

Aus dem Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Guido Reifenberger

**Molekulare Analyse von Tumorsuppressorgen-Kandidaten auf  
Chromosom 10 in Tumoren des Nervensystems**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Benjamin Köhler**

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez: Prof. Dr. Dr. Nürnberg

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. G. Reifenberger

Korreferent: PD Dr. med. M. Sabel

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in den folgenden wissenschaftlichen Artikeln veröffentlicht:

Köhler B, Wolter M, Blaschke B, Reifenberger G. Absence of mutations in the putative tumor suppressor gene KLF6 in glioblastomas and meningiomas. *Int J Cancer*. 2004 Sep 10;111(4):644-5.

Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Köhler 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 Jan;152(1):43-51.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>A</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1</b>	<b>Molekulargenetische Grundlagen der Tumorentstehung</b>	<b>8</b>
1.1	Physiologische Eigenschaften der Tumorzelle	8
1.2	Genetische Grundlagen der Tumorentstehung	8
1.2.1	Onkogene	9
1.2.2	Tumorsuppressorgene	10
1.2.2.1	Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Promotorhypermethylierung	11
1.2.2.2	Die Bedeutung der DNA-Methylierung für den Zellzyklus und die Tumorentstehung	12
<b>2</b>	<b>Glioblastome und andere gliale Tumoren</b>	<b>14</b>
2.1	Allgemeines	14
2.2	Einteilung und Epidemiologie	14
2.3	Morphologie	14
2.4	Klinik und Therapie	15
2.5	Molekulargenetische Veränderungen in Glioblastomen	16
2.5.1	Genetische Veränderungen in primären und sekundären Glioblastomen	17
<b>3</b>	<b>Meningeome</b>	<b>18</b>
3.1	Allgemeines und Epidemiologie	18
3.2	WHO-Klassifikation	18
3.3	Morphologie	19
3.4	Klinik und Therapie	19
3.5	Molekulargenetische Veränderungen in Meningeomen	20
<b>4</b>	<b>Medulloblastome</b>	<b>22</b>
4.1	Allgemeines	22
4.2	Lokalisation und Epidemiologie	22
4.3	Pathogenese und Morphologie	22
4.4	Klinik und Therapie	23
4.5	Molekulargenetische Veränderungen in Medulloblastomen	23
<b>5</b>	<b>Basalzellkarzinome und der Hedgehog-Signalweg</b>	<b>25</b>
5.1	Allgemeines und Epidemiologie	25
5.2	Lokalisation und Morphologie	25
5.3	Therapie	26
5.4	Molekulargenetische Veränderungen in Basalzellkarzinomen	27
5.5	Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg	27
5.6	Unterschiede im Hedgehog-Signalweg zwischen <i>Drosophila</i> und Säugern	30
5.7	Die Bedeutung des Hh-Signalweges für die Krebsentstehung	31
<b>6</b>	<b>Ziele der eigenen Arbeit: Identifizierung und Charakterisierung von Tumorsuppressor-Kandidatengenen auf Chromosom 10 in Hirntumoren</b>	<b>33</b>
<b>B</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Material</b>	<b>36</b>
7.1	Tumorgewebe und Blut	36
7.2	Oligonukleotide	41
7.3	Glioblastomzelllinien und Zellkultur	44
7.4	Verwendete Puffer und Lösungen	44
<b>8</b>	<b>Methoden</b>	<b>45</b>
8.1	Polymerasekettenreaktion	45
8.2	Verfahren zur mRNA-Expressionsanalyse	46
8.2.1	Synthese von cDNA aus mRNA	46

8.2.2	Expressionsanalyse mittels differentieller Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) und Real-Time RT-PCR	47
8.2.2.1	Differentielle Reverse Transkriptase-PCR	47
8.2.2.2	Real-Time Reverse Transkriptase-PCR	48
8.3	Methoden der Mutationsdetektion	51
8.3.1	Mutationsanalyse mittels Einzelstrangkonformationspolymorphismus (SSCP „Single-strand Conformational Polymorphism“-Analyse	51
8.3.2	Mikrosatellitenanalyse	53
8.3.3	DNA-Sequenzierung	54
8.4	Methoden zur Analyse epigenetischer Veränderungen	56
8.4.1	Natrium-Bisulfitbehandlung genomischer DNA	56
8.4.2	Methoden der Zellkultur	57
8.4.2.1	5'-Azacytidinbehandlung von Glioblastomzelllinien	57
8.4.3	Expressionsanalyse mittels Oligonukleotid-Mikroarray-Technologie	60
<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Analyse des Tumorsuppressorkandidatengens <i>KLF6</i> in Meningeomen und Glioblastomen</b>	<b>64</b>
9.1	<i>KLF6</i> -Mutationsanalyse	64
9.2	Ergebnisse der <i>KLF6</i> -Mutationsanalyse	64
9.3	mRNA-Expressionanalyse von <i>KLF6</i>	65
9.4	Methylierungsanalyse von <i>KLF6</i> in Meningeomen	67
<b>10</b>	<b>Mutations- und Expressionsanalyse des Tumorsuppressor-Kandidatengens <i>SUFUH</i> in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen</b>	<b>68</b>
10.1	<i>SUFUH</i> -Mutationsanalyse	68
10.2	Ergebnisse der LOH-Analyse von <i>SUFUH</i>	71
<b>11</b>	<b>Expressionsprofilerstellung von unbehandelten und mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und TSA-behandelten Gliomzelllinien mittels Mikroarray-Analyse</b>	<b>73</b>
<b>D</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
<b>12</b>	<b><i>SUFUH</i> – Suppressor of fused</b>	<b>78</b>
12.1	Eignung der SSCP-Analyse als Sichtungsverfahren von Mutationen in Tumoren	82
<b>13</b>	<b><i>KLF6</i> – Kruppel like factor 6</b>	<b>83</b>
13.1	<i>KLF6</i> – Konkurrenz zu p53?	83
13.2	Die Rolle als Tumorsuppressorgen	84
13.3	Diskussion der Ergebnisse	85
<b>14</b>	<b>Identifizierung neuer Tumorsuppressor-Kandidatengene durch eine kombinierte Demethylierungs-/globale Expressionsanalyse in Gliom-Zelllinien</b>	<b>88</b>
<b>E</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>F</b>	<b>Danksagung</b>	<b>99</b>
<b>G</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b>	<b>100</b>
<b>H</b>	<b>Zusammenfassung (Abstrakt)</b>	<b>102</b>

## A Einleitung

Das Ziel medizinischer Forschung ist unter anderem, das Wissen über Ätiologie und Pathogenese von Krankheiten zu detaillieren, um insbesondere die Basis für neue und bessere therapeutische oder präventive Ansätze zu schaffen. Die meisten Therapiemethoden, die dem aktuellen Standard zur Behandlung maligner Tumoren entsprechen, sind im Hinblick auf Effizienz und Zielgenauigkeit suboptimal. Sie richten ihre chemische, radiologische oder mechanische Attacke zwar in erster Linie gegen den „inneren Feind“, die Tumorzelle, vernichten jedoch durch ihre mangelnde Präzision fast immer auch gesundes Gewebe. Somit ergibt sich für den Therapeuten ein ständiges Abwägen von Dosis, Wirkung und Schaden. Hält man die Dosis klein, ist der Schaden für den Gesamtorganismus zwar gering, die Wirkung auf den Tumor jedoch ebenfalls und der Krebs hat gute Chancen, den Kampf zu gewinnen. Im umgekehrten Fall vernichtet eine hohe Dosis zwar viele Tumorzellen, schadet aber auch dementsprechend dem gesunden Gewebe.

Das Hauptproblem, dem in absteigender Reihenfolge die Chemo-, Radio- und chirurgische Therapie unterliegen, ist die Zielgenauigkeit der heutigen Therapiemethoden. So existiert momentan kaum ein Chemotherapeutikum, das sich selektiv gegen bestimmte Krebszellen richtet, sondern vielmehr in einem Rundumschlag die Krebszellen als vermeintlich „schwächsten Gegner“ am wirkungsvollsten trifft. Der wissenschaftlichen Fiktion, ein solches Pharmakon zu entwickeln, nähert sich die aktuelle Forschung mit langsamen Schritten.

In einigen Krebsarten sind durch molekulargenetische Untersuchungen bereits Signalwege identifiziert worden, die bei der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle spielen. Die Kenntnis von Komponenten dieser Signalwege ermöglicht es unter Umständen, selektive, pharmakologische Inhibitoren solcher Signalkaskaden zu produzieren. So führte die Entdeckung der Relevanz des Sonic Hedgehog (SHH)-Signalweges für die Entstehung von Medulloblastomen zu der Vermutung, dass man durch einen Inhibitor des Transmembranproteins Smoothend, dem Cyclopamin, diese Tumoren selektiv therapieren kann (Berman *et al.* 2002). Im Tiermodell zeigten sich bislang vielversprechende Ergebnisse. Ohne die Kenntnis der molekulargenetischen Grundlage von malignen Tumoren wäre es nicht möglich, derartige Therapiekonzepte zu entwickeln.

Ein weiteres Beispiel, wie molekulargenetische Analysen die Therapiestrategie beeinflussen können, sind 1p- und 19q-Deletionen in anaplastischen Oligodendrogliomen, deren

Anwesenheit für ein außerordentlich gutes Ansprechen auf eine Radio- und Chemotherapie spricht (Cairncross *et al.* 1998).

Aber auch die Diagnostik, die Prognoseermittlung und die Prävention profitieren von neuen molekulargenetischen Erkenntnissen. So ist es wahrscheinlich, dass die Etablierung eines „genetischen Fingerabdruckes“ diverser Tumoren mit tumorspezifischen Expressions- und Mutationsmustern die bislang teilweise subjektive histopathologische Diagnostik objektivieren wird. Weiterhin lässt sich durch die Kenntnis bestimmter genetischer Veränderungen die Prognose verschiedener Tumoren präziser voraussagen, da deren Verlaufsvarianten häufig mit spezifischen genetischen Alterationen assoziiert sind. Auch im Sinne einer Krebsprävention kann die Molekulargenetik hilfreich sein. So können beispielsweise im Falle einer entdeckten Prädisposition durch Keimbahn- bzw. *first-hit*-Mutationen präventive Maßnahmen, wie die Entfernung des entsprechenden krebgefährdeten Organs, rechtzeitig durchgeführt werden (z.B. die präventive Thyreoidektomie bei *RET*-Mutationsnachweis im Rahmen eines MEN2A - Syndroms).

Aus diesen Gründen ist die Erforschung der Tumorgenetik kein realitätsfernes Modelldenken, sondern die Suche nach der Ätiologie einer der „Seuchen“ der heutigen Zeit, die Grundlagen für das Verständnis und die Behandlung der Krebserkrankungen schafft.

Hirntumoren sind im Erwachsenenalter vergleichsweise selten, stellen im Kindesalter jedoch die häufigsten soliden, malignen Tumoren dar und rangieren in dieser Altersgruppe hinter den Leukämien auf dem zweiten Platz in der Häufigkeitsstatistik aller Krebsarten. Diese Untersuchung beschäftigt sich mit dem häufigsten Hirntumor des Kindes, dem Medulloblastom, und den beiden häufigsten intrakraniellen Tumoren des Erwachsenen, dem Meningeom und dem Glioblastom. Außerdem ist, aufgrund der genetischen Gemeinsamkeiten mit dem Medulloblastom, das Basalzellkarzinom, die häufigste Krebserkrankung des Menschen überhaupt, Teil dieser Arbeit.

# 1 Molekulargenetische Grundlagen der Tumorentstehung

## 1.1 Physiologische Eigenschaften der Tumorzelle

Krebszellen unterscheiden sich in ihren zellphysiologischen Eigenschaften grundlegend von normal funktionierenden Körperzellen. Durch genetische Alterationen ist es ihnen gelungen, sich analog der darwinistischen Theorie einen Selektionsvorteil gegenüber ihren physiologischen Konkurrenten zu verschaffen. Es findet hier also ein Evolutionsprozess auf zellulärer Ebene statt (Nowell 1976). Hanahan und Weinberg gelang es im Jahre 2000 die physiologischen Charakteristika, die eine Krebszelle als eine solche definieren, auf sechs Eigenschaften zu reduzieren:

- 1) die autokrine Autonomie, beziehungsweise die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren (z.B. Eigenproduktion von PDGF (*platelet derived growth factor*) in Glioblastomzellen)
- 2) die Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- 3) die Umgehung des programmierten Zelltodes, der Apoptose, (z.B. durch genetische Veränderung des Sensormoleküls p53)
- 4) die Expression des Enzyms Telomerase (verhindert die Reduktion der Telomere nach der Zellteilung) (Reddel *et al.* 2001)
- 5) die Etablierung einer autarken Blutversorgung (z.B. durch Veränderung der Expression von angiogeneseregulierenden Faktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*))
- 6) die Fähigkeit zum invasiven Wachstum und zur systemischen Metastasierung.

## 1.2 Genetische Grundlagen der Tumorentstehung

Die Entwicklung maligner Tumoren basiert vermutlich immer auf der Kombination mehrerer genetischer Ereignisse, die eine unkontrollierte Proliferation der Zellen zur Folge haben.

Die wesentlichen genetischen Alterationen, die zu neoplastischem Zellwachstum führen, sind Mutationen im Bereich von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen.

Genetische Veränderungen, die zur Aktivierung (*gain of function*) von Onkogenen oder zum Funktionsverlust (*loss of function*) von Tumorsuppressorgenen führen, veranlassen die Zelle zur ungehemmten Proliferation.

Fusionexperimente mit Fibroblasten (Land *et al.* 1983) wiesen auf die Notwendigkeit von mindestens zwei genetischen Veränderungen zur Etablierung eines neoplastischen Wachstums hin. Ähnliche Versuchsreihen mit humanen Tumorzellen korrigierten diese Zahl der Ereignisse jedoch auf mindestens vier bis sieben (Renan 1993).

### 1.2.1 Onkogene

Onkogene sind Gene, deren Produkte auf direktem oder indirektem Wege die Regulation von Wachstum, Differenzierung und Genexpression der Zelle beeinflussen (Bishop 1991; Cantley *et al.* 1991). Meist handelt es sich um Komponenten von zellulären Signalkaskaden. Ihre physiologisch vorkommenden Varianten werden als Protoonkogene oder *c-onc* bezeichnet und haben dieselbe Funktion wie das entsprechende Onkogen, jedoch wird in diesem Normalzustand die Aktivität der Protoonkogene und folglich die Zellproliferation durch zelleigene Kontrollmechanismen reguliert. Durch genetische Veränderungen wie Mutationen, Amplifikationen oder Translokationen entziehen sich die Protoonkogene diesem Regulationsmechanismus und überführen die Zelle in einen unkontrollierten Proliferationszustand. Da das Genprodukt durch diese Veränderung einen Zugewinn an Aktivität erhält, spricht man von einem „*gain of function*“.

Onkogene lassen sich funktionell verschiedenen Gruppen zuordnen (modifiziert nach Knippers, 1999):

- Wachstumsfaktoren (z.B. *sis*, *int-2*, *hst*, *FGF-5*)
- Rezeptor-Tyrosin-Protein-Kinasen (z.B. *erb-B*, *neu*, *met*)
- Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Protein-Kinasen (z.B. *abl/bcr-abl*, *src*, *yes*)
- Serin-Threonin-Protein-Kinasen (z.B. *raf*)
- Membrangebundene G-Proteine (z.B. *RAS*)
- Transkriptionsfaktoren (z.B. *myc*, *L-myc*, *N-myc*, *fos*, *jun*)
- Regulatoren des Zellzyklus (z.B. *Cyclin-D*-verwandte Proteine)

Das Funktionsprinzip eines Onkogens soll hier am Beispiel der Ras-Proteine illustriert werden:

Proteine der Ras-Familie zeigen Veränderungen in einer Vielzahl von Tumorentitäten, so z.B. in ca. 80% der Pankreaskarzinome und mehr als 50% der Kolonkarzinome. Sie sind als membrangebundene G-Proteine Teil von Signaltransduktionsketten, die eine ligandeninduzierte Rezeptoranregung durch GDP/GTP-Austausch ins Zellinnere weiterleiten. Als aktives GTP/Ras-Protein stimulieren sie eine nachgeschaltete Raf-Kinase als Element einer Signalkette, deren Ziel die Anregung der Transkription von Genen im Zellkern ist, die funktionell die Zellproliferation initiieren. Die Inaktivierung der Ras-Proteine erfolgt durch Hydrolyse von GTP über moleküleigene GTPase-Aktivität, die durch Anwesenheit eines weiteren Proteins GAP (*GTPase activating protein*) multipliziert werden kann. Bestimmte Mutationen im *RAS*-Gen führen über Veränderungen in der Aminosäuresequenz zur Unfähigkeit der hydrolytischen Abspaltung von GTP und somit zur permanenten Aktivierung des Ras-Proteins und der nachfolgenden Signalkaskade. Es resultiert eine ständige Stimulation der Zellproliferation.

### **1.2.2 Tumorsuppressorgene**

Tumorsuppressorgene (TSG) sind die funktionellen Antagonisten von Onkogenen im Prozess der Karzinogenese, weshalb sie auch als Anti-Onkogene bezeichnet werden (Varmus und Weinberg 1994). Es handelt sich um Gene, die z.B. durch eine Kontrollfunktion im Zellzyklus unphysiologisch erhöhte Proliferationszustände der Zelle unterdrücken können. Im Falle eines Funktionsverlustes des Genproduktes ermöglicht dies einen unkontrollierten Wachstumsprozess. Im Gegensatz zum Onkogen, das die Karzinogenese in der Regel durch einen Funktionsgewinn (*gain of function*) begünstigt, geschieht dies beim TSG zumeist durch eine genetische Inaktivierung (*loss of function*). Die wichtigsten molekularen Mechanismen, die zu einer Inaktivierung führen, sind Punktmutationen und Deletionen. Auch Translokationen und Insertionen sowie die Inhibition der Transkription infolge von Hypermethylierung sogenannter CpG-Inseln in regulatorischen 5'-Bereichen von Genen sind Mechanismen, die auf unterschiedlichem Wege einen Funktionsverlust von Tumorsuppressorgen herbeiführen können.

Tumorsuppressorgene zeigen in der Mehrzahl der Fälle rezessive Eigenschaften. Das bedeutet, dass das Ausschalten beider Allele notwendig ist, um eine vollständige Inaktivierung des Genproduktes zu erhalten. Im heterozygoten Zustand kann meist eine ausreichende Restfunktion durch das intakte Gen aufrechterhalten werden. Diese Theorie

veranlasste Knudson in den 70er Jahren zur sogenannten „*two-hit*“-Hypothese: In sporadisch auftretenden Tumoren, bei denen keine Keimbahnmutation vorliegt, müssen beide Allele durch somatische Mutationen inaktiviert werden. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines solchen Ereignisses ist für die Kombination zweier unabhängiger genetischer Veränderungen im gleichen Allelbereich äußerst gering. Ist jedoch durch eine Keimbahnmutation eines der beiden Allele im defekten Zustand vererbt worden (*first hit*), genügt in diesem Falle die einfache Alteration des anderen Allels (*second hit*) zum Verlust der TSG-Funktion. Natürlich ist hierfür die Wahrscheinlichkeit bei Weitem höher, was das frühe Auftreten der hiermit assoziierten Neoplasie begünstigt. Knudson konnte dies am Beispiel des Retinoblastoms, einem Netzhauttumor mit Manifestation im Kindesalter, erstmalig nachweisen (Knudson 1996).

Oben wurde bereits die Möglichkeit des Verlustes der Funktion eines TSGs durch Deletion erwähnt. Interessanterweise scheint eine Kombination von primärer Mutation eines Allels mit sekundärem Verlust des zweiten Allels (LOH = *loss of heterozygosity*) eine überdurchschnittlich häufige molekularpathogenetische Kombination zu sein. Seltener hingegen ist der Verlust beider Allele (homozygote Deletion). Die Entdeckung von überdurchschnittlich vielen Allelverlusten in einer bestimmten chromosomalen Lokalisation weist somit auf das Vorhandensein eines TSGs in dieser Region hin (Lasko *et al.* 1991). In Glioblastomen scheint eine solche Region unter anderem der lange Arm von Chromosom 10 zu sein. Die Identifizierung und Charakterisierung des dort lokalisierten TSGs ist Gegenstand aktueller Forschung und dieser vorliegenden Arbeit.

### **1.2.2.1 Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Promotorhypermethylierung**

In den letzten Jahren geriet ein alternativer Mechanismus zur Inaktivierung von TSGs zunehmend in den Fokus wissenschaftlichen Interesses, die sogenannte Hypermethylierung von 5'-CpG-Inseln. Grundlage ist die Modifizierung der Base Cytosin durch Anlagerung einer Methylgruppe am C5-Atom, wodurch das 5-Methylcytosin gebildet wird. Verantwortlich für diese Reaktion sind Enzyme aus der Gruppe der DNA-Methyltransferasen (Dnmt1, Dnmt3 $\alpha$  und Dnmt3 $\beta$ ). Man unterscheidet zwischen zwei verschiedenen Methylierungsreaktionen: die postreplikative Methylierung von hemi-methylierter DNA durch die Dnmt1 und die *de novo*-Methylierung von nicht-methylierter DNA durch die Dnmt3 $\alpha$  und Dnmt3 $\beta$  (Laird 2003, Laird und Jaenisch 1996).

Die Verteilung des 5-Methylcytosins im Genom ist keineswegs zufällig. Es existieren Bereiche mit einer hohen Dichte der modifizierten Base neben solchen, die kein einziges Molekül dieser Art enthalten. 5-Methylcytosin findet man im menschlichen Genom fast ausschließlich in der Sequenzabfolge CpG. Auch diese pallindromische Struktur wiederum unterliegt keiner einheitlichen Verteilung in der humanen DNA. Es finden sich überzufällige Anhäufungen im Bereich von Promotorregionen, während das Vorkommen außerhalb dieser Abschnitte eher selten ist. Diese Regionen mit einer hohen Zahl von CpG-Dinukleotiden in den 5'-regulatorischen Bereichen von Genen bezeichnet man als CpG-Inseln. CpG-Inseln sind im Durchschnitt ca. 1 kb lang (Bird 1986) und sind mit etwa der Hälfte aller Gene assoziiert (Antequera und Bird 1993), wobei es sich in der Mehrzahl um so genannte „Haushaltsgene“ handelt, deren Genprodukt für das homöostatische Gleichgewicht der Zelle relevant ist.

### **1.2.2.2 Die Bedeutung der DNA-Methylierung für den Zellzyklus und die Tumorentstehung**

Die Funktion solcher epigenetischen Veränderungen blieb nach ihrer Entdeckung lange Zeit unklar. Studien von Li *et al.* (1992) an Nagetieren konnten zeigen, dass angeborene Mutationen im DNA-Methyltransferasegen zum Absterben des Embryos führen. Dies war Grundlage der Erkenntnis, dass die DNA-Methylierung während der embryonalen Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt. Der molekulare Mechanismus, der hierfür von Bedeutung ist, ist die Regulation der Expression von ontogenetisch wichtigen Genen durch Methylierung ihrer Promotorregionen. Neben dieser lebenswichtigen Funktion ist die DNA-Methylierung für einen während der Entwicklung essentiellen Vorgang verantwortlich, der als genomische Prägung („*genomic imprinting*“) bezeichnet wird. Dieser Begriff steht für das Ausschalten eines der beiden vererbten Allele in der ontogenetischen Frühphase. Es wird angenommen, dass dieses Ausschalten durch Methylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen von Haushaltsgenen geschieht.

Neuere Studien hingegen deuten auf weiterreichende Aufgaben der DNA-Methylierung hin. Bereiche, die dabei tangiert werden, sind unter anderem der Schutz gegen intragenomische Parasiten (Walsh *et al.* 1998), X-Inaktivierung (Li 2002), geistige Gesundheit und Krebsentstehung (Robertson und Wolffe 2000, Laird 2003).

Als Konsequenz der Methylierung von CpG-Inseln im Bereich von Promotorregionen kann die Transkription des dazugehörigen Gens herunterreguliert werden, indem die molekulare zu

einer morphologischen Veränderung der Chromatinstruktur führt (Jones und Baylin 2002). Relevant ist diese Art der Expressionsregulation bzw. -dysregulation sowohl bei physiologischen Entwicklungsprozessen, wie z.B. der genetischen Prägung von Genen und der X-Chromosominaktivierung, als auch bei der Krebsentstehung durch Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Als erstes durch Hypermethylierung inaktiviertes Tumorsuppressorgen wurde das *RB*-Gen entdeckt (Greger *et al.* 1994). Ein weiteres bekanntes Beispiel ist das *VHL* (von Hippel-Lindau)-Gen, welches in spontanen Klarzellkarzinomen der Niere eine Promoterhypermethylierung aufweist (Herman *et al.* 1994). Es ist aber nicht nur so, dass die Expression bestimmter Gene durch Methylierung verändert sein kann, sondern dass die Mutationsrate von methylierten Cytosinbasen 40fach gegenüber der des nicht methylierten Cytosins erhöht ist (Shen *et al.* 1994). Molekulargenetisch findet hierbei eine spontane Desaminierung am C4-Atom des Pyrimidinringes statt, so dass eine Transition von Cytosin zu Thymin resultiert. Aufgrund der Affinität von 5-Methylcytosin zu CpG-Dinukleotiden ist das Produkt dieser Mutation die Sequenz TpG, bzw. CpA auf dem komplementären Strang. Diese Mutation ist die bei weitem häufigste Punktmutation in menschlichen Krebszellen, weshalb man die Base 5-Methylcytosin auch als stärkstes „endogenes Mutagen“ bezeichnet (Laird und Jaenisch 1996).

Vergleicht man die Epigenetik von Tumorzellen mit der von physiologischen Zellen, findet man neben der erwähnten Hypermethylierung von CpG-Inseln im Bereich spezifischer Promotoren insgesamt eine Hypomethylierung des Genoms (Gama-Sosa *et al.* 1983). Auch diese Gegebenheit hat Relevanz für die Tumorgenese, denn sie führt zu einer verstärkten genomischen Instabilität (Kisseljova und Kisseljov 2005). Analog zur Hypermethylierung von Promotorbereichen bestimmter Tumorsuppressorgene, deren Konsequenz die genetische Stilllegung der Expression des dazugehörigen Gens ist, nimmt man zusätzlich an, dass die Umkehrreaktion, d.h. die Hypomethylierung von Promotorbereichen von Onkogenen und die daraus resultierende Überexpression selbiger, die Zelle zur Proliferation anregen kann. Als Beispiele hierfür seien die Protoonkogene *RAF* in Leberkarzinomen von Nagetieren und *BCL-2* in der chronisch lymphatischen Leukämie des Menschen erwähnt (Rao 1989, Hanada 1993).

## **2 Glioblastome und andere gliale Tumoren**

### **2.1 Allgemeines**

Das Glioblastom nimmt unter den verschiedenen zentralnervösen Tumorentitäten eine Sonderstellung ein, da es sich um den häufigsten Hirntumor des Erwachsenen und zugleich um einen der bösartigsten Tumoren des gesamten menschlichen Organismus handelt.

### **2.2 Einteilung und Epidemiologie**

Das Glioblastom gehört histopathologisch einer heterogenen Gruppe von Tumoren an, die als diffus infiltrierende Astrozytome bezeichnet werden. Als häufigster astrozytärer Tumor nimmt es einen Anteil von 15-20% aller Hirntumoren ein. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 5.- und 6. Lebensjahrzehnt, wobei jedoch Unterschiede zwischen dem sich *de novo* manifestierenden primären und dem aus einer niedrigeren Vorstufe entstandenen sekundären Glioblastom bestehen. Letzteres tritt statistisch häufiger in jüngeren Lebensjahren auf. Unabhängig hiervon liegt die Inzidenz beim männlichen höher als beim weiblichen Geschlecht.

In den meisten Fällen ist der Tumor in den Großhirnhemisphären, insbesondere in der fronto-temporalen Region, lokalisiert. Die ätiologische Bedeutung exogener und endogener Faktoren ist weitgehend unklar. Der einzige Faktor, dem Relevanz für die Entstehung von Glioblastomen zugewiesen wurde, ist die Exposition des Schädelhirnbereiches gegenüber ionisierender Strahlung.

### **2.3 Morphologie**

Kategorisiert man die Gruppe der diffus infiltrierenden Astrozytome anhand der Kriterien der Malignität, so wird dem Glioblastom, als dem bösartigsten Vertreter dieser Tumoren, der WHO („*World Health Organization*“)-Grad IV zuteil. Typisch für die niedriggradigen Astrozytome ist, dass sie im Laufe der Zeit durch Kumulation genetischer Veränderungen obligatorisch in einen höheren WHO-Grad übergehen. Somit sind das niedriggradige

Astrozytom (WHO-Grad II) und das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) zwar eigenständige Tumorentitäten, jedoch gleichzeitig Vorstufen in der Entwicklung eines sekundären Glioblastoms. Diese Verwandtschaft ist nicht nur pathomorphologisch sondern auch molekulargenetisch erkennbar.

Visualisiert man ein Glioblastom mittels bildgebender Verfahren, erkennt man einen zentralen hypodensen Nekroseherd, der zirkulär von einer Zone vermehrter Kontrastmittelanreicherung umgeben ist. Makroskopisches Korrelat ist die charakteristische heterogene Schnittfläche mit flächenhaften Nekrosen, Einblutungen durch Arrosion von Tumorgefäßen und grau-weißem Tumorgewebe, die Bailey und Cushing im Jahre 1926 Anlass zur Namensgebung *Glioblastoma multiforme* gab. Typisch für das Glioblastom ist das aggressiv infiltrative Wachstumsverhalten, das nicht selten zu einer Ausbreitung des Tumors über den Balken in die kontralaterale Hemisphäre führt. Resultat ist das sogenannte Schmetterlingsgliom.

Mikroskopisch ist trotz weitgehender Entdifferenzierung des Zellverbandes die Verwandtschaft zu den geringgradigen Astrozytomen erkennbar. Es zeigt sich jedoch ein zellreicheres Bild als beim diffusen Astrozytom. Histologische Charakteristika des Glioblastoms sind weiterhin die hohe Dichte an Zellen in der Mitosephase, flächenhafte spontane Nekrosen mit randständig pallisadenartig angeordneten Tumorzellen und ausgeprägte pathologische Gefäßproliferate. Weitgehend unklar ist, aus welcher Zellart sich das Glioblastom entwickelt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass relativ häufig Mischtumoren aus Oligodendrozytom- und Astrozytomanteilen vorkommen, wird spekuliert, dass beide Tumorentitäten aus einer gemeinsamen, entdifferenzierten Progenitorzelle stammen (Holland 2001; Merlo 2003).

## **2.4 Klinik und Therapie**

Der klinische Verlauf dieser Tumorerkrankung gestaltet sich typischerweise rasch progredient. Neben fokalen neurologischen Symptomen wird das Erscheinungsbild hauptsächlich durch Kopfschmerzen, epileptische Anfälle, den kontinuierlich zunehmenden Hirndruck und ein hirnorganisches Psychosyndrom geprägt. Durch Arrosion größerer Tumorgefäße mit nachfolgender intrazerebraler Blutung kann der Verlauf auch durch apoplektiforme Ereignisse gekennzeichnet sein. Die mittlere Überlebenszeit beträgt trotz bester zur Verfügung stehender Therapie lediglich 12 - 14 Monate. Ein wichtiger Faktor, der die Prognose negativ beeinflusst, ist ein Patientenalter >60 Jahre. Für eine etwas bessere

Prognose sprechen ein hoher Karnofsky-Index vor Behandlung, eine Symptombdauer von >6 Monaten und das Auftreten epileptischer Anfälle. Behandelt wird das Glioblastom durch neurochirurgische Resektion, kombiniert mit Röntgenbestrahlung und alkylirender Chemotherapie, am häufigsten mit der Substanz Temozolomid oder Nitrosoharnstoff-Derivaten. Das therapeutische Dilemma ist das infiltrative Wachstum, wodurch Tumorzellen für den Operateur unerkennbar das umliegende Parenchym infiltrieren und Ausgangspunkte für postoperative Rezidive bilden. Die Immuntherapie mit Interleukin-2 oder Interferonen und die Isotopenimplantation sind neuere therapeutische Ansatzpunkte, die zwar durch gesteigerte Zielgenauigkeit auch Tumorzellen schädigen, die für andere Methoden unerreichbar sind, jedoch noch keine wesentliche Verbesserung der Prognose gewährleisten konnten. Hoffnungsvolle Therapieoptionen sind die pharmakologische Intervention in molekulargenetische, tumorspezifisch veränderte Signalwege, wie z.B. den EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Signalweg (Halatsch *et al.* 2006).

## 2.5 Molekulargenetische Veränderungen in Glioblastomen

Ungefähr 70 % aller Glioblastome weisen eine Störung im p53-Signalweg auf (Collins 2004). Neben *TP53*-Mutationen, finden sich Verluste beider Kopien von *p14<sup>ARF</sup>* sowie Amplifikationen und Überexpression von *MDM2*. In den meisten Fällen finden sich zusätzlich Veränderungen im Rb1-Signalweg, was darauf schließen lässt, dass die gleichzeitige Störung von beiden Signalwegen essentiell für die Entstehung von Glioblastomen ist. Derartige Störungen des Rb1-Signalweges weisen 90 % aller Glioblastome auf (Ichimura 2000), dabei finden sich neben Allelverlusten auf Chromosom 13q und Mutationen im *RBI*-Gen selbst auch Funktionsverluste von p16, Amplifikationen und Überexpression von *CDK4* sowie Amplifikationen von *CDK6*, *CCND1* und *CCND3* (Costello *et al.* 1997, Büschges *et al.* 1999).

Ebenso von großer Bedeutung für die molekulargenetische Ätiologie des Glioblastoms sind Veränderungen im Pten/Pi3K/Akt-Signalweg. Eine aberrante Aktivierung von Ras tritt in fast 100 % der Glioblastome auf, wobei Mutationen in den *RAS*-Genen selbst nur selten vorliegen (Knobbe *et al.* 2004). Die Dysregulation dieses Signalweges ist folglich auf andere beteiligte Moleküle zurückzuführen. So ist in ca. 35 % der Glioblastome eine Amplifikation und in 30-50 % dieser Fälle zusätzlich eine Mutation des *EGFR*-Gens (Chromosom 7p11-12) vorhanden (Wong *et al.* 1992). In 30-45 % der Fälle finden sich Mutationen im *PTEN*-Gen, welches auf

Chromosom 10q lokalisiert, ein chromosomaler Arm, der in mehr als 90 % der Glioblastome Allelverluste aufweist (Schmidt *et al.* 1999). Eine Inaktivierung von Pten führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Akt-Signalweges. Auch andere Bestandteile dieses Signalweges weisen unterschiedlich häufig genetische Veränderung auf (Knobbe *et al.* 2003). Weitere Regionen, neben Chromosom 10, die in Glioblastomen häufig von Allelverlusten betroffen sind, sind der kurze Arm von Chromosom 17 in etwa einem Drittel der Fälle (Bogler *et al.* 1995), sowie die Chromosomenarme 6q (Liang *et al.* 1994), 11p (Fults *et al.* 1992), 13q und 22q (James *et al.* 1988).

### **2.5.1 Genetische Veränderungen in primären und sekundären Glioblastomen**

Die klinische Differenzierung zwischen primären und sekundären Glioblastomen findet auch in der Molekulargenetik ihr Korrelat. Während die *de novo* entstehenden primären Glioblastome (pGBM) eine teilweise eigenständige Kombination von genetischen Veränderung aufweisen, basiert die Genetik des sekundären *Glioblastoma multiforme* (sGBM) auf Veränderungen der Erbsubstanz, die schon in Astrozytomen niedrigeren Grades existieren. Man stellt sich vor, dass im Verlauf der Tumorprogression sich weitere Veränderungen der DNA ansammeln, die letztendlich dem sekundären Glioblastom seine typischen molekulargenetischen Charakteristika verleihen.

*De novo*-Tumoren stören den p53- und Rb1-Signalweg häufig durch eine Amplifikation auf Chromosom 12q14 im Bereich der Gene *CDK4* und *MDM2*, während Mutationen von *TP53* eher selten sind. In den Sekundärtumoren treten im Gegensatz dazu in bis zu 80 % der Fälle Mutationen von *TP53* und Deletionen von *RBI* auf (Reifenberger *et al.* 1996). Weiterhin ist in diesen Fällen nahezu keine *EGFR*-Amplifizierung zu finden, während *de novo*-Tumoren häufig Amplifikationen und Mutationen dieses Gens aufweisen.

## **3 Meningeome**

### **3.1 Allgemeines und Epidemiologie**

Meningeome sind überwiegend gutartige Geschwülste, die ihren Ursprung von arachnoidalen Zellen der Hirnhäute nehmen. Mit einem Anteil von 13-26 % zählen sie zu den häufigsten primär intrakraniellen Tumoren. Die Inzidenz beläuft sich auf ca. 6/100.000/Jahr, wobei Frauen im Falle des sporadisch auftretenden Meningeoms doppelt so häufig betroffen sind wie Männer. Es zeigt sich in diesen Fällen ein Gipfel des Manifestationsalters im 6.-7. Lebensjahrzehnt. Als exogenen Risikofaktor für das Auftreten von Meningeomen gilt die Exposition des Schädel-Hirn-Bereiches gegenüber ionisierender Strahlung (Perry *et al.* 2004). Weiterhin wird aufgrund der höheren Prävalenz des weiblichen Geschlechtes und der Tatsache, dass etwa zwei Drittel der Meningeome Progesteron- und ca. ein Zehntel Östrogenrezeptoren tragen, angenommen, dass hormonelle Wachstumssignale bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen (Perry *et al.* 2004).

### **3.2 WHO-Klassifikation**

Die meisten Meningeome werden gemäss der WHO-Klassifikation dem WHO-Grad I zugeteilt (Tab.1), da sie langsam wachsen und in der Regel durch eine operative Entfernung geheilt werden können. Atypische Meningeome hingegen werden aufgrund ihrer Histopathologie dem WHO-Grad II zugeordnet. Anaplastische Meningeome des WHO-Grades III (Collins 2004) zeigen histologische Zeichen der Anaplasie. Als Kriterien der Atypie werden hierbei das vermehrte Auftreten von Mitosen, die regionale Hyperzellularität, flächenförmiges („*sheet-like*“) Wachstum, eine hohe Kern-Zytoplasma-Relation, prominente Nukleoli und spontane Nekrosen angesehen (Kleihues *et al.* 2002). Die Eigenschaft des infiltrativen Wachstums in Knochen- und Weichgewebe ist bei Meningeomen kein Zeichen der Malignität und somit kein Kriterium einer höheren Gradeinteilung. Jedoch lassen sich bei diesen Tumoren häufiger Rezidive nachweisen (Collins 2004).

**Tabelle 1: WHO-Graduierung der histologischen Subtypen des Meningeoms.**

<b>Histologischer Subtyp</b>	<b>WHO-Grad</b>
Meningotheliales Meningeom	I
Fibröses (Fibroblastisches) Meningeom	I
Transitionales Meningeom	I
Psammomatöses Meningeom	I
Angiomatöses Meningeom	I
Microcystisches Meningeom	I
Sekretorisches Meningeom	I
Lymphoplasmazytenreiches Meningeom	I
Metaplastisches Meningeom	I
Atypisches Meningeom	II
Klarzelliges Meningeom	II
Chordoides Meningeom	II
Rhabdoides Meningeom	III
Papilläres Meningeom	III
Anaplastisches Meningeom	III

### **3.3 Morphologie**

Das Meningeom nimmt seinen Ursprung von Zellen der Hirnhaut und wächst als ein der Dura anhaftender Tumor von meist prall-elastischer Konsistenz. Die Eigenart der Meningeome, verdrängend beziehungsweise nicht-infiltrativ zu wachsen, ist grundlegend für die geringgradige Malignität dieser Tumoren. Die Konsequenz ist jedoch die Verdrängung des benachbarten Hirngewebes mit konsekutivem Anstieg des intrakraniellen Drucks.

Makroskopisch präsentieren sich Meningeome als graue, derbe, meist rundliche Tumoren verschiedener Lokalisation, die häufig interne Verkalkungsareale aufweisen. Das mikroskopische Erscheinungsbild variiert mit der histologischen Subtypisierung (siehe Tab.1). Charakteristisch ist die Ausbildung von konzentrischen Wirbelformationen mit zentraler Hyalinisierung. Dies wird häufig als zwiebelschalenartiges Wachstum beschrieben. Typisch sind ferner konzentrische Verkalkungen, sogenannte Psammomkörper.

### **3.4 Klinik und Therapie**

Die klinische Symptomatik ist oft unspezifisch oder manifestiert sich in Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors. Hirndrucksymptome durch das verdrängende Wachstum und epileptische Anfälle gehören zu den häufigen klinischen Kennzeichen. Meistens zeigt sich der symptomatische Verlauf über Jahre hinweg chronisch-progredient.

Das therapeutische Vorgehen der Wahl ist die komplette neurochirurgische Exstirpation, wonach, trotz Neigung zu Rezidiven, mit Dauerheilung gerechnet werden kann. Entscheidend für die Prognose eines Meningeompatienten ist die Einteilung des Tumors nach der WHO-Klassifikation. Während ein Meningeom des WHO-Grades I durch chirurgische Operation in den meisten Fällen rezidivfrei therapiert werden kann, neigen atypische Meningeome zur Rezidivbildung (Perry *et al.* 2004). Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit einem anaplastischen Meningeom (WHO-Grad III) beläuft sich auf weniger als zwei Jahre.

### **3.5 Molekulargenetische Veränderungen in Meningeomen**

Die häufigste genomische Veränderung in Meningeomen ist der Verlust einer Kopie des langen Arms von Chromosom 22 in 40-70 % der Fälle (Seizinger *et al.* 1987, Dumanski *et al.* 1987). Mit dem auf 22q-lokalisierten Tumorsuppressorgen *NF2* (*Neurofibromatosis 2*) konnte bereits das für die Tumorgenese von Meningeomen bedeutsamste Gen identifiziert werden. Veränderungen im *NF2*-Gen finden sich in 70-80 % der Meningeome unabhängig vom WHO-Grad. In der Regel handelt es sich dabei um Insertionen, Deletionen bzw. *Nonsense*-Mutationen. Merlin (auch Schwannomin), das Genprodukt von *NF2*, ist funktionell ein Verbindungsprotein zwischen dem Zytoskelett und der Plasmamembran (Gusella *et al.* 1999), wobei jedoch der Mechanismus der Tumoringhibition noch weitgehend unklar ist. Neben Allelverlusten von Chromosom 22 erwiesen sich 1p-Deletion als die zweithäufigsten chromosomalen Abnormalitäten in Meningeomen. Die Häufigkeit von 1p-Verlusten korreliert positiv mit dem Tumorgrad, das heißt Deletionen auf Chromosom 1p sind potentielle Indikatoren für die Tumorprogression (Weber *et al.* 1997). Die Suche nach dem hier lokalisierten TSG blieb bisher erfolglos, es konnte lediglich der Bereich der interessanten Regionen auf die zwei Genloci 1pter-p34 und 1p32 eingengt werden (Lamzus 2004).

Die dritthäufigsten genetischen Veränderungen in Meningeomen sind Verluste von Chromosom 14. Sie zeigen ebenfalls eine Assoziation zu Tumoren höheren Grades und können somit als Progressionsmarker dienen (Maillo *et al.* 2003). Auch aus dieser Region konnte das entscheidende Tumorsuppressorgen noch nicht identifiziert werden, es gelang

jedoch wiederum die Definition einer kritischen Region im Bereich 14q24.3-q32.3 durch Menon *et al.* (1997). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass das *NDRG2*-Gen auf Chromosom 14q ein potentielles Tumorsuppressorgen für Meningeome ist, das insbesondere in anaplastischen Meningeomen häufig einen Verlust der Expression aufweist (Lusis *et al.* 2005) Überzählig häufig konnten desweiteren Verluste auf den Chromosomen 3p, 6q, 9p, X und Y und Gewinne auf 1q, 9q, 12q, 15q und 20q in Meningeomen festgestellt werden (Weber *et al.* 1997).

Auch auf dem im Fokus dieser Untersuchung stehenden Chromosom 10 konnten signifikant häufig Verluste von Erbmaterial in atypischen und anaplastischen Meningeomen nachgewiesen werden (Weber *et al.* 1997). Weiterhin war es möglich Zusammenhänge, zwischen derartigen genetischen Alterationen und einer kürzeren Überlebenszeit nach Diagnose bzw. einem früheren Auftreten von Rezidiven, herzustellen (Mihaila *et al.* 2003). Das dazugehörige Gen wurde bislang nicht identifiziert. Die Untersuchung des Glioblastom-assoziierten Tumorsuppressorgens *PTEN* zeigte in Meningeomen keine Mutationen (Boström *et al.*, 1998).

## **4 Medulloblastome**

### **4.1 Allgemeines**

Hirntumore sind nach den Leukämien die zweithäufigste Krebsart bei Kindern. Hierbei ist das Medulloblastom als häufigster maligner Hirntumor des Kindesalters von besonderer Bedeutung.

### **4.2 Lokalisation und Epidemiologie**

Als Medulloblastom bezeichnet man einen hochmalignen, embryonalen Tumor mit Lokalisation im Kleinhirn. Betroffen ist in den meisten Fällen der Kleinhirnwurm, seltener die cerebellären Hemisphären. Überwiegend treten Medulloblastome zwischen dem 3. und 8. Lebensjahr auf, jedoch manifestieren sie sich selten auch jenseits des Kindesalters.

### **4.3 Pathogenese und Morphologie**

Die Vorläuferzelle des Medulloblastoms ist noch nicht mit absoluter Sicherheit identifiziert. Jedoch scheint der Ursprung dieser Tumoren mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Körnerzell-Vorläuferzellen aus der externen Körnerzellschicht (*external granular layer*, EGL) zu liegen (Wechsler-Reya und Scott 2001). Mikroskopisch zeigt sich ein zelldichter Tumor aus dicht gepackten Tumorzellen mit rundlichen bis ovalen hyperchromatischen Zellkernen und einem relativ schmalen Zytoplasmasaum. Charakteristisch ist das häufige Auftreten von Mitosen und Apoptosen. Die Tumorzellen ordnen sich in typischen Formationen an, die als neuroblastische Rosetten (sog. Homer-Wright-Rosetten) bezeichnet werden. Makroskopisch zeigt sich ein weicher, feinkörniger Tumor, der ausgehend vom Kleinhirnwurm, nach Penetration des Ependyms frühzeitig nach kranial und kaudal über den Liquor cerebrospinalis metastasieren kann. Dabei bilden sich so genannte liquorigene Metastasen.

#### 4.4 Klinik und Therapie

Der rasche klinische Verlauf manifestiert sich in erster Instanz meist durch eine progrediente Hirndrucksymptomatik. Ergänzt wird das klinische Bild durch lokale Kleinhirnsymptome wie Rumpfataxie mit Gang- und Standunsicherheit. Die Prognose der jungen Patienten ist durch das rapide Fortschreiten der Tumorerkrankung limitiert. Ohne Behandlung führt dieser extrem bösartige Hirntumor schon innerhalb weniger Monate zum Tode. Unter Ausschöpfung aller therapeutischen Möglichkeiten lässt sich jedoch trotz des hohen Malignitätsgrades eine 5-Jahresüberlebensrate von 39-70 % erzielen (Michiels *et al.* 1999). Momentan besteht die Therapie aus der fächerübergreifenden Kombination von Operation, Radiotherapie der gesamten Neuroaxis und Chemotherapie. Neue therapeutische Strategien beinhalten Pharmaka, die in molekulargenetisch veränderte Signalwege eingreifen. Erste Versuche am Tiermodell erwiesen sich als durchaus erfolgreich und viel versprechend (Berman *et al.* 2002).

#### 4.5 Molekulargenetische Veränderungen in Medulloblastomen

Die häufigste chromosomale Abnormalität in Medulloblastomen ist die Formation eines Iso-Chromosoms 17q, die in circa 30-50 % aller Fälle auftritt (Bigner *et al.* 1988 und 1997). Ebenfalls häufig (ca.35 %) findet sich ein Verlust von DNA-Abschnitten auf Chromosom 10q (Michiels *et al.* 2002). Ungefähr 10-20 % der Medulloblastome weisen Mutationen im *PTCH*-Gen auf, dessen Genprodukt die Signalweiterleitung im Sonic Hedgehog (Shh)-Signalweg hemmt (siehe Kapitel 5.5). Weitere Komponenten des Shh-Weges, in denen Mutationen nachgewiesen wurden, sind *SMO*H und *SUFU*H (*suppressor of fused*) (Reifenberger *et al.* 1998; Taylor *et al.*, 2002). Es zeigte sich dabei eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Mutationen in Genen des Shh-Signalweges und dem desmoplastischen Subtyp des Medulloblastoms (Pietsch *et al.* 1997). Weiterhin konnte in Medulloblastomen eine Überexpression von Shh-Zielgenen, wie *GLI1* und *HIP*, nachgewiesen werden (Wechsler-Reya und Scott 2001, Toftgard 2000). Insgesamt tragen etwa 10-20 % der sporadischen

Medulloblastome Mutationen im Shh-Ptch-Signaltransduktionsweg (Rubin und Rowitch 2002).

Der Wnt-Signalweg ist eine intrazelluläre Signalkaskade, die zu einer Aktivierung von Genen führt, die den Zellzyklus anregen. Neben Deletionen und Mutationen von *APC*, einem Suppressor dieses Signalweges, konnten Veränderungen auch in anderen Komponenten des Wnt-Signalweges, wie *AXIN1* und  $\beta$ -Catenin, in Medulloblastomen entdeckt werden (Dahmann *et al.* 2001, Eberhart *et al.* 2000).

## **5 Basalzellkarzinome und der Hedgehog-Signalweg**

### **5.1 Allgemeines und Epidemiologie**

Tumoren, die lokal infiltrativ und destruktiv wachsen, jedoch nur äußerst selten zur Metastasierung neigen, bezeichnet man als semimaligne. Das Basalzellkarzinom (BCC, Basaliom) der Haut ist der häufigste Tumor dieser Art. Generell handelt es sich um den häufigsten malignen Tumor der weißen Bevölkerung (Miller 1995), dessen Inzidenz weltweit ansteigt. Es zeigen sich jedoch prägnante regionale Differenzen in der Häufigkeit der Erkrankungen. So liegt die Inzidenz in den USA bei ca. 146/100.000 Einwohner pro Jahr, während in Australien fast fünfmal so viele Menschen ein Basalzellkarzinom entwickeln (Inzidenz bis zu 726/100.000 Einwohner/Jahr). In der dunkelhäutigen Bevölkerung hingegen ist das Basalzellkarzinom eine Rarität.

Das Basalzellkarzinom ist ein Tumor des älteren Menschen. Die Erkrankungshäufigkeit ist vor dem 40. Lebensjahr gering und steigt mit zunehmendem Alter. Das Gesamtrisiko im Laufe einer Lebensspanne ein Basalzellkarzinom zu entwickeln beläuft sich auf etwa 30 % (Miller und Weinstock 1994). Verschiedene Risikofaktoren beeinflussen hierbei die Erkrankungswahrscheinlichkeit: Der Hauptrisikofaktor ist die Exposition der Haut gegenüber UV-Strahlung. So finden sich in den meisten Fällen genetische Mutationen, die typischerweise durch UV-Licht induziert werden. Aber auch andere exogene Faktoren wie ionisierende Strahlung, immunsuppressive Behandlung und verschiedene chemische Verbindungen (z.B. Arsen) können das Auftreten von Basalzellkarzinomen begünstigen (Miller 1995).

### **5.2 Lokalisation und Morphologie**

Etwa 80 % der Tumoren manifestieren sich in der so genannten zentrofazialen Zone, d.h. zwischen einer Verbindungslinie beider Mundwinkel mit den unteren Ohrbegrenzungen und einer Linie entlang des Haaransatzes. Das klassische Basalzellkarzinom beginnt als

erbsengroßes, derbes Knötchen (Basalzellkarzinomknötchen) und attackiert mittels lokal destruierendem Wachstums als sogenanntes *Ulcus rodens* (nagendes Geschwür) das benachbarte Gewebe. Die Läsion zeigt sich erstaunlicherweise relativ indolent und unterliegt einer langsamen Progredienz.

Die Tumoren stammen vermutlich von epidermalen Stammzellen im Bereich der Haarfollikel ab (Rubin *et al.* 2005). Im Unterschied zum normalen Wachstum der Epidermis machen die Zellen des Basalzellkarzinoms keinen Differenzierungsprozeß durch. Das Resultat ist das histopathologische Bild eines Tumors, dessen solider epithelialer Zellverband morphologische Ähnlichkeit zu Zellen des Stratum basale aufweist. Dementsprechend findet man hauptsächlich Zellen mit großen, längsovalen, basophilen Nuklei, eingebettet in relativ wenig Stroma. Die entarteten Zellverbände wachsen aus der Epidermis invasiv ins Corium hinein. Dabei zeigt die äußere Grenzschicht stets einen pallisadenartigen Aufbau, während im Inneren des Tumors die Zellanordnung scheinbar regellos geschieht.

Der makroskopische Aspekt hängt vom histopathologischen Subtyp und vom Fortschritt der Erkrankung ab. Das klassische Basalzellkarzinom beginnt als Basalzellkarzinomknötchen (s.o.) und entwickelt sich zum floriden, destruierenden Ulcus. Typischerweise besteht es dann aus einer zentral eingeschmolzenen Nekrosezone und einem teleangiektatischen, perlschnurartigen Randsaum, dessen „Perlen“ auf mikroskopischer Ebene Nestern von Basalzellen entsprechen.

### **5.3 Therapie**

Die therapeutischen Möglichkeiten sind aufgrund der oberflächlichen Lage der Tumoren und der intensiven Forschung auf diesem Gebiet vielfältig. Somit kann je nach Lokalisation des Geschwürs und Zustand des Patienten die optimale Therapie aus einem Spektrum gewählt werden, welches chirurgische, pharmakologische und strahlentherapeutische Interventionen umfasst. Die chirurgischen Techniken erreichen durch Anwendung von Spezialverfahren selbst bei Hoch-Risikotumoren eine 5-Jahresheilungsrate von ca. 95-99 %. Die Radiotherapie zeigt hingegen etwas schlechtere Ergebnisse und ist deswegen älteren Patienten mit größeren Läsionen vorbehalten, deren Operationsrisiko unverhältnismäßig hoch wäre. Auch die Heilungsrate der photodynamischen Therapie in Kombination mit  $\delta$ -Aminolävulinsäure als Photosensibilisator erreicht nicht jene der chirurgischen Behandlung, stellt aber eine gute Alternative für superfizielle Basalzellkarzinome dar. Pharmakologisch können BCCs,

insbesondere bei multipler Manifestation, topisch mit Fluorouracil oder Imiquimod behandelt werden. Die Prognose des Basalzellkarzinoms ist aufgrund der fehlenden Metastasierungstendenz in der Mehrzahl der Fälle gut.

#### **5.4 Molekulargenetische Veränderungen in Basalzellkarzinomen**

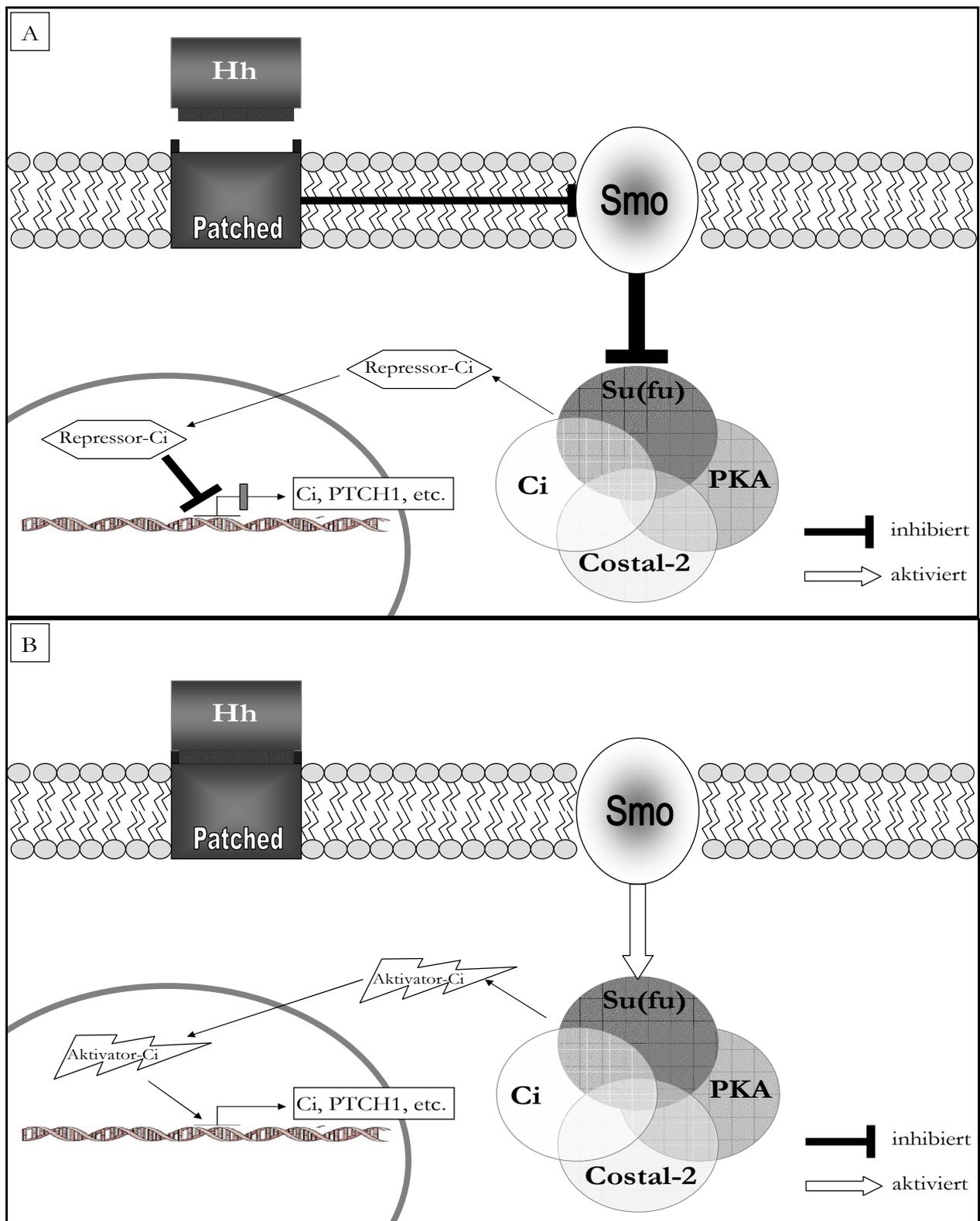
Für die Entstehung von Basalzellkarzinomen ist die aberrante Aktivierung des Sonic-Hedgehog-Signaltransduktionsweges von ausschlaggebender Bedeutung (Abb. 1). Experimente mit transgenen Mausmodellen konnten zeigen, dass Mutationen von Genen dieses Signaltransduktionsmechanismus ausreichend sind, um ein Basalzellkarzinom zu generieren (Saldanha *et al.* 2003). Patienten mit einem sog. Gorlin-Syndrom, einer autosomal vererbten Erkrankung, weisen eine erhöhte Prädisposition zur Bildung von Basalzellkarzinomen auf. Keimbahnmutationen des *PTCH*-Gens auf Chromosom 9q22.3-q31, welches für einen Rezeptor des Shh-Signalweges kodiert, wurden als Ursache für dieses Syndrom identifiziert (Uden *et al.* 1996, Situm *et al.* 1999). In über 60 % der sporadischen Basalzellkarzinomen konnten ebenfalls *PTCH*-Mutationen nachgewiesen werden (Reifenberger *et al.*, 2005), meistens in Form eines LOHs (*loss of heterozygosity*) des einen Allels mit einer inaktivierenden Mutation des anderen Allels (Gailani *et al.* 1996). In etwa 10 % der BCCs finden sich aktivierende Mutationen in *SMOH*, einer weiteren Signalkomponente des Shh-Weges (Reifenberger *et al.*, 2005). Zusätzlich zeigen fast alle untersuchten Basalzellkarzinome eine Überexpression der Zielgene des Shh-Signalweges, wie *GLII*, *PTCH* und *HIP*. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Dysregulation dieses Signaltransduktionsweges essentiell für die Entstehung von Basalzellkarzinomen ist.

#### **5.5 Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg**

Die detaillierte Aufklärung von molekularbiologischen Signalkaskaden mit Bedeutung für die Tumorentstehung bringt Licht in das noch weitgehend dunkle Feld der Krebsentstehung und bildet die Basis für die Entdeckung alternativer Therapiemethoden. Der Hedgehog-Signalweg ist ein interessantes Beispiel einer solchen intrazellulären Signalkaskade. Namensgeber ist ein Sekretionsprotein, dessen Gen von den deutschen Forschern Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus 1980 in *Drosophila* identifiziert wurde. Dieser Signalweg ist von entscheidender Bedeutung für die Morphogenese des Neuralrohres, der Somiten, des

Axialskeletts, der Gliedmaßen, der Lunge und der Haut (Stone *et al.* 1999). Auf zellulärer Ebene agiert er als Regulator für Zellwachstum, Zellteilung, Führung des Axons und als Überlebensfaktor (Ogden *et al.* 2004). Diese wachstumsregulierenden Eigenschaften sind Grundlage seiner Relevanz für die Entstehung verschiedener Krebsarten wie Basalzellkarzinome und Medulloblastome.

Da viele der bisherigen Studien dieses Signalweges an der Taufliege *Drosophila* durchgeführt wurden, soll hier zunächst die Signalweiterleitung, wie sie aus der Fliege bekannt ist, vorgestellt werden (Abb.1). Zentrales Molekül und Initiator der Signalkaskade ist das extrazelluläre, sekretorische Glykoprotein Hedgehog. Das *Hh*-Gen codiert für ein 45 kD schweres Protein, das nach seiner Sekretion in einem autokatalytischen Prozess in eine Signal- und eine katalytische Domäne gespalten wird. Die katalytische Domäne ist für diese Spaltung verantwortlich, während die Signaldomäne der Signalweiterleitung dient. Zur Verankerung und Weiterleitung von Hh in der Lipidmembran wird eine Cholesterolrest und ein Palmitinsäurerest in konsekutiven Schritten kovalent an die Signaldomäne gebunden. Die wichtigste molekulare Substruktur des Hh-Signalpeptids ist eine N-terminale gelegene Aminosäuresequenz, die mit der sogenannten „sterole sensing domain“ (SSD) des Rezeptormolekül Patched eine lipidregulierte Bindung eingeht und dadurch den Signaltransduktionsprozeß initiiert. Das Rezeptormolekül Patched (Ptc) ist durch 12 Transmembrandomänen in die Plasmamembran integriert. In Abwesenheit des Liganden Hedgehog inhibiert Patched das ebenfalls in der Plasmamembran eingebetteten Signalmolekül Smoothened (Smo), ein Homolog der Frizzled-Rezeptorenfamilie. Die Bindung von Hedgehog an den Ptc-Smo-Rezeptorkomplex führt zu einer Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von Smo (Ogden *et al.* 2004, Ruel *et al.* 2003). Das nun aktivierte Smo übermittelt das Signal dem Mikrotubuli-assoziierten Komplex („Hedgehog signalling complex“, HSC) aus Costal-2, der Serin/Threonin-Kinase Fused, dem Suppressor of Fused und dem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Cubitus interruptus (Ci). Letzterer ist als zellulärer Transkriptionsfaktor das zentrale Effektormolekül des Hedgehog-Signalweges und initiiert die Transkription von Zielgenen wie *Wingless*, *Decapentaplegic* und *PTC* selbst. In Abwesenheit von Hh wird Ci durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert und so für eine proteolytische Spaltung markiert. Dabei wird Ci (155 kD) in eine 75 kD-kleine Repressorform gespalten (Ci<sup>75</sup>), die im Zellkern die Expression der Hh-Zielgene inhibiert. Wird der Signalweg aktiviert, dann löst sich der Multiproteinkomplex von den Mikrotubuli und Ci wird nicht weiter von der PKA phosphoryliert. Die nun freigesetzte unprozessierte Aktivatorform Ci<sup>155</sup> induziert im Nukleus die Transkription der Hh-Zielgene (Ogden *et al.* 2004).



**Abb. 1: Der Hedgehog-Signalweg in *Drosophila*.** A, In Abwesenheit von Hh inhibiert Ptc das Signalmolekül Smo. Ci wird von PKA phosphoryliert und die 75 kD-Repressorform von Ci transloziert in den Nukleus, wo sie die Expression der Hh-Zielgene hemmt. B, Durch autokatalytische Spaltung werden ein C-terminales und ein N-terminales Polypeptid aus Hh gebildet, wobei nur die Hh-N Form eine Signalfunktion besitzt. Die Bindung von Hh-N an Ptc löst Smo aus der Inhibition durch Ptc und der Signalweg wird aktiviert. Ci wird nicht länger

phosphoryliert und aus dem Proteinkomplex freigesetzt. Als Aktivator-Ci kann es nun im Nukleus die Expression der Hh-Zielgene induzieren.

Zwei weitere Inhibitoren spielen im Hh-Signalweg eine wichtige regulatorische Rolle, Slimb und der Suppressor of Fused (Sufu). Das humane Homolog *SUFUH* ist auf Chromosom 10q23.4 lokalisiert und kodiert für ein 468 Aminosäuren langes, eine PEST-Domäne tragendes Protein. Lokalisationsstudien ergaben, dass sich Sufu sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma befindet. Eine wichtige Funktion von Sufu ist der Export von Ci/Gli aus dem Nukleus ins Zytoplasma (Méthot und Basler 2000). Ci/Gli beinhaltet ein leucinreiches Zellkernexportsignal (*nuclear export signal*, NES), das mit dem NES-Rezeptorprotein CRM-1 interagieren kann. Im Folgenden vermittelt Sufu den Crm1-abhängigen Export der Ci/Gli-Faktoren aus dem Nukleus und deren Degradation im Zytoplasma. Slimb, ein F-Box/WD40-Wiederholungsdomänen beinhaltendes Protein, stimuliert ebenfalls die Degradation von Ci/Gli-Faktoren im Proteasom. Sufu wird weiterhin eine Rolle als Transkriptions-Korepressor zugeschrieben, indem es zusammen mit einem Komplex aus SAP18 und mSin3 die Expression von Ci/Gli-Zielgenen durch Blockade der Promotorregionen unterdrückt. Vermutlich ist Sufu des Weiteren an einer Vielzahl zusätzlicher intranukleärer Proteininteraktionen beteiligt wie z.B. der Formation von multimeren Proteinkomplexen gleich dem Ci/Gli-Sufu-SAP18-mSin3-HDac-Komplex (Paces-Fessy *et al.* 2004). Jedoch übt Sufu nicht nur innerhalb des Hh-Signalweges seine regulierende Funktion aus. So greift es in den Wingless (Wnt)-Signalweg ein, indem es auf eine dem Ci/Gli-Transport ähnliche Art und Weise  $\beta$ -Catenin durch einen Crm-1 vermittelten Transportmechanismus aus dem Zellkern exportiert (Meng *et al.* 2001). Sufu selbst unterliegt der Regulation durch den Hh-Signalweg. Die Bindung von Hh vermittelt die Inaktivierung von Sufu. Hierbei spielt wahrscheinlich die Phosphorylierung durch die Fu-Kinase die entscheidende Rolle. Generell werden die meisten Komponenten des Hh-Pfades durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert.

## **5.6 Unterschiede im Hedgehog-Signalweg zwischen *Drosophila* und Säugern**

In Säugern sind bisher drei Homologe des *Drosophila*-Hedgehog Genes identifiziert worden: *Sonic Hedgehog (SHH)*, *Desert Hedgehog (DHH)* und *Indian Hedgehog (IHH)* (Ogden *et al.* 2004). Das in Bezug auf die Expression am weitesten verbreitete der drei Morphogene ist Shh, welches als einziges im zentralen Nervensystem exprimiert wird. Shh ist maßgeblich an der Entwicklung des Gehirns, des Rückenmarks, des Axialskeletts und der Extremitäten beteiligt. Ihh reguliert vermutlich die Differenzierung von Knorpelgewebe während des

Wachstums der langen Röhrenknochen, während Dhh sich hauptsächlich an Prozessen im Laufe der Keimzellentwicklung und Schwanzzellendifferenzierung beteiligt.

Das Rezeptormolekül für die Hedgehog-Moleküle Patched-1 (PTCH1) ist durch 12 Transmembrandomänen in die Plasmamembran integriert (Toftgard 2000). Zwei nach extrazellulär gerichtete, molekulare Schleifen sind verantwortlich für die Bindung des Liganden Hedgehog. N- und C-Termini des Proteins liegen intrazellulär. Es existiert ein verwandtes Patched-2-Molekül, dessen Funktion aber bislang unklar ist (Toftgard 2000). Patched-1 interagiert mit dem ebenfalls in der Plasmamembran eingebetteten Funktionsmolekül Smoothed (SMOH), einem Homolog der Frizzled (WNT)-Rezeptorenfamilie (Toftgard 2000).

Neuere Untersuchungen identifizierten alternative Mechanismen der Shh-Signalübermittlung. So ist Shh scheinbar fähig auf direktem Wege, also über eine regulatorische Sequenz, die keine Gli-Bindungsstellen beinhaltet, die Transkription von COUP-TFII zu induzieren (Krishnan *et al.* 1997). Ausschließlich in Vertebraten konnte man ein alternatives Protein ausfindig machen, das direkt mit Hh interagiert. Dieses Hedgehog interacting protein (Hip) bindet und inaktiviert alle drei Hh-Proteine über eine extrazelluläre Domäne und ist gleichzeitig eines der Hauptzielgene des konservierten Hh-Signalweges (Chuang und McMahon AP 1999).

Costal-2 hingegen ist bisher nur im Hh-Signalweg in *Drosophila* identifiziert worden (Ishii 2005). Die Rolle von Costal-2 während der Hh-Signaltransduktion ist ambivalent, denn je nach Relation seiner Konzentration zu derer des Transmembranmoleküls SMOH agiert es als positiver oder negativer Regulator des Signalweges. So sorgt es nach Bindung von Hh an den Patched-Rezeptor in Zusammenarbeit mit dem HSC für die Freigabe von Ci und somit für die Transkription von Hh-Zielgenen.

## **5.7 Die Bedeutung des Hh-Signalweges für die Krebsentstehung**

Als Regulator der Zellproliferation ist der Hh-Signalweg eine empfindliche Struktur im homöostatischen Gleichgewicht des zellulären Wachstums. So führen Alterationen bestimmter Komponenten des Hh-Pfades zu seiner unkontrollierten Stimulation und somit zur Expression von Genen, die das Zellwachstum begünstigen. Das Resultat ist ein Beitrag zur Entstehung einer Krebserkrankung. In vielen verschiedenen Geweben sind Hh-Signale verantwortlich für die Kontrolle der embryonalen Entwicklung der entsprechenden Organe.

So ist dieser Signalweg von herausragender Bedeutung für die Differenzierung und Formation des ventralen Hinterhirns, des Mittelhirns und des Vorderhirns. Insbesondere die Morphogenese des Cerebellums wird entscheidend durch Hh reguliert (Ruiz i Altaba *et al.* 2002). Das in den Purkinje-Zellen gebildete Shh kontrolliert hierbei die Proliferation der Körnerzell-Vorläuferzellen aus der externen Körnerzellschicht, die als Ursprungszellen des Medulloblastoms angesehen werden. Aber auch andere Organsysteme benötigen die Hh-Regulation für den fehlerfreien Ablauf ihrer Formation in der Embryogenese. Interessanterweise sind gerade in den aus Zellen dieser Organe entstandenen Tumoren häufig Mutationen im Hh-Signalweg zu finden. So entdeckte man *PTCH*- und *SMOH*-Mutationen in sporadischen Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen (Toftgard 2000, Wolter *et al.* 1997). Keimbahnmutationen von *PTCH* erhöhen das Risiko, im späteren Leben Basalzellkarzinome, Medulloblastome und andere Krebsarten zu entwickeln, signifikant. Die Funktion von *PTCH1* als Tumorsuppressorgen wurde erstmals im hereditären Gorlin-Syndrom (*nevoid basal cell carcinoma syndrome*, NBCCS) entdeckt. Individuen, die an diesem Syndrom erkranken, weisen schon bei der Geburt eine übermäßige Körpergröße, Hypertelorismus und diverse knöcherne Malformationen auf. Im späteren Leben entwickeln sie ein Spektrum von Neoplasien, das unter anderem Basalzellkarzinome, Medulloblastome und Meningeome umfasst. Die Patienten tragen Mutationen im Rezeptorgen *PTCH* (Uden *et al.* 1996, Situm *et al.* 1999). Weiterhin konnte eine Aktivierung des *SMOH*-Gens in sporadischen Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen entdeckt werden. Die These, dass *PTCH*-Mutationen relevant für die Entstehung des Mammakarzinoms sind, wurde von einigen Studien befürwortet, von anderen jedoch widerlegt (Reifenberger *et al.* 2001, Vorechovsky *et al.* 1999, Xie *et al.* 1997). Weitere Untersuchungen deuten auf eine Relevanz des Hh-Signalweges für die Genese des kleinzelligen Bronchialzellkarzinoms, des Pankreaskarzinoms und von Magen-Darm-Trakt-Tumoren hin (Watkins *et al.* 2003, 2004; Thayer *et al.* 2003). Taylor *et al.* analysierten 2002 ein Tumorkollektiv von 46 Medulloblastomen und fanden dabei in vier Tumoren (9%) Mutationen im *SUFUH*-Gen, aus denen ein verändertes Protein resultierte. Bei einer der Mutationen handelte es sich scheinbar um eine Keimbahnmutation, die neben dem Tumor für einen komplexen NBCCS-ähnlichen Phänotyp verantwortlich zu sein schien. Dieser Studie nach zu urteilen, könnten somit *SUFUH*-Mutationen eine nicht unbedeutende Rolle in der Entstehung von und in der Prädisposition zu Medulloblastomen spielen.

## **6 Ziele der eigenen Arbeit: Identifizierung und Charakterisierung von Tumorsuppressor- Kandidatengenegen auf Chromosom 10 in Hirntumoren**

Allelverluste auf Chromosom 10 gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Hirntumoren überhaupt. Insbesondere Glioblastome weisen Verluste auf Chromosom 10 in bis zu 90 % der Fälle auf (Collins 2004). Aber auch in anderen Hirntumorentitäten ist dieses Chromosom häufig deletiert. So fand man Verluste auf Chromosom 10p und 10q in höhergradigen (atypischen und anaplastischen) Meningeomen und Verluste auf 10q in 35 % aller sporadischen Medulloblastome (Bayani *et al.* 2000, Weber *et al.* 1997).

Allen Entitäten ist jedoch gemeinsam, dass das/die zugehörige(n) Tumorsuppressorgen(e) noch nicht entdeckt bzw. noch weitere Tumorsuppressorgene in dieser Region vermutet werden. In Deletionskartierungen konnten für Glioblastome drei interessante Kandidatengeneregionen auf 10p, 10q23 und 10q24-qter lokalisiert werden. Mit *PTEN* ist das auf 10q23 lokalisierte Tumorsuppressorgen bereits identifiziert worden, welches in ca. 30-40 % der primären Glioblastome Mutationen aufweist (Collins 1999, Boström *et al.* 1998, Steck *et al.* 1997, Schmidt *et al.* 1999). Da aber auch einige Fälle existieren, deren Allelverluste in diesem Bereich *PTEN* nicht mit einbeziehen, wird die Existenz weiterer Tumorsuppressorgene in diesen Regionen vermutet (Fujisawa *et al.* 1999, Rasheed *et al.* 1995, Ichimura *et al.* 1998). Mit Fokus auf 10q24-qter wurden in den letzten Jahren mehrere Kandidatengene untersucht, deren genetische Analyse ihnen jedoch allenfalls geringe Bedeutung in der Ätiologie von Glioblastomen zuschreiben konnte (Pulst und Reifenberger 2000). So blieb beispielsweise die Suche nach Mutationen und Hypermethylierungen im *LGII*-Gen (10q24) erfolglos (Sommerville *et al.* 2000). Mollenhauer *et al.* (1997) konnten zwar intragenische homozygote Deletionen des *DMBT1*-Gens (deleted in malignant brain tumors 1; 10q25) nachweisen, aber inzwischen wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei größtenteils um Deletions-Polymorphismen handelt (Sasaki *et al.* 2001). Tabatabai *et al.* (1998) konnten in ihren Untersuchungen keine Hinweise auf die Beteiligung von *MXII* (10q25) an der Glioblastomentstehung finden. Lediglich eine Missense-Mutation im Tumorsuppressorgen *NEURL* (10q25.1) konnte durch Nakamura *et al.* (1998) in Gliomzelllinien dingfest gemacht werden. Jedoch sind einige Kandidatengene auf Chromosom 10 noch keinen genetischen Analysen unterzogen worden, so dass die Suche nach dem unentdeckten Tumorsuppressorgen noch Potential birgt. Beispiele für möglicherweise interessante Kandidatengene sind *PDCD4* (programmed cell death 4; 10q25), *BCCIP $\alpha$*  (BRCA and CDKN1A interacting protein; 10q26.13), *EMX2* (10q26.1) und die in

der eigenen Untersuchung thematisierten Gene *SUFUH* (10q23.4) und *KLF6* (10p15.2), auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

In Meningeomen sind Verluste auf Chromosom 10, insbesondere auf dem langen Arm, mit der Tumorprogression zu höhergradigen, d.h. atypischen bzw. anaplastischen Tumoren assoziiert (Rempel *et al.* 1993, Weber *et al.* 1997). Sie scheinen somit prognostische Aussagekraft in Hinblick auf eine kürzere Überlebenszeit und die schnellere Entwicklung eines Rezidivs zu haben (Mihaila *et al.* 2003).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der molekularen Charakterisierung von neuen Tumorsuppressor-Kandidatengen auf Chromosom 10 in Glioblastomen und Meningeomen. Ein mögliches Tumorsuppressor-Kandidatengen ist *KLF6* (*kruppel-like factor 6*, *ZF9/COPEB*). Das *KLF6*-Gen ist auf Chromosom 10p15.2 lokalisiert. Das dazugehörige Genprodukt wurde erstmals aus menschlicher Plazenta und aktivierten hepatischen Sternzellen der Ratte isoliert (Narla *et al.* 2003). Es scheint jedoch ubiquitär exprimiert zu werden. Das Protein besteht aus 283 Aminosäuren, wobei die prolin- und serinreiche aminoternale Aktivierungsdomäne 201 und die carboxyterminale dreifache TFIIIA-Typ Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>-Zinkfingerstruktur 82 Aminosäuren umfassen (Narla *et al.* 2003). Es interagiert wie alle KLF-Moleküle über eine GC-Box-Promotorelement direkt mit der DNA und reguliert auf diesem Wege die Expression von Plazenta-Glykoprotein, Kollagen  $\alpha_1(I)$ , TGF $\beta_1$ , Typ I und II des TGF $\beta$ -Rezeptors, Urokinase-Plasminogen-Aktivators und human immunodeficiency virus long terminal repeat (HIV-1 LTR) (Narla *et al.* 2001, Narla *et al.* 2003). So sorgt es unter anderem in hepatischen Sternzellen nach einer Gewebsverletzung für die Hochregulation von Kollagen  $\alpha_1(I)$  und TGF $\beta_1$  und induziert dadurch die Fibrogenese und die Formation von extrazellulärer Matrix (Bieker 2001). Weiterhin bewirkt *KLF6* in traumatisierten arteriellen Endothelzellen eine Überexpression des Urokinase-Plasminogen-Aktivators, was die proteolytische Aktivierung von latentem TGF $\beta$  zur Folge hat und die anschließende Gewebsneubildung begünstigt (Bieker 2001). Außerdem ist *KLF6* an der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten beteiligt. Die für die Funktion als Tumorsuppressorgen wohl entscheidende Eigenschaft ist die Reduktion der Zellproliferation durch Hochregulation des cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21/WAF1/CIP (Narla *et al.* 2001). p21 wiederum inhibiert die cyclinabhängige Phosphorylierung des Rb-Proteins, welches dadurch die Bindung an den Transkriptionsfaktor E2F aufrechterhalten kann. E2F ist in diesem Zustand unfähig, die Expression von Genen, die den Zellzyklus aktivieren, anzuregen. Somit scheint die Regulation von p21 durch *KLF6* ein zu dem in den meisten Krebsarten alterierten p53-Signalweg alternativer Mechanismus der Tumorsuppression zu sein. Ob *KLF6* auch an der

Tumorgenese von Hirntumoren beteiligt ist, wird in dieser Arbeit durch mRNA-Expressions- und Mutationsanalysen an einem Kollektiv aus Meningeomen und Glioblastomen näher untersucht.

Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf der molekulargenetischen Untersuchung des *SUFUH*-Gens, welches für einen Repressor des Sonic Hedgehog-Signaltransduktionsweges kodiert. Das Gen kartiert auf Chromosom 10q24.32, einer Region, die nicht nur häufig in Glioblastomen und Meningeomen Allelverluste aufweist, sondern auch in bis zu 35 % aller sporadischen Medulloblastomen von Deletionen betroffen ist (Collins 2004). Als Repressor des Sonic Hedgehog-Signalweges könnten Funktionsverluste von Sufuh eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Medulloblastomen spielen (Taylor *et al.* 2002). In dieser Arbeit wird daher ein Tumorkollektiv aus 16 Medulloblastomen sowie 33 Basalzellkarzinomen auf Expression und genetische Veränderungen von *SUFUH* hin untersucht.

Ein dritter Teilbereich der eigenen Arbeit zielt darauf ab, durch eine Kombination von DNA-Demethylierung und globaler Expressionsanalyse von Gliomzelllinien neue Tumorsuppressor-Kandidatengene zu identifizieren, die in Gliomzellen durch aberrante Methylierung der 5'-Promotorregion herunterreguliert werden.

## **B Material und Methoden**

### **7 Material**

#### **7.1 Tumorgewebe und Blut**

Das Gesamtkollektiv der untersuchten Tumoren bestand aus 14 Medulloblastomen, 32 Basalzellkarzinomen, 42 Glioblastomen und 47 Meningeomen. In den meisten Fällen des oben erwähnten Kollektives stand konstitutionelle DNA aus venösem Blut (Leukozyten-DNA) der entsprechenden Patienten zur Verfügung. Die Hirntumoren wurden histopathologisch von Professor G. Reifenberger gemäß der WHO-Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems (Kleihues und Cavenee 2000) eingestuft. Die Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Tumorgewebe war bereits in Vorarbeiten erfolgt. Für die DNA- und RNA-Extraktion wurden dabei ausschließlich Gewebeproben verwendet, bei denen ein Tumorzellgehalt von über 80% mikroskopisch festgestellt werden konnte.

Klinische Daten zu den untersuchten Tumoren sind den Tabellen 2, 3, 4 und 5 zu entnehmen. Das Tumorgewebe der Basalzellkarzinome stammte von 15 weiblichen und 17 männlichen Patienten und wurde in allen Fällen in der dermatologischen Abteilung des Universitätsklinikums Düsseldorf operativ gewonnen. Das durchschnittliche Lebensalter (Mittelwert) der Patienten zum Zeitpunkt des Eingriffes betrug 69,6 Jahre, wobei sich die Altersspanne von 33 bis 87 Jahren erstreckt und der Median auf 72 Lebensjahre beläuft (Tab.2).

34 der 42 Glioblastompatienten waren in der neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf, die übrigen Patienten in den Evangelischen und Johanniter-Krankenanstalten zu Duisburg-Nord/Oberhausen operiert worden. Das mittlere Lebensalter der Patienten zum Operationszeitpunkt betrug hier 60,6 Jahre. Der jüngste Patient war 40 Jahre, die älteste Patientin 83 Jahre alt (Tab. 3).

Die Gewebeproben der Meningeome stammten ebenfalls von Patienten, die in Düsseldorf und Duisburg operiert worden waren. Von sechs Meningeompatienten wurden freundlicherweise RNA- und DNA-Proben vom Karolinska-Institut in Stockholm (Prof. V.P. Collins) zur Verfügung gestellt. Das Alter der Patienten zum Entnahmezeitpunkt betrug im Durchschnitt (Mittelwert) 60,2 Jahre, wobei der jüngste Patient sechs und die älteste Patientin 90 Jahre alt waren.

Als Kontrolle für die mRNA-Expressionsanalysen diente bei den Meningeomen RNA aus nicht-neoplastischem Hirnhautgewebe (Leptomeninge) und bei den glialen Tumoren RNA aus nicht-neoplastischem Hirngewebe.

**Tabelle 2: Klinische Daten zu den untersuchten Basalzellkarzinomen**

Tumor-Nr.	Alter	Geschlecht	Histologischer Subtyp	Lokalisation
BCC 3	68	m	nodulär	Unterschenkel
BCC 7	58	m	nodulär	Nase
BCC 8	85	m	nodulär	Kinn
BCC 9	61	m	nodulär	Wange
BCC 10	74	m	morpheaform	Stirn
BCC 11	67	w	nodulär	Oberlippe
BCC 13	79	m	nodulär	Nase
BCC 14	59	m	nodulär	Axilla
BCC 15	88	m	morpheaform	Kinn
BCC 16	33	m	nodulär	Wange
BCC 17	81	w	morpheaform	Nase
BCC 18	65	m	nodulär	Nase
BCC 19	74	w	nodulär	Kinn
BCC 20	33	m	nodulär	Oberlippe
BCC 21	84	w	morpheaform	Stirn
BCC 22	68	w	nodulär	Nase
BCC 23	75	m	nodulär	Rücken
BCC 24	86	w	nodulär	Wange
BCC 25	85	w	nodulär	Hals
BCC 26	69	w	nodulär	Kapillitium
BCC 27	87	w	morpheaform	Stirn
BCC 28	52	w	nodulär	Kapillitium
BCC 33	76	w	nodulär	Nase
BCC 34	87	w	nodulär	Stirn
BCC 37	54	m	nodulär	Ohr
BCC 40	70	m	nodulär	Stirn
BCC 42	81	m	morpheaform	retroaurikulär
BCC 43	74	w	nodulär	retroaurikulär
BCC 44	55	m	nodulär	Nase
BCC 45	56	w	nodulär	Wange
BCC 46	65	w	nodulär	Kapillitium
BCC 47	77	m	nodulär	retroaurikulär

**Tabelle 3: Klinische Daten zu den untersuchten Meningeomen**

Tumor-Nr.	Diagnose	WHO-Grad	Lokalisation	Alter [Jahren]	Geschlecht
MN12	Meningeom, endotheliomatös	I	temporale Konvexität	74	m
MN1	Meningeom, endotheliomatös (2.Rezidiv)	I	links-parasagittal	65	m
MN9	Meningeom, transitionell	I	okzipital	52	m
MN15	Meningeom, endotheliomatös (1.Rezidiv)	I	links-frontotemporal	69	w
MN17	Meningeom, fibromatös	I	rechts-frontal	55	w
MN2	Meningeom, fibromatös	I	median	42	m
MN7	Meningeom, fibromatös	I	frontobasal	50	w
MN10	Meningeom, endotheliomatös-fibromatös	I	keine Angaben	38	w
MN19	Meningeom, endotheliomatös-fibromatös	I	Trigonum des linken Seitenventrikels	52	w
MN27	Meningeom, transitionell	I	rechter Keilbeinflügel	73	w
MN31	Meningeom, angiomatös-mikrozystisch	I	links-zentrale Falx cerebri	47	m
MN36	Meningeom, fibromatös	I	hoch-parietal	58	w
MN56B	Meningeom, atypisch (4.Rezidiv)	II	keine Angaben	47	w
MN65	Meningeom, atypisch	II	Falx cerebri	76	w
MN61	Meningeom, atypisch	II	Konvexität	74	w
MN62	Meningeom, atypisch	II	sphenoidal	74	w
MN66	Meningeom, atypisch	II	Konvexität	90	w
MN56A	Meningeom, atypisch	II	Falx cerebri	44	m
MN68	Meningeom, atypisch	II	Konvexität	43	w
MN69	Meningeom, atypisch	II	parietal	38	m
MN42	Meningeom, atypisch	II	links-temporal	58	w
MN4	Meningeom, endotheliomatös-fibromatös	II	links-frontale Falx cerebri	70	m
MN14	Meningeom, endotheliomatös-fibromatös	II	rechts-frontoparietal	66	w
MN20	Meningeom, atypisch	II	links-frontal	44	m
MN22	Meningeom, atypisch	II	linkes Orbitadach	71	w
MN40	Meningeom, atypisch (1.Rezidiv)	II	links-parietal	71	w
MN47	Meningeom, atypisch	II	links-frontobasal	81	w
MN59A	Meningeom, endotheliomatös-fibromatös	II	rechts-frontale Konvexität	68	m
MN60	Meningeom, atypisch	II	rechts-frontal	72	w
MN34	Meningeom, anaplastisch (3.Rezidiv)	III	links-parietookzipital	55	m
MN49A	Meningeom, anaplastisch (1.Rezidiv)	III	links-temporobasal	55	w
MN63B	Meningeom, anaplastisch (3.Rezidiv)	III	links-frontal, parasagittal	78	w
MN64	Meningeom, anaplastisch	III	keine Angaben	6	m
MN67	Meningeom, anaplastisch (1.Rezidiv)	III	links-frontale Konvexität	70	w
MN16	Meningeom, anaplastisch	III	rechts-frontal	78	w
MN72	Meningeom, anaplastisch	III	sphenoidal	76	w
MN85	Meningeom, anaplastisch	III	keine Angaben	42	w
MN88B	Meningeom, anaplastisch	III	lumbal	51	m
MN90	Meningeom, anaplastisch	III	parietal	58	m
MN91A	Meningeom, anaplastisch	III	okzipital	66	m
MN87	Meningeom, anaplastisch	III	posterior fossa	71	w

**Tabelle 4: Klinische Daten zu den untersuchten Glioblastomen**

Tumor-Nr.	Diagnose	WHO-Grad	Lokalisation	Alter [Jahren]	Geschlecht
GB138	Glioblastom	IV	Intrazerebral	56	w
GB139	Glioblastom	IV	rechts-parietookzipital	40	w
GB140	Glioblastom, fusiform	IV	rechts-zentral	58	m
GB147	Glioblastom	IV	keine Angaben	63	w
GB149	Glioblastom	IV	links-okzipital	68	w
GB137	Glioblastom + sarkomatöse Komponente	IV	keine Angaben	56	w
GB153	Glioblastom	IV	temporal	57	w
GB158	Glioblastom	IV	links-frontal	83	w
GB113	Glioblastom	IV	links-postzentral	66	w
GB583	Glioblastom	IV	links-frontal	60	m
GB115	Glioblastom	IV	rechts-frontal	49	m
GB121	Glioblastom	IV	rechts-okzipital	70	w
GB130	Glioblastom	IV	links-parietal	64	w
GB131	Glioblastom	IV	links-temporal	62	m
GB136	Glioblastom	IV	rechts-präzentral	62	w
GB152	Glioblastom	IV	keine Angaben	49	w
GB99	Glioblastom	IV	links-temporal	72	w
GB100	Glioblastom	IV	links-temporal	66	m
GB101	Glioblastom	IV	links-temporal	41	m
GB103	Glioblastom	IV	keine Angaben	44	m
GB106	Glioblastom	IV	links-frontal	61	m
GB107	Glioblastom	IV	keine Angaben	74	m
GB110	Glioblastom	IV	links-okzipital	69	w
GB133	Glioblastom	IV	rechts-frontal	51	m
GB82	Glioblastom	IV	rechts-temporal	61	m
GB83	Glioblastom	IV	n.b.	n.b.	n.b.
GB85	Glioblastom	IV	keine Angaben	68	m
GB86	Glioblastom	IV	links-frontal	67	w
GB96	Glioblastom	IV	rechts-okzipital	54	m
GB97	Glioblastom	IV	links-okzipital	61	m
GB98	Glioblastom	IV	rechts-frontotemporal	54	m
GB49	Glioblastom	IV	rechtes Trigonum	71	w
GB52	Glioblastom	IV	rechts-frontotemporal	49	m
GB53	Glioblastom	IV	rechts-parietal/Angulus	74	w
GB59	Glioblastom	IV	rechts-frontal	71	w
GB60	Glioblastom	IV	links-temporoparietal	49	w
GB72	Glioblastom	IV	rechts-temporal	65	m
GB77	Glioblastom	IV	rechts-temporal	57	m
GB81	Glioblastom	IV	links-temporal	62	w

n.b. = nicht bekannt

**Tabelle 5: Klinische Daten zu den untersuchten Medulloblastomen und supratentoriellen primitiven neuroektodermalen Tumoren**

<b>Tumor-Nr.</b>	<b>Diagnose</b>	<b>WHO-Grad</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Alter [Jahre]</b>	<b>Geschlecht</b>
<b>dpMB10</b>	desmoplastisches Medulloblastom	IV	Kleinhirn	11	m
<b>dpMB11</b>	desmoplastisches Medulloblastom	IV	Kleinhirn	33	w
<b>dpMB12</b>	desmoplastisches Medulloblastom	IV	Kleinhirn	25	m
<b>dpMB13</b>	desmoplastisches Medulloblastom	IV	Kleinhirn	12	m
<b>dpMB14</b>	desmoplastisches Medulloblastom	IV	Kleinhirn	26	m
<b>dpMB18</b>	desmoplastisches Medulloblastom	IV	Spätrezidiv	40	m
<b>MB9</b>	Medulloblastom	IV	hintere Schädelgrube	8	m
<b>MB14</b>	supratentorieller PNET	IV	Kleinhirn	46	w
<b>MB15</b>	Medulloblastom	IV	spinale Metastase	37	m
<b>MB16</b>	desmoplastisches Medulloblastom	IV	Kleinhirn	20	m
<b>stP2</b>	supratentorieller PNET	IV	links temporo-ponto-occipital	0,5	m
<b>stP3</b>	supratentorieller PNET	IV	links occipito-pariteal	7	m
<b>stP4</b>	supratentorieller PNET	IV	links fronto-temporal	2	w
<b>stP5</b>	supratentorieller PNET	IV	links-frontal	5	m

## 7.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit als PCR-Primer verwendeten Oligonukleotide und ihre dazugehörigen Sequenzen sind in den Tabellen 6, 7, 8 und 9 aufgelistet.

**Tabelle 6: Oligonukleotide für SSCP/Heteroduplex- und Expressionsanalysen von *KLF6***

Primername	Sequenz	Amplikongröße [bp]
KLF6-Ex1-F	5' - ttg cag tca gtc cgg tgt ttg - 3'	369
KLF6-Ex1-R	5' - tct gaa ccc caa aca gcc ga - 3'	
KLF6-Ex1-F1	5' - ctc gcc gcc ctc gcg - 3'	192
KLF6-Ex1-R1	5' - gcc ggg ttg gac gga gc - 3'	
KLF6-Ex2-F	5' - gaa gac aga taa cat tgc tgc ccg - 3'	755
KLF6-Ex2-R	5' - ccc tcc agg gct ggt gca - 3'	
KLF6-Ex2-F1	5' - gtg cgc agc ggg act tcg - 3'	224
KLF6-Ex2-R	5' - ccc tcc agg gct ggt gca - 3'	
KLF6-Ex2-F2	5' - ctt aga gac caa cag cct gaa c - 3'	274
KLF6-Ex2-R1	5' -gcc att tcc ctt gtc acc tg - 3'	
KLF6-Ex2-F3	5' - gca atc acg tgc ctt ctc tg - 3'	271
KLF6-Ex2-R2	5' - gag gat tcg ctg ctg aca tc - 3'	
KLF6-Ex3-F1	5' - cat ggg ctg ctt gtc ctg tgc - 3'	182
KLF6-Ex3-R1	5' - gcc cag cat tgt cct cag gc - 3'	
KLF6-Ex4-F1	5' - ctg tgc ttc tga ttg gcc ctt g - 3'	176
KLF6-Ex4-R1	5' - gca gaa cgg cat gct ttg gc - 3'	
KLF6-Taq-F	5' - gcc gtc tct gga gga gta ctg - 3'	177
KLF6-Taq-R	5' - ctg gaa gat atc ttc agt tcg gat - 3'	
KLF6-Met-F1	5' - gtt tgg agc ggg gat agg ttt - 3'	344
KLF6-Met-R1	5' - act ccc cat ata caa cat ctt cc - 3'	
KLF6-Met-F1	5' - gtt tgg agc ggg gat agg ttt - 3'	453
KLF6-Met-R2	5' - cat aaa act ttc acc tac gct cc - 3'	
KLF6-Met-F2	5' - gat gat gtt agt ttc ggt taa tcg tag - 3'	523
KLF6-Met-R3	5' - cat aaa aaa aaa caa tta acg acc - 3'	
KLF6-Met-F3	5' - gtt cgt ttt gat tgg aaa gtg g - 3'	417
KLF6-Met-R3	5' - cat aaa aaa aaa caa tta acg acc - 3'	
KLF6-Ex2-SeqF	5' - caa tca cgt gcc ttc tct gg - 3'	732
KLF6-Ex2-SeqR	5' - gag aaa gtg agg att tgt ctg - 3'	
KLF6-Met-F1/Not	5' - gcg gcc gcg gtt tgg agc ggg gat agg ttt - 3'	353
KLF6-Met-R1	5' - act ccc cat ata caa cat ctt cc - 3'	
KLF6-Met-F2/Not	5' - gcg gcc gcg gga tga tgt tag ttt cgg tta atc gta g - 3'	533
KLF6-Met-R3	5' - cat aaa aaa aaa caa tta acg acc - 3'	
KLF6-Met-F5/Not	5' - gcg gcc gcg ggt aga aga gga tag ttg g - 3'	277
KLF6-Met-F6/Not	5' - gcg gcc gcg ggg tat aga agg gga tag ttg - 3'	

**Tabelle 7: Oligonukleotide für SSCP/Heteroduplex- und Expressionsanalysen von *SUFUH***

<b>Primername</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Amplikongröße [bp]</b>
SUFU-Ex1.1-F	5' - gca ccc tct ggc aga ctc - 3'	213
SUFU-Ex1.1-R	5' - cta ggc cgc agc tcc gc - 3'	
SUFU-Ex1.2-F	5' - cag tgc ctg ccc tac gc - 3'	237
SUFU-Ex1.2-R	5' - gcc tgt ccg tct ccc cg - 3'	
SUFU-Ex2-F	5' - cca ggc tta cac taa cac c - 3'	208
SUFU-Ex2-R	5' - gct ctg gat aaa gaa cag gtg - 3'	
SUFU-Ex3-F	5' - cct aag gta att gag ctt aaa aca c - 3'	208
SUFU-Ex3-R	5' - cac agc agc cag ccc tg - 3'	
SUFU-Ex4-F	5' - caa tga gga tcc ttg tat ctc - 3'	196
SUFU-Ex4-R	5' - gcc agc gtc caa cct g - 3'	
SUFU-Ex5-F	5' - gcc att aac aca caa tgg gc - 3'	153
SUFU-Ex5-R	5' - cgc gct ccc acc ttg c - 3'	
SUFU-Ex6-F	5' - gac cct cag tta cca ttg tat c - 3'	157
SUFU-Ex6-R	5' - cta ggc aca ggg tgc tag - 3'	
SUFU-Ex7-F	5' - gtt ctc tga aag aac tct ggc - 3'	225
SUFU-Ex7-R	5' - gct ggt gga atg ctg agt g - 3'	
SUFU-Ex8-F	5' - gcc act ggg caa ctt agt g - 3'	184
SUFU-Ex8-R	5' - gtc gtc ctc ttg ttc cag c - 3'	
SUFU-Ex9-F	5' - ctt ttc acc ttg tgc cga ac - 3'	204
SUFU-Ex9-R	5' - ctg tgt ggc agg gct g - 3'	
SUFU-EX10-F	5' - ctc act gtc tcc atg ttc c - 3'	221
SUFU-EX10-R	5' - gtg ggc aag gaa gtc ata g - 3'	
SUFU-Ex11-F	5' - gta taa cgc ttg gtg gtt gg - 3'	182
SUFU-Ex11-R	5' - gac ggg acc tgt tgt cag - 3'	
SUFU-Ex12-F	5' - cac act cct ggt ctg tgc - 3'	165
SUFU-Ex12-R	5' - gca gct ggg ctc cct g - 3'	

**Tabelle 8: Oligonukleotide für Expressionanalysen von Kandidatengenem auf Chromosom 10**

Primername	Sequenz	Amplikongröße [bp]
RSU1-Taq-F	5' - gcc acc gaa cat cgc aga ac - 3'	149
RSU1-Taq-R	5' - agc ctc gtg gca aag tgt tc - 3'	
INPP5A-Taq-F	5' - cca tgc tgg aga agg aga ag - 3'	175
INPP5A-Taq-R	5' - tac acg gaa ggg ctt gtt tc - 3'	
OAT-Taq-F	5' - tgc cgg gat tcg aca tca ttc - 3'	160
OAT-Taq-R	5' - gtg cag agc tct cgc act c - 3'	
DUSP5-RT-F	5' - gta tcc tgg gtc agt ggc g - 3'	234
DUSP5-RT-R	5' -ctt cac att cac acg ggt ctt ag - 3'	
GAPD3-Taq-F	5' - ctg gca ttg ccc tca acg ac - 3'	104
GAPD3-Taq-R	5' - ctt act cct tgg agg cca tgt g - 3'	
GAPD5-Taq-F	5' - gaa ggt gaa ggt cgg agt caa c - 3'	116
GAPD5-Taq-R	5' - gag gtc aat gaa ggg gtc att g - 3'	
β2MG3-Taq-F	5' - gtt gct cca cag gta gct cta g - 3'	123
β2MG3-Taq-R	5' - aca agc ttt gag tgc aag aga ttg - 3'	
β2MG5-Taq-F	5' - gtc tcg ctc cgt ggc ctt ag - 3'	112
β2MG5-Taq-R	5' - cat tct ctg ctg gat gac gtg ag - 3'	
ARF1-F	5' - gac cac gat cct cta caa gc - 3'	111
ARF1-R3	5' - tcc cac aca gtg aag ctg atg - 3'	

**Tabelle 9: Oligonukleotide für die Mikrosatellitenanalyse**

Primername	Sequenz	Amplikongröße [bp]
D10S212-F	5' - gtt tca cgg aag aag taa agc aag - 3'	229
D10S212-R	5' - gtt tct ata tgg cat gta ttc cat c - 3'	
D10S587-F	5' - ccc aga ttc atg gct ttc - 3'	172-186
D10S587-R	5' - ttc tgc tga cac ggg c - 3'	
D10S541-F	5' - ttt tga gtt tct gta ccc atc cc - 3'	267
D10S541-R	5' - atc cac aag taa cag aaa gcc - 3'	

### 7.3 Glioblastomzelllinien

Die Expressionsanalyse mittels Mikroarray-Technik wurde an den folgenden fünf Glioblastomzelllinien durchgeführt: TP365MG, CCF-STTG1, U138MG, A172 und T98G. Die Zelllinie TP365MG wurde freundlicherweise von Prof. V. P. Collins, Pathologisches Institut der Universität Cambridge, zur Verfügung gestellt. Die restlichen Zelllinien stammen aus der *American Type Culture Collection* (ATCC).

### 7.4 Verwendete Puffer und Lösungen

Es folgt eine Auflistung der in dieser Arbeit am häufigsten verwendeten Puffer und Lösungen:

1 x TE-Puffer	10 mM Tris HCL 1 mM EDTA, pH 8,0
10 x TAE-Puffer	400 mM Tris-Base 200 mM NaOAc 10 mM EDTA, pH 8,0
10 x TBE-Puffer	900 mM Tris Base 900 mM Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0
6 x Ladepuffer	0,25 % Bromphenol-Blau 0,25 % Xylencyanol FF 30 % Glycerol in 1x TE
FA-Ladepuffer	deionisiertes Formamid : Bromphenolblau (1:5)

## 8 Methoden

### 8.1 Polymerasekettenreaktion

Dieses zu Anfang der 80er Jahre etablierte Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung definierter Abschnitte von Nukleinsäuren ist heute essentieller Standard molekulargenetischer Forschung und soll aus diesem Grunde hier nicht weiter erläutert werden.

Die durchgeführten Reaktionen basierten auf folgendem Grundschemata:

Matrizen-Nukleinsäure	20 –100 ng
10 x PCR-Puffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
2 mM dNTP-Gemisch	2,5 µl
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 u/µl)	0,2 µl
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad</i> 25 µl

Nach einer initialen Denaturierung von 5 min erfolgte die Amplifizierung der Matrize in einem Thermocycler der Fa. Biometra für 30-40 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung	95°C	30 sec
Anlagerung („Annealing“) der Primer	56-60°C	30 sec
Polymerisierung	72°C	30 sec

Optional wurde die PCR durch Zugabe von 5 µl 1 x Q-Faktor (Qiagen, Hilden), 1,25 µl DMSO oder 1,25 µl (5% Endkonzentration) Formamid optimiert. Die Anzahl der Reaktionszyklen und die Höhe der Anlagerungs-Temperatur wurden für jedes Primerpaar ausgetestet.

## 8.2 Verfahren zur mRNA-Expressionsanalyse

### 8.2.1 Synthese von cDNA aus mRNA

Mit Hilfe des viralen Enzyms „Reverse Transkriptase“ ist es möglich, mRNA in komplementäre DNA (*copy DNA*; cDNA) umzuschreiben. Aus dieser cDNA lassen sich dann durch eine PCR spezifische Abschnitte amplifizieren.

Als Startpunkt der cDNA-Synthese dienen sogenannte „Hexamer-Primer“. Dabei handelt es sich um 6 Basen-kurze Oligonukleotide zufälliger Sequenz, die an komplementäre Sequenzen auf der mRNA binden. An die freien 3'-OH-Gruppen dieser Hexamer-Primer hängt die Reverse Transkriptase zur mRNA-Sequenz komplementäre Desoxynukleotide an und ermöglicht so die Synthese des cDNA-Stranges.

Für die cDNA-Synthese wurden 3 µg RNA in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem *Aqua dest.* ein Gesamtvolumen von 30,4 µl eingestellt. Die RNA-Lösung wurde für 5 min bei 70°C zur Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 19,6 µl des folgenden RNA-Reaktionsgemisches:

0,1 M DTT (Invitrogen)	0,4 µl
RNAsin (40.000 U/ml, Promega)	1,0 µl
BSA (2,9 mg/ml)	1,7 µl
dNTP-Gemisch (25 µM je dNTP)	2,5 µl
pd(N) <sub>6</sub> (1,5 µg/µl, Pharmacia)	3,0 µl
5x H-RT-Puffer (Invitrogen)	10,0 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen)	1,0 µl
gesamt	19,6 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 50 min bei 42°C inkubiert und die Reverse Transkriptase durch zehninütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert. Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde durch PCR-Amplifikation des ubiquitär exprimierten Gens *β<sub>2</sub>-Mikroglobulin* überprüft. Von den cDNAs wurde für die Expressionsanalysen mittels differentieller RT-PCR

Gebrauchslösungen mit einer Verdünnung von 1:10 und für die Real-Time RT-PCRs von 1:50 in *Aqua dest.* hergestellt.

## **8.2.2 Expressionsanalyse mittels differentieller Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) und Real-Time RT-PCR**

Beide Verfahren basieren auf dem Grundprinzip der Polymerasekettenreaktion und sind Methoden der semi-quantitativen Expressionsanalyse. Ausgangsmaterial für beide Reaktionen ist cDNA. Der grundlegende Unterschied zwischen beiden Methoden ist der Zeitpunkt der Produktbestimmung. Bei der differentiellen RT-PCR findet die Quantifizierung des gebildeten PCR-Produktes erst am Ende der Reaktion statt, während bei der Real-time RT-PCR die Produktbestimmung nach jedem PCR-Zyklus erfolgt. Bei beiden Messmethoden dient die Amplifizierung eines konstitutiv exprimierten Gens (Referenzgen) als interner Abgleich für die eingesetzte Matrizen-cDNA-Menge.

### **8.2.2.1 Differentielle Reverse Transkriptase-PCR**

Bei der differentiellen RT-PCR werden die Primer für das zu untersuchende Zielgen zusammen mit denen für das Referenzgen in den gleichen PCR-Ansatz pipettiert. Dabei wird das Konzentrationsverhältnis der Primer für jedes Zielgen-Referenzgenprimerpaar optimiert. Das Grundschemata der differentiellen RT-PCR für ein Zielgen-Kontrollgenprimer-Verhältnis von 1:1 ist nachfolgend dargestellt:

cDNA-Matrize	1 µl
10 x PCR-Puffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
2 mM dNTP-Gemisch	2,5 µl
Vorwärts-Zielgenprimer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Rückwärts-Zielgenprimer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Vorwärts-Kontrollgenprimer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Rückwärts-Kontrollgenprimer (10 pmol/µl)	1,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 u/µl)	0,2 µl
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 25 µl</i>

Das Reaktionsprodukt wird in einem 2-3 % Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung und fotografische Dokumentation erfolgte mit

Hilfe des Gel Doc 1000-Systems und der Molecular Analyst Software (Biorad). Die Software ermöglicht die Messung der Fluoreszenzintensitäten der DNA-Banden, so dass die Expressionsstärken umgerechnet als Zahlenwerte ausgedrückt werden können. Das Expressionsniveau eines jeden Ziel- und Referenzgens im Tumor wurde anhand des folgenden Quotienten in Bezug zum Expressionsniveau dieser Gene im Kontrollgewebe quantifiziert.

$$\text{Relative Expressionsstärke} = \frac{\text{Zielgen-mRNA Tumorgewebe/Referenzgen-mRNA Tumorgewebe}}{\text{Zielgen-mRNA Kontrollgewebe/Referenzgen-mRNA Kontrollgewebe}}$$

### 8.2.2.2 Real-Time Reverse Transkriptase-PCR

Die Real-Time RT-PCR ermöglicht die kontinuierliche quantitative Messung des gebildeten PCR-Produktes durch Interkalieren eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR<sup>®</sup> Green) in die doppelsträngige DNA. Jede zu untersuchende Gewebeprobe wurde in einem dreifachen Ansatz gemessen. Als Referenzgen wurde *ARF-1* (*ADP-Ribosylierungsfaktor-1*; NCBI GenBank-Zugangsnr. M36340) gewählt. Als Normalgewebe diente Hirn- bzw. Hirnhautgewebe aus neurochirurgischen Operationen, das keine Tumoranteile enthielt. Zu Beginn der Expressionsanalysen wurde von jedem Zielgen eine sogenannte „Primermatrix“ erstellt, durch die das optimale Konzentrationsverhältnis des Vorwärts- und Rückwärtsprimers ermittelt wurde. Folgendes Reaktionsgemisch wurde für ein Primerverhältnis von 300 µM Vorwärts- zu 300 µM Rückwärtsprimer angesetzt:

10x Reaktionspuffer	2,5 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,75 µl
5,0 mM dNTPs	1,0 µl
<i>Hot Gold Star Taq</i> Polymerase	0,125 µl
SYBR Green Farbstoff (1/66.000 verdünnt)	0,75 µl
Vorwärts-Oligonukleotid-Primer	variabel
Rückwärts-Oligonukleotid-Primer	variabel
cDNA-Gebrauchslösung	5 µl
<i>Aqua dest.</i>	ad 25 µl

Das Reaktionsgemisch wurde in PCR-Platten mit 96 Probestaschen aufgetragen und im ABI Prism<sup>®</sup> 5700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Darmstadt) folgenden Temperaturzyklen ausgesetzt, wobei die letzten beiden Schritte 39 x wiederholt wurden:

Temperatur	Zeit	Funktion
50°C	2 min	Aktivierung der Uracil-Glykosylase
95°C	10 min	Aktivierung der <i>Hot Gold Star Taq</i> Polymerase
95°C	15 sek	Denaturierung des DNA-Doppelstranges
60°C	1 min	Anlagerung der Primer und DNA-Synthese

Das Prinzip der Real-Time RT-PCR beruht auf der kontinuierlichen Messung der gebildeten PCR-Produktmenge durch den Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffes in die DNA. Dadurch ist es möglich, nach jedem PCR-Zyklus die Fluoreszenzzunahme mit Hilfe entsprechender Detektionssysteme zu messen und am Ende der PCR auf einem Computermonitor darzustellen. Dies unterscheidet die Real-Time PCR-Anwendung von herkömmlichen PCR-Methoden, bei denen nur das Endprodukt der Reaktion dargestellt werden kann. Die Anregung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt mit Hilfe einer Halogenlampe.

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte muss ein Fluoreszenzschwellenwert („*Threshold Cycle*“ oder C<sub>T</sub>-Wert) festgelegt werden. Der C<sub>T</sub>-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des PCR-Produktes die Basisfluoreszenz, welche zu Beginn des Experimentes durch den Fluoreszenzfarbstoff hervorgerufen wird, signifikant übersteigt. Die Quantifizierung erfolgt somit aufgrund der Kinetik der PCR-Reaktion. Der C<sub>T</sub>-Wert dient hierfür als Richtlinie, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in

dieser Phase der PCR keine limitierenden Faktoren, wie Oligonukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibierung der PCR durch Bildung hemmender Produkte gibt.

Aus den gewonnenen Fluoreszenzdaten erhält man ein Diagramm, wobei die relative Zunahme an PCR-Produkt logarithmisch gegen die Zyklenzahlen aufgetragen ist. Der Schwellenwert wird vom Anwender bestimmt und die Software ermittelt für jede PCR-Probe den  $C_T$ -Wert.

Da jede cDNA-Probe pro Gen in einem dreifachen Ansatz amplifiziert wurde, musste zur Auswertung sowohl für Ziel- als auch Kontrollgen zuerst der Mittelwert der dreifach bestimmten  $C_T$ -Werte berechnet werden. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Differenz ( $\Delta C_T = \text{Mittelwert } C_T\text{-Zielgen} - \text{Mittelwert } C_T\text{-Kontrollgen}$ ) der Mittelwerte von Ziel- und Kontrollgen. Nachfolgend wurde der  $\Delta\Delta C_T$  der Tumorproben bestimmt, indem die Differenz der  $\Delta C_T$ -Werte der Tumorproben und der  $\Delta C_T$ -Werte der Normalkontrollproben gebildet wurde. Dadurch setzt man die Werte der Normalkontrollen gleich null und die der Tumorproben hierzu in Relation. Die relative mRNA-Expression des Zielgens im Tumor ergibt sich durch Entlogarithmierung der  $\Delta\Delta C_T$ -Werte ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ).

### 8.3 Methoden der Mutationsdetektion

#### 8.3.1 Mutationsanalyse mittels Einzelstrangkonnektionspolymorphismus (SSCP „*Single-strand Conformational Polymorphism*“)-Analyse

Diese Methode der Mutationsdetektion ist ein allgemeines Suchverfahren nach Veränderungen in der Basensequenz von DNA-Proben. Der entscheidende Vorteil dieses Verfahrens ist die relativ preiswerte und schnelle Sichtung größerer Probenmengen. Nachteil dieser Methode ist, dass in den meisten Fällen zwar erkannt wird, dass eine Veränderung der Basenabfolge vorliegt, jedoch die Art und Position der Veränderung erst durch eine Sequenzierung des aberranten PCR-Produktes aufgedeckt werden kann. Die SSCP-Analyse basiert auf der Eigenschaft von DNA-Einzelsträngen, in Abwesenheit eines komplementären Stranges, eine durch die Basensequenz und durch externe Bedingungen festgelegte Sekundärstruktur anzunehmen. Diese Konformation ist von verschiedenen Faktoren abhängig, unter anderem von der Sequenz des DNA-Fragmentes. Daher bedingen Alterationen der molekularen Struktur, wie z.B. eine Veränderung in der Basenabfolge, eine andere Konformation des Moleküls. Während der elektrophoretischen Auftrennung in einem Polyacrylamidgel wandert das Molekül bedingt durch seine räumliche Struktur mit einer bestimmten Geschwindigkeit. Abweichungen in der Basensequenz führen somit über eine Konformationsänderung zu Unterschieden in der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit. Die einzelnen DNA-Banden werden am Ende der gelelektrophoretischen Auftrennung durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht und abweichende SSCP-Bandenmuster identifiziert.

Für die hier durchgeführten SSCP-Analysen wurden Fragmente von 153 bis 274 Basenpaar Länge mittels PCR amplifiziert. 3-4 µl des PCR-Produktes wurden mit formamidhaltigen Ladepuffer (deionisiertes Formamid : Bromphenolblau 1:5) versetzt und die DNA durch Erhitzen auf 95-100°C für 5 min denaturiert. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden Polyacrylamidgele (PAA-Gele) hergestellt, deren Vernetzung und Konzentration die optimale Auftrennung der PCR-Produkte in die DNA-Einzelstränge gewährleistete. Es wurden jeweils zwei verschiedene Kombinationen von PAA-Gel-Zusammensetzung und Geltemperatur für ein zu untersuchendes PCR-Fragment gewählt (Tab. 10).

**Tabelle 10: Bedingungen der Polyacrylamidgelelektrophoresen für die SSCP-Analysen**

	<i>SUFUH</i>					
	<b>1. Bedingung</b>			<b>2. Bedingung</b>		
	Vernetzung	Konzentration	Temperatur	Vernetzung	Konzentration	Temperatur
Exon 1.1	1:69	10%	4°C	1:29	10%	RT
Exon 1.2	1:29	10%	RT	1:79	12%	RT
Exon 2	1:29	10%	RT	1:79	12%	RT
Exon 3	1:69	10%	4°C	1:29	10%	RT
Exon 4	1:29	10%	RT	1:79	12%	RT
Exon 5	1:29	10%	RT	1:69	10%	RT
Exon 6	1:29	10%	RT	1:79	12%	RT
Exon 7	1:69	10%	4°C	1:29	10%	RT
Exon 8	1:29	10%	RT	1:69	10%	RT
Exon 9	1:29	10%	RT	1:79	12%	RT
Exon 10	1:29	10%	RT	1:69	10%	RT
Exon 11	1:29	10%	RT	1:69	10%	RT
Exon 12	1:79	12%	RT	1:29	10%	4°C
	<i>KLF6</i>					
	<b>1. Bedingung</b>			<b>2. Bedingung</b>		
	Vernetzung	Konzentration	Temperatur	Vernetzung	Konzentration	Temperatur
Exon 1.1	1:99	14%	4°C	1:29	10%	4°C
Exon 1.2	1:29	10%	RT	1:29	10%	4°C
Exon 2.1	1:29	10%	RT	1:69	12%	RT
Exon 2.2	1:99	14%	RT	1:29	10%	RT
Exon 2.3	1:29	10%	RT	1:69	12%	RT
Exon 3	1:99	14%	RT	1:69	12%	RT
Exon 4	1:29	10%	RT	1:99	14%	RT

Die entsprechenden Gellösungen wurden aus einer 40 % Acrylamid-Lösung (Fluka) und einer 2 % N,N'-Methylen-bis-acrylamid-Lösung (Fluka) mit den entsprechenden Mengenanteilen in 1 x TBE in einem Gesamtvolumen von 70 ml zusammenpipettiert. Die Polymerisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 200 µl 5 % Ammoniumpersulfat und 20 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet. Die Gellösung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen (wobei Abstandhalter die beiden Glasplatten voneinander trennten) und mit einem Kamm für die Ladetaschen versehen. Nach vollständiger Auspolymerisierung der PAA-Lösung wurde der Probenkamm entfernt und die Glasplatten senkrecht in eine Elektrophoresekammer eingespannt. Die Pufferkammern wurden mit 1 x TBE als Laufpuffer gefüllt, die Probenkammern mit Puffer ausgespült und die denaturierten PCR-Produkte geladen. Die Laufzeit bzw. die notwendige Spannung variierten je nach Vernetzung und Konzentration des PAA-Gels und der Geltemperatur (RT oder 4°C) zwischen 16 und 24 Stunden bzw. 80 und 140 V. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch eine Silberfärbung der PAA-Gele. In einem ersten Schritt wurde das Gel in 10 % Ethanol geschwenkt und anschließend für 1-3 min in 1% Salpetersäure gebadet. Das Gel wurde mit *Aqua dest.* gespült und für 20 min in 0,2 % Silbernitratlösung geschwenkt. Um nicht-komplexierte Silberionen zu entfernen, wurde

das Gel erneut dreimal mit *Aqua dest.* gewaschen. Durch anschließende Zugabe von 3 % Natriumhydroxidlösung wurde eine pH-Änderung herbeigeführt, die die Reduktion der komplexierten Silberionen zu elementarem Silber zur Folge hatte. Die Reaktion wurde bei ausreichender Darstellung der DNA-Banden mit 10 % Essigsäure durch erneute pH-Wert-Umkehr gestoppt. Das Gel wurde dann auf Whatman 3M-Papier aufgebracht und bei 80°C für 1 h unter Vakuum getrocknet.

### 8.3.2 Mikrosatellitenanalyse

Eine einfache Methode, Tumor-DNA auf den Verlust eines Allels („*loss of heterozygosity*“, LOH) hin zu untersuchen, ist die Analyse von Mikrosatellitenpolymorphismen. Mikrosatelliten sind nicht-kodierende multi-repetitive DNA-Sequenzen mit Motiven von 1-6 bp in vielfacher Wiederholung. Über die Existenz derartiger Regionen in nahezu allen Eukaryonten berichteten erstmals Tautz und Renz im Jahre 1984. Das von ihnen aufgestellte Konzept der „*simple sequences*“ (einfache Sequenzen) wurde fünf Jahre später von Weber und May (1989) aufgegriffen und zu einem molekulargenetischen Analyseverfahren erweitert. Bei den Mikrosatellitenregionen handelt es sich meist um multiple Wiederholungen der Basen Cytosin und Adenin. Da diesen Regionen keine ersichtliche Funktion zugeschrieben werden kann, fehlt hier vermutlich der Selektionsdruck bei genomischer Veränderung, d.h. Mutationen im Bereich von Mikrosatelliten bleiben ohne phänotypische Konsequenz und können sich somit ungehindert verbreiten. Hinzukommend ereignen sich bei der Replikation dieser DNA-Abschnitte statistisch häufiger Fehler als in kodierenden Genregionen. Beides trägt dazu bei, dass durch eine hohe Mutationsrate diese Mikrosatellitenbereiche in vielen verschiedenen Varianten in der Bevölkerung vorkommen. Somit ist auch die Wahrscheinlichkeit groß, dass die gleiche Mikrosatellitenregion eine unterschiedliche Sequenz auf dem väterlichen und dem mütterlichen Allel eines Individuums aufweist, man spricht dann von Heterozygotie und einem informativen Marker. Aufgrund der Doppelsträngigkeit der DNA verfügt die einzelne Zelle folglich über vier verschiedene Einzelstränge, die aufgetrennt in einem Polyacrylamidgel vier Banden ergeben. Bei Allelverlust reduziert sich die Anzahl der Banden auf nunmehr zwei. Man spricht von einem Verlust der Heterozygotie (LOH). Somit ist es möglich durch Amplifikation bestimmter Mikrosatellitenbereiche und anschließender Auftrennung des PCR-Produktes im Polyacrylamidgel Informationen über Allelverluste der entsprechenden chromosomalen

Region zu erhalten. Hierzu ist der Vergleich mit konstitutioneller DNA, z.B. Leukozyten-DNA aus peripherem Blut, notwendig. Zu beachten ist, dass dabei ausschließlich heterozygote Markerloci als informativ anzusehen sind, da homozygote Mikrosatellitenregionen sich auch in der konstitutionellen DNA als zweibandiges Muster darstellen.

Die Durchführung der Mikrosatellitenuntersuchung ist ähnlich der SSCP-Analyse mit dem Unterschied, dass bei der LOH-Untersuchung denaturierende PAA-Gele verwendet werden. Die Rezeptur der zu diesem Zwecke verwendeten Polyacrylamidgele lautet wie folgt:

Harnstoff (Urea)	8 M
Polyacrylamid (29:1), (BIO-RAD)	10 %
TBE	0,5 x

Die elektrophoretische Auftrennung der entsprechenden PCR-Produkte der korrespondierenden Tumor- und Blut-DNA-Proben erfolgte bei 45 W, die Dauer der Elektrophorese richtete sich nach der Größe der PCR-Produkte. Die Anfärbung der DNA-Banden erfolgte ebenfalls, wie oben beschrieben, mittels Silberfärbung.

### **8.3.3 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung ermöglicht es, die exakte Basensequenz eines definierten DNA-Abschnittes zu ermitteln. Die zugrunde liegende „Dye-Terminator“-Methode der Fa. Applied Biosystems ist eine Weiterentwicklung des Kettenabbruchverfahrens nach F. Sanger (1977). Grundlage ist ein der Polymerasekettenreaktion ähnlicher Prozess: Nach Anlagerung eines dem Zielabschnitt komplementären Oligonukleotids beginnt die enzymatische Elongation am 3'-Ende durch Einbau von Desoxynukleotiden. Dem Reaktionsgemisch beigefügt sind fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotide. Aus deren Einbau in die wachsende, dem Matrizenstrang komplementäre Desoxynukleotidkette resultiert die Termination der Kettenverlängerung. Dem Zufallsprinzip folgend geschieht dies in annähernd gleichem Maße an allen Stellen des neusynthetisierten Stranges. Die während der anschließenden Auftrennung im Polyacrylamidgel von einem Laserscanner registrierte Reihenfolge der Fluoreszenzmarkierungen signalisiert somit die Sequenz der Basen. Da jedes der vier

verschiedenen Didesoxynukleotide (ddGTP, ddATP, ddCTP und ddTTP) mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, ist im Gegensatz zum ursprünglichen Kettenabbruchverfahren bei dieser Methode nur eine Gelspur pro Probe notwendig.

Nach Amplifikation des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes wurde das PCR-Produkt mit einem Aufreinigungskit (Jetquick PCR Product Purification Spin Kit, Genomed) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Sequenzreaktion wurde für das Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotid getrennt nach folgendem Schema durchgeführt:

Aufgereinigtes PCR-Produkt	5-7,5 µl
Oligonukleotid (10 pmol/µl)	0,5 µl
BigDye <sup>®</sup> Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Mix (Applied Biosystems)	2,0 µl

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte unter folgenden Reaktionsbedingungen für 25 Zyklen:

1)	96°C	10 sec
2)	50°C	5 sec
3)	60°C	4 min

Um nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte ddNTPs aus der Reaktion zu entfernen, wurde die Sequenzreaktion nach Zugabe von 1 µl 3 M Natriumacetat und 25 µl 95 % Ethanol für 20 min bei 14000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellets wurde für 15 min bei 37°C getrocknet und in 4 µl Ladungspuffer (Formamid: 0,5 M EDTA 5:1, 50mg/ml Blue Dextran (Sigma)) aufgenommen. Jeweils 2 µl der Sequenzreaktion wurde dann auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel folgender Zusammensetzung aufgetragen:

Urea	21 g
30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid, 29:1 vernetzt (BIORAD)	8,4 ml
10x TBE	6 ml
<i>Aqua dest.</i>	20 ml
10 % APS	350 µl
<i>TEMED</i>	15 µl

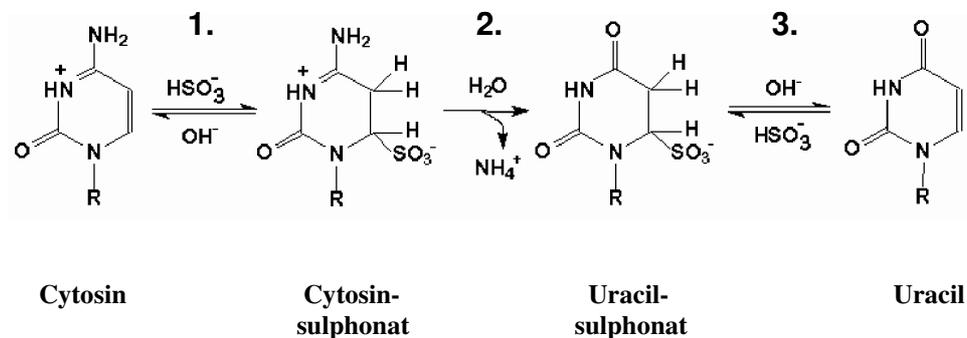
Die Auftrennung der Sequenzreaktion und die semi-automatische Sequenzierung erfolgte in einem ABI PRISM<sup>®</sup> 377-Sequenziergerät der Firma *Applied Biosystems*. Die Laufbedingungen wurden auf 2500 Volt, 48 Watt und 51°C Geltemperatur festgelegt.

Zur Auswertung der Mutationsanalysen wurden die erhaltenen Sequenzen mit der entsprechenden, unveränderten (physiologischen) Basensequenz verglichen, die den Genombibliotheken der NCBI Blast-Internet Homepage ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) entnommen wurden.

## 8.4 Methoden zur Analyse epigenetischer DNA-Veränderungen

### 8.4.1 Natrium-Bisulfitbehandlung genomischer DNA

Hierbei handelt es sich um eine effiziente Methode zur Detektion von DNA-Methylierungen. Grundprinzip dieser Methode ist die Umwandlung nicht-methylierter Cytosinreste in Uracil (Abb. 2), während 5-Methylcytosine unverändert bleiben. Bei einer nachfolgenden PCR-Amplifizierung und Sequenzierung dieser modifizierten DNA werden alle Uracil-Moleküle als Thymin gelesen, dagegen werden methylierte Cytosine als Cytosin erkannt.



**Abbildung 2: Chemischer Verlauf der Bisulfit-induzierten hydrolytischen Desaminierung von Cytosin zu Uracil.** Schritt 1: Sulphonierung; Schritt 2: Hydrolytische Desaminierung; Schritt 3: Alkali-Desulphonierung.

Ein Cytosin-Molekül kann über sein C5-Atom Addukte mit zahlreichen Substanzen, einschließlich dem Bisulfit-Ion, bilden. Die relativ langsame Reaktion mit Natrium-Bisulfit wird bei niedrigem pH-Wert (pH 5,0) katalysiert und ist stark einzelstrangspezifisch. In wässriger Lösung wird das Cytosin-Bisulfit-Addukt unter Abspaltung der  $\text{NH}_2$ -Gruppe zum Uracil- $\text{SO}_3$ -Derivat desaminiert und durch eine abschließende Alkali-Behandlung zu Uracil desulphoniert (Abb. 2).

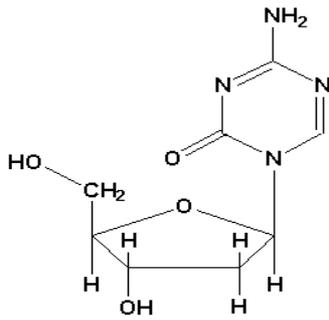
10 µl der DNA-Arbeitslösung (100 ng/µl) wurden nach Zugabe von 1,5 µl 10 N NaOH und 38,5 µl *Aqua dest.* für 15 min bei 37°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Bisulfitbehandlung durch Zugabe von 30 µl 10 mM Hydrochinon (frisch angesetzt) und 520 µl 3 M Natrium-Bisulfit (frisch angesetzt). Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei 55°C inkubiert. Für die darauf folgende Aufreinigung der bisulfitbehandelten DNA wurde das Wizard® DNA Clean-Up System des Herstellers Promega verwendet. Nach Elution der konzentrierten DNA mit 50 µl *Aqua dest.* erfolgte die Desulphonierung durch Zugabe von 1,5 µl 10 N NaOH und Inkubation bei 37°C für 15 min. Danach wurde die modifizierte DNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2 Vol. 99 % Ethanol für 30 min bei -20°C gefällt und anschließend 30 min bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl *Aqua dest.* aufgenommen.

## **8.4.2 Methoden der Zellkultur**

### **8.4.2.1 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und Trichostatin A-Behandlung von Glioblastomzelllinien**

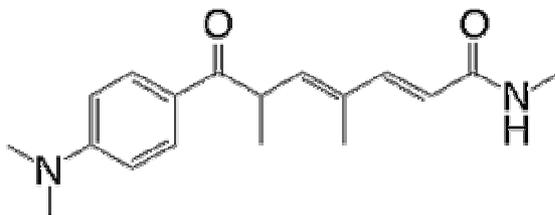
Ziel der eigenen Untersuchung war es, durch Kombination der Behandlung von Glioblastomzelllinien mit demethylierenden und die DNA-Histonacetylierung begünstigenden Substanzen mit einer anschließenden Mikroarray-Expressionsanalyse Gene zu identifizieren, die in den Zelllinien durch Promotorhypermethylierung abgeschaltet wurden und die eine mögliche Rolle bei der Entstehung von Glioblastomen spielen.

Glioblastomzelllinien sind anspruchslos und robust in ihrer *in vitro* Kultur. Aus diesem Grunde eignen sie sich zu Zellkulturexperimenten, die auf Behandlung mit toxischen Agenzien, wie 5'-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) und Trichostatin A (TSA), basieren. Die molekulare Struktur des 5-Aza-2'-Deoxycytidin entspricht einem Cytidin-Analogon, bei dem die Carbongruppe an Position 5 des Pyrimidinrings durch eine Nitrogruppe ersetzt ist (Abb.3).



**Abbildung 3: Strukturformel von 5-Aza-2'-Deoxycytidin**

Die demethylierende Wirkung dieser Substanz ergibt sich aus dem Einbau in die DNA während der Replikation. Integriert in die Erbsubstanz geht 5-Aza-2'-Deoxycytidin eine kovalente Bindung mit der DNA-Cytosin-C<sub>5</sub>-Methyltransferase 1 (Dnmt1) ein. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Methylierung des neu synthetisierten Stranges nach abgelaufener Replikation. Dabei wird das Methylierungsmuster des komplementären Stranges übernommen. Durch irreversible Bindung an 5-Aza-2'-Deoxycytidin wird das Enzym nicht-kompetitiv gehemmt, so dass nach Ablauf einer Replikation unter Anwesenheit von 5-Aza-2'-Deoxycytidin der neu-synthetisierte Strang demethyliert ist. Um vollständig demethylierte DNA zu erhalten, sind zwei Replikationszyklen notwendig. Oben erwähnte Toxizität von 5-Aza-2'-Deoxycytidin ergibt sich z.B. aus der Dekondensation von Chromatin, der Alteration der DNA-Replikations-Zeit, der Induktion von Chromosomenbrüchen und dem mutagenen Effekt von 5-Azacytosin–Dnmt1–Addukten. Durch Kombination mit Trichostatin A (Abb.4) ist es möglich die Effektivität der Re-Expression von Genen zu steigern. Trichostatin A ist ein Inhibitor von Histon-Deacetylasen. Somit beeinflusst TSA die Chromatinstruktur der DNA, welche von Bedeutung für die Genexpression ist.



**Abbildung 4: Strukturformel von Trichostatin A**

Die Zellen wurden entsprechend den folgenden Protokollen behandelt:

Nach 24 h-Anzucht in einer 250 ml-Zellkulturflasche in 10 ml DMEM-Medium [Dulbecco's MEM (1x) FG0435) + 10% FCS (fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptavidin-Lösung] wurden die Zellen mit 5 ml PBS (phosphate-buffered saline)

gespült und durch Zugabe von 1 ml Trypsin in Lösung gebracht. Die Zelldichte wurde durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je  $5 \times 10^5$  Zellen wurden pro Kammer in sechskammerige Zellkulturplatten ausgesät. Die Zelllinien wurden parallel verschiedenen Behandlungen unterzogen:

A + T1: Anzucht der Zellen für 24 h; Behandlung der Zellen für 24 h mit 500 nM 5-Aza (1 mM Stammlösung in PBS); Medium absaugen, Zellen mit PBS waschen und weitere 24 h mit 500 nM 5-Aza-dC und 1  $\mu$ M TSA (3 mM Stammlösung in DMSO) behandeln;

A + T2: Anzucht der Zellen für 24 h; Behandlung der Zellen 48 h mit 1  $\mu$ M 5-Aza-dC; Zellen mit PBS waschen und weitere 24 h mit 1  $\mu$ M 5-Aza-dC und 1  $\mu$ M TSA behandeln

TSA: Anzucht der Zellen für 24 h; Behandlung der Zellen für 24 h mit 1  $\mu$ M TSA

Kontrolle: Anzucht der Zellen mit täglichem Mediumwechsel für 5 Tage

Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml peqGOLD TriFast™ (PeqLab, Erlangen)/Zelllinie. Nach Überführung der Zellsuspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß wurde die RNA nach folgendem Protokoll isoliert: Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform zur Phasentrennung wurden die Proben für 15 sec kräftig geschüttelt und dann für 5-10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach anschließendem fünfminütigem Zentrifugieren mit 12000 g wurde die obere, wäßrige RNA-haltige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, die RNA durch Zugabe von 500  $\mu$ l Isopropanol für 10 min bei RT (20°C) präzipitiert und bei 12000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100  $\mu$ l DEPC-behandeltem *Aqua dest.* gelöst.

Nach Aufreinigung und Konzentrierung der RNA mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Microkits (Qiagen, Hilden) wurde die RNA-Konzentration durch Messung der optischen Dichte bestimmt.

### 8.4.3 Expressionsanalyse mittels Oligonukleotid-Mikroarray-Technologie

Die sogenannte Mikroarray-Expressions-Technologie ermöglicht die simultane Analyse von mehreren tausend Genen in einem Experiment. Nach Hybridisierung von markierter Proben-cRNAs auf fixierte Oligonukleotide wird die Menge der hybridisierten cRNA über die Intensität ihrer Eigenfluoreszenz bestimmt und somit auf die Konzentration der ursprünglichen mRNA rückgeschlossen.

In einem ersten Schritt diente die experimentell gewonnene RNA als Matrize zur Synthese einer komplementären Einzelstrang-cDNA, an deren Ende eine T7-Promotor-Sequenz adaptiert wurde:

- 1) 5 µg RNA wurden initial in einem Gesamtvolumen von 11 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst
- 2) Zugabe von 1 µl T7-(dT)<sub>24</sub>-Primer (100 pmol/µl)
- 3) Inkubation des Reaktionsansatzes für 10 min bei 70°C in einem Thermocycler
- 4) Proben auf Eis gesetzt und 4 µl 5x 1<sup>st</sup> cDNA-Puffer (Invitrogen), 2 µl 0.1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP hinzugefügt
- 5) Inkubation des Reaktionsansatzes für 2 min bei 42°C
- 6) Zufügen von 1 µl Superscript RT (Invitrogen, 200 u/µl)
- 7) Proben gut durchgemischt, erneute Inkubation bei 42°C für 1 Stunde
- 8) Proben auf Eis gestellt

Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde durch PCR-Amplifikation des *β<sub>2</sub>-Mikroglobulin* und *GAPDH*-Gens überprüft. Anschließend wurde in einem zweiten Reaktionsschritt Doppelstrang-cDNA erzeugt:

- 9) zum Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

+ 91,6 µl	DEPC-behandeltes Wasser
+ 30 µl	5x 2 <sup>nd</sup> cDNAPuffer
+ 3 µl	10 mM dNTP-Mix
+ 1 µl	10 u/µl <i>E.coli</i> DNA Ligase (Invitrogen)
+ 4 µl	10 u/µl <i>E.coli</i> DNA Polymerase I (MBI Fermentas)
+ 0,4 µl	5 u/µl Ribonuclease H (MBI Fermentas)
- 10) vorsichtig gemischt und bei 16°C für 2 Stunden inkubiert

- 11) Zugabe von 2 µl 5 u/µl T4 DNA Polymerase (MBI Fermentas)
- 12) 5 min bei 16°C inkubiert
- 13) Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA
- 14) Lagerung bei -20°C

Darauf folgte die Aufreinigung der gewonnenen cDNA durch das GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix):

- 15) Reaktionsansatz in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt
- 16) Zugabe von 600 µl cDNA Bindungspuffer
- 17) 500 µl des Reaktionsansatzes auf eine in einem 2 ml Sammelröhrchen platzierte cDNA-Aufreinigungs-Zentrifugierungs-Säule appliziert und 1 min bei 14.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert
- 18) der Durchfluß wurde verworfen und der restliche Reaktionsansatz erneut auf die cDNA-Aufreinigungs-Zentrifugierungs-Säule pipettiert
- 19) Überführung der cDNA-Aufreinigungs-Zentrifugierungs-Säule in ein neues 2 ml Sammelröhrchen und Auftragen von 750 µl cDNA-Waschpuffer auf die Säule
- 20) Zentrifugierung bei 14000 Umdrehungen pro Minute für 60 Sekunden und Beseitigung des Durchflusses
- 21) Weiteres Zentrifugieren für 5 min bei 14000 Umdrehungen pro Minute
- 22) Überführung der cDNA-Aufreinigungs-Zentrifugierungssäule in ein 1,5 ml Sammelröhrchen und Auftragen von 14 µl cDNA Elutionspuffer
- 23) Für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 14000 Umdrehungen pro Minute für 60 Sekunden zentrifugiert

Durch eine *in vitro*-Transkription wird die Ausgangs-RNA-Menge vergrößert und die so erhaltene cRNA mit Biotin markiert (unter Verwendung des Enzo BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit, Affymetrix):

- 24) 10 µl der entstandenen cDNA wurden in ein RNase-freies Röhrchen überführt und der Reihe nach folgende Komponenten hinzugefügt:
 

+ 12 µl	<i>Aqua dest.</i>
+ 4 µl	10x HY Reaktionspuffer
+ 4 µl	10x biotinmarkierte Ribonukleotide

- + 4 µl            10x DTT
- + 4 µl            10x RNase-Inhibitor-Mix
- + 2 µl            20x T7 RNA Polymerase

25) der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert

26) anschließend sofortige Überführung der Röhren in ein 37°C warmes Wasserbad und Inkubation für 5 Stunden, währenddessen wurde der Inhalt alle 30-45 Minuten vorsichtig gemischt

Hieran schloss sich ein weiterer Aufreinigungsprozess der biotinmarkierten cRNA an:

27) Zugabe von 60 µl RNase-freiem Wassers, 350 µl IVT cRNA-Bindungspuffer und 250 µl 100 % EtOH

28) cRNA- Aufreinigungs-Zentrifugierungssäulen in 2 ml Sammelröhren platziert und den Reaktionsansatz auf die Säule appliziert

29) Proben wurden nun für 15 sec bei 12000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen

30) Nach Überführung der Säulen in neue Sammelröhren wurden 500 µl IVT cRNA Waschpuffer aufgetragen, erneut 15 sec zentrifugiert und der Durchfluss verworfen

31) Der gleiche Vorgang wurde mit 500 µl 80 % EtOH wiederholt

32) Die Säulen wurden dann in 1,5 ml Sammelröhren überführt

33) 11 µl RNase-freies Wasser wurde auf die Membran der Säulen appliziert → Zentrifugierung für 1 Minute (14.000 U/min)

34) Der gleiche Vorgang wurde mit 10 µl RNase-freiem Wasser wiederholt

Anschließend wurde die cRNA-Konzentration der entstandenen Lösungen durch optische Dichtemessung bestimmt. Da alle Proben das erforderliche Mindestmaß von 0,6 µg/µl übertrafen, konnten sie der Fragmentierungsreaktion zugeführt werden. Vorerst wurde die hier noch unfragmentierte cRNA einer Kontrolle durch Gel-Elektrophorese in einem 1 % Agarosegel unterzogen. Danach erfolgte die enzymatische Spaltung der Nukleinsäuren durch metallinduzierte Hydrolyse in Fragmente von 35 bis 200 Basen Länge:

35) für jede 8 µl cRNA wurden der Lösung 2 µl 5 x Fragmentierungspuffer hinzugefügt und der Reaktionsansatz für 35 min bei 94°C inkubiert

Dieser Schritt wurde wiederum durch eine Elektrophorese im Agarosegel mit Ethidiumbromidzusatz überprüft. Nach Abschluß dieser Präparation wurden die Proben dem Institut für onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Durchführung der Hybridisierungsreaktion übergeben.

Die zu diesem Zwecke entworfenen GeneChips tragen millionenfache Kopien ausgewählter Oligonukleotide, die der, vom 3`-Ende aus gelesenen, Sequenz der mRNA der zu analysierenden Gene entsprechen. Der hier verwendete Human Genome U113A 2.0 Array Vers.A-Chip (Affymetrix) ist mit annähernd 14500 charakterisierten menschlichen Genen ausgestattet. Neben sog. „*Perfect Match*“ Oligonukleotiden mit exakter Sequenzübereinstimmung, finden sich „*Mismatch*“-Nukleinsäuren, deren Sequenz von der originalen mRNA um eine Base differiert. Dies ermöglicht die Quantifizierung und Subtraktion von unspezifischer Kreuzhybridisierung und erhöht die Genauigkeit der Analyse. Die nach Hybridisierung gebundene, biotinmarkierte cRNA wurde anschließend mit einem fluoreszierenden Streptavidin-Konjugat markiert und die Intensität der Fluoreszenz mittels eines konfokalen Laserscanners bestimmt.

Die Auswertung der gewonnenen Daten und die Feststellung der statistischen Relevanz wurde hauptsächlich computergesteuert durch das Institut für onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt, wobei für jedes untersuchte Gen der Faktor um den sich die addierten Fluoreszenzintensitäten der Proben aus den fünf behandelten Zelllinien von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden, kalkuliert wurde. Für FC gilt folglich:

$$Fc = \frac{\text{Summe der Fluoreszenzintensitäten der 5-Aza behandelten Zelllinien}}{\text{Summe der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollzelllinien}}$$

Steigt nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und TSA-Behandlung die Expression eines zuvor herunterregulierten Gens an, führt dies über die Zunahme der Fluoreszenzintensität zu einer Erhöhung des Zählers des Bruches und folglich bei gleich bleibendem Nenner zu einer Erhöhung des FC-Wertes. Somit lässt ein hoher FC-Wert auf eine direkte oder indirekte Herunterregulation des entsprechenden Gens durch DNA-Methylierung schließen.

## C Ergebnisse

### 9 Analyse des Tumorsuppressorkandidatengens *KLF6* in Meningeomen und Glioblastomen

#### 9.1 *KLF6*-Mutationsanalyse

Um die ätiologische Beteiligung von genetischen Veränderungen des *KLF6*-Gens in Meningeomen und Glioblastomen zu analysieren, wurden 47 Meningeome (13 benigne, 21 atypische und 13 anaplastische Meningeome) und 42 Glioblastome mittels SSCP-Analyse auf DNA-Veränderungen untersucht (Köhler *et al.* 2004). In den Fällen, die ein aberrantes Bandenmuster zeigten, wurden die Tumor- und die entsprechende konstitutionelle DNA (aus Leukozyten) sequenziert. Weiterhin wurde das von Jeng und Hsu (2003) als mutiert proklamierte Exon 2 in allen Fällen dieses Tumorkollektiv direkt sequenziert.

#### 9.2 Ergebnisse der *KLF6*-Mutationsanalyse

In der SSCP-Analyse des Exons 1 der 47 Meningeome zeigte sich in den drei Fällen MN12, MN59A und MN87 ein aberrantes Bandenmuster im SSCP-Gel. Die Sequenzierung dieses Genabschnittes identifizierte einen Basenaustausch von Cytosin durch Adenin (c.-4 C>A) in allen drei Tumoren. Da diese Veränderung sich jedoch ebenfalls in der Sequenz der dazugehörigen konstitutionellen DNA wiederfand, handelte es sich hierbei lediglich um einen Polymorphismus.

Die ergänzende SSCP-Analyse der 42 Glioblastome ergab ein verändertes Bandenmuster im Exon 1 des Glioblastoms GB138 und im Exon 2 des Glioblastoms GB81, wobei sich ersteres als Konsequenz des oben erwähnten Polymorphismus c.-4 C>A herausstellte und letzteres auf einen weiteren Polymorphismus [c.603G>A (R201R)] zurückzuführen war (Köhler *et al.* 2004). Die zusätzliche Sequenzierung des Exon 2 in allen Tumoren des gesamten Kollektivs (49 Meningeome und 42 primäre Glioblastome) bestätigte den zuvor entdeckten Polymorphismus im Glioblastom GB81, konnte aber darüber hinaus keine weiteren genetischen Veränderungen identifizieren (Köhler *et al.* 2004).

### 9.3 mRNA-Expressionanalyse von *KLF6*

Ein alternativer Mechanismus der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wäre unter anderem eine genetische oder epigenetische Veränderung, die einen Expressionsverlust oder einen schnelleren Abbau der aberranten RNA („*RNA decay*“) zur Folge hat. Daher wurde in dieser Arbeit eine mRNA-Expressionsanalyse von 31 Meningeomen, 39 Glioblastomen und 11 sekundären Glioblastomen mittels Duplex-Polymerasekettenreaktionen, ergänzt durch eine *real-time* RT-PCR-Analyse durchgeführt (Tab.11). Als Kontrollgewebe diente nichtneoplastisches Hirngewebe bzw. Leptomeninx.

Die Duplex-PCR-Untersuchungen ergaben in Hinblick auf die untersuchten Glioblastome und Rezidivgliome keinen signifikanten Expressionsverlust von *KLF6* gegenüber den Kontrollgeweben. Der Median der relativen Expressionsverhältnisse betrug für die Glioblastome 1,09 und für die sekundären Glioblastome 1,17. Die Mittelwerte der Expression zeigten, bedingt durch einige Tumoren mit erhöhter Expression, sogar eher eine leichte Tendenz zur Überexpression: Glioblastome 1,4 und Rezidivgliome 1,2. Lediglich das Glioblastom GB81 zeigte eine erniedrigte mRNA-Expression von weniger als 50% relativ zum Kontrollgewebe (Tab.11).

Die Untersuchung der meningealen Tumoren hingegen zeigte ein deutlich anderes Ergebnis. Die differentielle RT-PCR identifizierte 5/31 Meningeome (16 %), deren *KLF6*-Expression im Verhältnis zu der des Kontrollgewebes auf einen relativen Faktor von <0,5 erniedrigt war (Tab.11). Die *Real-Time* RT-PCR ermittelte 17/31 Meningeome (55 %), die eine erniedrigte *KLF6*-Expression zeigten (Tab.11).

Die Ermittlung des Medians der relativen Expressionswerte ergab für die differentielle RT-PCR einen Wert von 0,82, während diese Berechnung für die realtime-PCR-Methode sogar einen Wert von 0,45 ermittelte. Die Mittelwerte lagen bei 0,78 und 0,72.

**Tabelle 11: Ergebnisse der mRNA - Expressionsanalyse von *KFL6* in Glioblastomen und Meningeomen**

Fall	Tumor	Differentielle RT-PCR	Fall	Tumor	Differentielle RT-PCR	Real-Time RT-PCR
GB49	GBM	1,09	MN1	MN I	0,93	0,40
GB52	GBM	3,2	MN2	MN I	0,89	0,53
GB53	GBM	1,46	MN4	MN II	0,39	0,29
GB59	GBM	1,09	MN7	MN I	1,03	1,11
GB60	GBM	0,8	MN10	MN I	0,84	n.a.
GB72	GBM	0,94	MN12	MN I	0,75	0,47
GB77	GBM	1,2	MN14	MN II	0,52	0,48
GB81	GBM	0,47	MN15	MN I	0,94	1,00
GB82	GBM	0,52	MN16	MN III	0,77	0,72
GB83	GBM	0,76	MN17	MN I	0,87	0,67
GB85	GBM	1,6	MN19	MN I	0,84	0,24
GB86	GBM	0,67	MN20	MN II	0,35	0,23
GB96	GBM	0,71	MN22	MN II	0,48	0,31
GB97	GBM	0,76	MN27	MN I	0,95	0,65
GB98	GBM	0,73	MN31	MN I	1,25	4,63
GB99	GBM	1,27	MN34	MN III	1,07	0,92
GB100	GBM	1,37	MN36	MN I	0,88	0,59
GB101	GBM	1,25	MN40	MN II	0,82	1,44
GB103	GBM	n.a.	MN42	MN II	0,62	0,38
GB106	GBM	1,51	MN47	MN II	0,89	0,64
GB107	GBM	2,02	MN49A	MN III	1,87	3,02
GB110	GBM	0,54	MN56B	MN II	0,82	0,57
GB113	GBM	0,75	MN59A	MN II	0,59	0,29
GB115	GBM	2,01	MN60	MN II	0,82	0,42
GB121	GBM	0,86	MN63B	MN III	0,65	0,31
GB130	GBM	1,09	MN64	MN III	0,59	0,19
GB131	GBM	6,04	MN67	MN III	0,75	0,25
GB133	GBM	1,35	MN85	MN III	0,54	0,35
GB136	GBM	1,52	MN88B	MN III	0,93	0,22
GB137	GBM	0,98	MN90	MN III	0,03	0,04
GB138	GBM	1,72	MN91A	MN III	0,44	0,28
GB139	GBM	0,73				
GB140	GBM	0,88				
GB147	GBM	1,05				
GB149	GBM	1,55				
GB152	GBM	1,33				
GB153	GBM	5,32				
GB158	GBM	0,91				
GB583	GBM	1,13				
GB4	sGBM	1,04				
GB119	sGBM	1,49				
GB175	sGBM	1,46				
GB229	sGBM	1,2				
GB235	sGBM	1,12				
GB236	sGBM	1,19				
GB237	sGBM	1,04				
GB238	sGBM	1,17				
GB239	sGBM	1,16				
GB240	sGBM	1,25				
GB748	sGBM	1,1				

Grau markierte Werte kennzeichnen mRNA-Expressionswerte  $\leq 0,5$  relativ zu Normalgewebe

GBM, primäres Glioblastom WHO-Grad IV;  
sGBM, sekundäres Glioblastom WHO-Grad V;  
MN I, Meningeom WHO-Grad I;  
MN II, atypisches Meningeom WHO-Grad II;  
MN III, anaplast. Meningeom WHO-Grad III.

#### 9.4 Methylierungsanalyse von *KLF6* in Meningeomen

Zur Bestimmung des Methylierungsstatus wurde die DNA von sechs Meningeomen mit reduzierter *KLF6*-Expression mit Natriumbisulfit behandelt und anschließend die zu untersuchende CpG-Insel amplifiziert und sequenziert. Zwei Fragmente, die eine CpG-Inseln dieses Genabschnittes unterteilen, wurden festgelegt und analysiert. Insgesamt wurden im Fragment eins 35 und im Fragment zwei 48 CpG-Dinukleotide auf Cytosin-Methylierung hin untersucht. Die Analyse des ersten PCR-Fragmentes ergab in keinem der untersuchten Meningeome einen Hinweis auf DNA-Methylierung. Analog hierzu fiel auch die Untersuchung des zweiten Fragments, die aufgrund qualitativ schlechter PCR-Produkte (trotz multipler Primertestung) nur in zwei Tumoren durchgeführt werden konnte, negativ aus (Tab.12).

**Tabelle 12: Ergebnisse der *KLF6* - Promotormethylierungsanalyse in ausgewählten Meningeomen**

Fall-Nr.	mRNA-Expression	Fragment 1	Fragment 2
195-01	0,27	n.m.	
823-91	0,25	n.m.	
56-96	0,2	n.m.	
313-96	0,32	n.m.	n.m.
647-96	0,15	n.m.	n.m.
833-98	0,3	n.m.	
Leptomeninx	Referenz	n.m.	
Paccioni-Gran	Referenz	n.m.	n.m.
S119-01	Referenz	n.m.	

n.m. = nicht methyliert

## 10 Mutations- und Expressionsanalyse des Tumorsuppressor-Kandidatengens *SUFUH* in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen

### 10.1 *SUFUH*-Mutationsanalyse

Das *SUFUH*-Gen umfaßt 12 Exone und kartiert in die Chromosomenbande 10q24.32, einer Region, die häufig in Medulloblastomen deletiert vorliegt. Das *SUFUH*-Genprodukt spielt eine wichtige Rolle als negativer Regulator der Signaltransduktion im Sonic Hedgehog-Signalweg. In dieser Arbeit wurde die genomische DNA von 14 Medulloblastomen und 32 Basalzellkarzinomen mittels SSCP/Heteroduplexanalyse auf *SUFUH*-Mutationen hin untersucht. Die verwendeten Oligonukleotidpaare umspannten die Exon/Intron-Grenzen aller 12 Exone. PCR-Produkte, die ein aberrantes SSCP-Muster zeigten, wurden verifiziert und dann sequenziert. In Exon 4 und Exon 11 konnten aberrante SSCP-Banden in mehreren Tumoren identifiziert werden (Tab.13).

In der Tumor-DNA des Hauttumor-Patienten BCC17 konnte ein Basenaustausch von Cytosin nach Thymin an Position 591 (c.591C>T) der kodierenden Region festgestellt werden (Abb.5), der aber nicht zu einer veränderten Aminosäuresequenz führte (F197F). Diese stille Mutation war in der Blut-DNA des Patienten nicht nachweisbar.

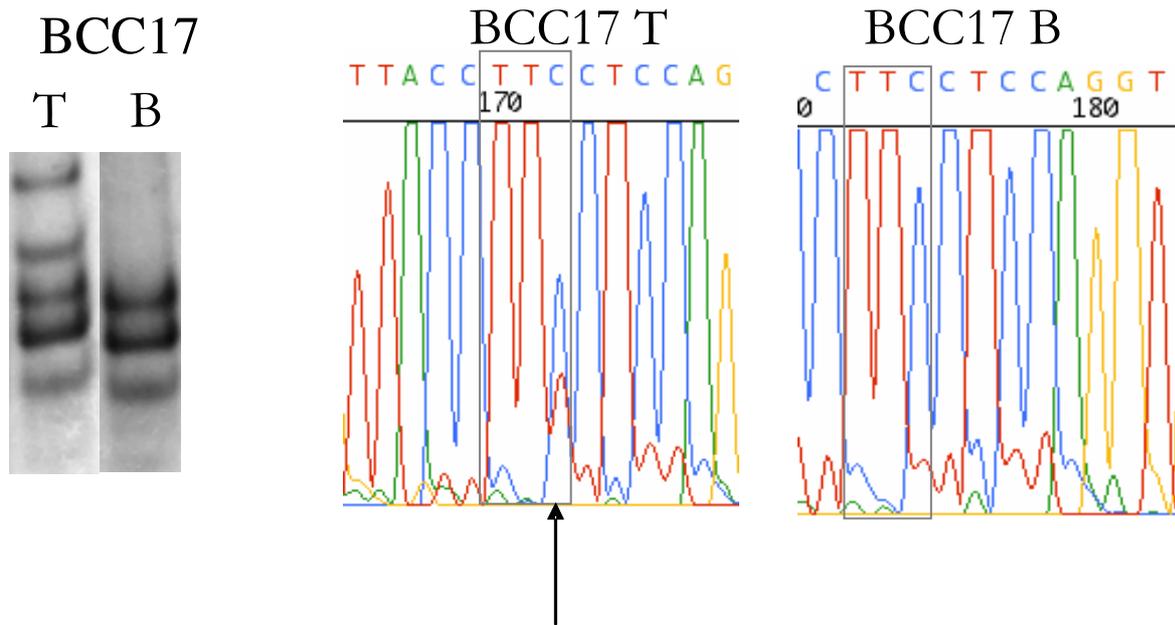
Eine weitere somatische Mutation legte die Sequenzierung der Tumor-DNA von BCC45 offen. Hierbei handelte es sich um einen heterozygoten Basenaustausch von C>T an Position 560 der kodierenden Region (Abb.6), der zu einem Aminosäureaustausch von Prolin nach Leucin im Codon 187 führt (c.560C>T: P187L). Im Blut des Patienten war die Wildtypsequenz nachweisbar (Abb.6).

Die SSCP/Heteroduplex-Analyse von Exon 11 ergab in sieben Medulloblastomen bzw. supratentoriellen PNETs (MB9, stP2, dpMB12, stP3, MB15, stP4, stP5) und in drei Basalzellkarzinomen (BCC13, BCC20, BCC33) eine Abweichung des Heteroduplex-Bandenmusters.

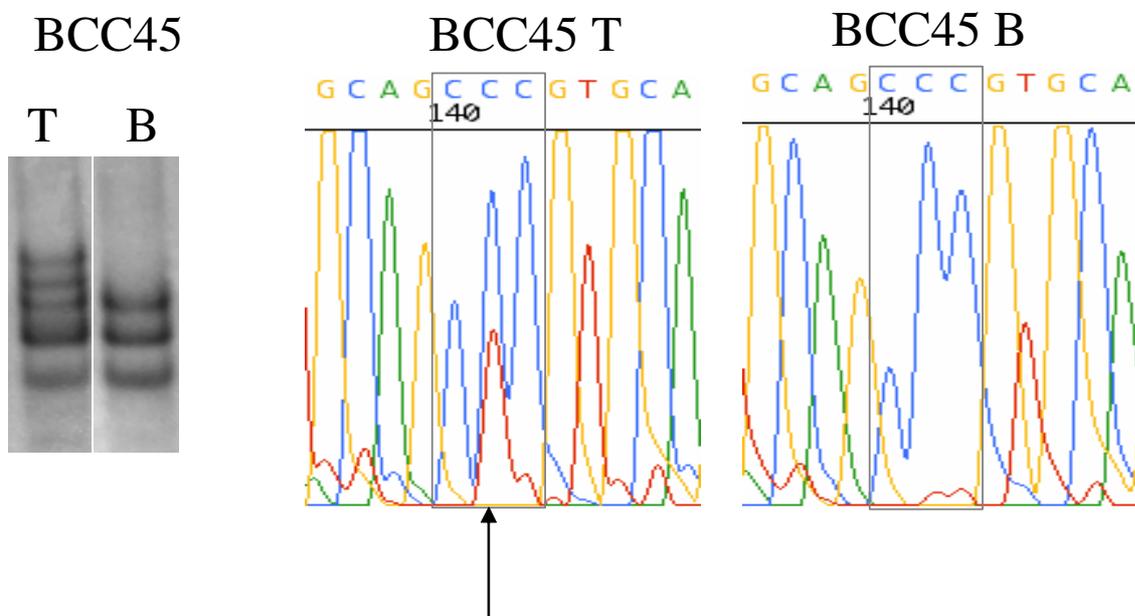
**Tabelle 13: Ergebnisse der Mutationsanalyse von *SUFUH* in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen**

Tumor-Nr.	Exon											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BCC 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c.1299C>T: I433I	0
BCC 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 17	0	0	0	c.-591C>T: F197F	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c.1299C>T: I433I	0
BCC 21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c.1299C>T: I433I	0
BCC 34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 45	0	0	0	c.560C>T: P187L	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BCC 47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dpMB10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dpMB11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dpMB12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c.1299C>T: I433I	0
dpMB13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dpMB14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dpMB18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MB9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c.1299C>T: I433I	0
MB14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MB15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c.1299C>T: I433I	0
MB16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
stP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c.1299C>T: I433I	0
stP3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c.1299C>T: I433I	0
stP4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c.1299C>T: I433I	0
stP5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c.1299C>T: I433I	0

o = kein aberrantes SSCP-Muster



**Abbildung 5: Nachweis einer stillen *SUFUH*-Mutation (c.591C>T:F197F) im Basalzellkarzinom BCC17.** Links, SSCP-Bandenmuster von Exon 4 der Tumor-DNA (T) und Blut-DNA (B) von BCC17. Rechts, DNA-Sequenzierung der Tumor- (links) und Blut-DNA (rechts) von BCC17. Pfeil, heterozygoter Basenaustausch von Cytosin durch Thymin.



**Abbildung 6: Nachweis einer heterozygoten *Missense*-Mutation in Exon 4 von *SUFUH* in BCC45.** Links, SSCP-Bandenmuster von Exon 4 der Tumor-DNA (T) und Blut-DNA (B) von BCC45. Rechts, DNA-Sequenzierung der Tumor- (links) und Blut-DNA (rechts) von BCC45. Pfeil, heterozygoter Basenaustausch von Cytosin durch Thymin an Position 560 der kodierenden Region (c.560C>T: P187L).

Die Sequenzierung der Tumor-DNA der Tumoren ergab in allen Fällen einen Basenaustausch von Thymin durch Cytosin (c.1299T>C). Im Tumor stP5 lag diese genetische Veränderung homozygot, in den anderen Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen in heterozygoter Form vor. Der Basenaustausch veränderte nicht die Aminosäuresequenz (I433I). Diese genetische Veränderung war ebenfalls in der korrespondierenden Blut-DNA der Hauttumor-Patienten nachweisbar, und stellt somit einen Polymorphismus dar.

## **10.2 Ergebnisse der LOH-Analyse von *SUFUH***

Mittels einer Mikrosatellitenanalyse sollte untersucht werden, ob um den *SUFUH*-Genlocus Allelverluste vorliegen. Für diese Untersuchung stand in den 32 Basalzellkarzinomfällen die entsprechende Blut-DNA zur Verfügung. Von den Medulloblastompatienten war keine konstitutive DNA verfügbar. Die 32 Basalzellkarzinome wurden auf Allelverluste in den folgenden drei Mikrosatellitenregionen überprüft D10S212 (10q26.3), D10S541 (10q23) und D10S587 (10q26.13). Alle informativen Mikrosatelliten-Loci zeigten eine Retention beider Allele in den untersuchten Basalzellkarzinomen (Tab.14).

**Tabelle 14: Ergebnisse der LOH-Analyse der chromosomalen Region um *SUFUH* in 32 Basalzellkarzinomen.**

Tumor-Nr.	D10S 541	D10S 587	D10S 212
BCC 3			
BCC 7			
BCC 8			
BCC 9			
BCC 10			
BCC 11			
BCC 13	n.a.		
BCC 14			
BCC 15			
BCC 16			
BCC 17			
BCC 18			
BCC 19			
BCC 20			
BCC 21			
BCC 22			
BCC 23			
BCC 24			
BCC 25			
BCC 26			
BCC 27			
BCC 28			
BCC 33			
BCC 34			
BCC 37			
BCC 40	n.a.		
BCC 42			
BCC 43			
BCC 44			
BCC 45			
BCC 46	n.a.		
BCC 47			

- nicht informativ

- Retention beider Allele

n.a. - nicht analysiert

## 11 Expressionsprofilerstellung von unbehandelten und mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und TSA-behandelten Gliomzelllinien mittels Mikroarray-Analyse

Behandelt man Zellen in der Wachstumsphase mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-Deoxycytidin, führt dies während mehrerer Replikationszyklen zu einem Verlust der zellspezifischen DNA-Methylierung. Eine Folge dieses Verlustes ist die Veränderung des Expressionsprofils der behandelten Zellen. Das heißt, Gene, deren Expression in der unbehandelten Zelllinie herunterreguliert sind und nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung einen Anstieg zeigen, werden entweder direkt durch Promotorhypermethylierung oder indirekt über eine Kaskade von epigenetisch regulierten Genen in ihrer Expression beeinflusst. Kombiniert man diesen Ansatz mit einer umfassenden Methode der Expressionsanalyse, wie z.B. einer Oligonukleotid-Mikroarray-Untersuchung, ist es möglich, gleichzeitig mehrere tausend Gene auf eine eventuelle Reexpression nach Demethylierung zu untersuchen.

Zu diesem Zwecke wurden die Glioblastomzelllinien CCF-STTG1, TP365MG, U138MG, A172 und T98G einer kombinierten 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und TSA-Behandlung (siehe Kapitel 8.4.2.1) unterzogen und anschließend durch eine Mikroarray-Expressionsanalyse auf Änderungen der Genexpression hin untersucht. Der Fokus der Auswertung wurde dabei auf solche Gene gelegt, die auf Chromosom 10 kartieren.

Nach Extraktion der RNA aus den behandelten und unbehandelten Zellen wurde diese aufgereinigt und die Quantität und Qualität der extrahierten RNA photometrisch und auf einem Agarosegel überprüft. Da sich beides in allen Fällen für die anschließende Mikroarray-Expressionsanalyse als ausreichend erwies, konnte die Erststrang-cDNA-Synthese durchgeführt werden. Die Effizienz dieser Reaktion wurde durch PCR-Amplifizierung mit jeweils zwei Oligonukleotidpaaren für *β2MG* und *GAPDH* überprüft. Dabei waren die Oligonukleotidpaare so ausgewählt, dass eine Sequenz im 5'-Bereich des Transkriptes und eine im 3'-Bereich vervielfältigt wurde. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Banden quantifiziert. Im Idealfall, bei qualitativ hochwertiger Ausgangs-RNA, sollte das Verhältnis der Bandenintensität des 5'-Amplikons zum 3'-Amplikon und *vice versa* einen Wert von 1,0 ergeben. Die PCR-Analyse der hier untersuchten Zelllinien ergab folgende Verhältniswerte (Tab.15):

**Tabelle 15: Verhältnis der Bandenintensitäten des 5'-Amplikons zum 3'-Amplikon**

Zelllinie	$\beta 2MG$		$GAPDH$	
	3'/5'	5'/3'	3'/5'	5'/3'
CCF-STTG1A+T1	0.80	1.26	1.20	0.83
CCF-STTG1	1.12	0.90	1.22	0.82
TP365MG A+T2	1.03	0.97	1.11	0.90
TP365MG	1.10	0.91	1.29	0.77
U138MG A+T2	0.99	1.01	1.11	0.90
U138MG	0.86	1.16	1.64	0.61
A172 A+T1	1.11	0.90	1.28	0.78
A172	0.90	1.11	1.26	0.79
T98G A+T1	0.81	1.23	1.01	0.99
T98G	0.81	1.23	1.10	0.91

Die ermittelten Werte lagen alle um 1,0. Die einzige Ausnahme bildet das Verhältnis der 3'/5' (1,64) und 5'/3'-Werte (0,61) für die Amplifikation von *GAPDH* in U138MG, die deutlich vom Idealwert 1,0 abweichen. Da aber die Verhältniswerte für die  $\beta 2MG$ -Amplikons in U138MG. vergleichbar mit den ermittelten Werten für die anderen Zelllinien waren, wurde diese cDNA ebenfalls für die Expressionsanalyse verwendet.

Es folgte die Zweitstrang-cDNA-Synthese und anschließende Retranskription in cRNA, die eine Verfünfachung der Ausgangskonzentration an RNA ermöglicht. Die Hybridisierung der *Human Genome* U113A 2.0 Array-Chips mit 15  $\mu$ g fragmentierter und markierter RNA wurde am Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Anschließend wurde für jedes auswertbare Gen die Expression (messbar als Pixelintensitäten) der 5'-Aza/TSA-behandelten Zelllinie in Relation zu der der jeweiligen unbehandelten Zelllinie gesetzt. Dieser Expressionsunterschied wird als sogenannter FC- (*Fold Change*)-Wert wiedergegeben. Da für diese Untersuchung ausschließlich die nach 5'-Aza/TSA-Behandlung heraufregulierten Gene von Interesse waren, wurden diese selektiert und in zwei Gruppen mit statistisch signifikantem Expressionsunterschied ( $p \leq 0,05$ ) aufgeteilt:

- Gruppe A: FC-Wert von 1,5-1,9
- Gruppe B: FC-Wert  $\geq 2,0$ .

Insgesamt wurden 537 Gene signifikant differentiell zwischen den Zelllinien vor und nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin/TSA-Behandlung exprimiert. 218 Gene konnten der Gruppe A zugeordnet werden, von denen sich elf auf Chr. 10 befanden. Von diesen elf Genen lagen drei (*NMT2*, *RSU1* und *PITRM1*) auf dem kurzen und acht Gene (*PPP3CB*, *NRBF-2*, *CBARA1*, *MINPP1*, *ARL3*, *SLC18A2*, *ECHS1* und *INPP5A*) auf dem langen Arm des Chromosoms (Tab.16).

Die Gruppe B umfasste ein Kollektiv von 319 Genen, wobei aus dieser Gruppe 14 Gene auf Chr. 10 lokalisiert waren: *NMT2*, *PRPF18*, *PFKFB3* und *ID11* auf 10p und *PSAP*, *BTAFL1*, *LIPA*, *PPP1R3C*, *GOT1*, *VIP32*, *MX11*, *DUSP5*, *OAT* und *INPP5F* auf 10q (Tab.17).

Um die Ergebnisse der Mikroarray-Expressionsanalyse zu verifizieren, wurden vier ausgewählte Gene, zwei aus Gruppe A (*RSU1* und *INPP5A*) und zwei aus Gruppe B (*DUSP5* und *OAT*), durch Real-Time RT-PCR in den unbehandelten und behandelten Zelllinien analysiert (Abb.8).

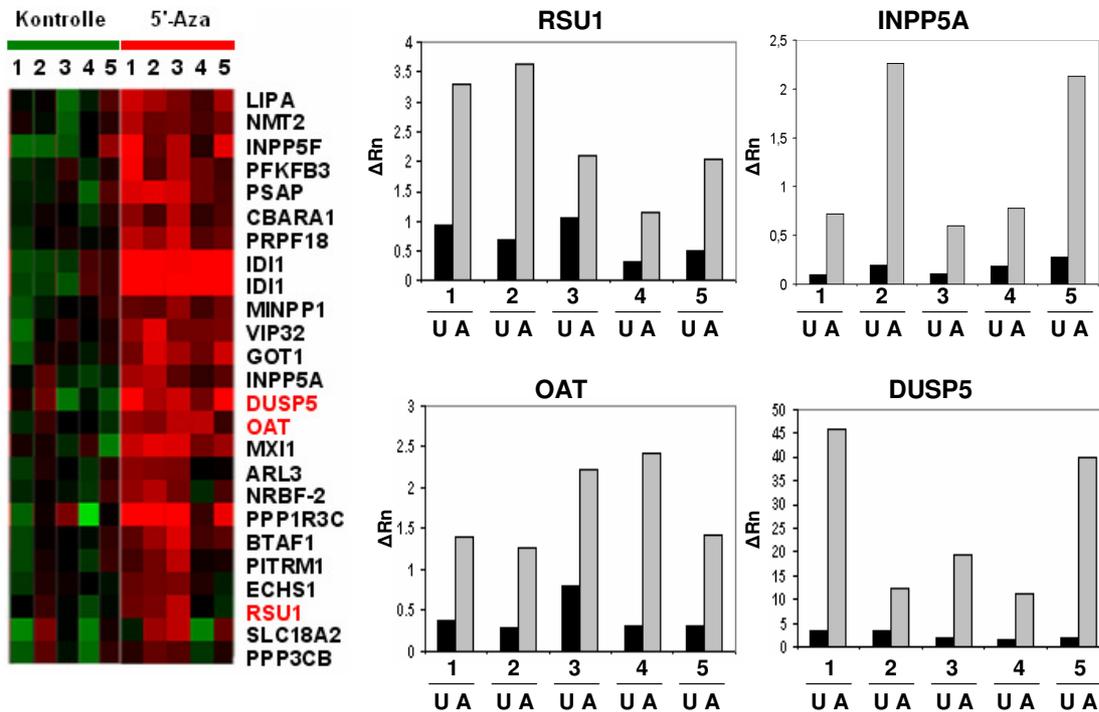
Die Ergebnisse der Expressionsprofilierung mittels Oligonukleotid-Mikroarrays konnten an den vier Genen, *RSU1*, *INPP5A*, *OAT* und *DUSP5*, durch die Real-Time RT-PCR-Analyse bestätigt werden. Es ergab sich hier ein mittlerer Expressionsanstieg nach 5'-Aza/TSA-Behandlung um den Faktor 4,1 für *RSU1* (Mikroarray-Analyse FC=1,6), 7,3 für *INPP5A* (FC=1,9), 4,1 für *OAT* (FC=2,2) und 9,9 für *DUSP5* (FC=4,0) (Abb.8).

**Tabelle 16: Gene auf Chromosom 10, die eine signifikante Heraufregulation nach Aza + TSA Behandlung zeigten ( $p \leq 0,05$ ; FC 1,5-1,9)**

Name	Probe-Set ID	Lokalisation	Funktion	FC
NMT2	205006_s_at	10p13	N-Myristoyltransferase 2	1,9
RSU1	201980_s_at	10p13	Ras-Suppressorprotein 1	1,6
PITRM1	205273_s_at	10p15.3	Pitrylsin-Metalloproteinase 1	1,6
PPP3CB	202432_at	10q21-q22	Proteinphosphatase 3, kat. Untereinheit, $\beta$ -Isoform (Calcineurin A $\beta$ )	1,7
NRBF-2	221803_s_at	10q22.1	nuclear receptor binding factor-2	1,8
CBARA1	216903_s_at	10q22.2	calcium binding atopy-related autoantigen 1	1,8
MINPP1	209585_s_at	10q23	multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase, 1	1,7
ARL3	202641_at	10q23.3	ADP-ribosylation factor-like 3	1,6
SLC18A2	213549_at	10q25	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), Mitglied 2	1,6
ECHS1	201135_at	10q26.2-q26.3	enoyl Coenzyme A hydratase, kurze Kette 1, mitochondrial	1,5
INPP5A	203006_at	10q26.3	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 40kDa	1,9

**Tabelle 17: Gene auf Chromosom 10, die eine signifikante Heraufregulation nach Aza + TSA Behandlung zeigten ( $p \leq 0,05$ ; FC  $\geq 2,0$ )**

Name	Probe-Set ID	Lokalisation	Funktion	FC
NMT2	205005_s_at	10p13	N-myristoyltransferase 2	2,1
PRPF18	221547_at	10p14	PRP18 pre-mRNA processing factor 18 homolog (Hefe)	2,2
PFKFB3	202464_s_at	10p14-p15	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	2,1
IDII	204615_x_at	10p15.3	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	4,7
PSAP	208881_x_at	10q21-q22	prosaposin (abweichend im M Gaucher u. d. metachrom Leukodystrophie)	2,5
BTAF1	200871_s_at	10q22-q23	BTAF1 RNA polymerase II, B-TFIID transcription factor-associated	2,0
LIPA	209430_at	10q23.2-q23.3	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase (Morbus Wolman)	2,2
PPP1R3C	201847_at	10q23-q24	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	3,9
GOT1	204284_at	10q24.1-q25.1	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, löslich (aspartate aminotransferase 1)	2,4
VIP32	208813_at	10q24.2	vasopressin-induced transcript	2,2
MXI1	218631_at	10q24-q25	MAX interacting protein 1	2,7
DUSP5	202364_at	10q25	dual specificity phosphatase 5	4,0
OAT	209457_at	10q26	ornithine aminotransferase (gyrale Atrophie)	2,2
INPP5F	201599_at	10q26.13	inositol polyphosphate-5-phosphatase F	3,1



**Abbildung 8: Erhöhte Expression von Chromosom 10-Genen in Glioblastomzelllinien nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und TSA-Behandlung.** Links, Heat map-Darstellung von Tumorsuppressor-Kandidatengenen auf Chr. 10 mit einem Expressionsunterschied  $\geq 1,5$  in den 5 Zelllinienpaaren. Die heat map wurde mit dem Programm Treeview (Eisen *et al.*, 1998) erstellt. Rechts, Real-Time RT-PCR-Analyse von vier ausgewählten Chr. 10-Genen. 1, TP365MG; 2, U138MG; 3, CCF-STTG1; 4, T98G; 5, A172. schwarze Balken, unbehandelte Zelllinie; graue Balken, 5-Aza-2'-Deoxycytidin/TSA-behandelte Zelllinie.

## D Diskussion

### 12 *SUFUH* – Suppressor of fused

Die Entdeckung des Gens für das Hedgehog-Protein durch Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus im Jahre 1980 war der erste Schritt zur Aufdeckung eines zellulären Signaltransduktionsmechanismus, der sich als von außerordentlicher Bedeutung für die Entwicklungsbiologie und Tumorforschung erweisen sollte. Veränderungen dieser Signalkaskade wurden in zahlreichen Tumorentitäten gefunden. So entdeckte man Mutationen und Expressionsveränderungen von Komponenten des Hedgehog-Signalweges unter anderem in Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen (Reifenberger *et al.* 2005, Taylor *et al.* 2002). Das bislang am häufigsten als mutiert beschriebene Gen der Shh-Signalkaskade in diesen beiden Krebsarten kodiert für das Transmembranmolekül Ptch, welches als Rezeptor für das Shh-Protein fungiert. Der Verlust seiner funktionellen Eigenschaften kann einen unkontrollierten Ablauf des Shh-Signalweges mit konsekutiver Stimulation des Zellzyklus zufolge haben. Aber auch in den Genen anderer molekularer Bausteine dieser Signalkaskade konnten genetische Alterationen entdeckt werden. Zum Beispiel wiesen Xie *et al.* (1998) und Reifenberger *et al.* (1998) Mutationen im Gen für das Molekül *SMOH* (*Smoothend*) in Basalzellkarzinomen und primitiven neuroektodermalen Tumoren nach. Weiterhin analysierten Taylor *et al.* (2002) in einer Untersuchung von 46 Medulloblastomen die Relevanz von Mutationen der Shh-Komponente *SUFUH* für die Entstehung dieser Tumoren. Hierbei konnten in vier Fällen (9 %) genetische Veränderungen nachgewiesen werden, wobei die gefundenen Mutationen eine Assoziation zum desmoplastischen Typ des Medulloblastoms zeigten. Einer der Tumoren wurde einem vier Jahre alten Jungen entnommen, der klinisch ein dem Gorlin-Goltz-Syndrom ähnliches Krankheitsbild bot. Bei diesem Patienten konnte weiterhin eine 2,5-Mb Keimbahndeletion in der Region 10q23.32-10q25.1 nachgewiesen werden, so dass die im Tumor gefundene Mutation (IVS8+1G→A) vermutlich im Sinne eines „*Second-Hits*“ zur Kanzerogenese beitrug. Die Mutationen in den sporadischen Tumoren wurden allesamt begleitet von einem *LOH* des anderen Allels. Diese Ergebnisse veranlassten die Autoren zu der These einer möglichen Beteiligung von *SUFUH* als Tumorsuppressorgen in der Entstehung von Medulloblastomen. Eine relativ groß angelegte Studie von Koch *et al.* (2004) beschäftigte sich unter anderem mit der Verifizierung dieser These. Zu diesem Zwecke wurde ein Tumorkollektiv von 145 primitiven neuroektodermalen Tumoren (90 klassische

Medulloblastome, 42 desmoplastische Medulloblastome, zwei Medullomyoblastome und elf Medulloblastomzelllinien) auf *SUFUH*-Mutationen untersucht. In keinem der analysierten Tumoren, einschließlich der desmoplastischen Medulloblastome, konnte eine Mutation im *SUFUH*-Gen nachgewiesen werden.

In der eigenen Untersuchung wurden 14 Medulloblastome und 32 Basalzellkarzinome auf genetische Veränderungen in den zwölf Exons des *SUFUH*-Gens überprüft. Außer dem Nachweis eines Polymorphismus im Exon 11 in sieben Medulloblastomen und drei Basalzellkarzinomen, konnten im Exon 4 eines Basalzellkarzinoms eine stille Mutation (c.591C>T: F197F) und eine Missense-Mutation im gleichen Exon eines zweiten Basalzellkarzinoms (c.-560C>T: P187L) identifiziert werden. Um sicherzugehen, dass die untersuchten Basalzellkarzinome keine Deletionen im Bereich des *SUFUH*-Gens tragen, wurden LOH-Analysen mittels Mikrosatelliten-PCR durchgeführt, die in keinem der 32 Fälle einen Hinweis auf derartige genetische Veränderungen lieferten.

Auch die eigene Untersuchung konnte, wie die Studie von Koch *et al.* (2004), die von Taylor *et al.* (2002) aufgestellte These einer signifikanten Relevanz von *SUFUH*-Mutationen in der Entstehung von Medulloblastomen nicht bestätigen. Wie ist diese Diskrepanz zu erklären? Die entdeckten genetischen Alterationen in der Studie von Taylor *et al.* (2002) betrafen allesamt Tumoren vom desmoplastischen Subtyp der Medulloblastome. Die Tatsache, dass die eigene Untersuchung keine Mutation im *SUFUH*-Gen dokumentiert, könnte somit eventuell auf die relativ geringe Anzahl an desmoplastischen Medulloblastomen zurückzuführen sein. Betrachtet man jedoch die Studie von Koch *et al.* (2004), deren Tumorkollektiv 42 Medulloblastome vom desmoplastischen Typ (29% der untersuchten Tumoren) umfasste, verliert diese Vermutung an Halt, denn in keinem dieser Tumoren konnten die Forscher eine Mutation im *SUFUH*-Gen nachweisen. Da die absolute Anzahl an desmoplastischen Tumoren in dieser Untersuchung sogar die Gesamtzahl aller von Taylor *et al.* (2002) analysierten Tumoren übertrifft, ist es eher unwahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Ergebnisse der eigenen Untersuchung und der von Taylor *et al.* (2002) durch eine anteilmäßige Erhöhung der desmoplastischen Tumoren hätten äquilibriert werden können. Unklar bleibt jedoch weiterhin, was der dissonanten Prävalenz an *SUFUH*-Mutation in den drei Studien zugrunde liegt. Eine kausale Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedliche Behandlungsmethoden der Tumorproben ist nicht vollkommen auszuschließen, es gibt jedoch auch keinen direkten Anhalt hierfür. Bekannt ist, dass die Formalinfixierung von Gewebeproben zu einer erhöhten Frequenz an falsch-positiven Mutationen in der molekulargenetischen Analyse der dazugehörigen DNA führt. In der

Materialbeschreibung der Publikation von Taylor *et al.* (2002) wird zwar erwähnt, dass ein Teil der verwendeten Proben durch direktes Einfrieren nach der Gewebentnahme konserviert wurde, jedoch stammten weitere Proben aus externen Tumorbanks, deren Behandlungsmethoden nicht aus den Erläuterungen von Taylor *et al.* (2002) hervorgeht. Welche Konservierungsmethode bei den Fällen benutzt worden, die letztendlich die Mutationen aufwiesen, ist ebenfalls nicht zu eruieren. In der eigenen Untersuchung wurden ausschließlich tiefgefrorene Gewebeproben eingesetzt.

Ein möglicher Erklärungsansatz wäre die unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Techniken der Mutationsdetektion. Während Taylor *et al.* (2002) das *SUFUH*-Gen in allen 46 Tumoren komplett sequenzierten, wurde in der eigenen Untersuchung und in der von Koch *et al.* (2004) vorerst eine Selektion durch SSCP-Analyse durchgeführt und anschließend lediglich die auffälligen Tumorproben sequenziert. Zweifelsohne ist das von Taylor *et al.* verwendete Verfahren mit einer höheren Sensitivität behaftet, zumal durch SSCP-Analyse unter optimalen Bedingungen maximal 90 % der tatsächlich vorhandenen Veränderungen der Basensequenzen detektiert werden können (s.u.). Um diesen methodischen Nachteil zu neutralisieren, führten Koch *et al.* (2004) jedoch eine Sequenzierung der vier DNA-Fragmente, die in der Studie von Taylor *et al.* (2002) die entdeckten Mutationen trugen, in allen desmoplastischen Medulloblastomen ihres Tumorkollektives durch. Auch diese Untersuchung blieb negativ, so dass mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit keine *SUFUH*-Mutationen in diesen Tumoren vorhanden waren. Hierbei sollte jedoch erwähnt werden, dass die von Taylor *et al.* (2002) gefundenen Mutationen sich scheinbar zufällig im *SUFUH*-Gen verteilten und nicht in einem Mutations-*Hot Spot* kumulierten, so dass eventuelle Mutationen in den Tumoren von Koch *et al.* (2004) nicht unbedingt in den gleichen Genfragmenten wie bei Taylor *et al.* (2002) liegen müssen. Dennoch scheint es unwahrscheinlich, dass die Diskrepanz der Ergebnisse Resultat unterschiedlicher Untersuchungsmethoden ist.

Koch *et al.* (2004) äußern weiterhin die Vermutung, dass den gegensätzlichen Ergebnissen ein voneinander abweichender genetischer Hintergrund durch die Herkunft aus unterschiedlichen Populationen zugrunde liegen könnte, zumal drei der vier von Taylor *et al.* (2002) entdeckten Mutationen als Keimbahnmutationen charakterisiert wurden. Letztendlich bleibt die Kausalität der unterschiedlichen Prävalenz von *SUFUH*-Mutationen in den drei Untersuchungen unklar.

In den untersuchten sporadischen Basalzellkarzinomen konnte in der eigenen Untersuchung eine Missense-Mutation (c.-560 C>T, BCC 45) identifiziert werden. Definitionsgemäß führt eine solche genetische Alteration zu einer Veränderung des Basentriplets, die einen

Aminosäurenaustausch im dazugehörigen Protein zufolge hat. In diesem Fall führt die Mutation zu einem Austausch der Aminosäure Prolin durch Leucin. Prolin wird die Eigenschaft eines „Helix-Brechers“ zugeschrieben. Es bewirkt in der Peptidkette einen haarnadelförmigen Knick, der die Ausbildung einer helikalen Struktur behindert. Ein Austausch von Prolin gegen Leucin könnte somit zu einer Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins führen und somit funktionell beeinträchtigen. Das betroffene Prolin-Molekül (P187L) ist auf der A-Kette des Sufuh-Proteins in einer beta-Faltblatt-Struktur lokalisiert. Somit ist es durchaus denkbar, dass durch den Verlust der „helix-brechenden“ Einflüsse des Prolins diese Struktur eine andere Morphologie, wie zum Beispiel die einer alpha-Helixstruktur, annimmt. Um diese Vermutung jedoch experimentell zu verifizieren, wären weitere Untersuchungen notwendig.

Insgesamt ist die Prävalenz von *SUFUH*-Mutationen geringer als die von *PTCH*- und *SMOH*-Mutationen. Die in der eigenen Untersuchung analysierten Tumoren wurden ebenfalls auf genetische Veränderungen in diesen beiden Genen überprüft. Zwei Drittel der Basalzellkarzinome dieses Tumorkollektives trugen Mutationen im *PTCH*-Gen und in 10 % der Fälle konnten *SMOH*-Mutationen nachgewiesen werden (Reifenberger *et al.* 2005). In der DNA des Basalzellkarzinoms BCC45, die in der eigenen Untersuchung die *SUFUH*-Missense-Mutation c.560C>T aufwies, konnten ebenfalls Mutationen (c.528-529AC>CT: L176L, Q177X) im *PTCH*-Gen und ein *LOH* auf Chromosom 9q nachgewiesen werden. Der Genlocus 10q (*SUFUH*) wies in einer *LOH*-Analyse in diesem Tumor kein Anzeichen eines Allelverlustes auf, so dass zumindest von einer Restfunktion des Proteins ausgegangen werden kann. Um zu demonstrieren, welche Konsequenz diese genetischen Alterationen nun tatsächlich hatten, wären weitere Untersuchungen notwendig.

Fest steht jedoch, dass es sich bei dem identifizierten Basenaustausch von Cytosin durch Thymin um eine vermutlich UV-induzierte Mutation handelt, da sich diese Art der genetischen Alteration häufig unter Bestrahlung mit UV-Licht etabliert. Dies stünde im Einklang mit der Ätiopathogenese des Basalzellkarzinom, bei dem UV-Bestrahlung den wichtigsten Risikofaktor darstellt (Hogan *et al.* 1989).

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass *SUFUH*-Mutationen in der Kanzerogenese von Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen nur von geringer Bedeutung sind.

## 12.1 Eignung der SSCP-Analyse als Sichtungsverfahren von Mutationen in Tumoren

Die hier zur Vorselektion für das aufwendigere Sequenzierungsverfahren verwendete SSCP-Analyse ist eine häufig kritisierte Methode. Vielfach wurde ihre Sensitivität in der Mutationsdetektion als nicht ausreichend deklariert. Sicherlich ist diese Kritik berechtigt, zumal es möglich ist, durch das SSCP-Verfahren eine geringe Anzahl von Mutationen im Rahmen eines Screeningprozesses zu übersehen. Trotzdem etablierte sich dieses Verfahren als eine insbesondere in Forschungsprojekten häufig verwendete Methode der Mutationsdetektion. Dies ist insbesondere durch die relativ einfache Durchführbarkeit erklärbar, die eine Untersuchung eines großen Kollektivs von Tumoren mit vergleichsweise geringem Zeitaufwand ermöglicht. Schließlich konnte demonstriert werden, dass durch Optimierung der Versuchsbedingungen (Austestung verschiedener Bedingungen, Fragmentlänge <200bp) eine Sensitivität von circa 90% erreicht werden kann (Hayashi und Yandell 1993). Ist das Ziel der Analyse die Relevanz einer Mutation für die Kanzerogenese einer Tumorentität zu untersuchen, kann diese Sensitivität bei Verwendung eines relativ großen Probenkollektivs als ausreichend angesehen werden, zumal nicht der Nachweis einer einzelnen Mutation, sondern die Häufigkeit des Auftretens von genetischen Veränderung im Bereich des Gens hierfür von entscheidender Bedeutung ist. In Rahmen der eigenen Untersuchung wurde, um sicherzugehen, dass keine Mutation auf dem Exon 2 von *KLF6* durch die SSCP-Methode übergangen wurde, dieses Exon in allen untersuchten Tumoren komplett sequenziert (s.u.). Außer den schon in der SSCP-Analyse entdeckten Polymorphismen ergab diese Untersuchung keine weiteren genetischen Veränderungen. Zukünftig wird dieses Verfahren jedoch sicherlich durch effektivere Techniken, wie zum Beispiel DNA-Chip-Methoden, abgelöst.

## 13 *KLF6* – kruppel like factor 6

### 13.1 *KLF6* – Konkurrenz zu p53?

Die Vermutung von Hanahan und Weinberg (2000), dass molekulargenetische Veränderungen, die unkontrollierte Proliferation initiieren, auf wenige zentrale intrazelluläre Signalwege konvergieren, findet Bestätigung in der Annahme von Tumorsuppressoreigenschaften für den Transkriptionsfaktor *KLF6*. *KLF6* (syn. ZF9/CPBP) ist Teil der Kruppel like factor (KLF)-Familie von Transkriptionsfaktoren, deren Nomenklatur auf einer Homologie des zuerst entdeckten Mitgliedes *KLF-1* zu dem *Drosophila* Kruppel Protein basiert. Die molekulare Morphologie der 16 Mitglieder dieser Gruppe richtet sich stets nach dem gleichen Schema. Alle verfügen über eine nahezu identische carboxyterminale DNA-Bindungsdomäne, die aus einer dreifachen Zink-Finger-Struktur besteht. Hingegen zeigt die aminoternale Aktivierungsdomäne eine breite intermolekulare Varianz. Dementsprechend variabel sind folglich auch die Transkriptionsziele und deren induzierte Genexpression (Narla *et al.* 2003). Die KLF-Familie reguliert multiple Ereignisse während der Proliferation und Differenzierung eines Gewebsverbandes wie zum Beispiel die wachstumsbezogene Signaltransduktion, Apoptose, Zellentwicklung und Angiogenese (Narla *et al.* 2003).

*KLF6* beeinflusst die Zellproliferation durch Interaktion mit dem cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21/Waf1/CIP, dessen konsekutive Hochregulation zur Inhibition der cyclinabhängigen Phosphorylierung des Rb-Proteins führt (Narla *et al.* 2001). Dies hat zur Folge, dass selbiges im an den Transkriptionsfaktor E2F gebundenen Zustand verbleibt und dieser somit seine Fähigkeit verliert in den Zellkern zu diffundieren, um dort die Expression von Genen, die den Zellzyklus aktivieren, zu induzieren. Innerhalb dieser Kaskade befindet sich eine Schnittstelle zum Signalweg des bekannten Tumorsuppressorgens p53, dessen Genprodukt unter anderem durch Kontrolle von p21 seine Funktion als Wächtermolekül ausübt. Diese Tatsache unterstützt die These, dass im *KLF6*-Molekül ein zu p53 alternatives Funktionsprotein entdeckt wurde (Narla *et al.* 2003), dessen Rolle für die Tumorsuppression, gemessen an derer des p53, von außerordentlicher Bedeutung sein könnte.

### 13.2 Die Rolle als Tumorsuppressorgen

Ein Funktionsverlust von KLF6 durch genetische Alteration kann theoretisch einen Expressionsverlust von *p21* zur Folge haben. Resultat wäre folglich eine unkontrollierte Rb-Phosphorylierung und durch die übermäßige Freigabe von E2F eine Stimulation der Progression im Zellzyklus. Narla *et al.* (2001) konnten durch funktionelle Studien den Beweis erbringen, dass Wildtyp KLF6 *p21* hochreguliert und somit die Zellproliferation hemmt, jedoch mutiertes KLF6 hingegen diese Funktion nicht mehr erfüllen kann. Weiterhin entdeckten sie Mutationen im Exon 2 von *KLF6* in 55 % (18 von 33) der von ihnen untersuchten Prostatakarzinome. Der dem anderen Allel zugehörige Genlocus von *KLF6* erwies sich in 77 % der Fälle als deletiert. So nahmen Narla *et al.* (2001) an, ein für die Entstehung von Prostatakarzinomen bedeutsames Tumorsuppressorgen identifiziert zu haben. Aufgrund des parallelen Mechanismus zu *p53* und der Tatsache, dass *p53* in Prostatakarzinomen selten Veränderungen aufweist, schlossen sie eventuell ein *p53*-Äquivalent in Tumoren entdeckt zu haben, die keine Mutation dieses Gens tragen. Weitere Studien mit dem Ziel der Verifizierung dieser These konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Chen *et al.* (2003) fanden in ihrem Tumorkollektiv von 96 Prostatakarzinomen nur 14 Mutationen (15 %). Mühlbauer *et al.* (2003) konnten sogar keine einzige Mutation in den untersuchten Tumoren nachweisen. Die anfängliche Euphorie über die Entdeckung eines für die Entstehung von Prostatakrebs entscheidenden Tumorsuppressorgens war somit gedämpft. Jedoch konnten weitere Studien *KLF6*-Veränderungen auch in anderen Tumorentitäten wie dem Lungen-, dem Ösophagus- und dem nasopharyngealen Karzinom aufdecken (Narla *et al.* 2003).

Die Lokalisation des Gens auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 schließlich weckte das Interesse der Hirntumorforschung. Da diese Region in Glioblastomen und Meningeomen häufig deletiert ist und das dazugehörige Tumorsuppressorgen bislang nicht identifiziert wurde, ist *KLF6* als potentieller Kandidat für diese Funktion anzusehen. In einer umfangreichen Studie postulierten Jeng und Hsu (2003) *KLF6* als relevantes Tumorsuppressorgen in der Entstehung von astrozytären Gliomen. Die Überprüfung dieser These war Teil der eigenen Untersuchung.

### 13.3 Diskussion der Ergebnisse

Die eigene Untersuchung konnte keine genetische Mutation von *KLF6* in den 47 untersuchten Meningeomen identifizieren, die relevant für die Entstehung der Tumoren, respektive dieser Tumorentität, sein könnte. Lediglich ein genetischer Polymorphismus (c.-4 C>A) konnte in drei Tumoren des Versuchskollektives nachgewiesen werden. Auch die anschließende Analyse von 42 Glioblastomen ergab, außer der zusätzlichen Entdeckung des gleichen Polymorphismus in einem der Glioblastome und eines weiteren Polymorphismus (c.603G>A) in einem anderen Glioblastom, keine weiteren genetischen Alterationen (Köhler *et al.* 2004). Zusätzlich wurde das als Mutations-*HotSpot* identifizierte Exon 2 in allen Tumoren des Kollektives unserer Arbeitsgruppe sequenziert (Köhler *et al.* 2004). Auch diese Untersuchung bestätigte lediglich die aus den vorherigen Analysen bekannten Polymorphismen und lieferte somit ebenfalls keine Hinweise auf eine pathoätiologische Beteiligung von *KLF6* an der Entstehung von Meningeomen und Glioblastomen.

Die eigenen Expressionsanalysen von *KLF6* hingegen zeigten eine reduzierte Expression des Gens in den untersuchten meningealen Tumoren. 17 der 31 Meningeome (55 %) wiesen eine signifikant herunterregulierte Expression ( $\leq 0,5$ ) im Vergleich zu normalem leptomeningealen Gewebe auf. Die Methylierungsanalyse der CpG-Insel im 5'-Bereich von *KLF6* macht eine kausale Bedeutung der Promotormethylierung für obiges Phänomen unwahrscheinlich. Bei der Regulation der Genexpression in eukaryotischen Zellen handelt es sich um einen komplexen Vorgang und es existieren zahlreiche Mechanismen, die die Expression diverser Gene direkt kontrollieren aber auch nur indirekt beeinflussen. Die epigenetische Methylierung von Promotorsequenzen ist somit nur eine Möglichkeit, die der reduzierten Expression zugrunde liegen könnte. Letztendlich muss dieses Phänomen auch nicht unbedingt auf einer direkten Beeinflussung der genomischen Strukturen von *KLF6* beruhen, sondern kann Folge einer Kaskade anderer alterierter Gene oder derer dysregulierten Expression sein. Um schließlich die Frage der Kausalität des entdeckten Expressionsverlustes von *KLF6* und dessen Bedeutung für die Tumorgenese von Meningeomen zu klären, wären weitere umfangreiche Untersuchungen notwendig.

Einige Studien beschäftigten sich in jüngster Zeit mit der Beteiligung von *KLF6* an der Entstehung von Tumoren. Hierbei konnte in diversen Tumorentitäten, zum Beispiel dem Prostatakarzinom, dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom und dem Kolonkarzinom, eine reduzierte Expression dieses Gens nachgewiesen werden (Chen *et al.* 2003, Ito *et al.* 2004 und

Reeves *et al.* 2004). Insbesondere in den letzten Jahren geriet das Gen in den Fokus der Hirntumorforschung. Vorreiter einer Serie von Publikationen waren Jeng und Hsu (2003), die in einer relativ umfangreichen Studie 155 Gliome auf *KLF6*-Mutationen untersuchten. Von den 140 astrozytären Gliomen wiesen 13 (9,3 %) eine Mutation im Exon 2 auf. Das untersuchte Tumorkollektiv schloss 76 Glioblastome mit ein, von denen 9 Tumoren (11,8 %) eine Mutation in diesem Bereich trugen. Kimmelman *et al.* (2004) wiesen neben einer verminderten Expression von *KLF6* in Glioblastomen auch die Funktion von *KLF6* als Inhibitor einer onkogeninduzierten, unkontrollierten Proliferation in Zellen dieser Tumorentität nach und lieferten somit den ersten Beweis für eine Tumorsuppressoreigenschaft. Es folgten drei Publikation, unter anderem die eigene, die sich mit der Bedeutung von *KLF6*-Alterationen in astrozytären Tumoren und Meningeomen beschäftigten (Köhler *et al.* 2004, Koivisto *et al.* 2004, Montanini *et al.* 2004). Alle drei Studien konnten die Vermutung von Jeng und Hsu, dass *KLF6*-Mutationen einen relevanten Beitrag zur Entstehung von astrozytären Tumoren leisten, nicht bestätigen. Ein möglicher Aspekt, der dieser Diskrepanz zugrunde liegen könnte, ist die Verwendung von formalinfixiertem, paraffineingebetteten Gewebe in den Analysen von Jeng und Hsu. Obwohl diese Methode der Gewebekonservierung in der molekulargenetischen Forschung routinemäßig durchgeführt wird, konnten verschiedene Studien zeigen, dass diese Art der Probenbehandlung zu einer im Vergleich zu unbehandeltem Gewebe (tiefgefrorenes Gewebe, wie es in der eigenen Untersuchung verwendet wurde) 3-4fach erhöhten Rate von falsch-positiven Mutationen führt (Quach *et al.* 2004). Es wird vermutet, dass eine beträchtliche Anzahl der bis dato in der Genforschung entdeckten Mutationen auf diese Art der Gewebefixierung zurückzuführen und somit nur ein falsch-positives methodisches Artefakt sind (Williams *et al.* 1999). In der eigenen Untersuchung wurde ausschließlich unmittelbar nach der Entnahme auf -80°C gefrorenes Gewebe verwendet. Diese Art der Konservierung scheint nicht mit dem häufigeren Auftreten von falsch-positiven Mutationen assoziiert zu sein. Die Tatsache, dass andere Studien, die sich mit der Verifizierung der Forschungsergebnisse von Jeng und Hsu (2003) beschäftigten, für ihre Analysen auch gefrorenes Tumorgewebe einsetzten und, analog zu der eigenen Untersuchung, ebenfalls keine Mutationen entdeckten, bestätigt diese Vermutung.

Die Analyse von *KLF6* in Prostatakarzinomen ergab ein ähnliches Phänomen. Die oben erwähnte Studie von Narla *et al.* (2001) legte die Inzidenz von *KLF6*-Mutationen in diesen Tumoren auf 55 % (18 von 33 der untersuchten Tumoren) fest. Analog den Befunden in Glioblastomen konnten jedoch die zwei anschließende Untersuchungen durch Chen *et al.*

(2003) und Mühlbauer *et al.* (2003) diese Häufigkeit fragwürdig erscheinen lassen, zumal erstere in nur 15 % und letztere sogar keine Mutationen in den untersuchten 96 bzw. 32 Prostatatumoren nachweisen konnten. Eine Begründung dieser variablen Inzidenz durch unterschiedliche Konservierungsmethodik lässt sich diesmal jedoch nicht nachvollziehen, da alle Autoren formalinfixiertes Gewebe in ihren Studien verwendet haben.

Letztendlich lässt sich schlussfolgern, dass die eigene Arbeit eine entscheidende Beteiligung von *KLF6* an der Pathogenese von Glioblastomen nicht bestätigen kann. Somit ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei *KLF6* um das relevante Tumorsuppressorgen auf dem Chromosomarm 10p handelt. Dies wird unterstützt durch die Einschränkung des interessanten Bereiches, der mit großer Wahrscheinlichkeit dieses Tumorsuppressorgen beherbergt, auf Genabschnitte von 10p, die *KLF6* nicht mit einschließen. So identifizierten Ichimura *et al.* (1998) in einer Deletionskartierung von Chromosom 10p die Regionen 10p15.3 (D10S549 bis D10S559) und 10p15.1-p14 (D10S17113 bis D10S189) als solche interessanten Genloci und grenzen somit *KLF6*, das auf Chromosom 10p15.2 lokalisiert ist, aus dem Kreise der Tumorsuppressorkandidatengene aus.

Auch in den untersuchten Meningeomen konnte keine Relevanz von *KLF6*-Mutationen für die Entstehung dieser Tumoren nachgewiesen werden. Lediglich eine reduzierte Expression in einem Großteil der untersuchten Tumoren wurde durch die eigene Versuchsreihe demonstriert. Die Bedeutung und Kausalität dieser Veränderung bleiben jedoch unklar. DNA-Hypermethylierung konnte als Ursache für diese Expressionsverluste nicht bestätigt werden.

## **14 Identifizierung neuer Tumorsuppressor-Kandidatengene durch eine kombinierte Demethylierungs-/globale Expressionsanalyse in Gliom-Zelllinien**

Die Demethylierung von Zelllinien in Kombination mit globalen Mikroarray-Expressionsanalysen bietet einen viel versprechenden Ansatz zur Identifizierung von Tumorsuppressor-Kandidatengen, die durch Promotorhypermethylierung abgeschaltet wurden (Miller *et al.* 2002). Vergleicht man die Expression von Genen in den unbehandelten Zelllinien mit der in behandelten Zellen fallen Gene auf, die nach 5-Aza-dC/TSA-Behandlung stärker exprimiert werden.

Die Behandlung der Zelllinien ist ein mehrtägiger Prozess. Trotz der Bemühung einer standardisierten, möglichst exakten Gleichbehandlung aller Zellreihen, sind minimale Abweichungen in einem *in vitro*-System nicht vollkommen auszuschließen. Da die Regulation der Expression von Genen einem höchstsensiblen Geflecht ineinander greifender Reaktionen auf externe und interne Ereignisse unterliegt, können selbst minimale Abweichungen in der Behandlung zu ungewollten Schwankungen in der Genexpression führen. Um dieses Versuchsartefakt zu minimieren, wurden hier fünf verschiedene Zelllinien mit 5-Aza-dC/TSA behandelt und nur solche Gene weiteren molekulargenetischen Untersuchungen unterzogen, die in allen fünf Zelllinienpaaren signifikant differentiell exprimiert wurden.

Ob eine Promotorhypermethylierung die tatsächliche Ursache für den Expressionsverlust eines Gens ist, muss aber erst durch epigenetische Untersuchungen geklärt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass Veränderungen im Expressionsmuster zwischen behandelten und unbehandelten Status nicht ausschließlich auf die demethylierende Wirkung der Reagenzien zurückzuführen, sondern eventuell Resultat einer unerwünschten Nebenwirkung sind.

Wurde die verstärkte Expression des Gens tatsächlich durch Demethylierung herbeigeführt, bleibt weiterhin die Frage, ob dieses Gen primär durch Demethylierung seines Promotorbereichs heraufreguliert wurde, oder ob dieser Expressionsanstieg nicht Konsequenz einer durch Demethylierung eines anderen Gens induzierten Kaskade ist. Bis zu 60 % der nach 5-Aza-dC/TSA-Behandlung induzierten Gene zeigen tatsächlich keine Methylierung der 5'-CpG-Inseln (Karpf und Jones 2002). Daher stellt eine 5-Aza-dC/TSA-Behandlung in Kombination mit einer globalen Mikroarray-Expressionsanalyse eher eine Screening-Untersuchung mit in Bezug auf die DNA-Methylierung geringer Spezifität (ca.40 %) dar. Sie

liefert aber Hinweise auf mögliche Tumorsuppressor-Kandidatengene, die dann mit molekulargenetischen Methoden weiter untersucht werden.

Mit Hilfe der kombinierten Demethylierungs- und Expressions-Analyse konnten in dieser Arbeit 25 Gene auf Chromosom 10 identifiziert werden, deren Expression in Gliomzelllinien nach 5-Aza-dC/TSA-Behandlung signifikant anstieg (Expressionunterschied  $FC \geq 1,5$ ). Exemplarisch wurde die differentielle Expression von vier Genen (*RSU1*, *INPP5A*, *DUSP5* und *OAT*) durch eine unabhängige Methode überprüft und verifiziert.

Das *RSU1*-Gen auf 10p13 kodiert für ein das Ras-Molekül inhibierendes Protein, welchem bereits potentielle Tumorsuppressoreigenschaften in Glioblastom-Zelllinien und Brustkrebszellen zugeschrieben wurde (Chunduru et al. 2002, Vasaturo et al. 2000). Über die Bedeutung von *INPP5A* in der Tumorentstehung ist bislang wenig bekannt. Es fungiert in der physiologischen Körperzelle als Inositolpolyphosphat-5-Phosphataseenzym. Die Enzyme dieser Familie katalysieren die Hydrolyse von Phosphatidylinositolen, die Bestandteile intrazellulärer Signalkaskaden sind (Mitchell *et al.* 1994). Um die Bedeutung einer Fehlfunktion des Genproduktes für den Zellzyklus und die Proliferation von Glioblastomzelllinien zu analysieren, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Das Genprodukt des *DUSP5*-Gens auf 10q25 (*Dual-specificity phosphatase 5*) ist ein Enzym, das zusammen mit p53 mitogen- oder stressaktivierte Proteinkinasen inaktiviert. Dieser Mechanismus ermöglicht als direkter Ansatzpunkt des p53-Signalweges eine Inhibition der Progression im Zellzyklus. Ein Ausfall des Gens, beispielsweise durch Promotorhypermethylierung, könnte den Verlust dieser Kontrollfunktion zur Folge haben. Das theoretische Tumorsuppressorpotential konnte bislang in verschiedenen menschlichen Krebszellen nachgewiesen werden, bei denen eine Überexpression von *DUSP5* zu einer Hemmung der Zellproliferation führte (Ueda et al. 2003). *OAT* (Ornithinaminotransferase; 10q26) kodiert für eine Aminotransferase, die eine wichtige chemische Reaktion der Aminosäure Ornithin katalysiert. Unter Abwesenheit des Enzyms akkumuliert diese Aminosäure und führt zu der hereditären Atrophie von Choroidea und Retina, einer Augenerkrankung mit konsekutiver Nachtblindheit und progressivem Visusverlust (Simell und Takki 1973).

Die hier identifizierten Gene stellen interessante Tumorsuppressor-Kandidatengene da, deren Rolle bei der Pathogenese der Glioblastome mit molekulargenetischen, biochemischen und *in vitro*-Untersuchungen weiter geklärt werden muss. Neben der Suche nach Tumorsuppressorgenen ist eine derartige Versuchsanordnung eine Grundlage zur Identifizierung von tumorspezifischen Methylierungsmustern, die für die Diagnostik und

Therapie (z.B. für die Tumorthherapie mit demethylierenden Agenzien) von außerordentlicher Bedeutung sein können. Die Existenz eines solchen tumorspezifischen Methylierungsmusters konnte anhand von Zelllinien für verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen werden, wobei gleichzeitig gezeigt wurde, dass die Muster der Primärtumoren und Zelllinien weitgehend übereinstimmen (Paz et al. 2003). Derartige epigenetische Marker finden zunehmend Akzeptanz in der molekularen Tumordiagnostik und befinden sich aufgrund der allmählichen Simplifizierung der Nachweismethoden auf dem mühsamen Wege von wissenschaftlicher Fiktion zu klinischer Routine (Esteller *et al.* 2000). Die resultierende Präzisierung der Diagnose ist gerade in der Krebstherapie von herausragender Bedeutung, zumal die individuelle Festlegung der Tumorentität und ihrer Subgruppen die nachfolgende Therapie entscheidend beeinflusst.

## E Literaturverzeichnis

- Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 15;90(24):11995-9.
- Bailey P, Cushing H: A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis. Philadelphia: JB Lippincott, 1926
- Bayani J, Zielenska M, Marrano P, Kwan Ng Y, Taylor MD, Jay V, Rutka JT, Squire JA. Molecular cytogenetic analysis of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping. *J Neurosurg*. 2000 Sep;93(3):437-48.
- Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, Beachy PA. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science*. 2002 Aug 30;297(5586):1559-61.
- Bieker JJ. Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34355-8. Epub 2001 Jul 6.
- Bigner SH, Mark J, Friedman HS, Biegel JA, Bigner DD. Structural chromosomal abnormalities in human medulloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1988 Jan;30(1):91-101.
- Bigner SH, McLendon RE, Fuchs H, McKeever PE, Friedman HS. Chromosomal characteristics of childhood brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997 Sep;97(2):125-34.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986 ; 321: 209-13.
- Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991 Jan 25;64(2):235-48. Review.
- Bogler O, Huang HJ, Cavenee WK. Loss of wild-type p53 bestows a growth advantage on primary cortical astrocytes and facilitates their in vitro transformation. *Cancer Res*. 1995 Jul 1;55(13):2746-51.
- Boström J, Cobbers JM, Wolter M, Tabatabai G, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G. Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res*. 1998 Jan 1;58(1):29-33.
- Büsches R, Weber RG, Actor B, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G. Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol*. 1999 Jul;9(3):435-42; discussion 432-3.
- 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 Oct 7;90(19):1473-9.
- Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell*. 1991 Jan 25;64(2):281-302. Review.
- Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature*. 1999 Feb 18;397(6720):617-21.
- Chen C, Hyytinen ER, Sun X, Helin HJ, Koivisto PA, Frierson HF Jr, Vessella RL, Dong JT. Deletion, mutation, and loss of expression of KLF6 in human prostate cancer. *Am J Pathol*. 2003 Apr;162(4):1349-54.
- Chunduru S, Kawami H, Gullick R, Monacci WJ, Dougherty G, Cutler ML. Identification of an alternatively spliced RNA for the Ras suppressor RSU-1 in human gliomas. *J Neurooncol*. 2002 Dec;60(3):201-11.
- Collins VP. Brain tumours: classification and genes, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75(Suppl II):ii2-ii11
- Collins VP. Progression as exemplified by human astrocytic tumors. *Semin Cancer Biol*. 1999 Aug;9(4):267-76.

- Costello JF, Plass C, Arap W, Chapman VM, Held WA, Berger MS, Su Huang HJ, Cavenee WK. Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res.* 1997 Apr 1;57(7):1250-4.
- Dahmen RP, Koch A, Denkhau D, Tonn JC, Sorensen N, Berthold F, Behrens J, Birchmeier W, Wiestler OD, Pietsch T. Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7039-43.
- Dumanski JP, Carlbom E, Collin VP, Nordenskjold M. Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:9275-79
- Eberhart CG, Tihan T, Burger PC. Nuclear localization and mutation of beta-catenin in medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000 Apr;59(4):333-7.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 8;95(25):14863-8.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000 Nov 9;343(19):1350-4. Erratum in: *N Engl J Med* 2000 Dec 7;343(23):1740.
- Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol.* 1999 Aug;155(2):387-94.
- Fults D, Petronio J, Noblett BD, Pedone CA. Chromosome 11p15 deletions in human malignant astrocytomas and primitive neuroectodermal tumors. *Genomics.* 1992 Nov;14(3):799-801.
- Gailani MR, Stahle-Backdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, Unden 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 Sep;14(1):78-81.
- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* 1983 Oct 11;11(19):6883-94.
- Greger V, Debus N, Lohmann D, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B. Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Hum Genet.* 1994 Nov;94(5):491-6.
- Gusella JE, Ramesh V, MacCollin M, Jacoby LB. Merlin: The neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1999;1423:M29-M36
- Halatsch ME, Schmidt U, Behnke-Mursch J, Unterberg A, Wirtz CR. Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treat Rev.* 2006 Apr;32(2):74-89.
- Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1993. 82:1820-28
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70. Review.
- Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat.* 1993;2(5):338-46. Review.
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Oct 11;91(21):9700-4.
- Hogan DJ, To T, Gran L, Wong D, Lane PR. Risk factors for basal cell carcinoma. *Int J Dermatol.* 1989 Nov;28(9):591-4.
- Holland, E.C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet.* 2001 Feb;2(2):120-9.

- Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP. Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res.* 2000 Jan 15;60(2):417-24.
- Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998 May;22(1):9-15.
- Ishii S. Costal-2: a scaffold for kinases mediates Hedgehog signaling. *Dev Cell.* 2005 Feb;8(2):140-1.
- Ito G, Uchiyama M, Kondo M, Mori S, Usami N, Maeda O, Kawabe T, Hasegawa Y, Shimokata K, Sekido Y. Kruppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3838-43.
- James CD, Carlbom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK. Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res.* 1988 Oct 1;48(19):5546-51.
- Jeng YM, Hsu HC. KLF6, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer.* 2003 Jul 10;105(5):625-9.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002 Jun;3(6):415-28. Review.
- Karpf AR, Jones DA. Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene.* 2002 Aug 12;21(35):5496-503. Review.
- Kimmelman AC, Qiao RF, Narla G, Banno A, Lau N, Bos PD, Nunez Rodriguez N, Liang BC, Guha A, Martignetti JA, Friedman SL, Chan AM. Suppression of glioblastoma tumorigenicity by the Kruppel-like transcription factor KLF6. *Oncogene.* 2004 Jun 24;23(29):5077-83.
- Kisseljova NP, Kissel'ov FL. DNA demethylation and carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc).* 2005 Jul;70(7):743-52. Review.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 Mar;61(3):215-25; discussion 226-9. Review.
- Knippers R. *Molekulare Genetik.* 8. Auflage. Georg Thieme Verlag. 2001
- Knobbe CB, Reifenberger G. Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastoma. *Brain Pathol* 2003;13:507-18
- Knobbe CB, Reifenberger J, Reifenberger G. Mutation analysis of the Ras pathway genes NRAS, HRAS, KRAS and BRAF in glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl).* 2004 Dec;108(6):467-70. Epub 2004 Oct 28.
- Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122(3):135-40. Review.
- Koch A, Waha A, Hartmann W, Milde U, Goodyer CG, Sorensen N, Berthold F, Digon-Sontgerath B, Kratzschmar J, Wiestler OD, Pietsch T. No evidence for mutations or altered expression of the Suppressor of Fused gene (SUFU) in primitive neuroectodermal tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2004 Oct;30(5):532-9.
- Köhler B, Wolter M, Blaschke B, Reifenberger G. Absence of mutations in the putative tumor suppressor gene KLF6 in glioblastomas and meningiomas. *Int J Cancer.* 2004 Sep 10;111(4):644-5.
- Koivisto PA, Zhang X, Sallinen SL, Sallinen P, Helin HJ, Dong JT, Van Meir EG, Haapasalo H, Hyytinen ER. Absence of KLF6 gene mutations in human astrocytic tumors and cell lines. *Int J Cancer.* 2004 Sep 10;111(4):642-3.
- Krishnan V, Elberg G, Tsai MJ, Tsai SY. Identification of a novel sonic hedgehog response element in the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II promoter. *Mol Endocrinol.* 1997 Sep;11(10):1458-66.

- Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer*, Volume 3, April 2003, 253-266
- Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet*. 1996;30:441-64. Review.
- Lam CW, Leung CY, Lee KC, Xie J, Lo FM, Au TS, Tong SF, Poon MK, Chan LY, Luk NM. Novel mutations in the PATCHED gene in basal cell nevus syndrome. *Mol Genet Metab*. 2002 May;76(1):57-61.
- Lamszus K. Meningioma Pathology, Genetics and Biology, *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:275-286
- Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*. 1983 Aug 18-24;304(5927):596-602.
- Lasko D, Cavenee W, Nordenskjold M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet*. 1991;25:281-314. Review.
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2002 Sep;3(9):662-73. Review.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992 Jun 12;69(6):915-26.
- Liang BC, Ross DA, Greenberg HS, Meltzer PS, Trent JM. Evidence of allelic imbalance of chromosome 6 in human astrocytomas. *Neurology*. 1994 Mar;44(3 Pt 1):533-6.
- Lusis EA, Watson MA, Chicoine MR, Lyman M, Roerig P, Reifemberger G, Gutmann DH, Perry A. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7121-6.
- Maillo A, Orfao A, Sayagues JM, Diaz P, Gomez-Moreta JA, Caballero M, Santamarta D, Santos-Briz A, Morales F, Taberero MD. New classification scheme for the prognostic stratification of meningioma on the basis of chromosome 14 abnormalities, patient age, and tumor histopathology. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 1;21(17):3285-95.
- Meng X, Poon R, Zhang X, Cheah A, Ding Q, Hui C, Alman B. Suppressor of Fused negatively regulates  $\beta$ -Catenin signalling. *J Bio Chem* 2001; 276(43):40113-19
- 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 of a putative 'tumor progression' locus. *Oncogene*. 1997 Feb 6;14(5):611-6.
- Merlo A. Genes and pathways driving glioblastomas in humans and murine disease models. *Neurosurg Rev*. 2003 Jul;26(3):145-58. Epub 2003 May 29. Review.
- Méhot N, Basler K. Suppressor of Fused opposes Hedgehog signal transduction by impeding nuclear accumulation of the activator form of Cubitus interruptus. *Development*. 2000 Sep;127(18):4001-10
- Michiels EM, Oussoren E, Van Groenigen M, Pauws E, Bossuyt PM, Voute PA, Baas F. Genes differentially expressed in medulloblastoma and fetal brain. *Physiol Genomics*. 1999 Aug 31;1(2):83-91.
- Michiels EM, Weiss MM, Hoovers JM, Baak JP, Voute PA, Baas F, Hermsen MA. Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002 Mar-Apr;24(3):205-10.
- Mihaila D, Jankowski M, Gutierrez JA, Rosenblum ML, Newsham IF, Bogler O, Rempel SA; NABTT CNS Consortium. Meningiomas: loss of heterozygosity on chromosome 10 and marker-specific correlations with grade, recurrence, and survival. *Clin Cancer Res*. 2003 Oct 1;9(12):4443-51.
- Miller DL, Weinstock MA. Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. *J Am Acad Dermatol*. 1994 May;30(5 Pt 1):774-8

- Miller LD, Long PM, Wong L, Mukherjee S, McShane LM, Liu ET. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell*. 2002 Nov;2(5):353-61. Review.
- Miller SJ. Etiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Clin Dermatol*. 1995 Nov-Dec;13(6):527-36. Review.
- Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, Poustka A. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet*. 1997 Sep;17(1):32-9.
- Montanini L, Bissola L, Finocchiaro G. KLF6 is not the major target of chromosome 10p losses in glioblastomas. *Int J Cancer*. 2004 Sep 10;111(4):640-1.
- Mühlbauer KR, Gröne HJ, Ernst T, Gröne E, Tschada R, Hergenhahn M, Hollstein M. Analysis of human prostate cancers and cell lines for mutations in the TP53 and KLF6 tumour suppressor genes. *Br J Cancer*. 2003 Aug 18;89(4):687-90.
- Nakamura H, Yoshida M, Tsuiki H, Ito K, Ueno M, Nakao M, Oka K, Tada M, Kochi M, Kuratsu J, Ushio Y, Saya H. Identification of a human homolog of the *Drosophila* neuralized gene within the 10q25.1 malignant astrocytoma deletion region. *Oncogene* 1998 Feb 26;16(8):1009-19.
- Narla G, Friedman SL, Martignetti JA. Kruppel cripples prostate cancer: KLF6 progress and prospects. *Am J Pathol*. 2003 Apr;162(4):1047-52.
- Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science*. 2001 Dec 21;294(5551):2563-6.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23-8.
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980 Oct 30;287(5785):795-801.
- Ogden SK, Ascano M Jr, Stegman MA, Robbins DJ. Regulation of Hedgehog signaling: a complex story. *Biochem Pharmacol*. 2004 Mar 1;67(5):805-14.
- Paces-Fessy M, Boucher D, Petit E, Paute-Briand S, Blanchet-Tournier MF. The negative regulator of Gli, Suppressor of fused (Sufu), interacts with SAP18, Galectin3 and other nuclear proteins. *Biochem J*. 2004 Mar 1;378(Pt 2):353-62
- Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2003 Mar 1;63(5):1114-21.
- Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G. Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol*. 2004 Nov;70(2):183-202. Review.
- Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sorensen 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 Jun 1;57(11):2085-8
- Pulst S-M, Reifenberger G. Primary Tumors of the Nervous System. *In* Neurogenetics. Pulst SM (Ed.), Oxford University Press, New York, Oxford, 2000, pp131-161
- Quach N, Goodman MF, Shibata D. In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC Clin Pathol*. 2004 Feb 12;4(1):1.
- Rao PM, Antony A, Rajalakshmi S, Sarma DS. Studies on hypomethylation of liver DNA during early stages of chemical carcinogenesis in rat liver. *Carcinogenesis*. 1989 May;10(5):933-7.

Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD, Bigner SH. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene*. 1995 Jun 1;10(11):2243-6

Reddel RR, Bryan TM, Colgin LM, Perrem KT, Yeager TR. Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat Res*. 2001 Jan;155(1 Pt 2):194-200. Review.

Reeves HL, Narla G, Ogunbiyi O, Haq AI, Katz A, Benzeno S, Hod E, Harpaz N, Goldberg S, Tal-Kremer S, Eng FJ, Arthur MJ, Martignetti JA, Friedman SL. Kruppel-like factor 6 (KLF6) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2004 Apr;126(4):1090-103.

Reifenberger J. [Hereditary tumor syndromes. Cutaneous manifestations and molecular pathogenesis of Gorlin and Cowden syndromes] *Hautarzt*. 2004 Oct;55(10):942-51. Review. German

Reifenberger J, Arnold N, Kiechle M, Reifenberger G, Hauschild A. Coincident PTCH and BRCA1 germline mutations in a patient with nevoid basal cell carcinoma syndrome and familial breast cancer. *J Invest Dermatol*. 2001 Mar;116(3):472-4.

Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers L, Oberstrass J, An HX, Niederacher D, Wechsler W, Reifenberger G. Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996 Jul;55(7):822-31.

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 Jan;152(1):43-51.

Reifenberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P, Reifenberger G. Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*. 1998 May 1;58(9):1798-803.

Rempel SA, Schwachheimer 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 May 15;53(10 Suppl):2386-92.

Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog*. 1993;7(3):139-46.

Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*. 2000 Oct;1(1):11-9. Review.

Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005 Nov 24;353(21):2262-9. Review.

Rubin JB, Rowitch DH. Medulloblastoma: a problem of developmental biology. *Cancer Cell*. 2002 Jul;2(1):7-8.

Ruel L, Rodriguez R, Gallet A, Lavenant-Staccini L, Thérond PP. Stability and association of Smoothed, Costal2 and Fused with Cubitus interruptus are regulated by Hedgehog. *Nat Cell Bio* 2003;5(10):907-13

Ruiz i Altaba A, Palma V, Dahmane N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Jan;3(1):24-33. Review.

Saldanha G, Fletcher A, Slater DN. Basal cell carcinoma: a dermatopathological and molecular biological update. *Br J Dermatol* 2003;148:195-202

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.

Sasaki H, Zlatescu MC, Betensky RA, Ino Y, Cairncross JG, Louis DN. PTEN is a target of chromosome 10q loss in anaplastic oligodendrogliomas and PTEN alterations are associated with poor prognosis. *Am J Pathol*. 2001 Jul;159(1):359-67.

Schmidt EE, Ichimura K, Goike HM, Moshref A, Liu L, Collins VP. Mutational profile of the PTEN gene in primary human astrocytic tumors and cultivated xenografts. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999 Nov;58(11):1170-83.

- Seizinger BR, de la Monte S, Atkins L, Gusella JF, Mertz RL. Molecular genetic approach to human meningioma: Loss of genes on chromosome 22, Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:5419-23
- Shen JC, Rideout WM 3rd, Jones PA. The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. Nucleic Acids Res. 1994 Mar 25;22(6):972-6.
- Simell O, Takki K. Raised plasma-ornithine and gyrate atrophy of the choroid and retina. Lancet. 1973 May 12;1(7811):1031-3.
- Situm M, Levanat S, Crnic I, Pavelic B, Macan D, Grgurevic J, Mubrin-Koncar M, Lipozencic J. Involvement of patched (PTCH) gene in Gorlin syndrome and related disorders: three family cases. Croat Med J. 1999 Dec;40(4):533-8.
- Somerville RP, Chernova O, Liu S, Shoshan Y, Cowell JK. Identification of the promoter, genomic structure, and mouse ortholog of LGII. Mamm Genome. 2000 Aug;11(8):622-7.
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. Nat Genet. 1997 Apr;15(4):356-62.
- Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, Phillips H, Brush J, Goddard A, de Sauvage FJ, Rosenthal A. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. J Cell Sci. 1999 Dec;112 ( Pt 23):4437-48.
- Tabatabai G, Boström J, Wolter M, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G. Analysis of MXII candidate tumor suppressor gene for mutation and expression in glioblastomas and meningiomas. Clin Neuropathol 1998;17:249
- Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. Nat Genet. 2002 Jul;31(3):306-10. Epub 2002 Jun 17.
- Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res. 1984 May 25;12(10):4127-38.
- Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. Nature. 2003 Oct 23;425(6960):851-6. Epub 2003 Sep 14.
- Toftgard, R. Hedgehog signalling in cancer. Cell. Mol. Life Sci., 57:1720-1731, 2000.
- Ueda K, Arakawa H, Nakamura Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. Oncogene. 2003 Aug 28;22(36):5586-91.
- Uden AB, Holmberg E, Lundh-Rozell B, Stahle-Backdahl M, Zaphiropoulos PG, Toftgard R, Vorechovsky I. Mutations in the human homologue of Drosophila patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation. Cancer Res. 1996 Oct 15;56(20):4562-5.
- Varmus H, Weinberg RA. Gene und Krebs. Spektrum Verlag, 1994 Heidelberg
- Vasaturo F, Dougherty GW, Cutler ML. Ectopic expression of Rsu-1 results in elevation of p21CIP and inhibits anchorage-independent growth of MCF7 breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2000 May;61(1):69-78.
- Vorechovsky I, Benediktsson KP, Toftgard R. The patched/hedgehog/smoothed signalling pathway in human breast cancer: no evidence for H133Y SHH, PTCH and SMO mutations. Eur J Cancer. 1999 May;35(5):711-3.
- Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. Nat Genet. 1998 Oct;20(2):116-7.

- Watkins DN, Berman DM, Baylin SB. Hedgehog signaling: progenitor phenotype in small-cell lung cancer. *Cell Cycle*. 2003 May-Jun;2(3):196-8. Review.
- Watkins DN, Peacock CD. Hedgehog signalling in foregut malignancy. *Biochem Pharmacol*. 2004 Sep 15;68(6):1055-60. Review.
- Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*. 1989 Mar;44(3):388-96.
- 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 U S A*. 1997 Dec 23;94(26):14719-24.
- Wechsler-Reya R, Scott MP. The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:385-428. Review.
- Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J, Sitbon G, Lundeberg J. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol*. 1999 Nov;155(5):1467-71.
- 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 Jul 1;57(13):2581-5
- Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Apr 1;89(7):2965-9.
- Xie J, Johnson RL, Zhang X, Bare JW, Waldman FM, Cogen PH, Menon AG, Warren RS, Chen LC, Scott MP, Epstein EH Jr. Mutations of the *PATCHED* gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. *Cancer Res*. 1997 Jun 15;57(12):2369-72.
- Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH Jr, de Sauvage FJ. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):90-2.

## **F Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Guido Reifenberger, der diese Dissertation durch die Überlassung des Themas, die vorzügliche und kompetente Betreuung und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten erst ermöglicht hat. Weiterhin danke ich Ihm für das generelle Interesse an meinem beruflichen Werdegang und der damit verbundenen Motivation für mein Studium.

Insbesondere danke ich auch Frau Dr. rer. nat. Marietta Wolter, die mir jederzeit mit unermüdlichem Einsatz und bewundernswerter Ausdauer für Fragen und Probleme jeglicher Art zur Verfügung stand. Ihr verdanke ich den komplikationslosen Ablauf der Laborarbeiten sowie zahlreiche Anleitungen und Hilfestellungen zur Orientierung im „Neuland“ der medizinischen Forschung.

Weiterhin gilt mein Dank auch der restlichen Besetzung des „Biologen, Chemikern und sonstigen Naturwissenschaftlern-Zimmers“ (vor allem Herrn Dr. rer. nat. Peter Roerig, Herrn Dr. rer. nat. Jörg van den Boom und Frau Dipl.-Biol. Petra Zipper), die mir allzeit bei kleineren und größeren Problemen mit kompetenten Ratschlägen weiterhalfen (natürlich stets begleitet von humorvollen Sprüchen, die den manchmal tristen Laboralltag aufheiterten).

Frau PD Dr. med. Julia Reifenberger danke ich für die Mithilfe bei meiner Arbeit mit Basalzellkarzinomen. Außerdem bedanke ich mich für die eindrucksvolle Demonstration der Wirksamkeit von Immunmodulatoren (z.B. Imiquimod) im dermatologischen „off-label“-Bereich.

Frau Britta Blaschke danke ich für die anhaltend freundliche Beantwortung redundanter Fragen bezüglich der Zusammensetzung bestimmter Lösungen und Puffer und selbstverständlich für die helfende Hand während meiner Laborzeit.

Bei Herrn PD Dr. med. Sabel und Herrn PD Dr. med. Stege möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bzw. die Durchführung der Prüfung bedanken.

Herrn Prof. V.P. Collins (Department of Pathology, University of Cambridge) danke ich für die freundliche Bereitstellung von Untersuchungsmaterial.

Dir, meiner geliebten Daniela, danke ich für Deine unerschöpfliche Geduld und Toleranz, die ich so oft beansprucht habe (nicht nur während meiner Arbeit an dieser Dissertation).

Last, but in no way least möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Mutter Veronika Köhler, meiner Großmutter Maria Freitag und meinem Bruder Dr. jur. Sebastian Köhler, LL.M. für die große Unterstützung und die liebevolle Fürsorge bedanken.

## **G Tabellarischer Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Benjamin Peter Köhler
Geburtsdatum	08.05.1979
Geburtsort	Bottrop
Nationalität	deutsch
e-mail	koehler_ben@arcor.de

### **Berufliche Weiterbildung**

ab 08/2006	Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin I des Klinikum Niederberg, Velbert
07/2006	Erteilung der Approbation als Arzt
06/2006	Ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote – sehr gut (1,16) – Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,0
04/2005 – 03/2006	Praktisches Jahr am Klinikum Krefeld, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Düsseldorf Wahlfach: Dermatologie
2002 – 2006	Dissertation am Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf (Doktorvater: Prof. Dr. med. Guido Reifenberger) Thema: Molekulare Analyse von Tumorsuppressorgen-Kandidaten auf Chromosom 10 in Tumoren des Nervensystems
03-04/2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,0
2002-2004	Kollegiat des Graduiertenkollegs "Pathologische Prozesse des Nervensystems: Vom Gen zum Verhalten“ mit Teilnahme an den wöchentlichen Ringvorlesungen und Jahresarbeitstreffen
08/2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
09/2001	Ärztliche Vorprüfung, Note: 1,66
10/1999	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

07/1998 bis 07/1999 Zivildienst in der ambulanten Alten- und Krankenpflege sowie der Behindertenbetreuung der Pflegestation Ratingen des Caritasverbandes für den Kreis Mettmann e.V.

### **Schulische Ausbildung**

05/1998 Abiturprüfung

1998-1989 Gymnasium „Dietrich-Bonhoeffer“, Ratingen

1989-1985 Grundschule „Gerhard-Tersteegen“, Ratingen

### **Publikationen**

Köhler B, Wolter M, Blaschke B, Reifenberger G. Absence of mutations in the putative tumor suppressor gene KLF6 in glioblastomas and meningiomas. *Int J Cancer*. 2004 Sep 10;111(4):644-5.

Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Köhler 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 Jan;152(1):43-51.

## H Zusammenfassung (Abstrakt)

Deletionen des Chromosoms 10 stellen eine häufige Veränderung in unterschiedlichen Tumoren des Nervensystems dar. Sie finden sich u.a. in der Mehrzahl der Glioblastome, aber auch in Subgruppen von atypischen und anaplastischen Meningeomen sowie Medulloblastomen. Der häufige Verlust von genetischem Material dieses Chromosoms spricht dafür, dass hier wichtige, bislang noch unbekannte Tumorsuppressorgene lokalisiert sind, deren Inaktivierung von ursächlicher Bedeutung für das Tumorwachstum der genannten Tumorentitäten ist. Erstes Ziel der eigenen Arbeit war es, im Rahmen eines sogenannten Kandidatengenansatzes die mögliche Bedeutung von genetischen Veränderungen des Tumorsuppressorgens *KLF6* (10p15.2) in Glioblastomen und Meningeomen abzuklären. Ein zweiter Projektteil beschäftigte sich mit der molekularen Analyse eines anderen Kandidatengens, *SUFUH* (10q24.32), in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen der Haut. Der dritte Teil der Arbeit betraf die Identifizierung neuer Kandidatengene auf Chromosom 10, die durch DNA-Hypermethylierung in Glioblastomzellen inaktiviert sind. Hierzu wurden Mikroarray-basierte Expressionsanalysen an fünf Glioblastomzelllinien vor und nach Behandlung mit der demethylierenden Substanz 5-Aza-2'-Deoxycytidin und dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A durchgeführt.

Die Mutationsanalyse von *KLF6* in 42 Glioblastomen und 47 Meningeomen erbrachte lediglich genetische Polymorphismen aber keine tumorassoziierten Mutationen. Zusätzlich an 39 Glioblastomen und 31 Meningeomen durchgeführte mRNA-Expressionanalysen zeigten keine wesentlichen Veränderungen in Glioblastomen, wohingegen in immerhin 19 von 31 Meningeomen (61%) im Verhältnis zu normalem menigealem Gewebe um mehr als 50% verminderte *KLF6*-Transkriptlevel nachweisbar waren. Die molekularen Ursachen dieser erniedrigten Expression sind allerdings noch unklar. Eine aberrante DNA-Hypermethylierung konnte durch Sequenzierung des *KLF6*-Promotor nach Natriumbisulfit-Behandlung der DNA ausgeschlossen werden.

Mutationsanalysen des *SUFUH*-Gens in 14 Medulloblastomen und 32 Basalzellkarzinomen deckten einen genetischen Polymorphismus im Exon 11 in sieben Medulloblastomen und drei Basalzellkarzinomen auf. Weiterhin konnten eine Missense-Mutation sowie eine stille Mutation im Exon 4 in zwei Basalzellkarzinomen nachgewiesen werden.

Durch die Mikroarray-Analyse von fünf Glioblastomzelllinien vor und nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A gelang es, 25 Gene auf Chromosom 10 zu

identifizieren, die nach der Behandlung eine signifikant verstärkte Expression zeigten. Anschließende Untersuchungen von vier dieser Gene mittels Real-time reverser Transkriptase-PCR bestätigten die Mikroarray-Daten.

Insgesamt sprechen die eigenen Ergebnisse dafür, dass *KLF6*-Mutationen in der Pathogenese von Glioblastomen und Meningeomen keine wesentliche Rolle spielen. Gleiches gilt für *SUFUH*-Mutation in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen. Die Suche nach den jeweils relevanten Tumorsuppressorgenen auf Chromosom 10 muss demnach fortgeführt werden. Diesbezüglich sind die in den eigenen Arbeiten in Glioblastomzelllinien identifizierten neuen, möglicherweise epigenetisch inaktivierten Kandidatengene von großem Interesse für weitergehende Forschungsarbeiten.

Genehmigt: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger