durch Zugabe von Essigsäure (für etwa 2 min) abgebrochen. Nach erneuter Spülung mit aqua dest. werden die Gele auf Filterpapier gezogen und auf einem Vakuumtrockner bei 75°C getrocknet.

## **2.10. Bearbeitung der Fragmente mit aberrantem Migrationsverhalten**

### **2.10.1. Isolierung mutierter Einzelstrang-DNS und Reamplifikation durch PCR**

DNS-Banden, die in der SSCP-Analyse ein aberrantes Laufverhalten im Vergleich zur Referenzprobe aufwiesen, wurden direkt aus dem noch ungetrockneten Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten, um daraus die DNS zu isolieren. Hierfür wurden die Banden zunächst in 50 µl DNS-Elutionspuffer gegeben und über Nacht bei 50°C im Heizschüttler bewegt. Nach Zentrifugation wurde das abgenommene Eluat danach durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol präzipitiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei -20°C und eine daran anschließende Zentrifugation bei 4°C mit 14000 g. Der Überstand wurde verworfen und das DNS-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, wobei erneut mit 14000 g 10 min bei 4°C zentrifugiert wurde. Der entstandene Überstand wurde wiederum verworfen, das Pellet getrocknet und in 20 µl aqua bidest. aufgenommen. Ein Mikroliter der eluierten DNS wurde in eine Reamplifikations-PCR mit einem Reaktionsvolumen von 40 µl unter den gleichen Bedingungen wie bei der ursprünglichen PCR eingesetzt. Der Erfolg der Reamplifikation wurde durch Auftragen auf ein 2%-iges Agarosegel überprüft.

### **2.10.2. Aufreinigung der PCR-Produkte**

Vor der Sequenzierreaktion ist es notwendig, daß das Produkt der Reamplifikationsreaktion aufgereinigt wird, um Primer, überschüssige Nukleotide, Salze und die Taq-Polymerase zu entfernen. Die Aufreinigung erfolgte mittels des QIAquick™ PCR Purification Kits der Firma Qiagen. Dabei werden Nukleinsäuren spezifisch an eine Glasfasermatrix gebunden und die DNS kann nach einem Waschvorgang durch Elution in Wasser oder einen Niedrigsalzpuffer isoliert werden. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Firmenprotokoll und es wurde in aqua bidest. eluiert. Nach einem erneuten Testen der Reinheit und Menge des Eluates mittels 2%-igen Agarosegels (3 µl aufgereinigtes Produkt + 5 µl Agarose-Ladepuffer), konnte die eluierte DNS in einer Verdünnung von 1:5 in die Sequenzierreaktion eingesetzt werden.

## 2.11. DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNS erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (1977) mit Hilfe des automatischen Sequenzierers 373 A von Perkin Elmer Applied Biosystems (ABI). Für die Sequenzierreaktion wurde das PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI) eingesetzt.

Das Verfahren basiert auf der enzymatisch katalysierten Synthese einer Population von basenspezifisch terminierten DNS-Fragmenten, die nach ihrer Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. In der Reaktion werden verschiedenfarbige, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide verwendet. Auf diese Weise kann die Sequenzierreaktion in nur einem Gefäß durchgeführt werden, und es wird nur eine Spur auf dem Polyacrylamidgel pro Sequenz benötigt. Durch Einbau eines fluoreszenzmarkierten 2', 3'- Didesoxynukleotids in den neu synthetisierten DNS-Strang kommt es zu einem Kettenabbruch. Da dieser Einbau zufällig erfolgt, entsteht eine Mischung unterschiedlich langer, neu synthetisierter DNS-Stränge (in einem Größenbereich zwischen einem und mehreren hundert Nukleotiden), entsprechend der Länge des Matrizenstranges. Die zu untersuchende DNS-Sequenz wird jeweils in beide Richtungen sequenziert. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden während der Elektrophorese mit einem Laser angeregt und können so detektiert werden.

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem Gene Amp 9600 Thermocycler (Perkin Elmer) bei folgendem Programm durchgeführt:

- Denaturierung bei 96°C, 2 min
- 25 Zyklen:
  - 96°C, 10 sec
  - 55°C, 5 sec
  - 60°C, 3.30 min

Nach Ablauf der Sequenzierreaktion wurden die Proben mit 2,5 Volumen Ethanol und 0,1 Volumen 3 M NaAc (pH 5,3) (mit Dextran-Blau) präzipitiert. Nach einem Waschvorgang mit 70% Ethanol und anschließender Vakuumtrocknung wurde das entstandene Pellet in 4 µl Ladepuffer aufgenommen.

Nach Hitzedenaturierung bei 94°C für 5 min wurden die Proben auf Eis gestellt und in das vorbereitete Sequenziergel geladen. Die folgende Gelelektrophorese wurde bei 2500 V, 40 mA und 30 W für 8 h durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe der Programme Data Collection und Data Analysis gesammelt und mit dem Programm Sequence Editor (alle ABI) ausgewertet.

## 2.12. cDNS-Synthese

Die cDNS wurde mit Hilfe des SuperScript™ Preamplification System der Firma Life Technologies hergestellt. Hierbei wird eine komplementäre DNS (cDNS) durch die enzymatische Reaktion der reversen Transkriptase synthetisiert.

Zunächst wurde eine DNS-Kontamination der RNS mittels einer PCR mit intronischen Primern des *TP53*-Gens ausgeschlossen (forward: 5'-AATGGGACAGGTGGACCTG-3'; reverse: 5'-ACCGCTTCTTGTCTGCTTG-3' bei 63°C, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 Zyklen). Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt. Nicht gDNS-kontaminierte cDNS durfte kein Produkt zeigen. Keine der verwandten Proben zeigte eine Kontamination.

250-500 ng totale zelluläre RNS wurden mit 1 µl Zufallsprimer (random hexamer, 50 ng/ml) versetzt und mit DEPC-behandeltem aqua bidest. auf 12 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Entsprechend dem vorgegebenen Protokoll der Firma wurden dNTP-Mix, 10 x PCR-Puffer, MgCl<sub>2</sub>, DTT (0,1M) und 0,7 µl reverse Transkriptase (200U/ml) zugegeben. Dann wurde der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die reverse Transkription bei 42°C über 50 min erfolgte. Die Reaktion wurde durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C beendet. Die synthetisierte cDNS wurde bei -20°C aufbewahrt.

### 2.13. Expressionsanalyse

Die Expressionsanalyse des *PTCH2*-Gens erfolgte mittels RT-PCR. Für die Expressionsstudie wurde die Methode der Duplex-RT-PCR verwendet. Bei dieser Methode werden in einer PCR neben den Primern für das Zielgen zusätzlich Primer für ein Referenzgen eingesetzt, welches als interner Standard fungiert. Ziel- und Referenzgen müssen hierbei unter ähnlichen Bedingungen amplifizierbar sein. Von dem Referenzgen nimmt man an, daß die Kopienzahl pro Zelle in allen zu untersuchenden Proben konstant ist, während die Kopienzahl des zu untersuchenden Gens variabel sein kann. Ein kurzes Fragment des zu untersuchenden Gens und des Referenzgens werden in derselben PCR-Reaktion amplifiziert. Die Menge des zu untersuchenden Gens wird dann auf das Referenzgen bezogen. Unterschiede in der Ausgangskopienzahl lassen sich bei dieser Analyse nur dann feststellen, wenn sich die PCR-Reaktionen in ihren exponentiellen Phase befinden, da die DNS-Mengen sich im Plateaubereich einem Sättigungswert annähern. Vor Beginn der eigentlichen Untersuchung wurde daher eine Zyklus-Kinetik durchgeführt, um die optimale Zykluszahl zu bestimmen.

Als Referenzgen wurde  $\beta_2$ -Mikroglobulin eingesetzt. Primer, PCR-Bedingungen und Produktgröße sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Die semiquantitative Expressionsanalyse wurde mit dem DNA Analyser Gene Reader 4200, von Li-Cor Biotechnology Division mit fluoreszenzmarkierten Primern (IRD800-Markierung, MWG Biotech) auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel durchgeführt. Nach Anregung durch einen Laser wird emittiertes Fluoreszenzlicht registriert. Die Datenerfassung erfolgte mit dem Programm Base Imager, die Datenauswertung und Berechnung der Bandenintensitäten mit dem Programm OneD-Scanalytion (beide MWG-Biotech). Hierbei wurde der Quotient der Signale *PTCH2*/ $\beta_2$ -Mik von jeder cDNS-Probe ermittelt.

Zuerst erfolgte unter Einsatz von normalem Hirngewebe als Referenz-cDNS die Ermittlung der optimalen Primerkonzentrationen für Ziel- und Referenzgen mittels Agarosegele. Diese Proben stammten aus Hirnbiopsaten, die nicht im Rahmen von Tumorerkrankungen entnommen worden waren.

Mit markierten Primern wurde die Zykluskinetik der Duplex-PCR durchgeführt, um den exponentiellen Bereich der PCR-Reaktion zu ermitteln. Beginnend nach 24 Zyklen, in Schritten von 1-2 Zyklen, wurde für die gebildeten Produkte die Reaktion abgestoppt und auf dem Li-Cor quantitativ ausgewertet. Die ermittelten optimalen PCR-Bedingungen für die anschließende Untersuchung sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Vor dem Auftragen wurden 10 µl PCR-Produkt mit 10 µl Li-Cor-Ladepuffer versetzt und davon nach Denaturierung (bei 94°C für 5 min) 2 µl aufgetragen.

	<b>Primersequenzen</b>	<b>PCR-Bedingung</b>
<b>PTCH2</b> 208 bp	Forward: 5'-IRD800-GTC CCT TTG CCT CCC TTG AG-3'  Reverse: 5'-TCC TGC CAG TGC ATG AAT TTG-3'	28 Zyklen  94°C, 40 sec  55°C, 50 sec  72°C, 50 sec
<b>β2-Mic</b> 148 bp	Forward: 5'-IRD800-TGT CTT TCA GCA AGG ACT GG-3'  Reverse: 5'-GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG-3'	1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10% DMSO

**Tabelle 3** Primersequenzen, Produktlänge und Duplex-RT-PCR-Bedingungen für die Expressions-Analyse. Erste Denaturierung bei 94°C, 3 min; finale Extension bei 72°C, 10 min.

Material:

10 µl 200 mM dNTPs

10 µl PCR-Puffer

3 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>

3 µl Primer (10 pmol) für β<sub>2</sub>-Microglobulin

2,7 µl Primer (10 pmol) für PTCH2

0,5 µl 0,025 U Taq

10% DMSO

ad. 100 µl aqua bidest.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Mutationsanalyse des *PTCH2*-Gens

Das *PTCH2*-Gen ist auf Chromosom 1p34.1 lokalisiert, in direkter Nähe zu den bekannten Allelverlusten bei Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen. Als Kandidat für ein Tumorsuppressorgen wurde die gesamte kodierende Sequenz, inklusive der Exon-Intron-Grenzen mit Hilfe der SSCP-Methode untersucht. Die Exone 12 und 17 wurden in je zwei überlappende Amplikons aufgeteilt. Aufgrund seiner Größe wurde das Amplifikat von Exon 13 vor der SSCP-Analyse mit dem Restriktionsenzym *Sac-I* geschnitten. Produkte mit aberrantem Laufverhalten wurden sequenziert. Primersequenzen, PCR- und SSCP-Bedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. In Exon 7, Exon 8, Intron 10, Exon 11, Intron 12 a, Exon 13, Exon 14, Exon 15, Intron 15, Exon 16 und Intron 18 konnten teils noch nicht beschriebene Polymorphismen nachgewiesen werden. Die SSCP-Analyse der übrigen Exone zeigte bei allen Proben identische Bandenmuster. Somatische Mutationen konnten in keiner der untersuchten Proben detektiert werden.

##### 3.1.1. SSCP-Analyse

Mit der SSCP-Methode wurden insgesamt 109 Tumorproben untersucht. Die 21 kodierenden Exone des *PTCH2*-Gens wurden einschließlich der Intron/Exon-Grenzen unter den in Tabelle 2 angegebenen Bedingungen analysiert. Die Primer lagen alle im intronischen Bereich. Zur Erhöhung der Sensitivität wurden für jedes Primerpaar zwei verschiedene SSCP-Bedingungen etabliert (ausgenommen Exon 1 und Exon 2). Als Referenzsequenz für die Untersuchungen wurde die GenBank Accession Number AF087651 (Smyth et al., 1999) herangezogen.

Bereits in der Literatur bekannte Polymorphismen konnten auch in unserem Kollektiv bestätigt werden: In Exon 7 zeigten 2 von 109 Proben ein abweichendes Laufmuster. In Exon 8 zeigte ein Tumor von 104 ein aberrantes Verhalten. Eine der 109 Tumorproben zeigte in Exon 11 und 13/58 Proben in Exon 13 veränderte Bandenmuster (Smyth et al., 1999).

Bislang in der Literatur noch nicht beschriebene intronische Polymorphismen fanden sich in Intron 10 bei 2/109 Proben, Intron 12 bei 46/97 Tumoren, Intron 15 bei 1/109, sowie Intron 18a in 20/83 Fällen. Neue stumme exonische Polymorphismen fanden sich in Exon 14 bei 1/75 Tumoren, in Exon 15 bei 1/30 Tumoren und in Exon 16 in 1/109 Fällen. Die Analyse der konstitutionellen DNS einiger dieser Proben aus Blutlymphozyten, zeigte das gleiche aberrante Laufverhalten, so daß von Polymorphismen und nicht von Mutationen ausgegangen werden konnte.

Die abweichenden Banden wurden direkt aus dem SSCP-Gel ausgeschnitten und die DNS eluiert. Nach Reamplifikation und Aufreinigung wurden die Produkte in die Sequenzierreaktion eingesetzt.

### **3.1.2. Sequenzierung**

Mittels Sequenzierung konnte in allen Amplifikaten ein Basenaustausch nachgewiesen werden. Die Sequenzierung und der anschließende Vergleich mit den Literatursequenzen des *PTCH2*-Gens ergab für Exon 7 einen stillen Basenaustausch von Thymin (T) zu Cytosin (C) in Codon 840 (Serin). In Exon 8 handelte es sich um einen stillen Austausch von Guanin (G) zu Thymin in Codon 1080 (Valin). Im 3'-Bereich des Exon 10 an der Position +50 konnte im Intron 10 ein Polymorphismus festgestellt werden, der durch einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin (A) hervorgerufen wurde. In Exon 11 zeigte sich ebenfalls ein stiller Basenaustausch von G→A im Codon 1425 (Alanin). Im 3'-Bereich des Exon 12a an der Position +22 konnte im Intron 12a ein Polymorphismus festgestellt werden, der durch einen Basenaustausch A→G hervorgerufen wurde. In Exon 13 konnte eine stille Einzelbasenaustausch von A→G in Codon 1821 nachgewiesen werden (Glutaminsäure). In Exon 14 war das veränderte Laufverhalten durch ein C→T Austausch im Codon 2127 (Asparaginsäure), in Exon 15 durch einen T→C Austausch im Codon 2487 (Asparaginsäure) hervorgerufen. Im 5'-Bereich des Exon 16 konnte im Intron 15 an der Position -39 ein Austausch von Cytosin zu Thymin detektiert werden. In Exon 16 zeigte sich im Codon 2565 ein Cytosin zu Thymin-Austausch (Leucin). Eine weitere intronische Veränderung fand sich im Intron 18 an der Position +14 mit einem Austausch von C→T.

Bei den Basenaustauschen, die in den nicht-kodierenden Introns liegen, kann nicht von einer Änderung der Aminosäuresynthese ausgegangen werden, zumal die betroffenen Bereiche keinen Anhalt für ein alternatives Splicing boten (Shapiro und Senapathy, 1987).

Da alle Basensubstitutionen auch in korrespondierenden Blutproben und in den DNS-Proben von gesunden Kontrollpersonen detektiert wurden, bzw. schon vorbeschrieben waren, konnten diese als Polymorphismen identifiziert werden. Die Polymorphismen in Exon 7, Exon 8, Exon 11 und Exon 13 sind in der Literatur bereits beschrieben (Smyth et al., 1999), während die Polymorphismen in Intron 10, Intron 12 a, Exon 14, Exon 15, Intron 15, Exon 16 und Intron 18 bisher nicht beschrieben sind.

Tabelle 4 und Tabelle 5 geben einen Überblick über die detektierten Polymorphismen und ihre Häufigkeiten in den einzelnen Tumorgruppen, sowie in der Kontrollgruppe.

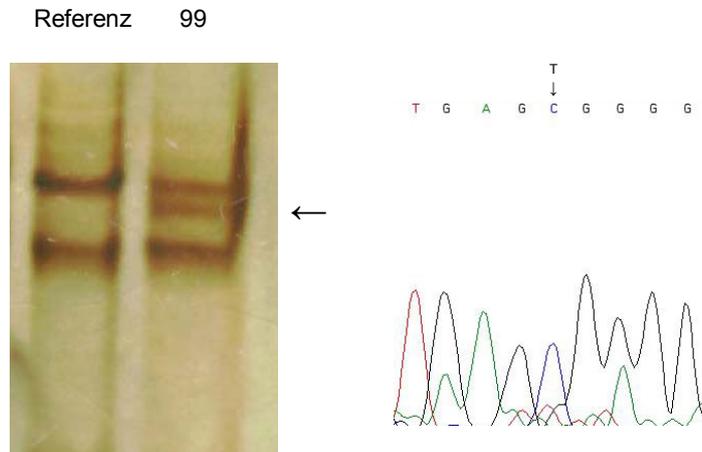
Exon/ Intron	Basen- Austausch	Aminosäure- Austausch	Frequenz der Polymorphismen			
			Meningeome	Gliale Tumoren	Alle Tumoren	Kontrollen
Exon 7	840 T>C	Ser-Ser	0/35	2/74	2/109	1/80
Exon 8	1080 G>T	Val-Val	0/34	1/70	1/104	0/79
Intron 10	1371(+50) G>A	intronisch	1/35	1/74	2/109	n.u.
Exon 11	1425 G>A	Ala-Ala	0/35	1/74	1/109	0/79
Intron 12a	1590(+22)A>G	intronisch	17/33	29/64	46/97	34/80
Exon 13	1821 A>G	Glu-Glu	1/7	12/51	13/58	14/80
Exon 14	2127 C>T	Asp-Asp	1/25	0/50	1/75	8/80
Exon 15	2487 T>C	Asp-Asp	1/18	0/12	1/30	n.u.
Intron 15	2515(-39) C>T	intronisch	1/35	0/74	1/109	0/79
Exon 16	2565 C>T	Leu-Leu	0/35	1/74	1/109	0/79
Intron 18	3114(+14) C>T	intronisch	9/30	11/53	20/83	25/80

**Tabelle 4** Sequenzveränderungen im *PTCH2*-Gen und deren Häufigkeiten im untersuchten Tumorkollektiv und Kontrollen (n.u.: nicht untersucht)

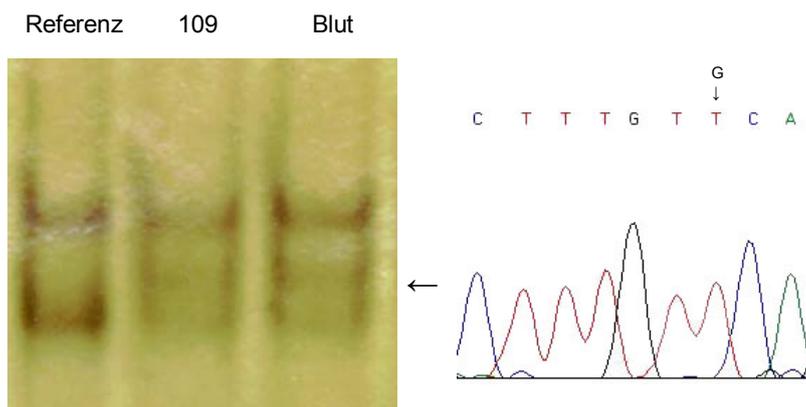
<u>Exon/ Intron</u>	MI	MII	MIII	OII	AO III	OAI	AOA III	AIII	GBM
Ex 7	0/13	0/16	0/6	0/12	0/29	0/9	1/13	0/5	1/6
Ex 8	0/13	0/16	0/5	0/12	0/29	0/8	0/12	0/4	1/5
In 10	0/13	1/16	0/6	0/12	1/29	0/9	0/13	0/5	0/6
Ex 11	0/13	0/16	0/6	0/12	0/29	0/9	0/13	0/5	1/6
In 12a	8/12	9/16	0/5	5/10	12/28	2/7	5/12	1/2	4/5
Ex 13	1/5	0/0	0/2	0/6	3/17	1/5	4/13	2/5	2/5
Ex 14	0/9	0/12	1/4	0/10	0/27	0/4	0/5	0/0	0/4
Ex 15	0/3	1/13	0/2	0/1	0/3	0/1	0/3	0/1	0/3
In 15	0/13	0/16	1/6	0/12	0/29	0/9	0/13	0/5	0/6
Ex 16	0/13	0/16	0/6	0/12	0/29	0/9	0/13	1/5	0/6
In 18	4/13	5/13	0/4	2/11	3/19	1/6	2/10	1/4	2/3

**Tabelle 5** Häufigkeiten der Sequenzveränderungen im *PTCH2*-Gen in Bezug auf die einzelnen Tumoruntergruppen.

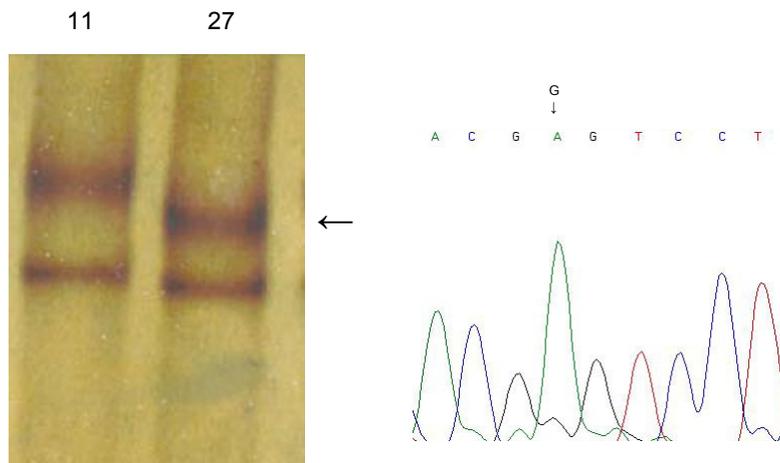
Die nachfolgenden Abbildungen 2-12 zeigen Ausschnitte aus den entsprechenden SSCP-Gelen mit den korrespondierenden Sequenzierungen.



**Abbildung 2** SSCP-Analyse von Exon 7 der Probe 99 (anaplastisches Oligoastrozytom) zusammen mit einer Referenz-DNS. Der Pfeil markiert die zusätzliche 3. Bande. (12%, 1:49, + Glycerol, RT)  
In der Sequenzierung ist der Einzelbasenaustausch von Thymin zu Cytosin im Codon 840 dargestellt.

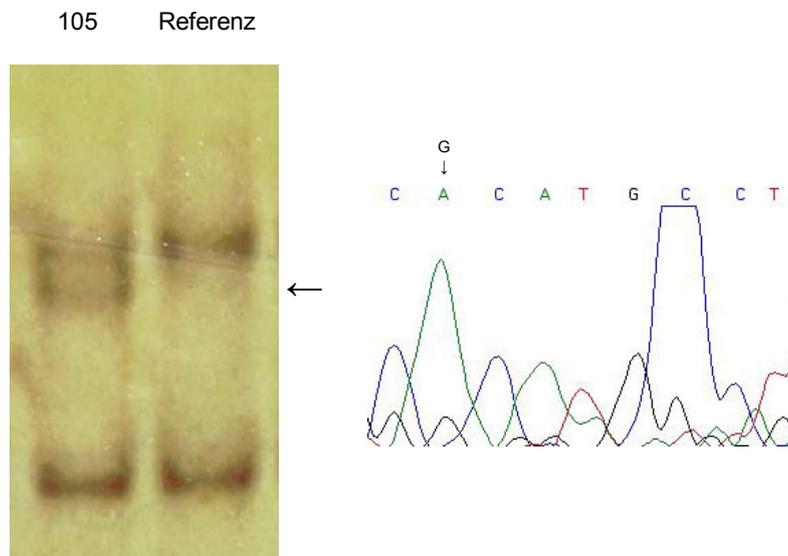


**Abbildung 3** SSCP-Analyse von Exon 8 der Probe 109 (Glioblastoma multiforme) zusammen mit der korrespondierenden Blutprobe und einer Referenz-DNS. Der Pfeil markiert die zusätzliche Bande. (10%, 1:79, Ø Glycerol, RT)  
In der Sequenzierung ist der Einzelbasenaustausch von Guanin zu Thymin im Codon 1080 dargestellt.



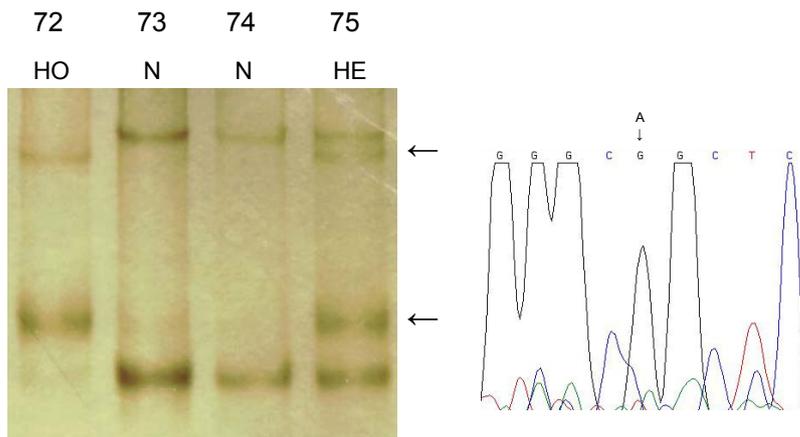
**Abbildung 4** SSCP-Analyse von Exon 10 der Proben 11 (Meningeom WHO-Grad I) und 27 (Meningeom WHO-Grad II). Der Pfeil markiert die aberrierende Bande. (14%, 1:99, + Glycerol, RT)

In der Sequenzierung ist der Einzelbasenaustausch im Intron 10 von Guanin zu Adenin an der Position 1371(+50) dargestellt.

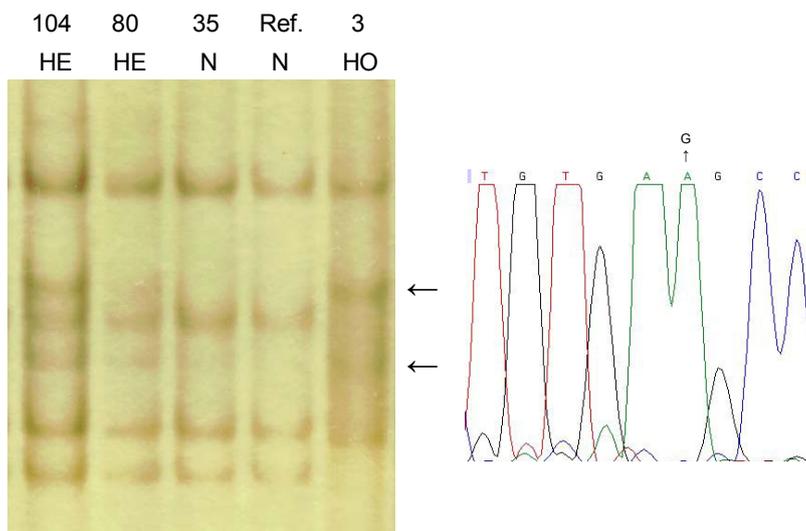


**Abbildung 5** SSCP-Analyse von Exon 11 der Probe 105 (Glioblastoma multiforme) zusammen mit einer Referenz-DNS. Der Pfeil markiert die zusätzliche 3. Bande. (12%, 1:49, + Glycerol, RT)

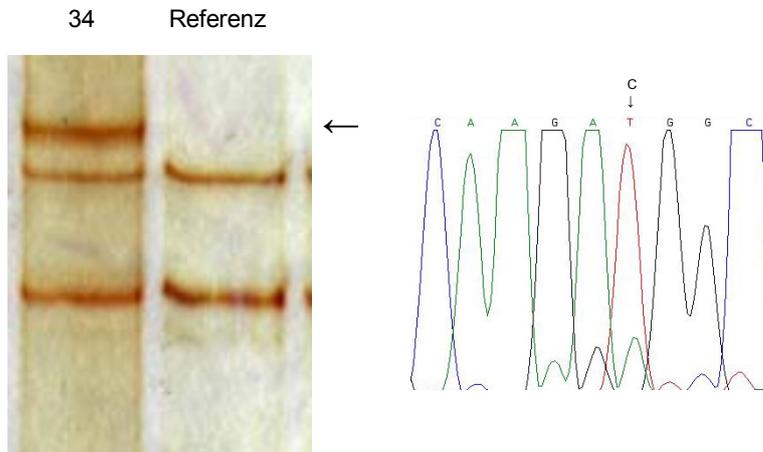
In der Sequenzierung ist der Einzelbasenaustausch von Guanin zu Adenin im Codon 1425 dargestellt.



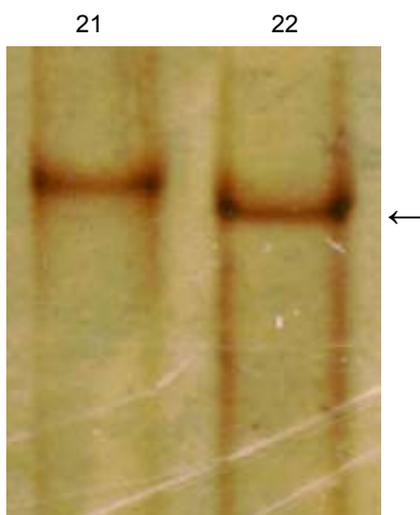
**Abbildung 6** SSCP-Analyse von Exon 12 a. Gezeigt sind Proben mit normalem Laufverhalten (N, 73; 74), sowie Laufverhalten von homozygoten (HO, 72) und heterozygoten (HE, 75) Varianten. (14%, 1:99, Ø Glycerol, RT)  
In der Sequenzierung ist der Einzelbasenaustausch im Intron 12 a von Adenin zu Guanin an der Position 1590(+22) dargestellt.



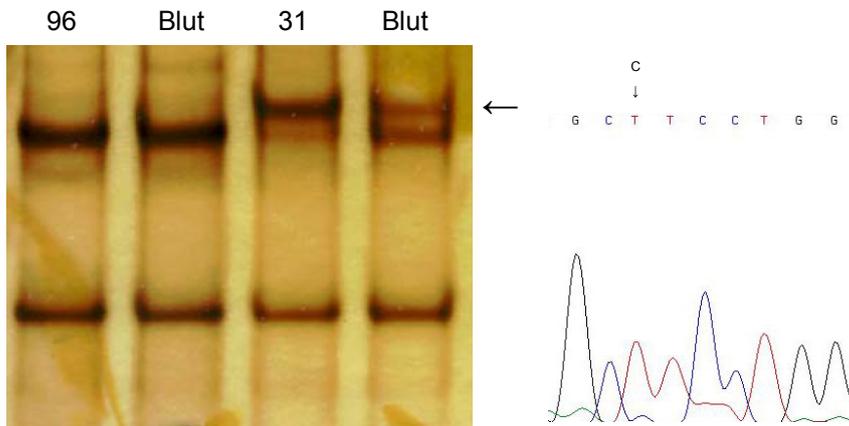
**Abbildung 7** SSCP-Analyse von Exon 13. Gezeigt sind normales Laufverhalten (N, 35; Referenz), sowie Laufverhalten von heterozygoten (HE, 104; 80) und homozygoten (HO, 3) Varianten. (10%, 1:29, Ø Glycerol, RT)  
In der Sequenzierung ist eine Variante mit normalem Laufverhalten im Codon 1821 (GAA) gezeigt (Variante: Austausch von Adenin zu Guanin →GAG)



**Abbildung 8** SSCP-Analyse von Exon 14 der Probe 34 (Meningeom WHO- Grad III) zusammen mit einer Referenz-DNS. Der Pfeil markiert die zusätzliche Bande. (14%, 1:99, Ø Glycerol, RT)  
In der Sequenzierung ist der Einzelbasenaustausch von Cytosin zu Thymin im Codon 2127 dargestellt.



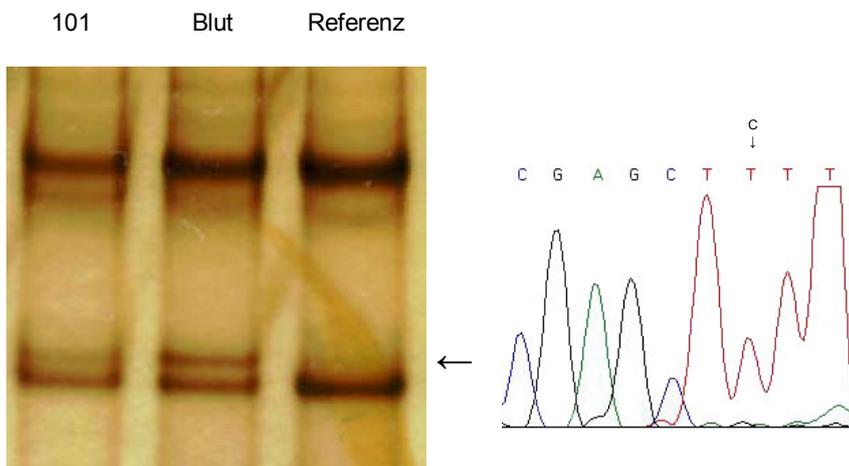
**Abbildung 9** SSCP-Analyse von Exon 15 der Tumoren 21 und 22 (Meningeome WHO-Grad II). Die aberrierende Bande ist mit dem Pfeil gekennzeichnet. (10%, 1:29, + Glycerol, RT)



**Abbildung 10** SSCP-Analyse von Exon 16 der Proben 96 (anaplastisches Oligoastrozytom) und 31 (Meningeom WHO-Grad III) mit korrespondierenden Blutproben. Der Pfeil markiert die zusätzliche Bande.

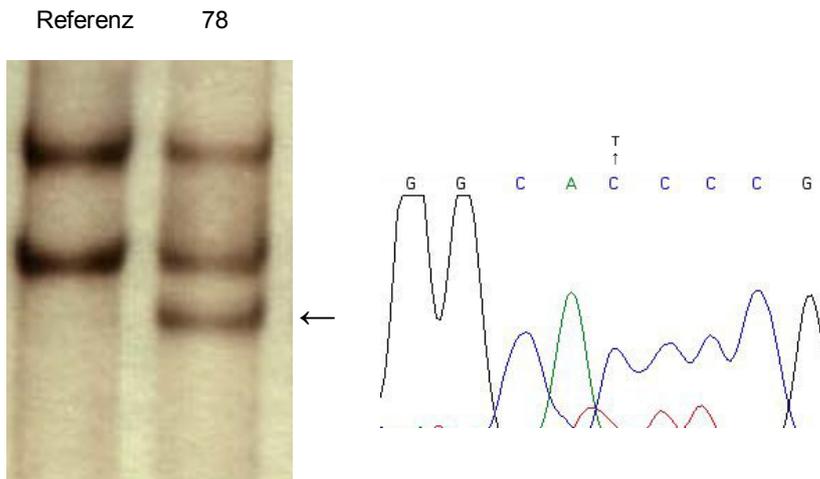
(14%, 1:99; Ø Glycerol, RT)

In der Sequenzierung ist der Einzelbasenaustausch im Intron 15 von Cytosin zu Thymin an der Position 2515(-39) dargestellt.



**Abbildung 11** SSCP-Analyse von Exon 16 der Probe 101 (Astrozytom WHO-Grad III) zusammen mit der korrespondierenden Blutprobe und einer Referenz-DNS. Der Pfeil markiert die zusätzliche Bande. (14%, 1:99; Ø Glycerol, RT)

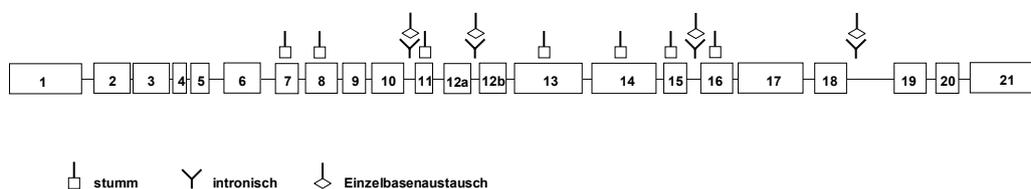
In der Sequenzierung ist der Einzelbasenaustausch von Cytosin zu Thymin im Codon 2565 dargestellt.



**Abbildung 12** SSCP-Analyse von Exon 18 der Probe 78 (Oligoastrozytom WHO-Grad II) zusammen mit einer Referenz-DNS. Der Pfeil markiert die zusätzliche 3. Bande. (14%, 1:99; + Glycerol, 4°C)

In der Sequenzierung ist das normale Laufverhalten im Intron 18 an der Position 3114(+14) gezeigt (Variante: Austausch von Cytosin zu Thymin)

Abbildung 13 zeigt schematisch die Verteilung der Polymorphismen im *PTCH2*-Gen in dem untersuchten Tumorkollektiv.



**Abbildung 13** Verteilung der genetischen Veränderungen im *PTCH2*-Gen in dem von uns untersuchten Kollektiv. Die nummerierten Kästen bezeichnen die Exone (modifiziert nach Smyth et al., 1999).

### 3.1.3. Häufigkeit der Polymorphismen und Allelverteilung

Die Untersuchung an 160 Allelen gesunder Kontrollpersonen sollte zeigen, wie häufig die identifizierten Polymorphismen in der Normalbevölkerung auftreten. Dazu wurde die DNS von 80 gesunden Personen mit den Primern für die Exone 7,8,11,12a, 13, 14, 16, und 18 amplifiziert und im SSCP-Gel analysiert. Das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

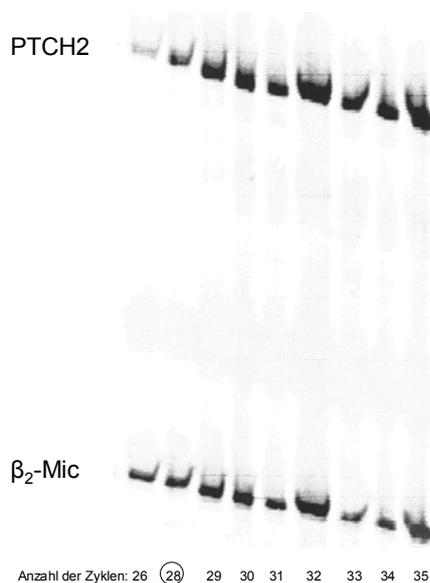
Exon	Basen-austausch	Aminosäure-Austausch	Träger des Polymorphismus	heterozygot	homozygot	Frequenz
7	T840C	Ser-Ser	1/80	1/80	0/80	0,006
8	G1080T	Val-Val	0/79	0/79	0/79	<0,007
10	G1371(+50)A	intronisch	n.u.	-	-	-
11	G1425A	Ala-Ala	0/79	0/79	0/79	<0,007
12A	A1590(+22)G	intronisch	34/80	26/80	8/80	0,2625
13	A1821G	Glu-Glu	14/80	14/80	0/80	0,088
14	C2127T	Asp-Asp	8/80	8/80	0/80	0,05
15	T2487C	Asp-Asp	n.u.	-	-	-
16	C2515(-39)T	intronisch	0/79	0/79	0/79	<0,007
16	C2565T	Leu-Leu	0/79	0/79	0/79	<0,007
18	C3114(+14)T	intronisch	25/80	22/80	3/80	0,175

**Tabelle 6** Polymorphismen und die an einem Normalkollektiv ermittelten Frequenzen der selteneren Allele.

Die veränderten Laufverhalten in Exon 8, 11 und 16 konnten in keiner von 79 untersuchten Kontrollen nachgewiesen werden. Die Veränderungen in Exon 8 und Exon 11 waren von Smyth et al. (1999) bereits als Polymorphismen definiert worden. Exon 10 und 15 wurden nicht hinsichtlich ihrer Frequenzen untersucht.

### 3.2. Expressionsanalyse

Wie unter 2.13 beschrieben, wurde zur semiquantitativen Bestimmung der *PTCH2*-Expression eine Duplex-PCR für das Zielgen und das Referenzgen  $\beta_2$ -Microglobulin ( $\beta_2$ -Mik) durchgeführt. In dieser Expressionsstudie wurde cDNS von 29 Meningeomen (MI, n=8, MII n=16, MIII n=5), 28 Oligodendrogliomen (OI n=6, AOI n=22), sowie 8 Oligoastrozytomen (OA n=4, AOA n=4), deren *PTCH2*-Mutations- und LOH-Status bekannt waren, eingesetzt. Die relativen Expressionswerte wurden aus dem Quotienten von Referenzgen/Zielgen ermittelt. Jede Probe wurde bis zu viermal (mindestens jedoch zweimal) untersucht und ein Mittelwert errechnet. Zu Beginn der Analyse wurde eine Zykluskinetik durchgeführt, um sicherzustellen, daß sich die PCR noch in ihrer exponentiellen Phase befand (Abbildung 14).

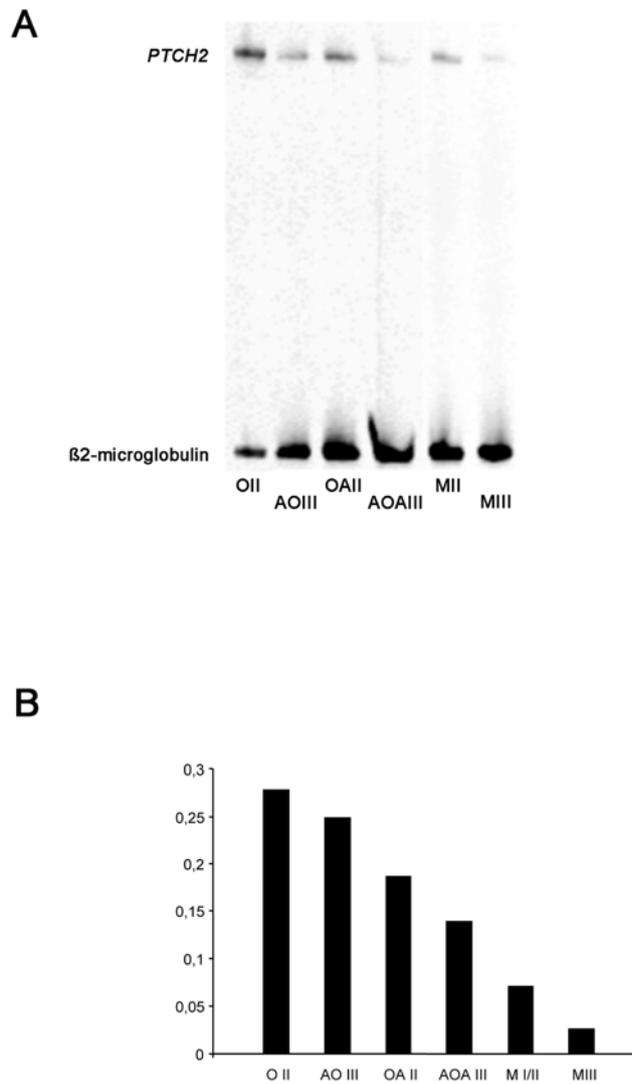


**Abbildung 14** Zykluskinetik für die Duplex-PCR mit  $\beta_2$ -Microglobulin. Es wurde aufgrund dieser Untersuchung im folgenden mit 28 Zyklen gearbeitet.

Das durchschnittliche Expressionslevel in Oligodendrogliomen lag bei 0,25; in Oligoastrozytomen bei 0,16; sowie bei 0,06 in den Meningeomen.

Als Kontrolle für die Expression in Meningeomen dienten die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe zur Bestimmung der *PTCH2*-Expressionslevel in normalen leptomeningealen Zellen mittels Real-Time PCR und TaqMan-Methode. Es zeigte sich hier eine signifikant höhere Expression im leptomeningealen Normalgewebe im Vergleich zu den Meningeomen. Eine normale Zellpopulation, die neoplastischen Oligodendrogliomzellen entspricht stand als Kontrollgewebe für die Expression in glialen Tumoren nicht zur Verfügung.

Mittels t-test wurden die Verhältnisse unter den verschiedenen Tumorübergruppen analysiert und es zeigte sich eine signifikant niedrigere mRNS-Expression in Meningeomen im Vergleich zu den Oligodendrogliomen ( $t\text{-test} < 0,001$ ), sowie den Oligoastrozytomen ( $t\text{-test} < 0,05$ ). Statistische Analyse in Hinblick auf den Malignitätsgrad in den einzelnen Untergruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede, es konnte jedoch in allen drei Gruppen ein Trend zu niedrigeren *PTCH2*-Expressionslevel mit zunehmenden Malignitätsgraden gefunden werden (Abbildung 15). Ebenso unterschieden sich die Expressionslevel innerhalb der einzelnen Tumorübergruppen in Bezug zu ihrem LOH-Status nicht signifikant.



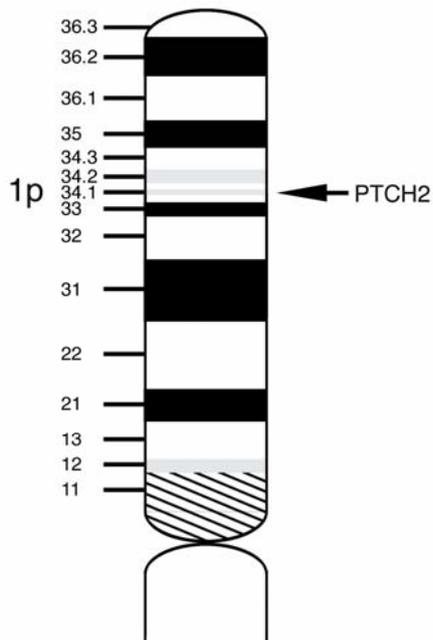
**Abbildung 15** Semiquantitative Expressionsanalyse mittels Duplex-PCR  
A: Repräsentative Gelelektrophorese der *PTCH2* und  $\beta_2$ Microglobulin cDNS in verschiedenen Tumorproben  
B: Diagramm der durchschnittlich ermittelten, relativen *PTCH2*-mRNS-Expression

#### 4. Diskussion

Vieles spricht dafür, daß der kurze Chromosomenarm 1p eines oder mehrere Tumorsuppressorgene beherbergt, die in der Pathogenese verschiedener Gehirntumoren eine Rolle spielen. Dies konnten verschiedene Untersuchungen wie die von Bello et al.(1995), Felsberg et al.(2004) (1p36.31-1pter; 1p36.22-p36.31; 1p34.2-p36.1), Reifenberger et al. (1994b), Kraus et al. (1995) und anderen Gruppen zeigen, die in bis zu 80% der Oligodendrogliome oder in bis zu 50% der Oligoastrozytome Allelverluste auf 1p nachweisen konnten.

Verlust genetischen Materials von 1p (1p34-1pter) konnte weiterhin mit der malignen Progression in atypischen Meningeomen in Verbindung gebracht werden (Boström et al., 1997; Rempel et al., 1993; Simon et al., 1995).

Das *PTCH2*-Gen ist auf Chromosom 1p34.1 lokalisiert und es konnten bereits Mutationen in diesem Gen in einzelnen Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen nachgewiesen werden, ähnlich wie Mutationen des zuerst identifizierten homologen Tumorsuppressorgens *PTCH*. Durch seine Lage und die Funktion seines Genproduktes stellt *PTCH2* ein interessantes Kandidatengen dar. Abbildung 16 zeigt schematisch die Lokalisation des *PTCH2*-Gens auf dem kurzen Arm von Chromosom 1.



**Abbildung 16** Schematische Darstellung des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p) und der dortigen Lokalisation des *PTCH2*-Gens

Um die Bedeutung des *PTCH2*-Gens als potentielles Tumorsuppressorgen in der Pathogenese verschiedener anderer Hirntumore, insbesondere meningealer und glialer Tumoren zu untersuchen, wurde zum einen eine systematische Mutationsanalyse mittels SSCP-Methode zur Detektion genetischer Veränderungen durchgeführt, sowie zusätzlich eine mRNA-Expressionsanalyse vorgenommen.

In dem vorliegenden untersuchten Kollektiv von insgesamt über einhundert Gehirntumoren verschiedener Entitäten konnten insgesamt elf, teils noch nicht bekannte Sequenzvariationen nachgewiesen werden. Keine dieser Varianten führte zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Ptch2-Proteins; es handelt sich somit also um stille Einzelbasenaustausche. Somatische Mutationen fanden sich nicht. Sämtliche Sequenzveränderungen konnten entweder ebenfalls im Blut des jeweiligen Patienten (falls vorhanden) oder einem großen Kontrollkollektiv nachgewiesen werden, so daß sie als Polymorphismen identifiziert werden konnten.

Die von uns nachgewiesenen Varianten lagen in Exon 7, Exon 8, Intron 10, Exon 11, Intron 12a, Exon 13, Exon 14, Exon 15, Intron 15, Exon 16 und Intron 18.

Die Polymorphismen in Exon 7, Exon 8, Exon 11 und Exon 13 hat bereits Smyth 1999 identifizieren können.

Genetische Varianten können neben dem direkten Einfluß auf die Aminosäuresequenz des entstehenden Proteins auch einen Einfluß auf die Transkriptionskontrolle und somit eine krankheitsverursachende oder krankheitsmodifizierende Rolle haben. Man vermutet, daß Veränderungen insbesondere von Spleißaktivitäten und regulatorischen Elementen eine Rolle bei der Entstehung genetisch komplexer Erkrankungen spielen können (Kleinjan und van Heyningen, 2005; Krawczak et al., 1992).

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten intronischen Veränderungen, die in Intron 10, 12 a, 15 und 18 des *PTCH2*-Gens gefunden wurden zeigten keinen Hinweis darauf, daß sie für ein alternatives Spleißen des *PTCH2*-Gens verantwortlich sein könnten, da sie außerhalb bekannter 5'-Splicedonor- oder 3'-Spliceakzeptor-Konsensussequenzen liegen (Shapiro und Senapathy, 1987). Somit werden durch die vorliegenden Veränderungen mit großer Wahrscheinlichkeit keine neuen Spleißstellen generiert und damit ist eine verkürzte oder abweichend gespleißte *PTCH2*-mRNA bzw. Protein nicht zu erwarten.

Prinzipiell können jedoch auch stumme Varianten, sowohl im Intron als auch im Exon, Splice-Silencer oder Splice-Enhancer verändern oder neu generieren, und so durch abgeschwächte oder verstärkte Spleißsignale die Spleißaktivitäten beeinflussen. Um derartige Alterationen in der Spleißaktivität nachzuweisen, wären weitergehende Analysen der mRNA-Spezies und zusätzliche funktionelle Untersuchungen möglich.

Die im Jahre 1999 von Smyth et al. bei einer initialen Mutationsanalyse beschriebene und in einem Basalzellkarzinom nachgewiesene intronische Variante in der Splicedonorsequenz von Intron 20 (C3357+5T), ist ein Beispiel für eine Mutation in einer bekannten Spleißregion im *PTCH2*-Gen. Im unserem Kollektiv konnte diese Veränderung jedoch nicht gezeigt werden. Ebenso fand sich in unserem Kollektiv nicht die von Smyth in einem Medulloblastom identifizierte trunkierende Mutation im Sinne einer Deletion von zwei Basenpaaren an der Position 1170 (1170delCT).

Diese von Smyth et al. (1999) beschriebenen Varianten sind die bislang einzigen identifizierten Mutationen im *PTCH2*-Gen.

Auch Mutationen im *PTCH*-Gen konnten nur in ca. 10-15% der Medulloblastome nachgewiesen werden, so daß man annimmt, daß der Hedgehog-Signaltransduktionsweg nur in einer bestimmten Untergruppe dieser Tumoren an deren Entstehung beteiligt ist (Pietsch et al., 1997; Wolter et al., 1997).

Ebenso wie in unserem Hirntumorkollektiv konnten auch in den Untersuchungen von Alonso et al. (2005) an Oligodendrogliomen oder von Jogi et al. (2000) an Neuroblastomen keine Mutationen im *PTCH2*-Gen identifiziert werden. Alonso et al. (2005) untersuchten ein Kollektiv von 40 Oligodendrogliomen mit LOH von 1p, ohne eine Mutation nachweisen zu können ebenso wie Jogi et al. (2000), die 14, hauptsächlich hochgradige Neuroblastome untersuchten. Neben den von uns ebenfalls nachgewiesenen Polymorphismen konnte die Arbeitsgruppe um Smyth (1999) andererseits fünf Polymorphismen detektieren, die in unserem Kollektiv nicht auftraten (Exon 6: G735C, A618(-37)G; Exon 8: G1073A; Exon 12b: C1596T; Exon 13: A2055G). Die einzige detektierte Sequenzveränderung in der Untersuchung von Alonso (2005) war ebenfalls ein in unserem Kollektiv nicht nachgewiesener Polymorphismus in Exon 13 (A2055G) mit einer ermittelten Frequenz von 7,3%.

Diese unterschiedliche Frequenz der Varianten kann einerseits mit der gewählten Untersuchungsmethode in Zusammenhang stehen (a), auf die in einigen Studien begrenzte Anzahl der untersuchten Proben zurückzuführen sein (b) oder in Zusammenhang mit dem genetischen Hintergrund der untersuchten Populationen stehen (c).

(a) Wie schon unter 2.8 erwähnt, steht mit der SSCP-Analysemethode eine reproduzierbare, zuverlässige und unkomplizierte Methode zur Detektion genetischer Varianten in Kandidatengenomen zur Verfügung, deren Detektionswahrscheinlichkeit jedoch nicht 100% erreicht (Hayashi und Yandell, 1993). Vermutlich werden durch diese Methode solche Varianten nicht detektiert, die unter den jeweiligen Untersuchungsbedingungen keine ausgeprägten Konformationsänderungen, und damit keine bemerkbaren Veränderungen im Laufverhalten im Polyacrylamidgel bewirken. Zur Erhöhung der Detektionsrate werden die Proben daher bei unterschiedlichen Gel- oder Temperaturbedingungen untersucht, dennoch kann ein Übersehen einzelner Varianten nicht sicher ausgeschlossen werden.

(b) Die Anzahl der untersuchten Chromosomen eines Probenkollektives ist ausschlaggebend für die Wahrscheinlichkeit, mit der Varianten unterschiedlicher Populationsfrequenz detektiert werden können. Setzt man eine 100%-ige Detektionswahrscheinlichkeit der SSCP-Methode voraus, sollten im hier untersuchten Kollektiv Varianten mit einer Allelfrequenz von mindestens 1% rechnerisch mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in der Variabilitätsanalyse entdeckt werden. Allerdings sind die Konfidenzintervalle gerade für relativ seltene Varianten hoch bei gleichzeitig nicht 100%-iger Sensitivität der SSCP-Methode.

(c) Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Frequenzen der detektierten Varianten kann in dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Populationen begründet sein. So können die Allelfrequenzen in geographisch getrennten Kollektiven (beispielsweise Europa und Australien) variieren.

Es liegen uns keine Daten zu den Polymorphismenfrequenzen im von Smyth et al. (1999) untersuchten Tumor- oder Kontrollkollektiv vor. Da einige davon jedoch in unserem recht großen Tumorkollektiv nicht nachgewiesen werden konnten, muß angenommen werden, daß sie Varianten sehr geringer Häufigkeit oder sogar auch möglichen Sequenzierfehlern entsprechen könnten.

Zusätzlich konnte weder bei den bereits bekannten, noch bislang nicht bekannten Polymorphismen in unserem Kollektiv eine Häufung in bestimmten Tumorentitäten oder ein signifikanter Unterschied in den Häufigkeiten im Vergleich zum Normalkollektiv gezeigt werden. Wenn man zugrunde legt, daß eine Variante dann als Risikofaktor für die Entstehung von Tumoren des untersuchten Kollektives diskutiert werden kann, wenn sich die Frequenzen der Tumorproben signifikant vom Normalkollektiv unterscheiden, muß man abschließend feststellen, daß die von uns detektierten Polymorphismen keine Risikofaktoren für die Entstehung der untersuchten Hirntumoren darstellen.

Die Expressionsanalyse der *PTCH2*-mRNS wurde an leptomeningealem Gewebe, sowie 29 Meningeomen, 28 Oligodendrogliomen und 8 Oligoastrozytomen durchgeführt. Es ergab sich eine signifikant erniedrigte mRNS-Expression in den Meningeomen im Verhältnis zu normalem leptomeningealem Gewebe, zu Oligodendrogliomen und zu den Oligoastrozytomen.

Die Expression in glialen Tumoren wurde nicht in Relation zu einem entsprechenden Kontrollgewebe untersucht, da eine solche Zellpopulation, die neoplastischen Oligodendrogliomzellen entspricht, nicht sicher bekannt ist und nicht zur Verfügung stand.

In Basalzellkarzinomen wurde eine Überexpression von *PTCH2* beobachtet. Basalzellkarzinome zeigen häufig Mutationen im homologen *PTCH* und diese Mutationen führen zu einer Überexpression der *PTCH*-mRNS. Man nimmt an, daß in den betroffenen Zellen durch die Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs das Zielgen *PTCH* überexprimiert wird, auch die defekte Variante (Gailani et al., 1996). Da auch eine Überexpression von *PTCH2* in diesen Tumoren beobachtet wurde, ohne daß jedoch *PTCH2*-Mutationen vorlagen, unterstellte Zaphiropoulos et al. (1999) eine Regulation der *PTCH2*-mRNS-Expression durch eine Aktivierung des Signalwegs.

Die von uns beobachtete Unterexpression, insbesondere in Meningeomen läßt sich möglicherweise durch epigenetische Veränderungen (DNS-Methylierung) erklären. Untersuchungen konnten für *Ptch* im murinen System zeigen, daß die Transkriptionsaktivität des *Ptch*-Promotor sensitiv auf eine Methylierung ist (Uhmann et al., 2005). Ob ähnliche Mechanismen beim *PTCH2*-Gen eine Rolle spielen, ließe sich durch eine induzierte Re-Expression nach demethylierender Behandlung von Zelllinien weiter belegen.

Einschränkend muß jedoch bemerkt werden, daß durch die demethylierende Wirkung alle in der Zelle durch diesen Mechanismus inaktivierten Gene erfaßt werden. Somit kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob eine eventuelle Methylierung des *PTCH2*-Promotor selber funktionell ist, oder ein Gen, dessen Genprodukt die Expression des *PTCH2* kontrolliert. Eine solche Aussage ist nur durch den Nachweis des Methylierungsstatus der Promotorregion möglich.

Da die Promotorregion des *PTCH2*-Gens nicht genau charakterisiert ist, ist eine Untersuchung der Methylierung des *PTCH2*-Gens derzeit erschwert.

Zusätzlich zeigten unsere Daten eine Tendenz zu abnehmender *PTCH2*-mRNS-Expression mit höherem Tumorgrad in allen drei Tumoruntergruppen. Dies weist auf eine mögliche Beteiligung des *PTCH2*-Gens in Hinblick auf die Tumorprogression hin und steht einer klassischen Funktion als Tumorsuppressorgen entgegen.

Zusammenfassend schließen wir aus den Daten, daß das *PTCH2*-Gen keine entscheidende Rolle in der Entstehung der von uns untersuchten meningealen und glialen Tumoren zu spielen scheint. Es muß unterstellt werden, daß andere Tumorsuppressorgene auf dem Chromosomenarm 1p existieren müssen, die einen größeren Einfluß auf die Entstehung der untersuchten Hirntumoren haben. Die Expressionsdaten legen jedoch eine gewisse Bedeutung des *PTCH2*-Gens insbesondere in Hinblick auf die Tumorprogression nahe.

## 5. Zusammenfassung

Allelverluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p) kommen in hoher Frequenz in einer Reihe von intrakraniellen Tumoren vor, wie in Oligodendrogliomen und höhergradigen Meningeomen. Dies legt nahe, daß in diesem chromosomalen Bereich ein oder mehrere Tumorsuppressorgene lokalisiert sind, welche in der Entstehung und Progression dieser Tumoren involviert sind. Das *PTCH2*-Gen ist in diesem Bereich auf 1p lokalisiert und es konnten Mutationen in einzelnen Tumoren, u.a. einem Medulloblastom und Basalzellkarzinomen nachgewiesen werden.

*PTCH2* ist ein Homolog des *PTCH*-Gens, welches einen Transmembranrezeptor kodiert, der von Liganden der Hedgehog-Morphogenfamilie gebunden wird und eine zentrale, hemmende Wirkung auf den in der ZNS-Entwicklung involvierten Hedgehog-Signalweg hat.

Um die Relevanz des *PTCH2*-Gens als potentielles Kandidatengen in Hirntumoren zu beurteilen, wurden in dieser Studie verschiedene Hirntumorentitäten in Hinblick auf DNS-Mutationen des *PTCH2*-Gens mittels der SSCP-Technik und nachfolgender Sequenzierung, sowie auf veränderte Genexpression mittels Duplex-RT-PCR-Analyse untersucht. Zu dem untersuchten Tumorkollektiv von 109 Proben zählten meningeale und gliale Tumoren, welche gehäuft Allelverluste von 1p aufwiesen.

Vier, der in der Literatur bereits vorbeschriebenen DNS-Sequenzpolymorphismen konnten in unserem Kollektiv bestätigt werden (in Exon 7, 8, 11, 13). Zusätzlich konnten sieben neue DNS-Sequenzpolymorphismen identifiziert werden (in Exon 14, 15, 16; Intron 10, 12A, 15, 18). Somatische Mutationen konnten nicht identifiziert werden.

Die Expressionsanalyse mittels Duplex-RT-PCR zeigte signifikant unterschiedliche *PTCH2*-mRNS-Expressionslevel in Meningeomen und Oligodendrogliomen sowie Meningeomen und Oligoastrozytomen mit jeweils niedrigeren Expressionsleveln in meningealen Tumoren. Ebenso ergab sich eine signifikant erniedrigte mRNS-Expression in den Meningeomen im Verhältnis zu normalem leptomeningealem Gewebe. Zusätzlich zeigte sich eine Tendenz zu niedrigerer *PTCH2*-mRNS-Expression mit zunehmendem Malignitätsgrad in allen drei Untergruppen, ohne daß diese Ergebnisse jedoch das Signifikanzlevel erreichten.

Obwohl das Fehlen somatischer Mutationen im *PTCH2*-Gen bei den untersuchten Hirntumorentitäten darauf hinweist, daß *PTCH2* kein Zielgen für Mutationen ist, scheint die abnehmende mRNA-Expression in höheren Tumorgraden auf eine Beteiligung von *PTCH2* bei der Tumorprogression hinzuweisen. Eine Ursache könnte in epigenetischen Veränderungen liegen.

Die funktionelle Rolle des *PTCH2*-Gens in Gehirntumoren muß in zukünftigen Untersuchungen weiter eruiert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Alonso ME, Bello MJ, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Aminoso C, Lopez-Marin I, de Campos JM, Isla A, Vaquero J, Gutierrez M, Sarasa JL, Rey JA. Mutational study of the 1p located genes p18ink4c, Patched-2, RIZ1 and KIF1B in oligodendrogliomas. *Oncol Rep* 2005; 13: 539-542

Barnfield PC, Zhang X, Thanabalasingham V, Yoshida M, Hui CC. Negative regulation of Gli1 and Gli2 activator function by Suppressor of fused through multiple mechanisms. *Differentiation* 2005; 73: 397-405

Beckmann MJ, Prayson RA. A clinicopathologic study of 30 cases of oligoastrocytoma including p53 immunohistochemistry. *Pathology* 1997; 29: 159-164

Bello MJ, Leone PE, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA. Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 1995; 64: 207-210

Bello MJ, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Saez Castresana J, Pestana A, Rey JA. Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in human gliomas reveals frequent loss of 1p in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 1994; 57: 172-175

Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 180-185

Bigner SH, Vogelstein B. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma. *Brain Pathol* 1990; 1: 12-18

Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 1996; 6: 298-304

Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 1976; 3: 2303-2308

---

Böcker W, Höfler H, Denk H, Heitz PU. Allgemeine Tumorpathologie. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Hrsg.. Pathologie. München-Wien-Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1997: 161-200

Boström J, Mühlbauer A, Reifenberger G. Deletion mapping of the short arm of chromosome 1 identifies a common region of deletion distal to D1S496 in human meningiomas. *Acta Neuropathol* 1997; 94: 479-485

Brat DJ, James CD, Jedlicka AE, Connolly DC, Chang E, Castellani RJ, Schmid M, Schiller M, Carson DA, Burger PC. Molecular genetic alterations in radiation-induced astrocytomas. *Am J Pathol* 1999; 154: 1445-1451

Brüstle O, Ohgaki H, Schmitt HP, Walter GF, Ostertag H, Kleihues P. Primitive neuroectodermal tumors after prophylactic central nervous system irradiation in children. Association with an activated K-ras gene. *Cancer* 1992; 69: 2385-2392

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 137-144

Burger PC, Scheithauer BW. Tumors of the Central Nervous System. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1994

Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS. Surgical Pathology of the Nervous System and its Coverings, 3<sup>rd</sup> edition. London: Churchill Livingstone, 1991

Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 1985; 56: 1106-1111

Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1473-1479

Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13630-13634

Cavin LW, Dalrymple GV, McGuire EL, Maners AW, Broadwater JR. CNS tumor induction by radiotherapy: a report of four new cases and estimate of dose required. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18: 399-406

Chin HW, Hazel JJ, Kim TH, Webster JH. Oligodendrogliomas. I. A clinical study of cerebral oligodendrogliomas. *Cancer* 1980; 45: 1458-1466

Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 1988; 62: 2152-2165

Davis FG, Preston-Martin S. Epidemiology. Incidence and survival. In: Bigner DD, McLendon RE, Bruner JM, eds.. *Russell and Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System*, 6<sup>th</sup> edition. London: Arnold, 1998; 5-45

Dehghani F, Schachenmayr W, Laun A, Korf HW. Prognostic implication of histopathological, immunohistochemical and clinical features of oligodendrogliomas: a study of 89 cases. *Acta Neuropathol (Berl)* 1998; 95: 493-504

Di Rocco F, Carroll RS, Zhang J, Black PM. Platelet-derived growth factor and its receptor expression in human oligodendrogliomas. *Neurosurgery* 1998; 42: 341-346

Donahue B, Scott CB, Nelson JS, Rotman M, Murray KJ, Nelson DF, Banker FL, Earle JD, Fischbach JA, Asbell SO, Gaspar LE, Markoe AM, Curran W. Influence of an oligodendroglial component on the survival of patients with anaplastic astrocytomas: a report of Radiation Therapy Oncology Group 83-02. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 38: 911-914

Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjold M, Collins VP. Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* 1990; 50: 5863-5867

Edwards MK, Terry JG, Montebello JF, Hornback NB, Kuharik MA. Gliomas in children following radiation therapy for lymphoblastic leukemia. *Acta Radiol Suppl Stockh* 1986; 369: 651-653

Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 1991; 51: 2164-2172

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767

Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC, Kirsch L, Fimmers R, Blaschke B, Schlegel U, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G. Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol* 2004; 14: 121-130

Frappaz D, Ricci AC, Kohler R, Bret P, Mottolese C. Diffuse brain stem tumor in an adolescent with multiple enchondromatosis (Ollier's disease). *Childs Nerv Syst* 1999; 15: 222-225

Fuller GN, Bigner SH. Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat Res* 1992; 276: 299-306

Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res* 1992; 52: 674-679

Gailani MR, Stahle-Backdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, Uden AB, Dean M, Brash DE, Bale AE, Toftgard R. The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet* 1996; 14: 78-81

Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev* 1996; 10: 301-312

Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 1997; 277: 1109-1113

Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 1994; 8: 2939-2952

Hagel C, Krog B, Laas R, Stavrou DK. Prognostic relevance of TP53 mutations, p53 protein, Ki-67 index and conventional histological grading in oligodendrogliomas. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18: 305-309

Hahn H, Christiansen J, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Chidambaram A, Gerrard B, Vorechovsky I, Bale AE, Toftgard R, Dean M, Wainwright B. A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem* 1996a; 271: 12125-12128

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix T, Wainwright B, Bale AE. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996b; 85: 841-851

Hammerschmidt M, Brook A, McMahon AP. The world according to hedgehog, *Trends Genet* 1997; 13: 14-21

Harrison MJ, Wolfe DE, Lau TS, Mitnick RJ, Sachdev VP. Radiation-induced meningiomas: experience at the Mount Sinai Hospital and review of the literature. *J Neurosurg* 1991; 75: 564-574

Hayashi K. PCR-SSCP: rapid and easy detection of DNA-sequence changes. *Hum Cell* 1992a; 5: 180-184

Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl* 1992b; 9: 73-79

Hayashi K, Yandell DW How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 1993; 2: 338-346

Helseth A, Mork SJ. Neoplasms of the central nervous system in Norway. III. Epidemiological characteristics of intracranial gliomas according to histology. *APMIS* 1989; 97: 547-555

Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, von Deimling A, Fassbender F, Xu HJ, Benedict WF, Yandell DW, Louis DN. The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann Neurol* 1994; 36: 714-721

Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson W, Heldin CH, Westermark B, Nister M. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 1992; 52: 3213-3219

Husemann K, Wolter M, Büschges R, Boström J, Sabel M, Reifenberger G. Identification of two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 and rare mutation of the CDKN2C gene from 1p32 in oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 1041-1050

James CD, Carlom E, Dumanski JP, Hausen M, Nordenskjold MD, Collins VP, Cavenee WK. Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 1988; 48: 5546-5551

Jaskolsky D, Zawirski M, Papierz W, Kotwica Z. Mixed gliomas. Their clinical course and results of surgery. *Zentralbl Neurochir* 1987; 48: 120-123

Jogi A, Abel F, Sjoberg RM, Toftgard R, Zaphiropoulos PG, Pahlman S, Martinsson T, Axelson H. Patched 2, located in 1p32-34, is not mutated in high stage neuroblastoma tumors. *Int J Oncol* 2000; 16: 943-944

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH, Scott MP. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996; 272: 1668-1671

Kim TS, Halliday AL, Hedley W, Convery K. Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. *J Neurosurg* 1991; 74: 27-37

Kleihues P, Cavenee WK, eds.. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000

Kleinjan DA, van Heyningen V. Long-range control of gene expression: Emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 8-32

Kolles H, Niedermayer I, Schmitt C, Henn W, Feld R, Steudel WI, Zang KD, Feiden W. Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings, and cytogenetics. *Acta Neurochir Wien* 1995; 137: 174-181

Kolodner RD. Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 397-401

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 1971; 68: 820-823

Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A. Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 91-95

Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single basepair substitutions in messenger RNA splice junctions of human genes- causes and consequences. *Hum Genet* 1992; 90: 41-54

Kros JM, Pieterman H, Van Eden CG, Avezaat CJ. Oligodendroglioma: the Rotterdam-Dijkzigt experience. *Neurosurgery* 1994; 34: 959-966

Lantos PL, VandenBerg SR, Kleihues P. Tumours of the Nervous System. In: Graham DI, Lantos PL, eds.. *Greenfield's Neuropathology*, 6<sup>th</sup> edition. London: Arnold, 1996; 583-879

Lindblom A, Rutledge M, Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP. Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 1994; 56: 354-357

Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H. Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *J Neurosurg* 1992; 77: 616-623

Maintz D, Fiedler K, Koopmann J, Rollbrocker B, Nechev S, Lenartz D, Stangl AP, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A. Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 1098-1104

Marigo V, Johnson RL, Vortkamp A, Tabin CJ. Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol* 1996; 180: 273-283

Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP, Synder H, Murdoch C, Blumenfeld A, Martuza RL, von Deimling A, Gusella JF, Houseal TW. Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: Identification a putative 'tumor progression' locus. *Oncogene* 1997; 14: 611-616

Mercer WE, Shields MT, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Romano JW, Ullrich SJ. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6166-6170

Monnier V, Dussillol F, Alves G, Lamour-Isnard C, Plessis A. Suppressor of fused links fused and Cubitus interruptus on the hedgehog signalling pathway. *Curr Biol* 1998; 8: 583-586

Mork SJ, Lindegaard KF, Halvorsen TB, Lehmann EH, Solgaard T, Hatlevoll R, Harvei S, Ganz J. Oligodendroglioma: incidence and biological behavior in a defined population. *J Neurosurg* 1985; 63: 881-889

Nakagawa Y, Perentes E, Rubinstein LJ. Immunohistochemical characterization of oligodendrogliomas: an analysis of multiple markers. *Acta Neuropathol (Berl)* 1986; 72: 15-22

Nijjar TS, Simpson WJ, Gadalla T, McCartney M. Oligodendroglioma. The Princess Margaret Hospital experience (1958-1984). *Cancer* 1993; 71: 4002-4006

Nishikawa R, Furnari FB, Lin H, Arap W, Berger MS, Cavenee WK, Su H. Loss of P16INK4 expression is frequent in high grade gliomas. *Cancer Res* 1995; 55: 1941-1945

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004; 64: 6892-6899

Orenic TV, Slusarski DC, Kroll KL, Holmgren RA. Cloning and characterization of the segment polarity gene cubitus interruptus Dominant of Drosophila. *Genes Dev* 1990; 4: 1053-1067

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformational polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989a; 86: 2766-2770

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989b; 5: 874-879

Papi L, De Vitis LR, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Montali E, Bigozzi U. Somatic mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet* 1995; 95: 347-351

Peraud A, Ansari H, Bise K, Reulen HJ. Clinical outcome of supratentorial astrocytoma WHO grade II. *Acta Neurochir (Wien)* 1998; 140: 1213-1222

Perrimon N. Hedgehog and beyond. *Cell* 1995; 80: 517-520

Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC. "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer* 1999; 85: 2046-2056

Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sörensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Wolf HK, von Deimling A, Wainwright B, Chenevix-Trench G, Wiestler OD, Wicking C. Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila* patched. *Cancer Res* 1997; 57: 2085-2088

Pohl U, Cairncross JG, Louis DN. Homozygous deletions of the *CDKN2C/p18<sup>INK4C</sup>* gene on the short arm of chromosome 1 in anaplastic oligodendrogliomas. *Brain Pathol* 1999; 9: 639-643

Preat T, Therond P, Lamour-Isnard C, Limbourg-Bouchon B, Tricoire H, Erk I, Mariol MC, Busson D. A putative serine/threonine protein kinase encoded by the segment-polarity fused gene of *Drosophila*. *Nature* 1990; 347: 87-89

Pulst SM, Rouleau GA, Marineau C, Fain P, Sieb JP. Familial meningioma is not allelic to neurofibromatosis 2. *Neurology* 1993; 43: 2096-2098

---

Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res* 1997; 57: 842-845

Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res* 1994a; 54: 4299-4303

Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994b; 145: 1175-1190

Reifenberger J, Reifenberger G, Ichimura K, Schmidt EE, Wechsler W, Collins VP. Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors. *Am J Pathol* 1996; 149: 29-35

Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Kohler B, Schonicke A, Scharwachter C, Kumar K, Blaschke B, Ruzicka T, Reifenberger G. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 2005; 152: 43-51

Rempel SA, Schwechheimer K, Davis RL, Cavenee WK, Rosenblum ML. Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res* 1993; 53: 2386-2392

Rhyu MS. Molecular mechanisms underlying hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 240-251

Robbins DJ, Nybakken KE, Kobayashi R, Sisson JC, Bishop JM, Therond PP. Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2. *Cell* 1997; 90: 225-234

Russell DS, Rubinstein LJ. *Pathology of Tumours of the Nervous System*, 5<sup>th</sup> edition. London: Edward Arnold, 1989

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491

Salvati M, Artico M, Caruso R, Rocchi G, Orlando ER, Nucci F. A report on radiation-induced gliomas. *Cancer* 1991; 67: 392-397

Schneider BF, Shashi V, von Kap H, Golden WL. Loss of chromosomes 22 and 14 in the malignant progression of meningiomas. A comparative study of fluorescence in situ hybridization (FISH) and standard cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 85: 101-104

Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, Fulton D, Hagen NA, MacKinnon JA, Sutherland G, Cairncross JG, Forsyth P. Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study. *Can J Neurol Sci* 1998; 25: 197-201

Shafqat S, Hedley-Whyte ET, Henson JW. Age-dependent rate of anaplastic transformation in low-grade astrocytoma. *Neurology* 1999; 52: 867-869

Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 7155-7174

Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR, Davis DH. Mixed oligoastrocytomas: a survival and prognostic factor analysis. *Neurosurg* 1994; 34: 577-582

Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavenee WK, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature* 1992; 355: 846-847

Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM, 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

Sisson JC, Ho KS, Suyama K, Scott MP. Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 1997; 90: 235-245

Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, Pietsch T, Wicking C, Wainwright BJ. Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 291-297

Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F, Rosenthal A. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 1996; 384: 129-134

Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* 2002; 418: 892-897

Taylor MD, Zhang X, Liu L, Hui CC, Mainprize TG, Scherer SW, Wainwright B, Hogg D, Rutka JT. Failure of a medulloblastoma-derived mutant of SUFU to suppress WNT signaling. *Oncogene* 2004; 23: 4577-4583

Uhmann A, Ferch U, Bauer R, Tauber S, Arziman Z, Chen C, Hemmerlein B, Wojnowski L, Hahn H. A model for PTCH1/Ptch1-associated tumors comprising mutational inactivation and gene silencing. *Int J Oncol* 2005; 27: 1567-1575

Uden AB, Zaphiropoulos PG, Bruce K, Toftgard R, Stahle-Backdahl M. Human patched (PTCH) mRNA is overexpressed consistently in tumor cells of both familial and sporadic basal cell carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 2336-2340

Van Meir EG, Kikuchi T, Tada M, Li H, Diserens AC, Wojcik BE, Huang HJ, Friedmann T, de Tribolet N, Cavenee WK. Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 1994; 54: 649-652

Van Nielen KM, de Jong BM. A case of Ollier's disease associated with two intracerebral low-grade gliomas. *Clin Neurol Neurosurg* 1999; 101: 106-110

Von Deimling A, Eibl RH, Ohgaki H, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Kleihues P, Chung RY, Wiestler OD, Seizinger BR. p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. *Cancer Res* 1992a; 52: 2987-2990

Von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR. Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. *Cancer Res* 1992b; 52: 4277-4279

Vorechovsky I, Uden AB, Sandstedt B, Toftgard R, Stahle-Backdahl M. Trichoepitheliomas contain somatic mutations in the overexpressed PTCH gene: support for a gatekeeper mechanism in skin tumorigenesis. *Cancer Res* 1997; 57: 4677-4681

Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996; 273: 613-622

Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D, Parsons R. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1997; 57: 4183-4186

Weber RG, Bostrom 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 USA* 1997; 94: 14719-14724

Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 1995; 146: 827-832

Wharton SB, Hamilton FA, Chan WK, Chan KK, Anderson JR. Proliferation and cell death in oligodendrogliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24: 21-28

Wicking C, Shanley S, Smyth I, Gillies S, Negus K, Graham S, Suthers G, Haites N, Edwards M, Wainwright B, Chenevix-Trench G. Most germ-line mutations in the nevoid basal cell carcinoma syndrome lead to a premature termination of the PATCHED protein, and no genotype-phenotype correlations are evident. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 21-26

Wolter M, Reifenberger J, Sommer C, Ruzicka T, Reifenberger G. Mutations in the human homologue of the Drosophila segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 1997; 57: 2581-2585

Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6899-6903

Wu JK, Folkerth RD, Ye Z, Darras BT. Aggressive oligodendroglioma predicted by chromosome 10 restriction fragment length polymorphism analysis. Case study. *J Neurooncol* 1993; 15: 29-35

Wu JK, Naber SP. *Molecular Biology of Brain Tumors*. *Neurosurg Clin N Am* 1994; 5: 127-133

Zang KD. Cytological and cytogenetical studies on human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 6: 249-274

Zaphiropoulos P, Uden AB, Rahnema F, Hollingsworth RE, Toftgard R. PTCH2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. *Cancer Res* 1999; 59: 787-792

Zhu JJ, Santarius T, Wu X, Tsong J, Guha A, Wu JK, Hudson TJ, Black PM. Screening for loss of heterozygosity and microsatellite instability in oligodendrogliomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 207-216

Zülch KJ. Brain Tumours. Their Biology and Pathology, 3<sup>rd</sup> edition. Berlin Heidelberg: Springer, 1986

## **7. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Torsten Pietsch danke ich für die Aufgabenstellung und Betreuung meiner Arbeit.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pietsch für die nette Betreuung im Labor.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie für die große Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Herrn Ulrich Klatt für die Fotoarbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Albert Becker für seine fortwährende Unterstützung und konstruktive Hilfe.

Meinen Freundinnen und Freunden, sowie meiner Familie danke ich ganz herzlich für ihr Verständnis und ihre Hilfe.