

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mutationsanalyse des mitochondrialen Genoms bei pilozytischen Astrozytomen im
Kindesalter

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lena Wronski

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze
2. Prof. Dr. med. F. Heppner
3. Prof. Dr. Dr. M. Frühwald

Datum der Promotion: 20.11.2009

“Hold somebody’s hand and feel its warmth. Gram per gram, it converts 10 000 times more energy per second than the sun. You find this hard to believe? Here are the numbers: An average human weighs 70 kilograms and consumes about 12 600 kilojoules / day; that makes about 2 millijoules / gram and second, or 2 milliwatts / gram. For the sun it’s miserable 0.2 microjoules / gram and second. Some bacteria, such as the soil bacterium “Azotobacter” convert as much as 10 joules / gram and second, outperforming the sun by a factor of 50 million. I am warm because inside each of my body cells there are dozens, hundreds or even thousands of mitochondria that burn the food I eat.”

Gottfried Schatz

Aminosäurencode	7
Abkürzungen	8
1 Einleitung und Grundlagen	11
1.1 Hirntumoren im Kindesalter unter besonderer Berücksichtigung der pilozytischen Astrozytome	11
1.1.1 Einleitung.....	11
1.1.2 Klassifikation der Hirntumoren.....	11
1.1.3 Epidemiologie der Hirntumoren im Kindesalter	13
1.1.4 Pilozytische Astrozytome, Lokalisation, Morphologie und Histologie	13
1.1.5 Molekulargenetik der pilozytischen Astrozytome	15
1.1.6 Symptomatik und Diagnostik	16
1.1.7 Therapie und Prognose der pilozytischen Astrozytome	16
1.2 Mitochondrien	18
1.2.1 Einleitung.....	18
1.2.2 Das mitochondriale Genom und dessen Besonderheiten	20
1.2.3 Die Funktionen der Mitochondrien in der Zelle	23
1.2.4 ROS und oxidativer Stress	25
1.2.5 Mitochondrien und ihre Funktionen in der Apoptoseregulation.....	26
1.2.6 Mitochondriale Pseudogene	28
1.2.7 Heteroplasmie und replikative Segregation	29
1.2.8 Mutationen der mitochondrialen DNA.....	31
1.2.9 Mitochondrien und ihre Bedeutung für die Kanzerogenese.....	36
2 Zielsetzung der Arbeit	38
3 Material und Methoden	40
3.1 Patientenkollektiv	40
3.2 Molekularbiologische Methoden	41
3.2.1 DNA-Isolierung aus Tumorgewebe und Blutleukozyten	41
3.2.2 Long Range-PCR zur Amplifizierung des mitochondrialen Genoms	42

3.2.2.1	Beschreibung der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
3.2.2.2	Primer	43
3.2.2.3	Bedingungen für die Durchführung der Long Range-PCR.....	47
3.2.3	Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte	49
3.2.4	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	49
3.2.5	Sequenzierung	50
3.2.5.1	Darstellung der Sequenzierung nach der Didesoxymethode	50
3.2.5.2	Durchführung der Sequenzierungs-PCR.....	50
3.2.5.3	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	51
3.2.5.4	Durchführung der Sequenzierung, Auswertung der Sequenzen	52
3.3	Material	53
3.3.1	Chemikalien.....	53
3.3.2	Reagenziensysteme (Kits).....	54
3.3.3	Enzyme und Zelllinie	54
3.3.4	DNA-Präparationssystem	55
3.3.5	DNA-Längenmarker/ Desoxynukleotide	55
3.3.6	Lösungen.....	55
3.3.7	Primer.....	56
3.3.8	Filmmaterial.....	56
3.3.9	Software und Webseiten zur Auswertung.....	56
3.3.10	Geräte	57
4	Ergebnisse	59
4.1	Somatische Mutationen	59
4.1.1	Somatische Mutationen in der D-loop-Region.....	61
4.1.2	Somatische Mutationen im Bereich der ribosomalen RNA.....	62
4.1.3	Somatische Mutationen im Bereich der NADH-Dehydrogenase	64
4.1.4	Somatische Mutationen im Bereich der Cytochrom C-Oxidase.....	65
4.1.5	Somatische Mutationen im Bereich der ATP-Synthase.....	67
4.1.6	Somatische Mutationen im Bereich des Cytochrom B.....	69
4.1.7	Somatische Mutationen der tRNA	71
4.2	Keimbahnmutationen	72

5	Diskussion	80
5.1	Verteilung der Mutationen im Genom	81
5.2	Somatische Mutationen in proteinkodierenden Genabschnitten	83
5.3	Polymorphismus versus somatische, stumme Mutation	83
5.4	Homoplasmie und Heteroplasmie	86
5.5	Verteilung der Mutationen auf die Patienten	87
5.6	Keimbahnmutationen	89
5.7	Stärken und Limitierungen dieser Arbeit	89
5.8	Ausblick	91
	Zusammenfassung	94
	Literaturverzeichnis	96
	Abbildungsverzeichnis	103
	Anhang	105

Aminosäurencode

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungen

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	„B-cell lymphoma-2“; B-Zell-Lymphom-assoziiertes anti-apoptotisches Protein, Prototyp gleichnamiger Proteinfamilie
BER	„Base excision repair“; Basenexzisionsreparatur
Bp	Basenpaar
C	Cytosin
CAD	“Caspase Activated DNase”; Caspaseaktivierte DNase
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cytochrom-Oxidase
CYB	Cytochrom B
DEAF	„maternally inherited DEAFness“; maternal vererbte Taubheit
DHODH	Dehydroorotat-Dehydrogenase
D-loop	„Displacement loop“; Kontrollregion der mtDNA
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form
G	Guanin
GTP	Guanin-Triphosphat
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
H-strand	„heavy strand“; schwerer Strang

KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
Kb	Kilobase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LOH	„loss of heterozygosity“; Verlust der Heterozygotie
LHON	Leber'sche hereditäre Opticusneuropathie
L-strand	„light strand“; leichter Strang
MAPK	„mitogen activated protein kinase“
mtPTP	„mitochondrial permeability transition pore“; mitochondriale Permeabilitätspore
mtDNA	mitochondriale DNS
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form
ND	NADH-Dehydrogenase
nDNA	Nukleäre DNS
NER	„Nucleotide Excision Repair“; Nukleotidexzisionsreparatur
np	Nukleotidposition
O ₂	molekularer Sauerstoff
OD	optische Dichte
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PA	pilozytisches Astrozytom
PCR	„Polymerase-Chain-Reaction“; Polymerasekettenreaktion
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
ROS	„reactive oxygen species“; reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SOD	Superoxiddismutase
T	Thymin

tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TTP	Thymintriphosphat
U	Uracil
UMP	Uridylmonophosphat
WHO	„World Health Organization“; Weltgesundheitsorganisation
ZNS	zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG UND GRUNDLAGEN

1.1 Hirntumoren im Kindesalter unter besonderer Berücksichtigung der pilozytischen Astrozytome

1.1.1 Einleitung

Bei den malignen Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) unterscheidet man zwischen primären und sekundären Tumoren. Primäre Tumoren entwickeln sich aus Zellen des ZNS, während sekundäre Tumoren in das Gehirn metastasierte Tumoren sind. Astrozytome gehören zu den häufigsten primären Tumoren des ZNS. Sie sind neuroepithelialer Herkunft und leiten sich von den zum Stützgewebe des ZNS gehörenden Astrozyten (Makroglia) ab. Sie werden zur Gruppe der Gliome gezählt, die sich alle von glialen Zellen ableiten. Niedriggradige Gliome können Zellen verschiedener glialer Entwicklungslinien, darüber hinaus jedoch auch neoplastische Ganglienzellen enthalten (Gangliogliome). Desmoplastische Varianten treten vor allem bei sehr jungen Kindern auf. Niedriggradige Gliome entsprechen sämtlich den WHO-Graden I oder II. Die TNM-Klassifikation zur Stadieneinteilung findet bei Gliomen niedrigen Malignitätsgrades keine Anwendung. Die Einteilung folgt den Hauptlokalisationen (zerebrale Hemisphären, supratentorielle Mittellinie, Mittelhirn, Zerebellum, Hirnstamm und Spinalkanal), die sich aufgrund der unterschiedlichen Tumorresektabilität als prognostisch bedeutsam herausgestellt haben.

1.1.2 Klassifikation der Hirntumoren

Hirntumoren werden vorwiegend nach der international gebräuchlichen WHO-Klassifikation eingeteilt. Diese sieht eine Einteilung nach histopathologischen Kriterien in vier Malignitätsgrade vor. Betrachtet werden Dichte und Differenzierungsgrad der Tumorzellen, Mitoserate und Kernpolymorphie sowie Endothelproliferation und Tumornekrosen. Histologisch werden Mikrozysten im Allgemeinen mit niedriger Malignität und besserer Prognose in Verbindung gebracht. Das Vorkommen erhöhter

Tumorzellichte, vermehrter Mitoseraten, Zelltypen und Nekrosen sowie Gefäßproliferationen sind Kennzeichen erhöhter Malignität.

Grad I bezeichnet demnach langsam wachsende Tumoren mit einer Überlebenszeit für den Träger von mehr als zehn Jahren nach Diagnosestellung. Grad II schließt semimaligne Tumoren ein, die Überlebenszeiten für den Patienten von im Median fünf Jahren bieten und die eine Möglichkeit zur fortschreitenden Malignisierung in sich tragen. Patienten mit Tumoren der Grade III und IV haben mittlere Überlebenszeiten nach Therapie von zwei bis drei (anaplastisches Astrozytom, Grad III) beziehungsweise weniger als einem Jahr (Glioblastom, Grad IV). Tumoren dieser Grade sind als maligne zu bezeichnen. Die alleinige histomorphologische Betrachtung der Tumoren genügt jedoch nicht, um die Tumoren hinsichtlich ihres Verhaltens und ihrer Prognose hinreichend zu charakterisieren. Dazu bedarf es weiterer Marker. In die neueste Fassung der WHO-Klassifikation wurde deswegen das immunhistochemische und genetische Tumorprofil so weit als möglich mit eingeschlossen [1]. Im Bereich der niedriggradigen Gliome sowie gemischt neuronal-glialen Tumoren unterscheidet die Klassifikation demnach folgende Gruppen:

Astrozytäre Tumoren:

- Subependymales Riesenzellastrozytom (WHO Grad I)
- Pilozytisches Astrozytom (WHO Grad I)
- Pilomyxoides Astrozytom (WHO Grad II)
- Diffuses Astrozytom (WHO Grad II)
- Pleomorphes Xanthoastrozytom (WHO Grad II)

Oligodendrogliale/ Oligoastrozytäre Tumoren

- Oligodendrogliom (WHO Grad II)
- Oligoastrozytom (WHO Grad II)

Ependymome

- Subependymom (WHO Grad I)
- Myxopapilläres Ependymom (WHO Grad I)
- Ependymom (WHO Grad II)

Andere neuroepitheliale Tumoren

- Angiozentrisches Gliom (WHO Grad I)
- Chordoides Gliom des III Ventrikels (WHO Grad II)

Tumoren des Plexus choroideus

- Papillom des Plexus choroideus (WHO Grad I)

- Atypisches Papillom des Plexus choroideus (WHO Grad II)

Neuronale und gemischt neuronal-gliale Tumoren

- Gangliozytom (WHO Grad I)
- Gangliogliom (WHO Grad I)
- Desmoplastisches infantiles Astrozytom/Gangliogliom (WHO Grad I)
- Dysembryoplastischer neuroepithelialer Tumor (WHO Grad I)
- Zentrales Neurozytom (WHO Grad II)
- Extraventrikuläres Neurozytom (WHO Grad II)
- Cerebelläres Liponeurozytom (WHO Grad II)
- Paragangliom des Rückenmarks (WHO Grad I)
- Papillärer glioneuronaler Tumor (WHO Grad I)
- Rosetten-bildender glioneuronaler Tumor des IV Ventrikels (WHO Grad I)

1.1.3 Epidemiologie der Hirntumoren im Kindesalter

Tumoren des zentralen Nervensystems sind die häufigsten soliden Tumoren im Kindes- und Jugendalter. Nach den hämatologischen Neoplasien bilden sie mit 20 % der Gesamterkrankungen die zweitgrößte Gruppe der Tumorerkrankungen in dieser Altersgruppe. In Deutschland liegt die jährliche Inzidenz bei 2,5-4 Neuerkrankungen bezogen auf 100.000 Kinder. Im Jahr 2004 erkrankten 370 Kinder neu an einem Tumor des ZNS [3]. Unter den primären Hirntumoren stellen die pilozytischen Astrozytome mit einem Anteil von 30 % die größte Gruppe dar [2]. Das Haupterkrankungsalter bei pilozytischen Astrozytomen liegt bei fünf bis sieben Jahren, Mädchen und Jungen sind gleich häufig betroffen [3]. Jenseits des 18. Lebensjahres sind pilozytische Astrozytome eine Rarität. Bei 10-15 % der Patienten liegt als Grunderkrankung eine Phakomatose (Neurofibromatose von Recklinghausen, NF1) vor [4].

1.1.4 Pilozytische Astrozytome, Lokalisation, Morphologie und Histologie

Pilozytische Astrozytome (PA) werden als eigene Tumorentität geführt und entsprechen den Kriterien des WHO-Grad I. PA sind im Allgemeinen gut demarkierte Tumoren und zeigen nur selten eine maligne Entartungstendenz [5].

Die häufigsten Lokalisationen des pilozytischen Astrozytoms sind das Chiasma opticum und der Fasciculus opticus (Opticusgliom), der dritte und vierte Ventrikel, das Kleinhirn und der Hirnstamm. PA finden sich zumeist im Bereich der Mittellinie, seltener wachsen

sie lateral. Neben der Lokalisation im Großhirn können die Tumoren auch im Spinalkanal sowie entlang der Hirnnerven vorkommen. Ein multifokales Auftreten ist möglich. Opticus- und Stammhirngliome stellen separate Untergruppen der PA dar. Es existiert eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Opticusgliomen mit einer gleichzeitig bestehenden Neurofibromatose. Makroskopisch imponieren pilozytische Astrozytome durch ein knolliges, derbes Aussehen, die Schnittfläche ist gräulich bis weiß. Oft finden sich wasserhelle zystische Strukturen. Die Tumoren wachsen verdrängend und nur langsam infiltrierend, eine Infiltration der Meningen kommt dagegen häufig vor.

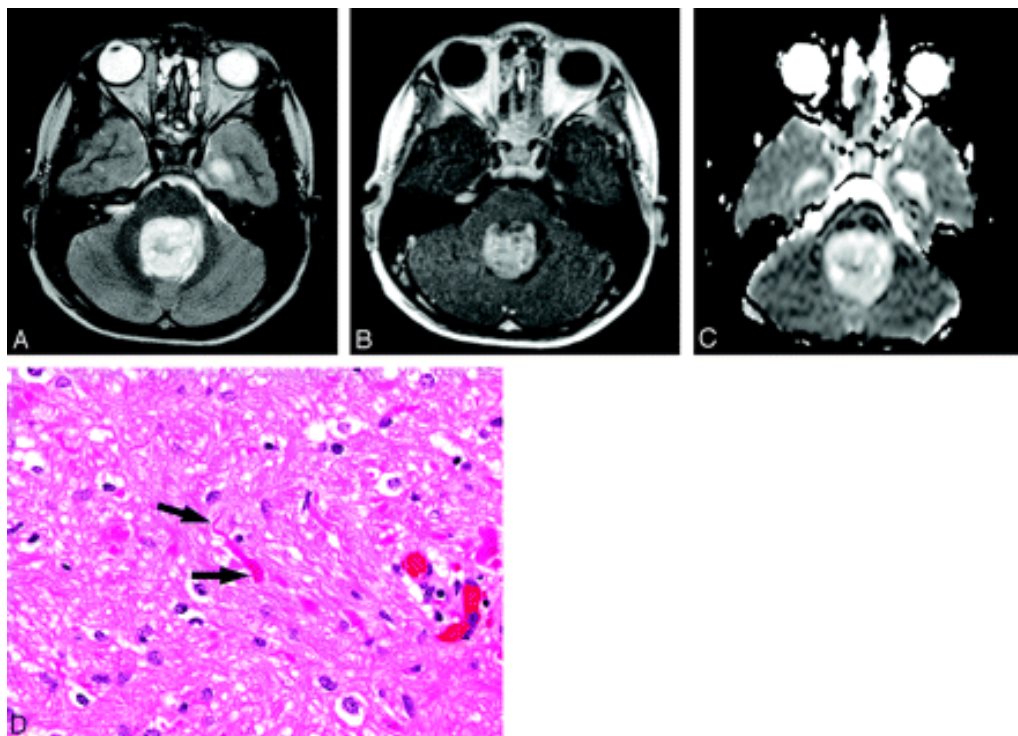


Abb. 1: PA, Makro- und Mikroskopie, A,B,C: T2-gewichtete Magnetresonanztomografien eines Patienten mit pilozytischem Astrozytom. D: mikroskopisches Bild eines pilozytischen Astrozytoms mit dichterem Stroma und zahlreichen Rosenthalfasern (Pfeile) (Hematoxylin-Eosin-Färbung, 20x). (Abbildung aus [7])

Histopathologisch sind sie durch bipolare, fusiforme oder piloide Zellen charakterisiert, die in eine reichlich fibrilläre Matrix eingebettet sind. Die Zellen tragen haarförmige Fortsätze, diese sind kolbenartig aufgetrieben und bilden die sogenannten Rosenthalfasern. Im Zytoplasma finden sich eosinophile Proteingranula. Der Mitoseanteil liegt bei 1-3 % und ist damit gering. Oft finden sich Mikrozysten,

Kernatypien und mehrkernige Zellen. Circa 10 % der Tumoren speichern vermehrt Calcium. PA können ausgeprägte Gefäßproliferationen zeigen, die im Gegensatz zu den Befunden bei diffusen Astrozytomen nicht auf eine erhöhte Malignität des Tumors hindeuten [6]. Nekrosen treten nicht auf.

1.1.5 Molekulargenetik der pilozytischen Astrozytome

Bei der Graduierung des Tumors ist die histologische Untersuchung das wichtigste diagnostische Instrument. Dennoch kann nicht immer eine sichere Einschätzung des Tumorverhaltens und seiner Progressionstendenz erreicht werden. In anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen der Erwachsenen konnten verschiedene genetische Aberrationen nachgewiesen werden, die den Verlust von Tumorsuppressorgenen oder die Aktivierung von Onkogenen bedingen. Bei pädiatrischen PA finden sich solche Veränderungen nur vereinzelt. Am häufigsten konnte eine Duplikation des BRAF-Protoonkogens festgestellt werden, welche mit einer aberranten Aktivierung der MAPK-Signalwege assoziiert wird [8]. Bei den zytogenetischen Aberrationen, die in sporadisch auftretenden PA im Kindesalter nachgewiesen werden konnten, handelte es sich insbesondere um Trisomien der Chromosomen 7, 5 und 8, sowie um eine Monosomie des Chromosom 22 [9-16]. Diese korrelieren jedoch nicht mit dem ereignisfreien und dem Gesamtüberleben [17], ebenso zeigt sich kein konsistentes Aberrationsmuster.

Des Weiteren wurden bei 20 % der PA Verluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 gefunden, die auch den Genlokus TP53 betrafen. Vermehrtes Vorliegen des p53-Proteins konnte in 50 % der PA nachgewiesen werden, jedoch ohne korrelierende Mutationen des zugrunde liegenden Gens [18]. Ebenso fanden sich Verluste auf Chromosom 17q, die in manchen Fällen den NF1-Lokus betrafen. Mutationen dieses Lokus konnten allerdings nicht nachgewiesen werden [19]. NF1-assoziierte pilozytische Astrozytome wiesen im Gegensatz zu sporadisch auftretenden PA vermehrt Verluste von NF1-Allelen auf [20]. Keimbahnmutationen im Ras-Guanosin-Triphosphatase-activating-Protein (Neurofibromin) bei Patienten mit NF1 stellen eine Prädisposition für pilozytische Astrozytome dar. Vereinzelt konnten auch somatische Mutationen dieser Genregion nachgewiesen werden [21]. LOH (Loss of Heterozygosity) auf Chromosom 17p stellt die häufigste Veränderung in den Tumoren dar [22, 23]. Kein Genlokus zeigte sich in PA als spezifisch und klinisch relevant verändert [24]. Die festgestellten

Veränderungen lassen sich nicht sicher mit einer Tumorprogression korrelieren, sie scheinen darüber hinaus im Gewebe ungleich verteilt vorzuliegen. Valide Daten über einen Tumorprogression von PA zu höhergradigen Tumoren existieren nicht.

Pilozytische Astrozytome unterscheiden sich damit nicht nur morphologisch und in ihrem biologischen Verhalten, sondern auch in ihrem genetischen Profil von anderen niedriggradigen Astrozytomen.

1.1.6 Symptomatik und Diagnostik

Die Symptomatik der pilozytischen Astrozytome ist im Wesentlichen abhängig von ihrer Lokalisation. Optikusgliome manifestieren sich vor allem durch Sehstörungen. Bei Tumoren, die im Zwischenhirn lokalisiert sind, stehen hypothalamische Ausfälle im Vordergrund. Es kommt zu Störungen der hormonellen Hypothalamus-Hypophysen-Achse, der Körpertemperaturregelung und der Nahrungsaufnahme. Tumoren im Kleinhirn führen zu Gangunsicherheit mit Fallneigung, Schwindel und Ataxie. Erstsymptome von Hirnstammgliomen sind Ausfälle der Hirnnerven. Durch den tumorbedingten erhöhten intrakraniellen Druck können Kopfschmerzen, Erbrechen und Krampfanfälle auftreten.

Zur Initialdiagnostik wird neben der gründlichen neurologischen Untersuchung eine Magnetresonanztomografie der gesamten Neuraxis (Schädel und Rückenmark) gefordert. Pilozytische Astrozytome reichern in der Regel homogen Kontrastmittel an. Die Tumorperipherie ist oft zystisch durchsetzt. Calcifizierungen lassen sich computertomografisch darstellen. Zusätzlich sollte eine augenärztliche Untersuchung zur Darstellung eines eventuellen Papillenödems als Zeichen erhöhten intrakraniellen Druckes erfolgen. Bei Vorliegen multifokaler Läsionen wird eine Lumbalpunktion zum Nachweis von Tumorzellen im Liquor empfohlen. Die Diagnossicherung erfolgt durch die histopathologische Aufarbeitung des Tumorsektates.

1.1.7 Therapie und Prognose der pilozytischen Astrozytome

Mit Einführung der modernen Mikrochirurgie sowie dem Einsatz von Chemotherapeutika und verbesserten Bestrahlungsmöglichkeiten haben sich die Prognosen der Hirntumoren im Kindesalter auch für die Gruppe der pilozytischen

Astrozytome deutlich verbessern lassen. Im Vordergrund der Therapie steht bei den pilozytischen Astrozytomen nach wie vor die operative Entfernung des Tumors. Insgesamt liegt die Zehn-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit niedrigmalignen Gliomen bei 78 % [25]. Die Prognose für den einzelnen Patienten hängt im Wesentlichen von der Lage des Tumors und der durchgeführten Behandlung ab. Patienten mit Tumoren des Groß- und Kleinhirns, bei denen eine vollständige Tumorentfernung möglich ist, haben eine sehr gute Prognose. Ihr Risiko ein Rezidiv zu erleiden ist gering, als Langzeitüberlebensraten werden bis zu 100 % angegeben. [25]. Die Prognose verschlechtert sich, wenn die Tumoren nicht vollständig entfernt werden können. Die Zehn-Jahres-Überlebensraten liegen dann bei 74-94 % und darunter [26]. Patienten mit Tumoren der übrigen Hirnregionen haben weniger günstige Heilungsaussichten, denn diese Tumoren können oft nicht vollständig entfernt werden und auch nach fünf bis zehn Jahren oder später erneut zu wachsen beginnen. Die Heilungsaussichten für Tumoren des Zwischenhirns und der Sehnervenregion liegen nach zehn Jahren bei etwa 76 % [25, 27]. Bei manchen Tumoren kann offenbar auch eine nur teilweise Entfernung ohne jede nachfolgende Therapie zum langfristigen oder dauerhaften Erfolg führen [28]. Ebenfalls sind spontane Regressionen möglich. Eine maligne Transformation des Tumors ist nur ausnahmsweise nach erfolgter Strahlentherapie beschrieben worden [29]. In 60 % der Fälle, bei denen nur eine subtotale Tumorentfernung gelang, kommt es zur Tumorprogression bzw. lokalem Rezidiv. Bei nur teilreseziertem oder biopsiertem Tumor erfolgt deswegen bei neuroradiologischen Zeichen der Progression oder neurologischen Ausfällen eine zusätzliche Therapie durch Chemotherapeutika oder Bestrahlung. Bei Kindern unter 8 Jahren wird die Polychemotherapie einer Radiatio vorgezogen, da sie weniger schädigend auf das noch reifende Gehirn wirkt und eine eventuell notwendige Bestrahlung so herausgezögert oder gar überflüssig gemacht werden kann. Bei 90 % der mit Chemotherapeutika behandelten Patienten kann so eine Tumorprogression verhindert werden, 10 % der Fälle zeigen sich jedoch therapieresistent [30]. Bisher existieren keine Daten zu Risikofaktoren, die eine Vorhersage zum Ansprechen auf die adjuvante Therapie erlauben. Eine Übersicht des therapeutischen Vorgehens gemäß dem Protokoll der Therapieoptimierungsstudie SIOP-LGG 2004 gibt die folgende Darstellung:

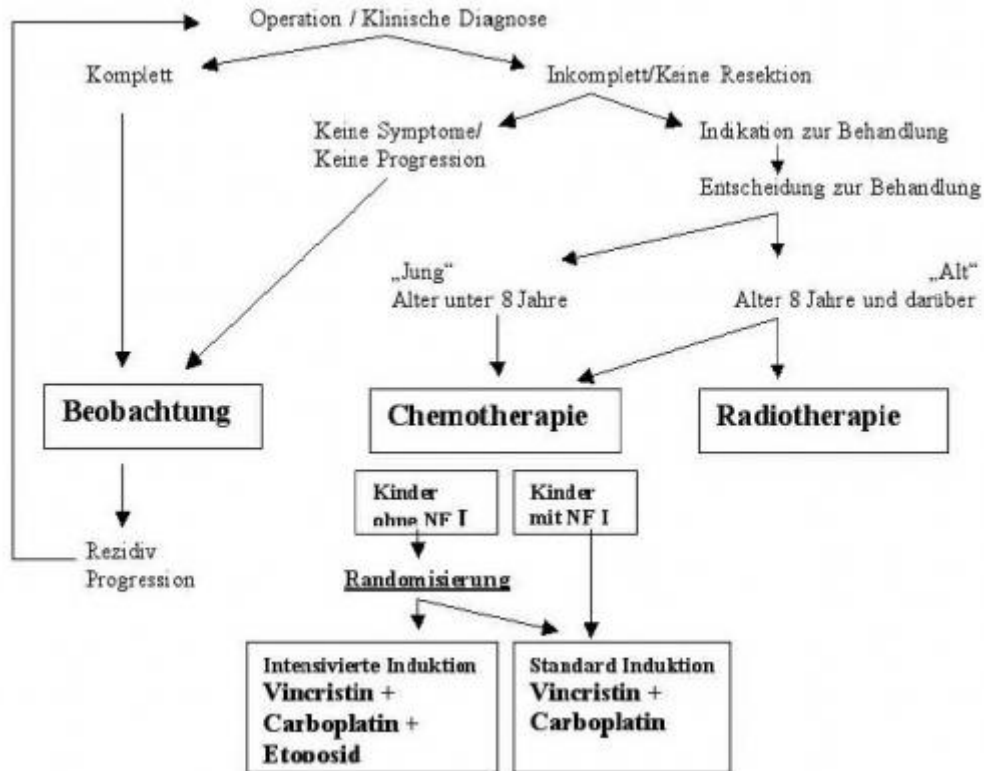


Abb. 2: Therapieschema der pilozytischen Astrozytome: Die Therapieoptimierungsstudie SIOP-LGG 2004 für die Behandlung von niedrigmalignen Gliomen (low grade gliomas, LGG) sieht die o.g. Therapiestratifizierung vor. Die einzelnen Therapieschritte sind im zugehörigen Behandlungsprotokoll detailliert aufgeführt. (Abbildung aus: Rutkowski S, Gnekow A, Wolff J: Multimodale Therapiekonzepte für Kinder und Jugendliche mit Hirntumoren, Journal Onkologie online, 08/2004)

1.2 Mitochondrien

1.2.1 Einleitung

Störungen mitochondrialer Funktionen stehen schon lange im Verdacht, zur Entwicklung und Progression von Tumoren beizutragen. Otto Warburg stellte 1924 fest, dass Tumorzellen erheblich erhöhte Laktatwerte aufweisen. Dieses weist auf eine vermehrte Energiegewinnung durch anaerobe Glykolyse hin, bei der als Nebenprodukt Laktat anfällt, anstelle durch die in normalen Zellen vorrangigen oxidativen Phosphorylierung. Er entwickelte daraufhin eine Hypothese zur Krebsentstehung, die besagt, dass Tumorzellen ihren hohen Energiebedarf vorzugsweise durch anaerobe

Glykolyse decken. Hierfür seien vor allem Störungen der in den Tumorzellen enthaltenen Mitochondrien verantwortlich. Gleichfalls vermutete er, dass eben jene tumorspezifischen mitochondrialen Veränderungen einzigartige Ziele zur gezielten Therapie verschiedener Tumorentitäten darstellen könnten [31].

Inzwischen konnten vielfältige mit der Entstehung von Tumoren assoziierte Veränderungen der mitochondrialen DNA detektiert werden. Diese Veränderungen beinhalten Veränderungen der Mitochondrienanzahl, Änderungen in der Expression und Aktivität der Atmungskettenenzyme sowie Mutationen der mitochondrialen DNA. Die Warburg-Hypothese wird durch die Arbeit von Schulz et al. gestützt, die am Beispiel des kolorektalen Karzinoms zeigen konnte, dass das Krebswachstum durch erzwungene aerobe Glykolyse gehemmt und durch Förderung der anaeroben Glykolyse verstärkt wird [32].

Mitochondrien sind semiautonome Zellorganellen, die wichtige Funktionen im Zellstoffwechsel und der zellulären Energiegewinnung übernehmen. Sie sind von ovaler Form und messen im Mittel 2 x 5 µm. Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umgeben. Die äußere grenzt das Mitochondrium zum Zytosol hin ab und ist aufgrund ihrer starken Durchsetzung mit Porinen für viele Substanzen durchlässig. Die innere Membran ist stark gefältelt und bildet so genannte Cristae. Durch die Fältelung der Membran wird eine enorme Oberflächenvergrößerung der Membran erzielt. Hier sind die Proteinkomplexe der oxidativen Phosphorylierung verankert. Im Intermembranraum entsteht während der Reaktionen der Atmungskette der für die ATP-Synthese benötigte Protonengradient. Die Mitochondrienmatrix, der innere Raum, enthält die mitochondriale DNA, den Proteinbiosyntheseapparat sowie weitere Stoffwechsellzyme. Mitochondrien sind an der Regulation der Apoptose sowie am physiologischen Prozess der Zellalterung beteiligt. Mitochondrien verfügen über eine eigene zirkuläre DNA sowie einen unabhängigen Proteinbiosyntheseapparat. Sie sind in ihrer Replikation unabhängig vom Zellzyklus. Die Anzahl der Mitochondrien eines spezifischen Zelltyps bleibt relativ konstant, so dass vermutet wird, dass die mitochondriale Replikation durch extra-mitochondriale Signaltransduktion beeinflusst wird.

Mit Ausnahme von Erythrozyten enthält jede eukaryontische Zelle Mitochondrien, deren Anzahl je nach Stoffwechselaktivität der Zelle variiert. In stark energieverbrauchenden Zellen, wie z.B. Herzmuskelzellen, können mehrere Tausend Mitochondrien enthalten sein. Jedes Mitochondrium enthält zwischen einer und zehn Kopien seines Genoms.

Die evolutionäre Herkunft der Mitochondrien wird durch die bereits 1883 von Andreas Franz Wilhelm Schimper aufgestellte und von Lynn Margulies 1967 weiterentwickelte Endosymbiontentheorie erklärt [33]. Diese besagt, dass die Mitochondrien ursprünglich als eigenständige prokaryontische Zellformen existierten, die vor circa 1,5 Milliarden Jahren die Atmungskette entwickelten. Im Laufe der Evolution wurden diese Prokaryonten von eukaryontischen Zellen durch Endozytose aufgenommen und in die eukaryontische Zelle integriert. Aus dem Zusammenspiel von Wirtszelle und integriertem Prokaryonten entwickelte sich eine Endosymbiose, d.h. ein Zustand gegenseitiger Abhängigkeit, in der weder die Wirtszelle noch der aufgenommene Prokaryont ohne den jeweiligen Partner existieren kann.

Im Verlauf dieses Prozesses gingen nicht mehr benötigte Teile des ursprünglich prokaryontischen Genoms verloren oder wurden in die nukleäre DNA der Wirtszelle integriert. Insgesamt verblieben von den ursprünglich ca. 3000 mitochondrialen Genen nur 37 im mitochondrialen Genom. Einzelne Proteinkomplexe der Mitochondrien, so zum Beispiel die ATP-Synthase, werden sowohl aus kernkodierten als auch aus mitochondrial kodierten Untereinheiten gebildet. Die aktuelle revidierte Sicht der Eukaryonten-Entwicklung geht inzwischen davon aus, dass zwei Bakterientypen (aerob und anaerob) fusionierten und sich daraus ein primitiver Eukaryont entwickelte [34].

1.2.2 Das mitochondriale Genom und dessen Besonderheiten

Mitochondrien verfügen als einzige Zellorganellen über eine eigenständige DNA. Das mitochondriale Genom besteht aus einer zirkulären doppelsträngigen DNA mit einer Größe von 16.569 Basenpaaren. Der Doppelstrang setzt sich aus einem Guanin-reichen schweren Strang (H-Strand) und aus einem Cytosin-reichen leichten Strang (L-strand) zusammen. Die mitochondriale DNA (mtDNA) enthält im Gegensatz zur nukleären DNA (nDNA) keine Introns (nichtkodierende Sequenzen). Eine vergleichbare Gendichte findet sich sonst nur in viralen Genomen.

Insgesamt enthält die mtDNA 37 Gene. Diese kodieren die 12s und 16s rRNA (ribosomale RNA) des Mitochondriums sowie die 22 transfer-RNAs der mitochondrialen Proteinbiosynthese. 13 der 87 Polypeptide der Atmungskette werden ebenfalls mitochondrial kodiert. Zusätzlich ist in der mitochondrialen DNA eine 1,1 Kilobasen große nichtkodierende Region enthalten, die „Displacement loop“ (D-loop) genannt

wird. Diese ist für die Initiierung der Replikation und Transkription im Mitochondrium verantwortlich. Im Gegensatz zur nukleären DNA wird die mtDNA nicht durch Histone oder eine Chromatinstruktur geschützt.

Jedes Mitochondrium enthält zwischen einer und zehn Kopien seines Genoms. Die mtDNA wird ausschließlich maternal vererbt [35]. Eizelle und Spermium enthalten ungleich verteilte Mitochondrienmengen. Während die Eizelle zum Zeitpunkt der Befruchtung ungefähr 200.000 Mitochondrien enthält, sind im Spermium kaum Mitochondrien vorhanden [36]. Reste paternaler mtDNA werden nach der Befruchtung der Eizelle durch nukleär kodierte Enzyme abgebaut [37].

Die Replikation der mtDNA geschieht kontinuierlich und unabhängig vom Zellzyklus. Mit einer Dauer von circa zwei Stunden benötigt sie sehr viel länger als die der nukleären DNA. Im Gegensatz zur Transkription der nukleären DNA, die für jedes Gen einen eigenen Promotor enthält, ist bei der Transkription der mtDNA nur je ein Transkriptionspromotor für den gesamten H- bzw. L-Strang vorhanden.

Auch die Translation der mtDNA unterscheidet sich von der der nDNA. Der genetische Code der mtDNA weicht in einigen Punkten vom früher als universell angenommenen genetischen Code ab. So stehen die Basentriplets AGA und AGG für ein Stop-Codon und nicht für Arginin, AUA für Methionin anstelle von Isoleucin und UGA für Tryptophan anstatt für ein Stop-Codon [38].

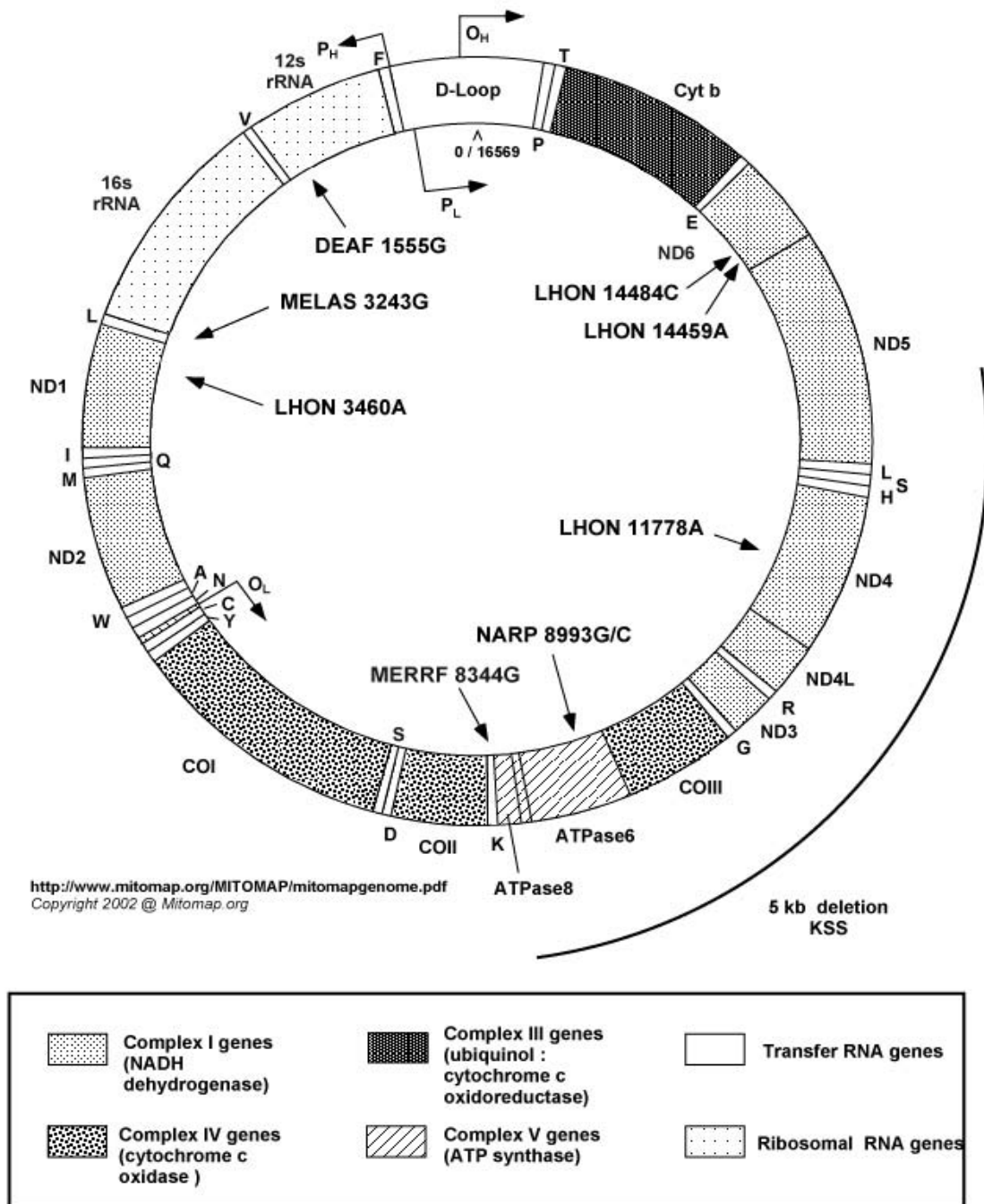


Abb. 3. Das mitochondriale Genom: Dargestellt sind die einzelnen Abschnitte der mtDNA, die danach benannt werden, welche Proteine sie kodieren, sowie die Genloci, die bisher identifiziert und mit mitochondrialen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden konnten. (Abbildung aus: www.mitomap.org)

1.2.3 Funktionen der Mitochondrien in der Zelle

Mitochondrien übernehmen wichtige Funktionen in der Zelle. In ihnen findet eine Vielzahl sowohl anaboler als auch kataboler Stoffwechselfvorgänge statt. Darüber hinaus sind sie unter anderem an der Apoptoseregulation, der Calciumhomöostase [39] und der Generierung von ROS beteiligt. Eine Übersicht über die Funktionen der Mitochondrien gibt die folgende Tabelle:

Tab. 1 Die Funktionen der Mitochondrien im Zellstoffwechsel

oxidative Phosphorylierung
Produktion reaktiver Sauerstoffradikale
Apoptose (programmierter Zelltod)
Reifung von Eisen-Schwefel Proteinen
Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase
Citratzyklus
Harnstoffzyklus
Biosynthese von Aminosäuren
Phospholipidbiosynthese
Biosynthese von Biotin, Liponsäure
Hämbiosynthese
β -Oxidation von Fettsäuren
DNA-Replikation
Transkription
Proteinbiosynthese
Proteinabbau

Oxidative Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), auch Atmungskette genannt, ist ein wichtiger Mechanismus der zellulären Energiegewinnung [40]. In eukaryontischen Zellen findet sie im Intermembranraum der Mitochondrien statt. Die Atmungskette ist an fünf Proteinkomplexe gebunden, die die mitochondriale Innenmembran durchspannen. Insgesamt setzt sie sich aus 87 Polypeptiden zusammen, von denen 13 mitochondrial und die übrigen nukleär kodiert sind.

Die Atmungskette besteht aus einer Kaskade biochemischer Redoxreaktionen, in denen die aus dem Citratzyklus, der Glykolyse und dem Fettsäureabbau stammenden Substrate NADH und FADH₂ schrittweise zu NAD⁺ und FAD reduziert werden. Während der Reduktion der Substrate kommt es im Intermembranraum der Mitochondrien zum Aufbau eines Protonengradienten, der zur Synthese des zellulären Energieträgers ATP aus ADP und Phosphat genutzt wird. Der Protonengradient dient jedoch nicht nur der ATP-Gewinnung, sondern auch der Thermogenese. Hierzu bedarf es spezieller die Atmungskette entkoppelnde Proteine [41]. Die folgende Abbildung stellt die Atmungskette dar.

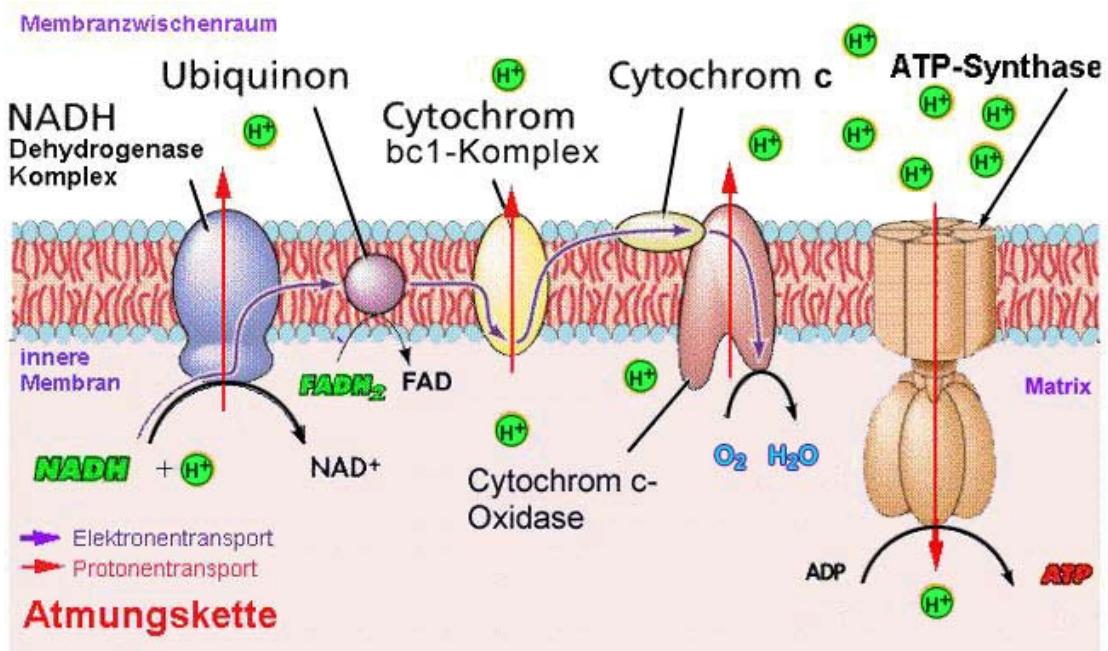


Abb. 4: Die Atmungskette: Dargestellt sind die einzelnen Komplexe mit den in ihnen ablaufenden Reaktionen sowie der Transport der Elektronen entlang der Atmungskette (Abbildung aus <http://www.gaw-verden.de/Fachgruppen/FG-Chemie/hefe/Hefeskript-2003.htm>)

1.2.4 ROS und oxidativer Stress

Als reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) bezeichnet man alle Sauerstoffformen, die eine höhere Reaktivität als molekularer Sauerstoff besitzen. Zu ihnen gehören unter anderem freie Radikale wie das Hyperoxidanion, angeregte Sauerstoffmoleküle sowie stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxyd (H_2O_2). Ihnen gemeinsam ist ein freies, das heißt ungepaartes Elektron, das die hohe Reaktivität der ROS erklärt.

ROS entstehen in den Mitochondrien als Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung durch den Verlust von Elektronen während ihres Transports entlang der Proteinkomplexe der Atmungskette und nachfolgender Reaktion mit molekularem Sauerstoff. Physiologische Funktionen erfüllen sie in der körpereigenen Abwehr von Viren und Bakterien sowie im Rahmen des kontrollierten Zellwachstums und der Signaltransduktion. Ihnen kommt eine wichtige Rolle in der Induktion des programmierten Zelltodes zu. Zu den körpereigenen Antioxidantien gehören sowohl enzymatische (unter anderem Katalase, Glutathionperoxidase, Hämoxygenase) als auch nicht-enzymatische Substanzen (unter anderem Vitamin A, C, E, Glutathion-Derivate, Harnsäure). Ihr Wirkmechanismus besteht in der Reduktion der reaktiven Sauerstoffspezies zu weniger reaktiven Produkten durch Donation eines freien Elektrons. Durch ungerichtete Reaktionen mit den sie umgebenden Strukturen in dem Bestreben, sich ein weiteres Elektron anzueignen, entfalten ROS toxische Wirkungen wie mutagene DNA-Schädigungen und Veränderungen der Genexpression und Zellfunktionen bis hin zum Zelltod.

Unter oxidativem Stress versteht man ein Ungleichgewicht zwischen dem Auftreten von ROS und den vorhandenen antioxidativen Schutzmechanismen. Überwiegen die entstehenden ROS die reduktiven Kapazitäten der Antioxidantien, ist der Organismus den potentiell toxischen und mutagenen Wirkungen der ROS ausgesetzt. Es kommt zu zunehmenden Schäden der DNA (Basenschäden und Einzelstrangbrüche, seltener auch Doppelstrangbrüche) sowie der Zellstrukturen. Die Funktionsfähigkeit der Zelle wird in der Folge herabgesetzt.

Sowohl in der Zellalterung als auch in der Tumorgenese spielt oxidativer Stress eine Rolle. Darüber hinaus wird eine entscheidende Beteiligung des oxidativen Stresses an der Entstehung vieler chronischer Erkrankungen postuliert [42]. Chronische ROS-

Exposition hat einen schädigenden Effekt sowohl auf die mitochondriale als auch auf die nukleäre DNA [43]. In niedrigen Konzentrationen wirken ROS auf die DNA mutagen, in hohen wirken sie dagegen zytotoxisch [44].

Insbesondere die mitochondriale DNA ist aufgrund ihrer räumlichen Nähe sowie mangelhaft ausgeprägter Reparaturmechanismen den schädigenden Einflüssen der ROS ausgesetzt. In Abwesenheit effektiver DNA-Reparaturmechanismen akkumulieren diese Schäden in den Mitochondrien. Die mitochondrialen Funktionen werden dadurch meist nicht wesentlich beeinträchtigt. Allerdings können die entstandenen Schäden im Zusammenspiel mit anderweitig aufgetretenen vorbestehenden Mutationen der mitochondrialen DNA dazu führen, dass sich die Menge der während der OXPHOS anfallenden ROS verändert. Diesen Effekt können polymorphe Mitochondrien auch allein bewirken [45].

Vermehrter Anfall von ROS wiederum führt zu erhöhtem oxidativen Stress in der betroffenen Zelle mit den oben beschriebenen potentiellen Auswirkungen auf die nukleäre DNA und die zellulären Proteine. Aus diesem Grund können durch mutierte Mitochondrien veränderte Mengen an ROS zu somatischen Mutationen in den betroffenen Zellen führen.

1.2.5 Mitochondrien und ihre Funktion in der Apoptoseregulation

In der Biologie können zwei Formen des Zelltodes unterschieden werden. Jede Zelle verfügt über einen Mechanismus zur gezielten Zerstörung ihrer selbst. Dieser programmierte Zelltod, Apoptose genannt, ist ein aktiver, kaskadenartig ablaufender Vorgang. Es kommt zur Aktivierung kataboler Enzyme und zu charakteristischen Veränderungen der Kernmorphologie (Chromatinkondensation). Die zellulären Proteine werden gezielt abgebaut und die DNA fragmentiert. Im Gegensatz dazu findet bei der Nekrose kein gerichteter Abbau der zellulären Bestandteile statt. Hier kommt es zu einem Anschwellen des Zytoplasmas und der mitochondrialen Matrix. Letztlich führt dies zur Ruptur der Zellmembran und damit zur totalen Zerstörung der Zelle.

Für jeden Organismus ist die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod essentiell. Eine verminderte Apoptosebereitschaft ist Kennzeichen maligner Zellen. Die Apoptosebereitschaft kann für die Effektivität antitumoraler Chemotherapeutika maßgeblich sein.

Bei der Apoptose kann ein extrinsischer von einem intrinsischen Aktivierungsweg unterschieden werden. Der extrinsische Weg spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort und der Bekämpfung von Tumorzellen. Die Stimulation des intrinsischen (mitochondrialen) Wegs der Apoptose erfolgt über das proapoptotische Protein Bid, welches durch die aktivierte Caspase 8 freigesetzt wird [46]. Eine Aktivierung kann darüber hinaus auch durch Stressoren wie UV-Strahlung, zytotoxische Substanzen, ROS oder Entzug von Wachstumsfaktoren erfolgen. Die Signalvermittlung übernehmen Proteine der Bcl-2-Familie [47].

Mitochondrien verfügen über einen unspezifischen Kanal in ihrer inneren Membran, den Mitochondrial Permeability Transition Pore (mtPTP), der durch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert wird [48, 49]. Der innere Membranraum der Mitochondrien enthält eine Reihe von den Zelltod fördernde Faktoren [50-53].

Die Öffnung der Membranpore führt zum Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials, Anschwellen der inneren Mitochondrienmembran und Freisetzung der apoptosefördernden Substanzen. Die Öffnung der mtPTP kann durch exzessive Calciumaufnahme in das Mitochondrium, erhöhte ROS-Exposition oder verminderte mitochondriale Energieproduktion gefördert werden. Ein signifikanter Anstieg von mt16s-rRNA-Zerstörung wird als ein frühes Ereignis der Apoptose gewertet [54-57].

Mitochondriale Mutationen oder Polymorphismen, die die Stabilität der rRNA beeinflussen, können also über Untergang oder Proliferation der Zelle entscheiden. Ebenso können sich Veränderungen der Mitochondrienfunktionen durch Mutationen oder Polymorphismen sekundär auf die Regulation der Apoptose auswirken.

Neuere Forschungen legen nahe, dass Mitochondrien über ein autonomes System verfügen, das ihnen erlaubt, im Falle irreparabler Schädigung selbständig zu degradieren. Dieser Vorgang des kontrollierten Untergangs wird analog zur Apoptose der Zelle als Mitoptose bezeichnet [58]. Vermehrte Mitoptosen durch ein erhöhtes Aufkommen von ROS und den dadurch entstehenden oxidativen Stress können die Apoptose der beherbergenden Zelle zur Folge haben, da durch den Abbau der Mitochondrien in vermehrtem Maße Cytochrom C und andere Apoptose-induzierende Faktoren ins Zytoplasma freigesetzt werden. Die Apoptosekaskade ist im Folgenden schematisch dargestellt:

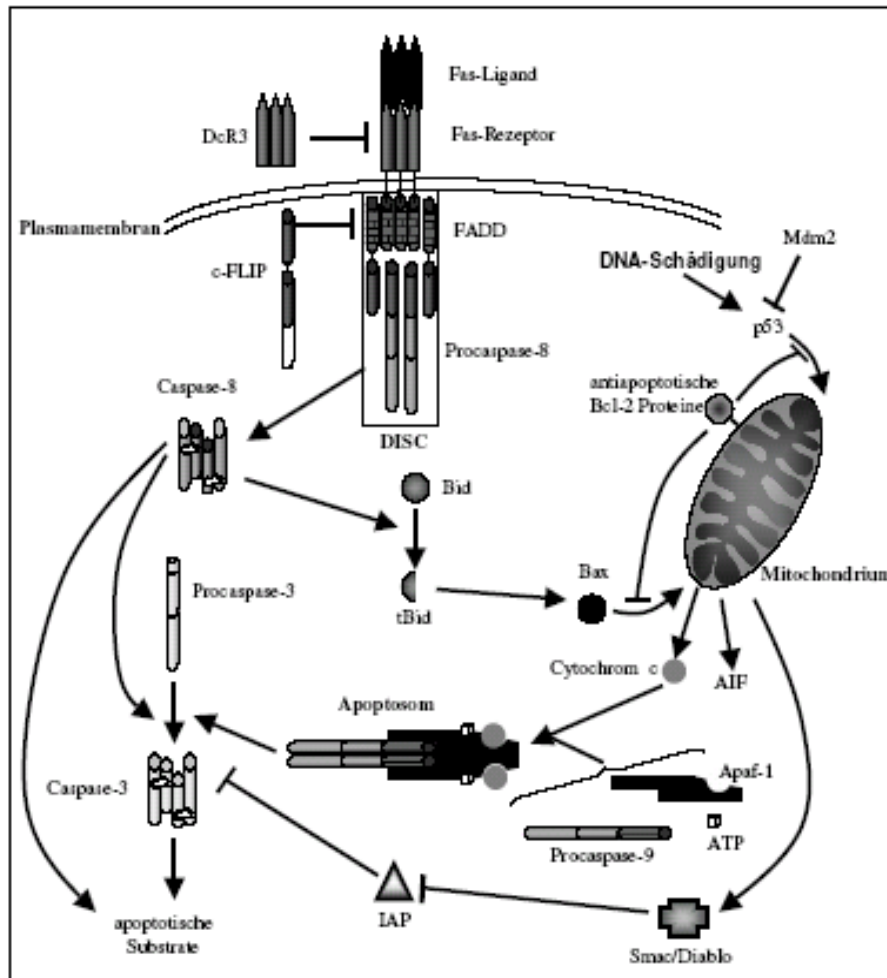


Abb. 5: Die Apoptosekaskade: Die extrinsische Aktivierung erfolgt über Bindung des auslösenden Agens an membrangebundene Rezeptoren, die intrinsische über intrazelluläre Signale. Sowohl extrinsischer als auch intrinsischer Weg der Apoptose münden in die Chromatinkondensation und Fragmentierung der DNA (Abbildung modifiziert aus Thiede B „Proteomanalyse des Ribosoms und von Komponenten der Apoptose in T-Zellen“ Habilitation HU-Berlin 2003)

1.2.6 Mitochondriale Pseudogene

Das nukleäre Genom enthält Kopien mitochondrialer Sequenzen, die im Laufe der Evolution vom Mitochondrium in den Nukleus transferiert und in die nukleäre DNA integriert wurden [59, 60]. Der Transfer mitochondrialer DNA-Sequenzen ist ein evolutionärer Prozess, der weiter andauert. In HeLa-Zellen konnten Insertionen mitochondrialer DNA in nichtkodierenden Abschnitten sowie in Exon 2 und 3 des c-myc-Onkogens nachgewiesen werden [60, 61]. Ob der Transfer und die Integration

mitochondrialer DNA-Sequenzen einen Einfluss auf die Genexpression haben und damit einen Schritt in der Karzinogenese darstellen, ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Im Kern lokalisierte mtDNA Fragmente, sogenannte mitochondriale Pseudogene, konnten sowohl durch Amplifikation von DNA mitochondriendepletierter Zellen (ρ° -Zellen), als auch durch Klonierung aus Genbanken nachgewiesen werden. Bei der Mutationsanalyse des mitochondrialen Genoms ist es demnach möglich, irrtümlich Mutationen mitochondrialen Genen zuzuordnen, die jedoch nukleären Pseudogenen entstammen [62] [60, 63]. Bei Patienten mit Morbus Alzheimer wurde das Vorkommen mehrerer heteroplasmischer missense-Mutationen beschrieben [64]. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass es sich bei diesen scheinbaren mtDNA-Mutationen um Pseudoheteroplasmien handelt, die der PCR-Co-Amplifikation nukleärer Pseudogene entstammen [60]. Der Ausschluss versehentlicher Co-Amplifikationen nukleärer Pseudogene ist demnach bei einer Mutationsanalyse des mitochondrialen Genoms von großer Wichtigkeit. Nur wenn sicher behauptet werden kann, ausschließlich mitochondriale Sequenzen analysiert zu haben, lassen sich verlässliche Aussagen über das Vorliegen mitochondrialer Veränderungen treffen.

1.2.7 Heteroplasmie und replikative Segregation

Tritt eine Mutation der mitochondrialen DNA auf, so enthält die betroffene Zelle zunächst sowohl den Wildtyp der mtDNA (wt) als auch die mutierte Form der mtDNA (mt). Dieser Zustand wird als Heteroplasmie bezeichnet. Teilt sich diese Zelle, werden die Mitochondrien dem Zufallsprinzip folgend auf die Tochterzellen verteilt. Dieses Prinzip wird als replikative Segregation bezeichnet. Gewebsabhängig kann es so zu einer unterschiedlichen quantitativen Verteilung der mutierten mtDNA kommen. Mit dem Heteroplasmiegrad wird diese Verteilung prozentual beschrieben.

Der Anteil an mutierter mtDNA kann im Laufe der Zeit variieren und im Verlauf weiterer Zellteilungen wiederum zu einem Zustand der Homoplasmie führen, bei der nur ein mtDNA-Subtyp in der Zelle enthalten ist (homoplasmic Drift) [65]. Der genaue Mechanismus, der zur Homoplasmie in einer Zelle führt, ist bisher nicht bekannt. Mögliche Erklärungen finden sich in der zufälligen Verteilung der Mitochondrien auf die Tochterzellen während der Zellteilung, die den Gesetzen der Wahrscheinlichkeitsrechnung folgend zu einem homoplasmischen Zustand führen kann. Ebenso ist eine

klonale Expansion oder Selektion des Mutanten gegenüber dem Wildtyp denkbar, wenn damit ein genetischer Vorteil erreicht wird und diese Zellen selektiv besser proliferieren und/oder überleben. Des Weiteren wurden unterschiedliche Replikationsraten mutierter und Wildtyp-mtDNA beschrieben. Insgesamt zeigen stark proliferierende Zellen eine erhöhte Tendenz zur Homoplasmie.

Zellen, die einen Schwellenwert an mutierten Mitochondrien erreichen, sind in ihren Funktionen beeinträchtigt. Die mtDNA enthält keine Introns. Deswegen finden sich die meisten Mutationen in kodierenden Sequenzen. Diese Mutationen können eine Kaskade von Ereignissen in Gang setzen, an deren Ende wiederum eine erhöhte Produktion von ROS steht [65]. In dieser Atmosphäre erhöhten oxidativen Stresses können karzinogene Prozesse gefördert werden.

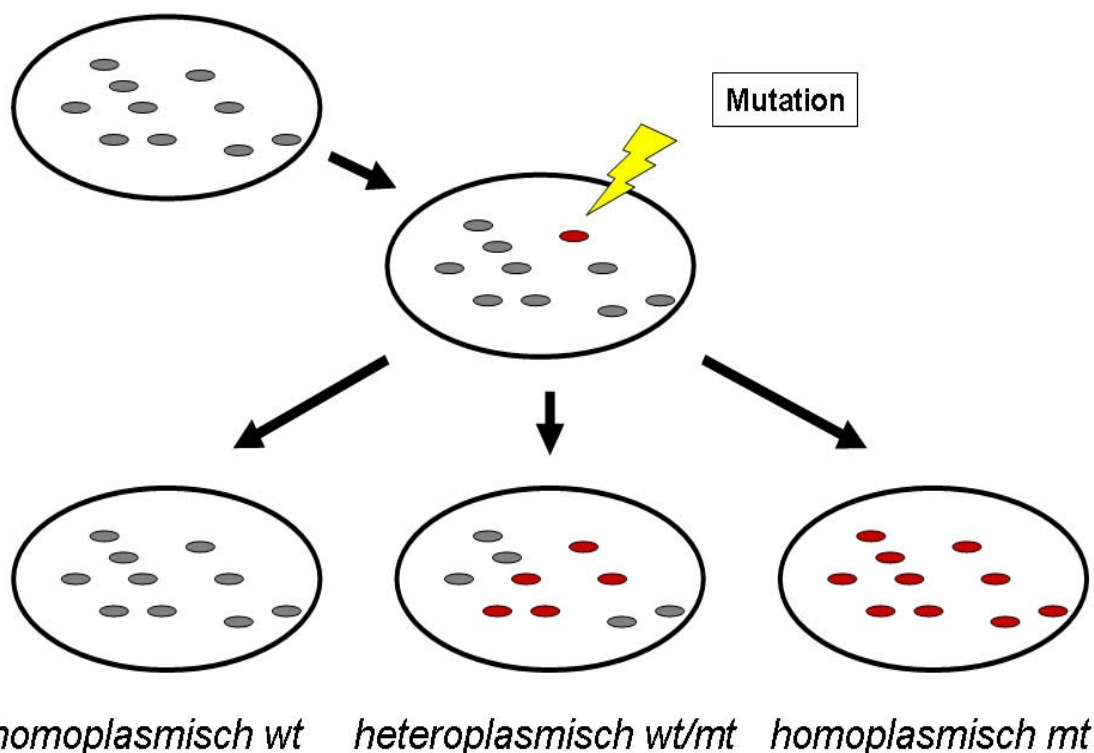


Abb. 6: Replikative Segregation: Oben links die homoplasmisch den Wildtyp (wt) der Mitochondrien enthaltende Zelle. Nach einem Mutationsereignis enthält sie heteroplasmisch sowohl wt als auch mutierte (mt) Mitochondrien. Im Rahmen der Zellreplikation werden die Mitochondrien zufällig auf die Tochterzellen verteilt, diese können homoplasmisch wt, heteroplasmisch wt/mt oder homoplasmisch mt – Mitochondrien enthalten.

1.2.8 Mutationen der mitochondrialen DNA

Aus folgenden Gründen ist die mitochondriale DNA besonders anfällig für Mutationen:

1. Die mitochondriale DNA wird kontinuierlich während des gesamten Zellzyklus repliziert. Dies macht sie anfällig für toxische Einflüsse, die besonders während der DNA-Synthese wirksam werden. Dazu zählen insbesondere die durch ROS verursachten Schäden. Die mtDNA liegt in der mitochondrialen Matrix sehr nahe an den während der oxidativen Phosphorylierung entstehenden ROS.
2. Die mitochondriale DNA wird im Gegensatz zur nukleären DNA nicht durch Histone und eine Chromatinstruktur geschützt.
3. Mitochondrien verfügen nur über eingeschränkte DNA-Reparaturmechanismen. Zwar sind Basenexzisionsreparatur (BER), Basenfehlpaarungsreparatur, Mismatch-Reparatur- und Rekombinations-Reparaturmechanismen vorhanden, doch fehlt bisher der Nachweis einer Nukleotidexzisionsreparatur (NER) [66]. ROS-induzierte DNA-Schäden, die abhängig von ihrer Einwirkungsdauer auf den Zellkern in diesem repariert werden konnten, bedingen unter gleichen Bedingungen im Mitochondrium Wachstumsstillstand und Apoptose [67].
4. Da das mitochondriale Genom keine Introns enthält, ist die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Beeinträchtigung des Genoms durch eine Mutation erhöht.

In der Tat liegt die Mutationsrate der mtDNA um das Zehn- bis Zwanzigfache über der der nukleären DNA [35, 68]. Je nach Lokalisation können mtDNA-Mutationen klinisch stumm sein oder zu Einschränkungen der mitochondrialen Funktionen und klinischen Symptomen führen.

Bei zu starker pränataler mtDNA-Schädigung kommt es zur Unterbrechung der Keimentwicklung. Ist die Mutation mit dem Leben vereinbar, sind Zeitpunkt und Ausmaß des Auftretens klinischer Symptome davon abhängig, wie sehr die Atmungskette und damit die Energieversorgung der Zelle von Geburt an beeinträchtigt ist und wie rasch weitere somatische Mutationen der mtDNA hinzukommen [69]. Hierbei definierte Wallace 1994 einen Schwellenwert, der den Punkt kennzeichnet, an dem ein Organismus nicht mehr in der Lage ist, die durch die Mutationen bedingte Störung zu kompensieren [70]. Ein Zusammenhang zwischen mtDNA-Mutationen und bestimmten Erkrankungen ist seit Ende der 80er Jahre bekannt. Bei Patienten mit Leber'scher hereditärer Opticusneuropathie (LHON) konnte ein Basenaustausch der mtDNA

nachgewiesen werden, der eine Missense-Mutation zur Folge hatte [71]. Bei Patienten mit mitochondrialen Myopathien wurden große Deletionen der mtDNA entdeckt [72]. Die Pathogenese verschiedener hereditärer neuromuskulärer Erkrankungen wurde durch den Nachweis spezifischer mitochondrialer DNA-Defekte klarer. Neben ZNS und Muskulatur können auch andere Strukturen, wie z.B. die Leber oder die Nieren von mtDNA-Defekten betroffen sein. Häufig sind mehrere Gewebe gemeinsam in ihren Funktionen eingeschränkt. Eine Auswahl von Erkrankungen, die mit mtDNA-Mutationen in Verbindung gebracht werden können, zeigt folgende Tabelle.

Tab. 2 Beispiele für mitochondriale oder mit mitochondrialen Defekten assoziierte Erkrankungen

Mitochondriale Enzephalomyopathie, Lactatazidose und Schlaganfall (MELAS)

Myoklonus-Epilepsie mit „ragged red fibres“ (MERRF)

Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa (NARP)

Mitochondriale neurogastrointestinale Enzephalomyopathie (MNGIE)

Subakute nekrotisierende Enzephalomyopathie (Leigh-Syndrom)

Pearson-Marrow-Pancreas-Syndrom

Kearns-Sayre-Syndrom

Leber'sche hereditäre Optikusneuroretinopathie (LHON)

Chronisch progrediente externe Ophthalmoplegie (CPEO)

Aminoglykosid-assoziierte Taubheit

Diabetes mit Taubheit

1.2.9 Mitochondrien und ihre Bedeutung für die Kanzerogenese

Die mitochondriale Elektronentransportkette ist bekannt als einer der größten zellulären Erzeuger von ROS. Es gibt Hinweise darauf, dass mtDNA Mutationen zu einer Zunahme der produzierten ROS führen, was wiederum eine gestörte oxidative Phosphorylierung bewirkt [73]. Dieses führt dann zu oxidativem Stress, der potentiell DNA-Schäden verursacht.

Um die Bedeutung von ROS in Hinblick auf Zellschäden zu beweisen, produzierte man Mn-SOD (superoxide dismutase)-Knock-Out-Mäuse. Experimente mit diesen Mäusen zeigten deutlich, dass die mitochondriale ROS-Produktion in vivo ein physiologisch bedeutsamer Prozess ist. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die mitochondriale Superoxiddismutase essentiell ist, um die Funktionen mitochondrienreicher Organe (Gehirn, Herz, Leber) aufrechtzuerhalten [74].

Um herauszufinden, ob die mutierte mtDNA direkt verantwortlich ist für verstärktes Tumorstadium und ob dieses ebenfalls mit verstärkter ROS-Produktion korreliert, wurde ein Mausmodell verwendet. In dieses Modell wurde die mtDNA T8993G Mutation in die PC3 Prostata-CA Zelllinie durch Cybrid-Transfer eingefügt [75]. Die T8993G Mutation in der mtDNA führt zu einer Änderung der kodierten Aminosäure von Leucin zu Arginin an Position 156 der ATP6-Untereinheit der mitochondrialen F1F0-ATPase. Bei zwei mitochondrialen Erkrankungen ist diese Mutation mit einer verringerten Funktionsfähigkeit der OXPHOS assoziiert: NARP (neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa) and MILS (maternally inherited Leigh syndrome) [76]. Die T8993G Cybrid-Zellen wurden hernach bezüglich ihres Tumorstadiums in Nacktmäusen getestet und zeigten siebenfach größere Tumoren als die Wildtyp-Cybriden (T8993T). Darüber hinaus generierten die mutierten Tumore signifikant mehr ROS [75]. Diese Daten zeigen deutlich, dass mtDNA-Mutationen eine wichtige Rolle in der Entwicklung maligner Zellen einnehmen und dass es sich hierbei nicht lediglich um Sekundäreffekte nukleärer Ereignisse handelt. Daten von Shidara et al. [77] zeigten, dass die Mutationen im ATP6-Gen zum Tumorstadium beitragen. Dies geschah nicht, indem sie zu Mehranfall von ROS führten, sondern weil die Zellen, welche die Mutation trugen, weniger Apoptoseaktivität zeigten. Dies weist darauf hin, dass pathogene mtDNA-Mutationen in Tumoren nicht nur die OXPHOS deregulieren und zu erhöhter ROS-Produktion führen sondern auch Apoptose verhindern können.

In diversen Tumorentitäten konnten bereits somatische Mutationen der mitochondrialen DNA nachgewiesen werden [45, 78-88]. Punktmutationen im Bereich des D-loops und verschiedene Deletionen sowie Insertionen zeigten sich vor allem in kolorektalen und Magenkarzinomen. Dabei fanden sich für das kolorektale Karzinom spezifische Mutationen, die jedoch allein zu keinem Funktionsverlust der betroffenen Mitochondrien führen. Auslösend für veränderte zelluläre ROS-Niveaus scheint vielmehr ein

Zusammenspiel von gefundenen tumorspezifischen Mutationen mit natürlich vorkommenden Polymorphismen der mtDNA zu sein [45].

Mutationen, die die kodierenden Bereiche der Atmungskettenuntereinheiten Ubichinon, Cytochrom C-Oxidoreduktase und Cytochrom C-Oxidase betreffen, wurden vermehrt mit hepatozellulären Karzinomen in Verbindung gebracht [89]. Ebenso konnten mtDNA-Mutationen in Bronchialkarzinomen und Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches detektiert werden, die sich insbesondere in der D-loop-Region sowie den kodierenden Bereichen für die 16s rRNA und die NADH-Untereinheiten des Komplexes 1 der Atmungskette finden. Diese Mutationen konnten ebenfalls in aus Urin, Speichel und Bronchiallavagen isolierten Mitochondrien entsprechender Patienten nachgewiesen werden. [90, 91].

Wong et al. wiesen verschiedene Mutationen in Medulloblastomzellen nach, die auch in den korrespondierenden Liquorproben gefunden werden konnten. Sechs von 15 Fällen beherbergten mindestens eine mtDNA-Mutation. Sieben von acht Liquorproben enthielten mutierte mtDNA. Patienten, deren Liquor nach Therapie frei von mtDNA Mutationen war, bzw. solche, deren Liquor andere Mutationen als die im Primärtumor gefundene zeigte, erlitten kein Rezidiv, während bei einem weiteren Patienten, in dessen Liquor nach Therapie persistierende Mutationen gefunden wurden, ein Tumorrezidiv auftrat [80]. Die im Liquor nachweisbaren Veränderungen in der mitochondrialen DNA könnten also als Marker für die Tumorprogression und die Rezidivwahrscheinlichkeit genutzt werden. Die Arbeitsgruppe um Kirches et al. wies höhergradige Sequenzvariabilitäten in der D-loop-Region von Astrozytomen der WHO-Grade II und III nach. Darüber hinaus konnte sie zeigen, dass in diesen Tumoren die im Vergleichsmaterial vorhandene Heteroplasmie im D-loop fast gänzlich zugunsten einer homoplasmischen Situation verloren gegangen war [92]. Die von der gleichen Arbeitsgruppe erhobenen Daten an Glioblastoma multiforme legen nahe, dass in diesen Tumoren Mechanismen, die zur Entstehung von mtDNA-Polymorphismen beitragen, sehr aktiv sind und somit somatische Mutationen verursachen [93]. Somatische Mutationen der mtDNA konnten auch in plexiformen und kutanen Neurofibromen von Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 (NF1) identifiziert werden. Dabei fiel auf, dass die beim selben Patienten gefundenen Mutationen in Tumoren unterschiedlicher Lokalisation identisch waren. Verglichen zum Normalgewebe wies das Tumorgewebe dabei einen weitaus höheren Anteil mutierterterter mtDNA auf [94].

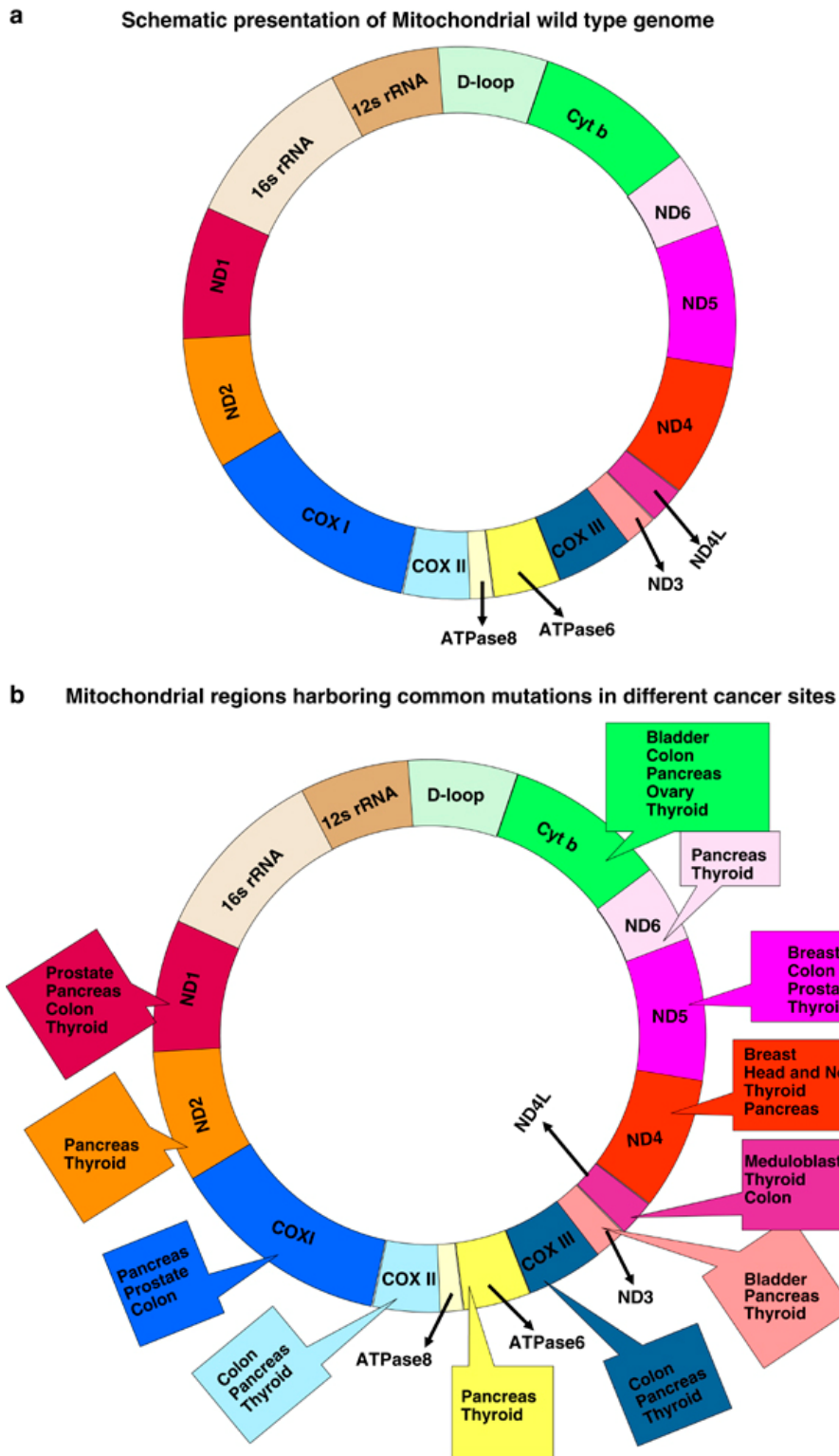


Abb. 7: Mutationen der mtDNA: In vielen Tumorentitäten konnten Mutationen des mitochondrialen Genoms nachgewiesen werden. Diese befinden sich in beinahe allen Regionen des mitochondrialen Genoms. Ob aus dem Auftreten der Mutationen und der Tumorentwicklung eine Kausalität abgeleitet werden kann, ist nicht endgültig geklärt. (Abbildung aus: Mitochondrial DNA mutations in human cancer, A Chatterjee, E Mambo and D Sidransky, *Oncogene* (2006) 25, 4663–4674)

Tumorzellen werden als metabolisch aktive Zellen angesehen, deren Glykolyserate erheblich gesteigert ist. Es ist also anzunehmen, dass die Effektivität der OXPHOS in Tumorzellen nicht ausreichend ist, um deren Energiebedarf zu decken. Ursächlich kann hierbei eine eingeschränkte mitochondriale Funktionsfähigkeit sein.

In der Theorie des Alterns können Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Mutationen der mitochondrialen DNA und dem vermehrten Anfall von ROS hergestellt werden. Die Einschränkung der mitochondrialen Funktionsfähigkeit hat also Einfluss auf den fortschreitenden Verlust zellulärer Funktionen und die Akkumulation von Defekten.

In der Karzinogenese sind veränderte Zellfunktionen von entscheidender Bedeutung. Sowohl Verlust von Mechanismen als auch deren ungeordneter, unsteuerbarer Ablauf sind Merkmale von Tumorzellen. Für eine Beteiligung der Mitochondrien an der komplexen Transformation einer gesunden Zelle zur Tumorzelle sprechen folgende Punkte:

1. Mitochondrien kommt eine entscheidende Rolle in der Apoptose zu. Ein wichtiger Schritt in der Reaktionskaskade der Apoptose ist die Permeabilitätserhöhung der mitochondrialen Membran durch Ausbildung einer Membranpore. Hierdurch kommt es zum Abfall des mitochondrialen Membranpotentials und Auslösung der irreversiblen Abbauvorgänge. Die Zusammensetzung dieser Pore unterscheidet sich bei normalen und malignen Zellen und kann somit die Schwelle zur Auslösung der Apoptose verändern [95]. Veränderungen der Bereitschaft zur Apoptose sind wichtige Eigenschaften von Tumorzellen.
2. Mitochondrien generieren das für die Ausbildung des mitotischen Spindelapparates notwendige ATP. Für die genetische Stabilität proliferierender Zellen ist die präzise Verteilung der Chromosomen während der Zellteilung sehr wichtig. Dies gewährleistet der Spindelapparat, dessen Funktionen in hohem Maße ATP-abhängig sind [96]. So wird ATP unter anderem für den Aufbau von Mikrotubuli [97] und für den Antrieb von Motorproteinen benötigt, die Richtung und Geschwindigkeit der Chromosomenwanderung beeinflussen [98, 99]. Eine verminderte ATP-Produktion als Folge einer durch mitochondriale Mutationen gestörten Funktion der OXPHOS kann somit als Ursache für fehlerhafte Segregation der Chromosomen angesehen werden. Aneuploidie und

ausgeprägte chromosomale Deletionen wiederum sind Merkmale vieler Tumorzellen [100].

3. Mitochondrien sind entscheidend an der de-Novo-Pyrimidinsynthese beteiligt. Das Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH) führt den vierten Schritt der Pyrimidinsynthese aus. Es ist an der inneren Mitochondrienmembran verankert. In seiner Funktion ist es von einer intakten Atmungskette abhängig [101]. Eine Blockierung der Atmungskette führt zu einer Verminderung der Konzentration an Pyrimidinnukleotiden. Das daraus resultierende Nukleotidungleichgewicht könnte die Replikation der nukleären DNA behindern und gleichzeitig die Mutationsrate erhöhen [102].

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Somatische Mutationen der mitochondrialen DNA konnten bereits in vielen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Für die Gruppe der pilozytischen Astrozytome liegt jedoch noch keine Mutationsanalyse des kompletten mitochondrialen Genoms vor. Diese soll im Rahmen dieser Promotionsarbeit an einem Kollektiv von 19 Patienten mit pilozytischem Astrozytom durchgeführt werden. Dazu wurde das mitochondriale Genom der 19 Tumorproben vollständig sequenziert und auf auftretende somatische Mutationen hin untersucht. Zum Vergleich wurde die mtDNA aus Blutleukozyten derselben Patienten ebenfalls sequenziert und auf Mutationen hin untersucht.

Da es sich bei den pilozytischen Astrozytomen um die häufigsten Hirntumoren im Kindesalter handelt, liegt es nahe, diese Gruppe auch auf molekularbiologischer Ebene charakterisieren zu wollen, um eine möglichst genaue Aussage über das Tumorverhalten treffen und eine bessere Therapiestratifikation durchführen zu können. Ebenso könnten sich aus den Erkenntnissen über den Einfluss von Mitochondrien auf die Tumorgenese neue Ansatzpunkte für eine spezifische Therapie ergeben. Mitochondrien befinden sich nicht unter der strengen Kontrolle des Zellzyklus und stellen damit ein interessantes Ziel für neue Ansätze in der antitumoralen Behandlung dar.

Hieraus ergeben sich folgende Fragen:

1. Weisen pilozytische Astrozytome somatische Mutationen ihrer mitochondrialen DNA auf?
 - 1.1. Liegen diese Mutationen in hetero- oder homoplasmischer Form vor?
 - 1.2. Sind die Mutationen spezifisch für pilozytische Astrozytome?
 - 1.3. Wie unterscheidet sich das Spektrum der gefundenen Mutationen von denen anderer Tumorentitäten?

2. Korrelieren die somatischen Mutationen in pilozytischen Astrozytomen mit Lokalisation und progressionsfreiem Überleben?
 - 2.1. Sind bei unterschiedlicher Lokalisation auch unterschiedliche Mutationen vorhanden?
 - 2.2. Lassen die vorhandenen Mutationen Aussagen über das Ansprechen der Tumoren auf Chemo- oder Radiotherapie zu?
 - 2.3. Weisen progrediente Tumoren differente Mutationsmuster im Vergleich zu denen nicht-progredienter Tumoren auf?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patientenkollektiv

Als Untersuchungsmaterial diente Tumorgewebe von 37 Patienten mit histologisch gesichertem pilozytischen Astrozytom. Als Kontrollmaterial wurden Blutproben derselben Patienten verwendet. Von ursprünglich 37 Patienten konnten insgesamt 19 Patienten in die kompletten Untersuchungen eingeschlossen werden. Die DNA der übrigen 18 Patienten konnte aufgrund mangelhafter DNA-Qualität oder Amplifizierbarkeit in der Long Range-PCR nicht vollständig sequenziert werden. 17 der ausgewerteten Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung unter 18 Jahre alt, zwei Patienten wurden trotz ihres höheren Alters (37 bzw. 40 Jahre bei Diagnosestellung) in die Untersuchungen mit eingeschlossen, um das Kollektiv auf annähernd 20 Patienten zu erweitern. Entscheidend war hier die histologische Diagnose eines pilozytischen Astrozytoms. Zehn Patienten waren männlich, sieben waren weiblichen Geschlechts. Bei zwei Patienten konnte hierzu keine Angabe gemacht werden. Tumorlokalisierung, erfolgte Therapie, ggf. Rezidivaufreten sowie derzeitiger Status der Erkrankung sind in Abbildung 8 aufgeführt. Sieben Patienten wurden an der Charité-Universitätsmedizin Berlin behandelt. Diese Proben wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. A. von Deimling zur Verfügung gestellt. Fünf Patientenproben entstammen der Tumordatenbank des Kompetenznetzes „Pädiatrische Onkologie und Hämatologie“, sieben Proben stellte Herr Prof. Dr. med. T. Pietsch aus der Tumordatenbank der Neuropathologie des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung. Das Tumorgewebe wurde intraoperativ gewonnen, unmittelbar nach der Operation schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert. Die Blutproben wurden intraoperativ oder zu einem späteren Zeitpunkt entnommen.

Tab. 3: Klinische Informationen zu den Patienten

Patient.	Geschlecht	Alter bei Dg ² (Jahre)	Tumorklassifikation	Therapie	Rezidiv	derzeitiger klinischer Status
1	m	11	Fossa posterior	Totalresektion	nein	anhaltende Remission
2	m	7	Fossa posterior	Totalresektion	ja	anhaltende Remission
3	f	14	Fossa posterior	Totalresektion	nein	stable disease
4	f	8	Fossa posterior	Totalresektion	nein	anhaltende Remission
5	f	3	Cerebellum, Vermis	Totalresektion/ Chemotherapie	nein	anhaltende Remission
6	m	5	Fossa posterior	Totalresektion	nein	anhaltende Remission
7	f	n.k.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
8	m	37	Lobus temporalis links	n.b.	n.b.	n.b.
9	m	17	Cerebellum, li. Hemisphäre	n.b.	n.b.	n.b.
10	m	10	Cerebellum	n.b.	n.b.	n.b.
11	f	40	Lobus temporalis rechts	n.b.	n.b.	n.b.
12	n.b. ¹	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
13	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
14	m	17	Lobus parietalis links	n.b.	n.b.	n.b.
15	f	1.6	Vierter Ventrikel	subtotale Resektion	nein	anhaltende Remission
16	m	4	n.b.	n.b.	nein	n.b.
17	m	6	Cerebellum, Vermis	subtotale Resektion	nein	n.b.
18	m	9	Cerebellum, Vermis	Totalresektion	nein	anhaltende Remission
19	f	1.8	Cerebellum, Vermis	Totalresektion	nein	anhaltende Remission

Dg: Diagnose, m: männlich, w: weiblich, n.b.: nicht bekannt

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA-Isolierung aus Tumorgewebe und Blutleukozyten

Die DNA-Extraktion aus dem Tumorgewebe wurde den Angaben des Herstellers entsprechend mit dem Puregene DNA-Isolation Kit™ (Biozym Diagnostics GmbH, Oldendorf, Deutschland) durchgeführt. Das gleiche Kit kam bei der Extraktion der DNA aus den Blutleukozyten zum Einsatz. Diese Methode beruht auf einer modifizierten Salzpräzipitation und ermöglicht auch bei geringer Zellzahl eine optimale DNA-Ausbeute.

Zur DNA-Isolierung aus Vollblut wurde 1 ml Vollblut mit 3 ml Erythrozytenlysepuffer versetzt, gevortext und anschließend für zehn Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pipette abgezogen und das verbliebene

Pellet mit 300 µl Lysepuffer vermischt. Zur Isolierung von DNA aus dem Tumorgewebe wurden 5-10 mg homogenisiertes Gewebe mit 300 µl Lysepuffer und 1,5 µl Proteinase K bis zu 24 Stunden bei 55 °C inkubiert, um den Zellverband zu zerstören. Anschließend erfolgte die Proteinausfällung durch Zugabe von 100 µl Protein-Präzipitationslösung und nachfolgende Zentrifugation bei 13.000 x g für zehn Minuten. Nach der Zelllyse wurde die DNA durch Zugabe von 300 µl 100 % Isopropanol, vorsichtiges Invertieren und erneute Zentrifugation für zehn Minuten bei 13.000 x g ausgefällt. Es folgte ein Waschschriff mit 300 µl 70 % Ethanol zur Reinigung der gewonnenen DNA von Verunreinigungen und Isopropanolresten. Die Proben wurden mehrfach invertiert, der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und die Proben bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde durch Zugabe von 50 µl DNA-Hydrationslösung rehydriert. Für die nachfolgende PCR wurde die DNA mit Aqua dest. auf 15 ng/µl verdünnt und bei +4 °C gelagert. Mit dieser Methode wurde sowohl mitochondriale als auch nukleäre DNA isoliert.

Die Ausbeute und Reinheit der DNA wurden durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) mit einem Photometer (Eppendorf Biophotometer, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum der DNA) und 280 nm (Verunreinigung durch Proteine oder aromatische Substanzen) beurteilt. Das Photometer berechnet aus diesen Werten die Konzentration der DNA:

$$\begin{aligned} & \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml (1 OD von doppelsträngiger DNA)} \\ & = 50 \mu\text{g/ml H}_2\text{O)} \times \text{OD der gemessenen Probe } (\mu\text{g/ml}) \end{aligned}$$

3.2.2 Long Range-PCR zur Amplifizierung des mitochondrialen Genoms

3.2.2.1 Beschreibung der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur künstlichen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Sie ahmt die in vivo Replikation der DNA nach. Mithilfe einer Polymerase und eines 15-30 Basen umfassenden Oligonukleotids (Primer) sowie durch Zugabe eines Gemischs von dNTPs (Desoxyribonukleotidtriphosphate) als Bausteine der DNA-Synthese können gezielt spezifische Abschnitte eines DNA-Stranges in vitro synthetisiert werden. Die Basenabfolge des Primers, die komplementär zum Anfang des zu synthetisierenden DNA-Abschnitts sein muss, bestimmt dabei den Startpunkt der

Neusynthese. Abhängig von der Wahl der Polymerase ist es möglich, Abschnitte mit einer Größe von bis 20 kB zu amplifizieren.

Die PCR umfasst drei Reaktionsschritte, die sich nur in ihrer Reaktionstemperatur unterscheiden. Zunächst wird die doppelsträngige DNA denaturiert, so dass sie als Einzelstrang vorliegt. Im zweiten Schritt kommt es zur Bindung des Primers an den DNA-Strang. Der letzte Reaktionsschritt umfasst die Neusynthese eines DNA-Stranges durch die Polymerase. Ausgehend vom 3'-Ende des Primers wird ein zum Ursprungsstrang komplementäres DNA-Molekül synthetisiert.

Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Reaktionszyklus, in dem neben dem Ursprungsstrang auch die neusynthetisierte DNA als Matrize dient, kommt es zur exponentiellen Vermehrung des Ausgangssubstrats. Die Verwendung einer hitzestabilen Polymerase (Taq Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*) erlaubt eine automatisierte Durchführung der Reaktionszyklen, da die Polymerase nicht denaturiert und so nicht jedem Zyklus erneut hinzugefügt werden muss.

Unter Verwendung dieser Methode wurde jede Tumorprobe sowie deren korrespondierende Blutprobe amplifiziert. Die Verwendung spezieller Polymerasengemische erlaubt eine Amplifikation größerer DNA-Abschnitte (Long range-PCR). Zur Anwendung kam das Long Template PCR System™ (Roche, Mannheim, Deutschland), das die Amplifikation von Fragmenten bis zu einer Größe von 22 Kilobasen ermöglicht. Das Reaktionskit enthält neben der Taq-Polymerase noch eine Tgo-Polymerase aus dem Bakterium *Thermococcus gorgonarius*, die mit einer inhärenten 3'-5'-Exonuklease „proof-reading activity“ besitzt und so die Fehlerquote während der Neusynthese größerer DNA-Abschnitten minimiert. Um Co-Amplifikationen nukleärer Pseudogene auszuschließen, wurde die mitochondriale DNA in drei überlappenden Fragmenten mit einer Größe von jeweils ca. 6,5 Kilobasen (6,0 Kb, 5,8 Kb und 7,9 Kb) amplifiziert. Durch die Auswahl der Primer konnte sichergestellt werden, dass ausschließlich mitochondriale DNA amplifiziert wurde.

3.2.2.2 Primer

Die verwendeten Primer sind Teil eines von Wong et al. [103] etablierten Sets aus 32 Primerpaaren, das zusammen eine komplette Synthese der mitochondrialen DNA ermöglicht. Angaben zur genauen Sequenz und Position der Primer finden sich in den

folgenden Tabellen. Dabei gibt der Primernamen die genaue Position des Primers bezogen auf die revidierte Cambridge-Referenzsequenz wieder.

Tab. 4 Vorwärtsprimer

Genregion	Primernamen/-position	Sequenz
F	mtF 467	5'-CCC ATA CTA CTA ATC TCA TC-3'
12S	mtF 770	5'-CAA TGC AGC TCA AAA CGC-3'
V	mtF 1351	5'-GCA AGA AAT GGG CTA CAT-3'
16s.1	mtF 1706	5'-CCA GAC AAC CTT AGC CAA-3'
16s.2	mtF 2361	5'-GAA CTG ACA ATT AAC AGC-3'
L	mtF 3085	5'-ATC CAG GTC GGT TTC TAT-3'
ND1	mtF 3679	5'-TCA AAC TAC GCC CTG ATC-3'
IQM	mtF 4013	5'-CCC TCA CCA CTA CAA TCT T-3'
ND2.1	mtF 4444	5'-ATG TTG GTT ATA CCC TTC C-3'
ND2.2	mtF 4881	5'-CCC ATC TCA ATC ATA TAC C-3'
WANCY	mtF 5460	5'-GCC CTT ACC ACG CTA CTC C-3'
COI.1	mtF 5960	5'-CCT ATT ATT CGG CGC ATG-3'
COI.2	mtF 6606	5'-TTC TGA TTT TTC GGT CAC C-3'
SD	mtF 7234	5'-CCG ATG CAT AGA CCA CAT-3'
K	mtF 7804	5'-AGT CCT CAT CGC CCT CCC-3'
ATP6.1	mtF 8295	5'-CAC TGT AAA GCT AAC TTA GC-3'
ATP6.2	mtF 8416	5'-CCT TAC ACT ATT CCT CAT C-3'
COIII	mtF 9104	5'-TCA CAA TTC TAA TTC TAC TGA C-3'
GR1	mtF 9827	5'-CGT CAT TAT TGG CTC AAC-3'
GR2	mtF 10126	5'-GAC TAC CAC AAC TCA ACG-3'
ND4.1	mtF 10551	5'-TCC TCC CTA CTA TGC CTA-3'

ND4.2	mtF 11091	5'-CAG CCA CAG AAC TAA TCA T-3'
HSL	mtF 11688	5'-CCG GCG CAG TCA TTC TCA-3'
ND5.1	mtF 12239	5'-ACT CAT GCC TCC ATG TCT A-3'
ND5.2	mtF 12949	5'-AAC GCT AAT CCA AGC CTC-3'
ND6	mtF 13695	5'-CAT TAA ACG CCT GGC AGC-3'
E	mtF 14459	5'-ATA GCC ATC GCT GTA GTA G-3'
CYTB	mtF 15119	5'-GCA ACA GCC TTC ATA GGC T-3'
TP	mtF 15812	5'-GTA GCA TCC GTA CTA TAC-3'
Dloop1	mtF 16100	5'-ATT ACT GCC AGC CAC CAT-3'
Dloop2	mtF 16411	5'-CGT GAA ATC AAT ATC CGC-3'
Dloop3	mtF 159	5'-TAT CGC ACC TAC GTT CAA TA-3'

Tab. 5: Rückwärtsprimer

Genregion	Primernamen/-position	Sequenz
F	mtR 828	5-GTT AAG CAC TGC TGT TTC C-3'
12S	mtR 1424	5'- ATC CAC CTT CGA CCC TTA-3'
V	mtR 1762	5'-TAT CTA TTG CGC CAG GTT-3'
16s.1	mtR 2454	5'-CCT TTC CTT ATG AGC ATG C-3'
16s.2	mtR 3135	5'- TGT CCT TTC GTA CAG GGA-3'
L	mtR 3758	5'-AGT AGA ATG ATG GCCT AGG GTG AC-3'
ND1	mtR 4051	5'- GTC ATA TGT TGT TCC TAG G-3'
IQM	mtR 4508	5'-GAT GGT AGA GTA GAT GAC G-3'
ND2.1	mtR 4917-na	5'-GCT TAC GTT TAG TGA GGG A-3'
ND2.2	mtR 5539-na	5'-TTG AAG GCT CTT GGT CTG-3'
WANCY	mtR 6016	5'-CGA ATA AGG AGG CTT AGA G-3'

COI.1	mtR 6656	5'-GAA GCC TGG TAG GAT AAG-3'
COI.2	mtR 7282	5'-GAA TGA GCC TAC AGA TGA T-3'
SD	mtR 7921	5'-GAA GAT TAG TCC GCC GTA G-3'
K	mtR 8380	5'-ATT TAG TTG GGG CAT TTC ACT TTA-3'
ATP6.1	mtR 8600	5'-AGA ATG ATC AGT ACT GCG G-3'
ATP6.2	mtR 9169	5'-TGA AAA CGT AGG CTT GGA T-3'
COIII	mtR 9868	5'-CGG ATG AAG CAG ATA GTG-3'
GR1	mtR 10286	5'-TGG TAG GGG TAA AAG GAG-3'
GR2	mtR 10629	5'-GCA CAA TAT TGG CTA AGA G-3'
ND4.1	mtR 11150	5'-CCA AGG TGG GGA TAA GTG-3'
ND4.2	mtR 11757	5'-TTT GAG TTT GCT AGG CAG A-3'
HSL	mtR 12360	5'-GGT TAT AGT AGT GTG CAT G-3'
ND5.1	mtR 13086	5'-TTC CTG CTA CAA CTA TAG TG-3'
ND5.2	mtR 13738	5'-TGA GAA ATC CTG CGA ATA G-3'
ND6	mtR 14449	5'-TAT TTA GGG GGA ATG ATG G-3'
E	mtR 15185	5'-GGC GGA TAG TAA GTT TGT-3'
CYTB	mtR 15863	5'-CAA TTA GGG AGA TAG TTG G-3'
TP	mtR 16133	5'-GTA CCG TAC AAT ATT CAT G-3'
Dloop1	mtR 16543	5'-CGT GTG GGC TAT TTA GGC-3'
Dloop2	mtR 242	5'-GTT ATT ATT ATG TCC TAC AAG C-3'
Dloop3	mtR 577	5'-AGG AGG TAA GCT ACA TAA AC-3'

Die Primer wurden nach eigenen Vorgaben von der Firma TIB Molbiol, Berlin hergestellt.

Für die Long Range-PCR wurden folgende drei Primerpaare ausgewählt:

Tab. 6: Primerpaare der Long Range-PCR

Fragment/-größe	Primername	Position	Sequenz
1 (6 Kb)	F	mtF 467	5'-CCC ATA CTA CTA ATC TCA TC-3'
	WANCY	mtR 6016	5'-CGA ATA AGG AGG CTT AGA G-3'
2 (5,8 Kb)	ND2.1	mtF 4444	5'-ATG TTG GTT ATA CCC TTC C-3'
	GR1	mtR10286	5'-TGG TAG GGG TAA AAG GAG-3'
3 (7,9 Kb)	COIII	mtF 9104	5'-TCA CAA TTC TAA TTC TAC TGA C-3'
	Dloop3	mtR 577	5'-AGG AGG TAA GCT ACA TAA AC-3'

Durch gezielte Auswahl der Primer konnte sichergestellt werden, dass ausschließlich mitochondriale DNA amplifiziert wurde. Kriterium zur Auswahl der Primerpaare war, dass mittels BLAST-Search (Basic Local Alignment Search Tool) keine nukleären Entsprechungen der Primersequenzen gefunden werden konnten. Die ausgewählten Primerpaare führten nach Anwendung an mitochondriendepletierten Zellen (ρ -0-Zellen) zu keinen PCR-Amplifikaten, sind also mtDNA-spezifisch.

3.2.2.3 Bedingungen für die Durchführung der Long Range-PCR

Der Reaktionsansatz enthielt 4 μ l Proben-DNA (15 ng/ μ l), 0,5 μ l Polymerase, je 1 μ l des Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimers (10 mM), 3 μ l Pufferlösung und 1 μ l dNTPs (enthielt je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP). Das Endvolumen von 30 μ l pro Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von 19,5 μ l Aqua dest. erreicht.

Die Amplifikation der großen Fragmente erfolgte nach initialer fünfminütiger Denaturierung bei 94 °C in 30 Zyklen, die aus 15 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 30 Sekunden Primerhybridisierung bei 55 °C und sechs Minuten DNA-Polymerisation

bei 68 °C bestanden. Abschließend folgten nochmals sieben Minuten DNA-Polymerisation bei 68 °C. Die automatische Durchführung der PCR-Zyklen erfolgte mit Thermocycler PCR-Geräten.

Die nachfolgenden Tabellen geben einen Überblick über den Reaktionsansatz der Long Range-PCR sowie die Reaktionsbedingungen:

Tab. 7: Long Range-PCR Reaktionsansatz

DNA (15 ng/µl)	4 µl
dNTP(10 µM)	1,0 µl
Vorwärtsprimer (10 µM)	1,0 µl
Rückwärtsprimer (10 µM)	1,0 µl
Puffer	3,0 µl
Polymerase	0,5 µl
Aqua dest	19,5 µl
Endvolumen	30 µl

Tab. 8: Long Range-PCR Reaktionsbedingungen

Vordenaturieren	94 °C	2 min
Zyklen	x 30	
Denaturieren	94 °C	15 s
Primerbindung (annealing)	55 °C	30 s
Verlängerung (extension)	68 °C	6 min
Endverlängerung (final extension)	68 °C	7 min
- nach den Zyklen-		

3.2.3 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte

Die Gelelektrophorese trennt Nukleinsäuremoleküle ihrer Größe nach auf. Das Gel besteht aus Agarosepolymeren mit netzartiger Struktur, durch die die DNA ähnlich wie durch ein Sieb wandert. Durch die Konzentration des Gels kann die Größe der Netzporen beeinflusst werden. Ein elektrisches Feld wird angelegt, um die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die Gelmatrix zu ziehen. Dabei wandern kleinere DNA-Moleküle schneller als größere. Bei einem Gemisch verschieden großer DNA-Proben wird so eine Auftrennung der Größe entsprechend ermöglicht. Durch Zusatz von Ethidiumbromid, das mit der DNA interkaliert und sich unter UV-Licht blau fluoreszierend darstellt, können die Nukleinsäuren auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden. Die Darstellung der Long-Range PCR-Produkte erfolgte in einem zweiprozentigen ethidiumbromidhaltigen Agarosegel.

Die Herstellung eines Agarosegels (2 %) wurde wie folgt durchgeführt: 2 g NuSieve Agarose, 100 ml 1x TAE-Puffer und 4 µl Ethidiumbromid wurden unter Rühren erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Die Lösung wurde unter Vermeidung von Luftblasen in eine horizontale Gelkammer gegossen, ein Gelkamm wurde eingelegt. Nach dem Erkalten der Lösung und Polymerisation des Gels konnte der Kamm entfernt werden. 2 µl PCR-Produkt wurden mit 8 µl Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein DNA-Längenstandard aufgetragen, der DNA-Basenpaare definierter Länge enthält und so eine Größenzuordnung der PCR-Produkte erlaubt. Die Produkte wurden auf dem UV-Transilluminator bei 254 nm sichtbar gemacht und fotografisch mit einer Polaroid-Kamera dokumentiert.

3.2.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Für eine erfolgreiche Sequenzierungsreaktion ist eine sorgfältige Aufreinigung der PCR-Produkte nötig. Eine mögliche Restaktivität der DNA-Polymerase kann die Qualität der Amplifikate, die als Ausgangsprodukte für die folgende Sequenzierung dienen, beeinflussen. Die Sequenzierung selbst wird durch Primerreste oder Primerdimere beeinträchtigt.

Die Long Range-PCR-Produkte wurden mithilfe des QIAquick™ PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden, Germany) aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Die aufgereinigten PCR-Produkte dienten als Ausgangsprodukte für die nachfolgende Sequenzanalyse.

3.2.5 Sequenzierung

3.2.5.1 Darstellung der Sequenzierung nach der Didesoxymethode

Die Sequenzierung mittels der Didesoxymethode (Kettenabbruchsynthese) nach Sanger ermöglicht eine genaue Analyse der Basenabfolge von DNA-Abschnitten [104]. Ähnlich der PCR werden zunächst DNA-Abschnitte durch eine Polymerase gezielt neusynthetisiert. Auch hier entscheidet die Wahl des Primers über den Startpunkt der Neusynthese. Im Gegensatz zum Reaktionsansatz der PCR enthält der Sequenzierungsansatz die erforderlichen Nukleotidbausteine auch als Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs). Werden diese in den neusynthetisierten DNA-Strang eingebaut, ist eine weitere Verlängerung durch die Polymerase nicht mehr möglich, es kommt zum Strangabbruch. So entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die in der Folge kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden. Die ddNTPs sind fluoreszenzfarbstoffmarkiert und werden während der Elektrophorese durch einen Laser angeregt. Am Ende eines jeden Kettenabbruchstranges kann so ein Fluoreszenzsignal detektiert und grafisch dargestellt werden. Dieses Chromatogramm gibt somit die direkte Abfolge der in der sequenzierten DNA enthaltenen Basen wieder.

3.2.5.2 Durchführung der Sequenzierungs-PCR

Für die Sequenzierungs-PCR wurde das BigDye v3.1 Terminator Ready Reaction Sequencing Kit™ (Applied Biosystems, Boston, USA) verwendet. Die Primer für die Sequenzierungs-PCR entstammten wiederum dem bereits oben genannten Primerset von Wong et al. [103]. Die durch die Primer entstehenden Amplifikate variieren in der Größe zwischen 306 und 805 Basenpaaren (bp) mit einer Durchschnittslänge von 594 bp und weisen überlappende Sequenzen von circa 70 bp an jedem Ende auf. Das gesamte mitochondriale Genom einer jeden Tumorprobe sowie der korrespondierenden Blutprobe wurde sowohl in 5'3'-Richtung als auch in 3'5'-Richtung sequenziert. Insgesamt waren somit 64 Sequenzierungsansätze pro Probe erforderlich.

Der Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR enthielt 2 µl Template, 1,75 µl Pufferlösung, 0,125 µl Primer (10 µmol) sowie 0,5 µl BigDye v 3.1 Terminator Ready Reaction Sequenziermix (ddNTPs sowie Polymerase). Zum Erreichen des Reaktionsvolumens von 10 µl wurden 5,625 µl Aqua dest. je Ansatz hinzugegeben.

Die PCR-Zyklen wurden automatisiert in Thermocycler-Geräten durchgeführt. Die Zyklen bestanden aus zehn Sekunden Denaturierung bei 96 °C, fünf Sekunden

Primerhybridisierung bei 55 °C und vier Minuten DNA-Polymerisation bei 60 °C. Insgesamt wurden 32 Zyklen durchgeführt. Nachfolgende Tabellen stellen den Reaktionsansatz der PCR sowie die Reaktionsbedingungen dar.

Tab. 9: Sequenzierungs-PCR Reaktionsansatz

Template (Long Range PCR-Produkt)	2 µl
Primer (10µmol)	0,125 µl
Puffer	1,75 µl
BigDye v3.1 Terminator Ready Reaction Sequenziermix	0,5 µl
Aqua dest.	5,625 µl
Endvolumen	10 µl

Tab. 10: Sequenzierungs-PCR Reaktionsbedingungen

Zyklen	x31	
Denaturieren	96 °C	10 s
Primerbindung (annealing)	55 °C	5 s
Verlängerung (extension)	60 °C	4 min

3.2.5.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die erforderliche Aufreinigung des Ansatzes vor der eigentlichen Sequenzierung wurde mittels der Sephadex-Methode durchgeführt. Hierzu wurden 96-Loch-Platten mit Sephadex™ G-50 Superfine (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) und 300 µl Aqua dest. je Loch befüllt und zum Quellen des Trägermaterials für drei Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Wasser durch Zentrifugation (2000 rpm für 3 Minuten) entfernt und der Sequenzieransatz auf die Platten aufgebracht. Nach kurzer Inkubation wurden die Produkte durch erneute Zentrifugation (2000 rpm für 3 Minuten) eluiert. Nach der Aufreinigung wurde das Sequenzier-PCR-Produkt lyophilisiert und in 1,2 µl Sequenzierladepuffer

aufgenommen. Kurz vor dem Laden wurde es bei 92 °C denaturiert und dann auf Eis gelagert.

3.2.5.4 Durchführung der Sequenzierung, Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzierung der Proben erfolgte automatisiert mit einem ABI prism 3730™ automated sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA). Für die Herstellung eines Sequenziergels wurden folgende Substanzen benötigt: 21 g Harnstoff, 8,4 ml Acrylamid zur Sequenzierung (29:1), 6 ml 10x TBE, 20 ml H₂O (bidestilliert). Die Substanzen wurden bei maximal 50 °C gelöst und anschließend filtriert (Millex®-GS 0,22 µm). Mit 350 µl 10 % Ammoniumpersulfat und 15 µl TEMED wurde die Polymerisation induziert, welche für mindestens eine Stunde erfolgte. Als Elektrophoresepuffer kam 1x TBE zum Einsatz. Vor dem Laden der Proben erfolgte im Sequenzierer ein Vorlauf von einer Stunde, während derer sich die Lauftemperatur von 50 °C einstellt. Die Einstellungen des automatischen Sequenzierers richten sich nach dem Markierungsverfahren, dem Kamm im Gel, der Acrylamidmenge sowie der Länge der Produkte. Der Sequenzierer führt nach der Sequenzierung eine automatische Analyse durch. Diese Analyse kann nach einer eigenen Korrektur des Gel-Files wiederholt werden. Indem die vorderen und hinteren unlesbaren Bereiche der Sequenz abgeschnitten werden, ist eine weitere Nachanalyse der Sequenzabfolgen und Chromatogramme möglich.

Die so erhaltenen DNA-Sequenzen aus Tumor- und Blutproben wurden mit dem Softwareprogramm Lasergene™ (DNASar, Madison, USA) ausgewertet und mit Hilfe des BLAST-Programms mit der publizierten Cambridge-Referenzsequenz der mitochondrialen DNA verglichen [105]. Sequenzabweichungen, die sowohl in Tumor- als auch korrespondierender Blutprobe auftraten, werteten wir als Keimbahnmutationen. Jede Mutation wurde daraufhin mit der unter www.mitomap.org abrufbaren Datenbank mitochondrialer Sequenzen verglichen. Darüberhinaus wurden eine Internetsuche (Schlüsselwörter: jeweilige Mutation und Mitochondrien und Mutationen) durchgeführt. Mutationen, die so bereits aufgeführt waren, werteten wir als Polymorphismen, solche, die keine Entsprechung fanden, als Neumutationen [106]. Sequenzveränderungen, die sich nur in den Tumorproben fanden, fassten wir als somatische Mutationen auf.

3.3 Material

3.3.1 Chemikalien

Tab. 11: Chemikalien

Acrylamid-/Bisacrylamid-Stammlösungen	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ratiophorese [®] Acrylamid/Bis-40 (29:1)	
Agarose	Biozym Diagnostics GmbH, H.Oldendorf, Deutschland
NuSieve [®] GTG Agarose	
APS (Ammonium persulfate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Merck Eurolab GmbH Darmstadt, Deutschland
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Eisessig	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 %	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid, reinst	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formamid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland

Natriumhydroxid Plätzchen	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Saccharose	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sephadex® G 50 Superfine	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
TEMED (Tetramethyldiamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trizma Base®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Water, Molecular Biology Grade	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Wasser, HPLC gereinigt	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylencyanol	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.3.2 Reagenziensysteme (Kits)

Tab. 12: Reagenziensysteme (Kits)

BigDye™ Terminator	Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA
Long Template™ PCR-System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
QIAquick™ PCR Purification Kits	Qiagen, Hilden, Deutschland

3.3.3 Enzyme und Zelllinie

Tab. 13: Enzyme und Zelllinie

Proteinase K	Qiagen, Hilden, Deutschland
ρ-0-Zellen	A. Rötig, INSERM, Paris, Frankreich

3.3.4 DNA-Präparationssystem

Tab. 14: DNA-Präparationssystem

Puregene DNA-Isolation Kit	Biozym Diagnostics GmbH, H. Oldendorf, Deutschland
----------------------------	--

3.3.5 DNA-Längenmarker/Desoxynukleotide

Tab. 15: DNA-Längenmarker, dNTPs

DNA-Längenmarker

100 bp	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
1000 bp	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
dNTP Set 100 mM	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

3.3.6 Lösungen

Tab. 16: Lösungen

EDTA 0,5M pH8

EDTA	186,12 g
pH 8 mit NaOH-Plätzchen ~20 g	einstellen
H ₂ O, bidestilliert	ad 1 l
autoklavieren	

TAE 10x (Tris-Acetat)

Trizma® Base	242g (2 M)
EDTA 0,5M (pH 8,0)	100 ml (0,05 M)
Eisessig	57,1 ml (2 M)
H ₂ O, bidestilliert	ad 1 l

Ladepuffer

Bromphenolblau 0,25 %
Xylencyanol 0,25 %
Saccharose 40 % (w/v)
Lagerung bei 4 °C

TBE 10x (Trisborat)

Trizma® Base	108 g (0,445 M)
Borsäure	55 g (0,445 M)
EDTA 0,5M (pH 8,0)	40 ml (0,01 M)
H ₂ O, bidestilliert	ad 1 l

Sequenzierladepuffer

Formamid = A

EDTA (pH 8,0) 0,25 mM

mit Blue Dextran 50 mg/ml = B

A und B im Verhältnis 5:1

Lagerung bei -20 °C

3.3.7 Primer**Tab. 17: Primer**

Primer	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
--------	----------------------------------

3.3.8 Filmmaterial**Tab. 18: Filmmaterial**

Land Pack Filme Typ 667 (36 DIN)	Polaroid, Offenbach/Main, Deutschland
----------------------------------	---------------------------------------

3.3.9 Software und Webseiten zur Auswertung**Tab. 19: Software und Webseiten**

Gemini™ v4.1	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Sequencing Analysis™ Software v5.2	Applied Biosystems, Foster City, USA
KB™ Basecaller Software v1.2	Applied Biosystems, Foster City, USA
SeqMan, Lasergene™ v7	DNASStar Inc., Madison, USA
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
MitoAnalyzer	National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA
Mitomap	http://www.mitomap.org

3.3.10 Geräte

Tab. 20: Geräte

<i>Elektrophoresekammer</i>	
Agarosegel	Biometra, Göttingen, Deutschland
<i>Heizplatte und Magnetrührer</i>	
Heizplatte-Magnetrührer RCT	Janke&Kunkel GmbH&CoKG, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
<i>Kamera</i>	
CU-5 Nahaufnahmen-Kamera	Polaroid, Offenbach/Main, Deutschland
<i>Mikrowelle</i>	
Mikrowelle MW706	CLATronic, Kempen, Deutschland
<i>pH-Meter</i>	
pH-Meter, pH-330 Set 1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Photometer</i>	
Biophotometer	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>Pipettierroboter</i>	
Genesis RSP™ 100 und 150	Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland
<i>Sequenzierungsgerät</i>	
ABI PRISM 3730™ DNA Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Spannungsquelle</i>	
Power PAC 3000	Bio-Rad Laboratories, Göttingen, Deutschland
<i>Thermocycler</i>	
GeneAmp® PCR System 9700	Perkin Elmer™ Life Sciences, Foster City, USA
<i>Vortex</i>	
VF2	Janke&Kunkel GmbH&CoKG, JKA Labortechnik Staufen, Deutschland

Waage

Scaltec, SBA/SBC	Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
------------------	---

Thermomixer

Thermomixer comfort	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
---------------------	--------------------------------------

Zentrifugen

Biofuge	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
---------	--------------------------------------

Labofuge 400	Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
--------------	--

Labofuge 400R	Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
---------------	--

Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
--------------	--

Vakuumentrifuge, VR-I Heto	Hetovac, Centrivac, Scandinavia
----------------------------	---------------------------------

4 ERGEBNISSE

Das gesamte mitochondriale Genom jeder Tumorprobe und der korrespondierenden Blutprobe wurde in 32 Fragmenten sequenziert. Die jeweiligen Fragmente wurden sowohl vom 5'- zum 3'-Ende des schweren Stranges („vorwärts“) als auch vom 5'- zum 3'-Ende des komplementären leichten Stranges („rückwärts“) sequenziert. Als Standard-Normalsequenz wurde die überarbeitete Cambridge-Sequenz von Andrews et al. [38] verwendet.

Sequenzabweichungen, die sowohl in Tumor- als auch korrespondierender Blutprobe auftraten, wurden als Keimbahnmutationen gewertet. Jede dieser Mutationen wurde daraufhin mit der unter Mitomap abrufbaren Datenbank mitochondrialer Sequenzen verglichen. Des Weiteren wurde unter Verwendung der Schlüsselwörter „given mutation AND mitochondrium AND mutation“ mithilfe konventioneller Internetsuchmaschinen (Google) nach Entsprechungen gesucht. Mutationen, die so bereits aufgeführt waren, wurden als Polymorphismen gewertet, solche, die keine Entsprechung fanden, als Neumutationen.

Sequenzveränderungen, die sich nur in den Tumorproben fanden, nicht jedoch in den Blutproben, wurden als somatische Mutationen aufgefasst. Nur Sequenzabweichungen, die sowohl in der Vorwärts- als auch in der Rückwärtssequenzierung bzw. wiederholt in den überlappenden Sequenzen angrenzender Fragmente nachgewiesen werden konnten, wurden in die Auswertungen mit eingeschlossen.

4.1 Somatische Mutationen

In den 19 untersuchten Tumorproben konnten insgesamt 34 somatische Mutationen der mtDNA detektiert werden. 16 der 19 Tumoren (84 %) wiesen somatische Mutationen auf. Hierbei reichte deren Anzahl von einer bis sieben pro Patient. 31 Mutationen traten in homoplasmischer, drei in heteroplasmischer Form auf. 30 Mutationen führten zum

Austausch einzelner Basen. Vier Mutationen waren Insertionen in der np 303-315 Poly-C-Region der D-loop-Region. Insgesamt 17 (50 %) Mutationen fanden sich in Regionen, die Proteine der Atmungskette kodieren, zwölf (35 %) in der D-loop-Region des Genoms. Vier Mutationen (12 %) lagen in mitochondriale Ribosomen betreffenden DNA-Bereichen, eine (3 %) in tRNAs kodierenden Abschnitten. Drei Mutationen führten zu einem Aminosäureaustausch: M60V in der Untereinheit 6 der ATP-Synthase, L236I im Cytochrom B und L112M in der Untereinheit 1 der Cytochrome C Oxidase. Diese Mutationen lagen alle in Regionen, die Proteine der oxidativen Phosphorylierung kodieren. Die übrigen Mutationen waren stumm. Insgesamt sieben Mutationen wurden bisher nicht beschrieben, hierunter fallen auch die zu einem Aminosäureaustausch führenden Mutationen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit erfolgt im Weiteren nur in diesen Fällen eine Darstellung der jeweiligen Chromatogramme.

Das folgende Diagramm gibt einen Überblick über die Verteilung der gefundenen Mutationen:

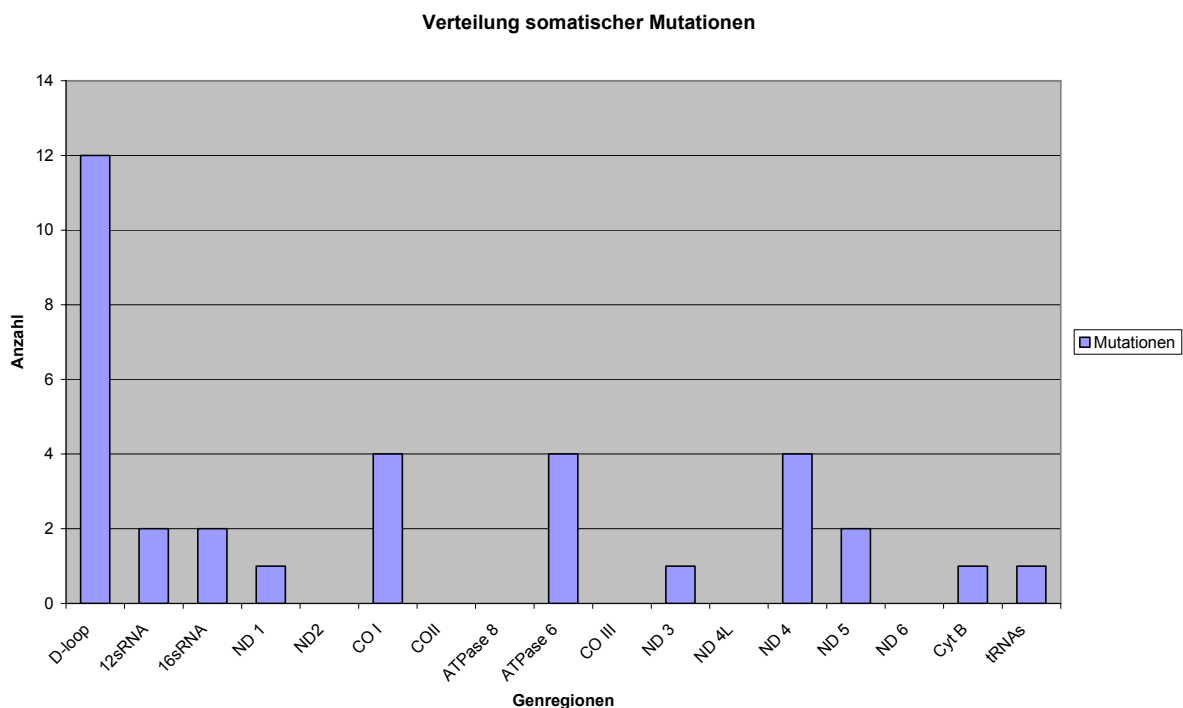


Abb. 8: Verteilung der somatischen Mutationen: Deutlich wird die Häufung von Mutationen im als „hot spot“ bekannten D-loop. Allein 12 Mutationen wurden dort detektiert, in den Bereichen ND2, COII, APT8 und COIII traten keine somatischen Mutationen auf.

4.1.1 Somatische Mutationen in der D-loop-Region

Insgesamt zwölf Mutationen traten im Bereich des D-loops auf. Dieser Bereich der mitochondrialen DNA umfasst die Nukleotidpositionen 16024-576 und kodiert keine Gene. Anders als in den übrigen Regionen der mtDNA, in denen Mutationen oft deletär wirken und damit ihre Weitergabe limitiert ist, können hier Mutationen akkumulieren. Im Bereich des D-loops befinden sich die Promotoren der mitochondrialen Translation. Die Replikation der mtDNA nimmt ihren Ursprung im D-loop. Beide Stränge der mtDNA werden komplett durch die im D-loop befindlichen Promotoren transkribiert. Zusätzlich enthält der D-loop zwei kleine Abschnitte, die als hypervariable Regionen I und II (HVI und HVII) bezeichnet werden. Die Mutationsrate in diesen Bereichen ist noch höher als im übrigen D-loop und kann innerhalb der HV variieren [107]. Wegen ihrer hohen Mutationsrate und fehlender kodierender oder regulatorischer Sequenzen eignen sich die hypervariablen Regionen mit ihrer großen Bandbreite mutmaßlich genetisch neutraler Variationen insbesondere für phylogenetische Untersuchungen.

Alle im D-loop gefundenen somatischen Mutationen traten in homoplasmischer Form auf und sind als Mutationen und/oder als Polymorphismen der mtDNA vorbeschrieben. Sie sind als stumme Mutationen ohne direkte pathologische Signifikanz zu werten, da sie sich in nichtkodierenden Abschnitten der mtDNA befinden und auch die Replikationsursprünge der mtDNA nicht betreffen. Sie deuten aber auf eine höhere genetische Instabilität in diesen Genregionen hin. Insgesamt konnten 12 Mutationen in diesem Bereich detektiert werden. In der nachfolgenden Tabelle sind diese Mutationen aufgeführt:

Tab. 21: Somatische Mutationen im D-loop

Pat. Nr.	Position	Genregion	Mutation	homo-/ heteroplasmisch	Aminosäure	vorbeschrieben
1	311	HVII	Ins C	homo-homo	noncod	ja
1	514	CA-Rep	Ins C	homo-homo	noncod	ja
2	264	HVII	Trans T→C	homo-homo	noncod	ja
2	514	CA-Rep	Ins C/A	homo-homo	noncod	ja
2	16325	HVI	Trans T→C	homo-homo	noncod	ja

3	228	kons.Block	Trans G→A	homo-homo	noncod	ja
5	16086	HVI	Trans T→C	homo-homo	noncod	ja
5	16294	HVI	Trans C→T	homo-homo	noncod	ja
6	311	HVII	Ins C	homo-homo	noncod	ja
15	303	HVII	Ins C	homo-homo	noncod	ja
15	16368	HVI	Trans T→C	homo-homo	noncod	ja
18	16129	HVI	Trans G→A	homo-homo	noncod	ja

Ins: Insertion, Trans: Transition, homo: homoplasmisch, noncod: nichtkodierende Region, HVI: hypervariable Region I, HVII: hypervariable Region II, CA Rep: CA-Repeat Region, kons Block: konservierter Block

4.1.2 Somatische Mutationen im Bereich der ribosomalen RNA

Im mitochondrialen Genom wird die ribosomale RNA in zwei Abschnitten kodiert. Die Nukleotidpositionen 648-1601 enthalten Informationen zum Aufbau der 12S-Untereinheit der rRNA, die Positionen 1671-3228 kodieren die 16S Untereinheit. In den untersuchten Tumorproben fanden sich vier somatische Mutationen in diesen Bereichen. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

Tab. 22: Somatische Mutationen in den Regionen RNR 1 und RNR 2

Pat. Nr.	Position	Genregion	Mutation	homo-/heteroplasmisch	Aminosäure	vorbeschrieben
1	827	RNR1	Trans A→G	homo-homo	noncod	ja
3	1559	RNR1	Trans G→A	homo-hetero	noncod	nein
9	2416	RNR2	Trans T→C	homo-homo	noncod	ja
13	2706	RNR2	Trans A→G	homo-homo	noncod	ja

Trans: Transition, homo: homoplasmisch, hetero: heteroplasmisch, noncod: nichtkodierender Genabschnitt

Patient Nr. 3: Hier konnte eine heteroplasmische Mutation im Genlokus RNR2 nachgewiesen werden. An Nukleotidposition 1559 fand sich eine Transition G→A. Diese Mutation wurde, da sich keine Entsprechung fand, als Neumutation gewertet.

Dargestellt sind zwei Chromatogramme von Sequenzen, die mit Hilfe von unterschiedlichen Primern gewonnen wurden. In beiden Fällen zeigt sich die heteroplasmische Mutation, so dass eine fälschliche Interpretation von so genanntem „Hintergrundrauschen“ (fehlerhafte Deutung von Verunreinigungen als Basenpeaks durch den Sequenzierer) unwahrscheinlich ist.

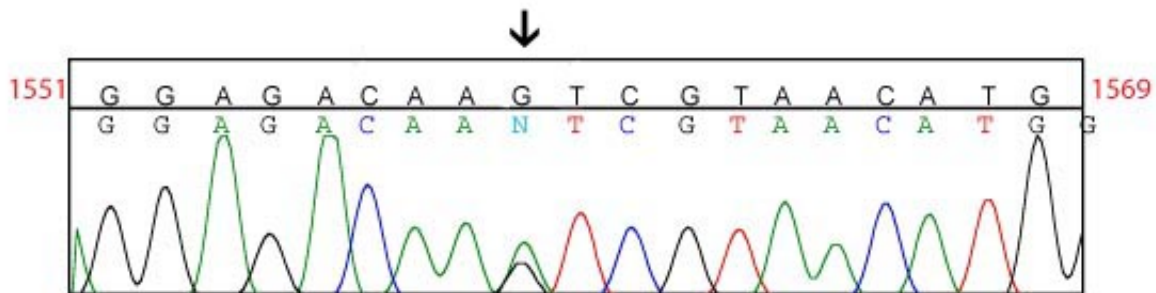


Abb. 9: Patient Nr. 3, np 1559 (Primer mtF 12S): Heteroplasmische Transition $G \rightarrow A$ (Primer: mtF 12S). Neben dem schwarzen Peak der ursprünglichen Base Guanin ist auch der schwarze Peak der durch die Mutation bedingten Base Adenin sichtbar. Die Sequenz zeigt sonst kein Hintergrundrauschen.

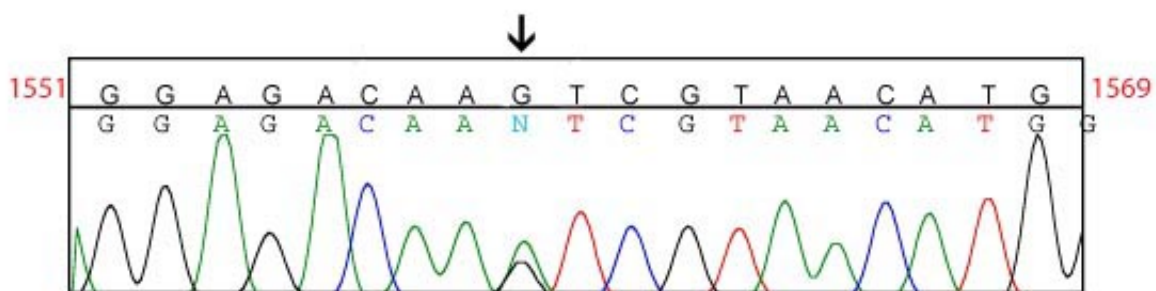


Abb. 10: Patient Nr. 3, np 1559 (Primer mtF V): Die heteroplasmische Transition $G \rightarrow A$ kommt auch in der Vergleichssequenz mit dem gegenläufigen Primer zur Darstellung.

4.1.3 Somatische Mutationen im Bereich der NADH-Dehydrogenase

Die NADH-Dehydrogenase, auch Komplex I der Atmungskette genannt, katalysiert die Oxidation von NADH zu NAD⁺ gekoppelt an die Reduktion von Coenzym Q und den Transport von Protonen. Sie setzt sich aus circa 46 Untereinheiten zusammen, von denen sieben in der mitochondrialen DNA kodiert sind. Von den 19 untersuchten Patienten wiesen acht je eine somatische Mutation in diesen Bereichen auf. Dabei konzentrierten sich die Mutationen auf die Genregionen ND1, 3, 4 und 5 (Tab. 23). Bei diesen Mutationen handelt es sich ausnahmslos um Transitionen ohne Auswirkungen auf die kodierten Aminosäuren.

Tab. 23: Somatische Mutationen in den Genregionen ND 1-5

Pat. Nr.	Position	Genregion	Mutation	homo-/ heteroplasmisch	Aminosäure	vorbeschrieben
1	11251	ND4	Trans A→G	homo-homo	Leu	ja
2	11719	ND4	Trans G→A	homo-homo	Gly	ja
5	14133	ND5	Trans A→G	homo-hetero	Leu	ja
7	12130	ND4	Trans T→C	homo-homo	Phe	nein
11	10115	ND3	Trans T→C	homo-homo	Ile	ja
12	10873	ND4	Trans T→C	homo-homo	Pro	ja
14	12372	ND5	Trans G→A	homo-homo	Leu	ja
15	3480	ND1	Trans A→G	homo-homo	Lys	ja

Trans: Transition, homo: homoplasmisch

Patient Nr. 7: Im Bereich ND 4 konnte in der Tumorprobe dieses Patienten eine homoplasmische Transition T→C an Position 12130 detektiert werden (Abb. 10). Diese Mutation führt zu keiner Änderung der Aminosäure Phenylalanin. Sie wurde bisher nicht beschrieben.

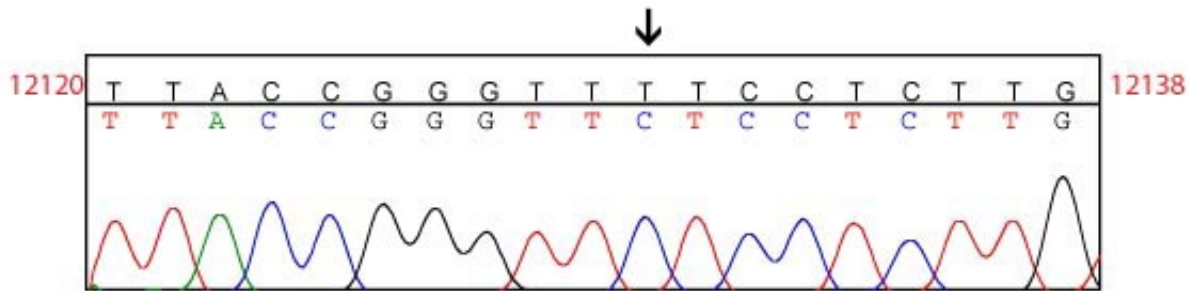


Abb. 11: Patient Nr 7, np 12130: Bisher nicht beschriebene homoplasmische Transition T→C. Deutlich zeigt das Signal einen Cytosinpeak, die darüber abgebildete Referenzsequenz fordert an dieser Stelle ein Thymin.

4.1.4 Somatische Mutationen im Bereich der Cytochrom C-Oxidase

Die Cytochrom C-Oxidase, auch Komplex IV der Atmungskette genannt, stellt den terminalen Elektronenakzeptor der oxidativen Phosphorylierung dar. Sie katalysiert die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser und vermittelt den Protonentransport über die mitochondriale Membran. Die Cytochrom-C-Oxidase besteht aus 13 Untereinheiten, von denen die Untereinheiten I-III mitochondrial kodiert werden.

Im hier untersuchten Material konnten vier Mutationen der Untereinheit I (CO I) detektiert werden (Tab. 24), die übrigen Untereinheiten des Enzymkomplexes zeigten keine Auffälligkeiten.

Tab. 24: Somatische Mutationen im Bereich der COI

Pat. Nr.	Position	Genregion	Mutation	homo-/heteroplasmisch	Aminosäure	vorbeschrieben
5	6851	COI	Trans C→T	homo-homo	Thr	nein
10	5915	COI	Trans C→T	homo-homo	Asp	ja
10	6671	COI	Trans T→C	homo-homo	His	ja
16	6237	COI	Transv C→A	homo-homo	Leu→Met	nein

Trans: Transition, Transv: Transversion, homo: homoplasmisch

Patient Nr. 5: An Position 6851 zeigte dieser Patient eine homoplasmische Transition C→T (Abb. 11). Diese Mutation bleibt ohne Einfluss auf die kodierte Aminosäure Threonin, da sowohl das originäre Basentriplet ACC als auch das durch die Transition entstandene Triplet ACT die Aminosäure kodieren. Sie ist jedoch bisher nicht beschrieben worden.

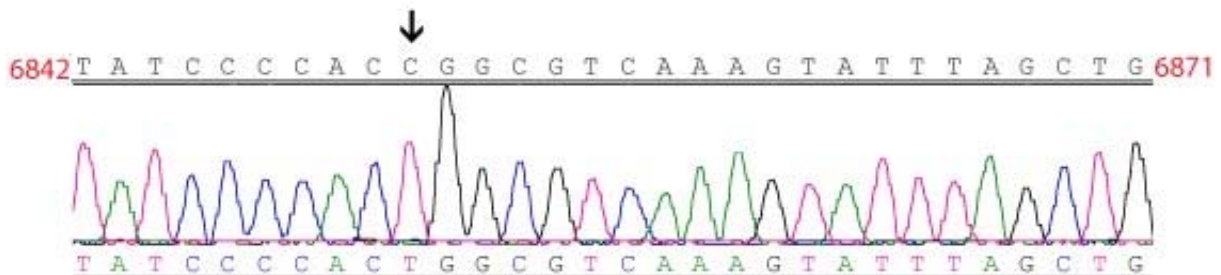


Abb. 12: Patient Nr. 5, np 6851: Homoplasmische Transition C→T, deutlicher Thyminpeak anstelle des zu erwartenden Cytosinpeaks. Die Mutation ist bisher nicht beschrieben worden.

Patient Nr. 16: Im Tumorgewebe dieses Patienten fand sich eine bisher nicht beschriebene homoplasmische Transversion C→A an der Nukleotidposition 6237. Die Mutation betrifft die 112. Aminosäure von insgesamt 514 Aminosäuren, aus denen die Untereinheit I aufgebaut ist. Sie befindet sich im ersten Basenpaar des Codons.

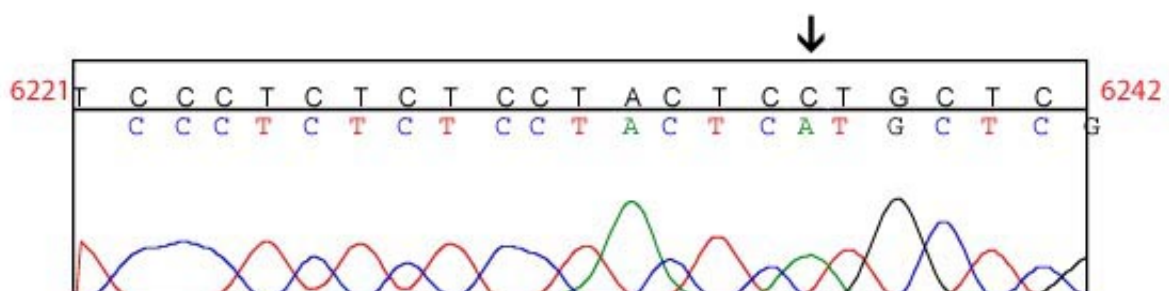


Abb. 13: Patient Nr. 16, np 6237: Homoplasmische Transversion C →A mit konsekutiver Änderung der kodierte Aminosäure Leucin zu Methionin. Diese Mutation ist bisher nicht beschrieben worden.

Diese Mutation führt zu einer Änderung der kodierte Aminosäure Leucin zu Methionin. Leucin an Position 112 ist eine in der Evolution stark konservierte Aminosäure, die sich sowohl bei Vertebraten als auch bei Nonvertebraten findet (Abb 13).

In ihren strukturellen Eigenschaften sind sich Leucin und Methionin jedoch sehr ähnlich. Beide gehören zu den unpolaren Aminosäuren und besitzen das gleiche van-der-Waals-Volumen (124).

Tab. 25: Interspeziesvergleich im Genlokus COI, Aminosäurepositionen 102-123

Pat. 16	102	F	W	L	L	P	P	S	L	L	L	M	L	A	S	A	M	V	E	A	G	A	G	123	
Mensch	102	F	W	L	L	P	P	S	L	L	L	L	L	A	S	A	M	V	E	A	G	A	G	123	
Schimpanse	102	F	W	L	L	P	P	S	L	L	L	L	L	A	S	A	M	V	E	A	G	A	G	123	
Hund	102	F	W	L	L	P	P	S	F	L	L	L	L	A	S	S	M	V	E	A	G	A	G	123	
Maus	102	F	W	L	L	P	P	S	F	L	L	L	L	A	S	S	M	V	E	A	G	A	G	123	
Huhn	103	F	W	L	L	P	P	S	F	L	L	L	L	A	S	S	T	V	W	A	G	A	G	124	
Zebrafisch	102	F	W	L	L	P	P	S	F	L	L	L	L	A	S	S	G	V	E	A	G	A	G	123	
Fruchtfliege	100	F	W	L	L	P	P	A	L	S	L	L	L	V	S	S	M	V	E	N	G	A	G	121	
Hefe	103	F	W	V	L	P	M	G	L	V	C	L	L	V	T	S	T	L	V	E	S	G	A	G	124

In diesem Aminosäurevergleich wird deutlich, wie stark Leucin an der Position 112 konserviert ist. Sowohl bei Vertebraten als auch bei Nonvertebraten, sogar bei der Bäckerhefe ist an dieser Stelle Leucin vorhanden.

4.1.5 Somatische Mutationen im Bereich der ATP-Synthase

Die ATP-Synthase bildet den Komplex V der Atmungskette. Sie nutzt den während der Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung aufgebauten Protonengradienten zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat. Die ATP-Synthase setzt sich aus dem hydrophilen Komplex F₁, der die eigentliche Synthese des ATP bewirkt, und dem hydrophoben Komplex F₀, der einen transmembranösen Protonenkanal bildet, zusammen. Insgesamt besteht die ATP-Synthase aus 20 Untereinheiten, davon sind die Untereinheiten 6 und 8 des Komplexes F₀ mitochondrial kodiert.

Im vorliegenden Untersuchungsmaterial konnten vier Mutationen in der Genregion ATP6 detektiert werden, über die die folgende Tabelle eine Übersicht gibt:

Tab. 26: Somatische Mutationen im Bereich ATP6

Pat. Nr.	Position	Genregion	Mutation	homo-/heteroplasmisch	Aminosäure	vorbeschrieben
2	8610	ATP6	Trans T→C	homo-homo	Pro	ja
2	8614	ATP6	Trans T→C	homo-homo	Leu	ja
2	8704	ATP6	Trans A→G	homo-homo	Met→Val	nein
5	8697	ATP6	Trans G→A	homo-homo	Met	ja

Trans: Transition, homo: homoplasmisch

Patient Nr. 2: Drei der vier detektierten Mutationen fanden sich im Tumormaterial dieses Patienten. Alle Mutationen waren homoplasmische Transitionen, in einem Fall kam es zu einer Aminosäurenänderung. An Position 8610 fand sich eine Transition T→C, die kodierte Aminosäure Prolin war dadurch nicht betroffen. Nur vier Nukleotidpositionen weiter fand sich an Position 8614 eine weitere Transition T→C, die ebenfalls keine Aminosäurenänderung bedingt. Eine dritte Transition, hier jedoch A→G, zeigte sich an Position 8704.

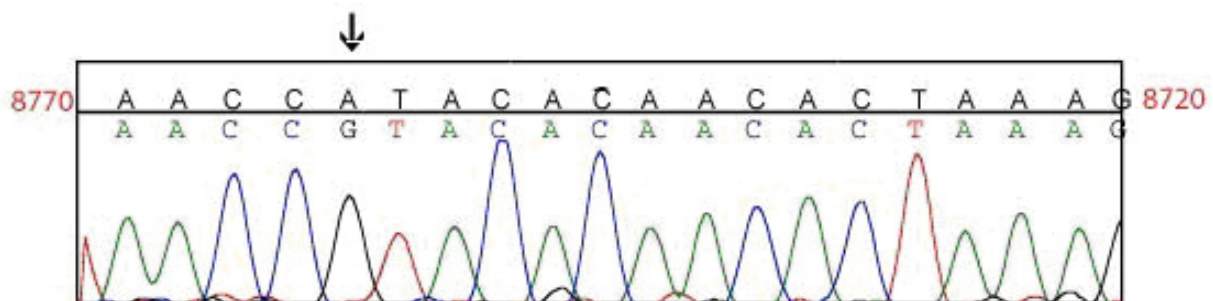


Abb. 14: Patient Nr. 2, np 8704: Bisher nicht beschriebene homoplasmische Transition A→G

Diese Mutation führt zu einer Änderung der kodierten Aminosäuren von Methionin zu Valin. Sie ist bisher nicht beschrieben worden. Die Mutation findet sich in der 60. Aminosäure von 227 Aminosäuren, aus denen sich die Untereinheit 6 zusammensetzt. Sie betrifft die erste Base des Codons. Der Interspeziesvergleich zeigt, dass Methionin an dieser Stelle wenig konserviert ist (Tab.28). Lediglich der Schimpanse besitzt an

dieser Position die gleiche Aminosäure. Schon bei Hund und Maus steht dort die unpolare Aminosäure Isoleucin.

Tab. 27: Interspeziesvergleich im Bereich ATP6, Aminosäurepositionen 50-70

Pat. 2	50	I	K	L	T	S	K	Q	M	M	A	V	H	N	T	K	G	-	-	-	-	R	T	W	S	L	70
Mensch	50	I	K	L	T	S	K	Q	M	M	A	M	H	N	T	K	G	-	-	-	-	R	T	W	S	L	70
Schimpanse	50	I	Q	L	T	S	K	Q	M	M	T	M	H	S	T	K	G	-	-	-	-	R	T	W	S	L	50
Hund	50	I	Q	L	T	S	K	Q	M	L	A	I	H	N	Q	K	G	-	-	-	-	R	T	W	A	L	70
Maus	50	V	K	L	I	I	K	Q	M	M	L	I	H	T	P	K	G	-	-	-	-	R	T	W	T	L	50
Huhn	49	T	H	L	I	T	K	Q	L	M	T	P	L	N	K	A	G	-	-	-	-	H	K	W	A	L	69
Zebrafisch	51	T	G	R	F	T	N	Q	L	M	T	P	L	N	F	S	G	-	-	-	-	H	K	W	A	L	71
Fruchtfliege	50	L	L	T	L	H	K	E	F	K	T	L	L	G	P	S	G	-	-	-	-	H	N	G	S	T	70
Hefe	85	I	S	Q	E	A	I	Y	D	T	I	M	N	M	T	K	G	Q	I	G	G	K	N	W	G	L	94

Die 60. Aminosäure ist im evolutionären Verlauf wenig konserviert. Nur Mensch, Schimpanse und Bäckerhefe zeigen an dieser Position Methionin.

Sowohl Methionin als auch Valin gehören zu den unpolaren Aminosäuren. Methionin besitzt ein van-der-Waals-Volumen von 124, Valin eines von 105.

4.1.6 Somatische Mutationen im Bereich des Cytochrom B

Cytochrom B ist eine von drei katalytischen Untereinheiten der Cytochrom C-Oxidoreduktase, dem Komplex III der Atmungskette. Die anderen katalytischen Bestandteile des Komplex III sind Cytochrom C sowie ein Eisen-Schwefel-Protein. Komplex III katalysiert die Oxidation von Ubichinol (Coenzym Q) und Reduktion von Cytochrom C mit Transport von zwei Protonen vom Matrix- in den Intermembranraum des Mitochondriums. Cytochrom B spielt hier eine wichtige Rolle beim Elektronentransport entlang der Atmungskette.

In den untersuchten Tumorproben fand sich eine somatische Mutation in dieser Genregion.

Tab. 28: Somatische Mutationen im Bereich CYTB

Pat. Nr.	Position	Genregion	Mutation	homo-/heteroplasmisch	Aminosäure	vorbeschrieben
5	15452	CYTB	Transv C→A	homo-homo	Leu→Ile	ja

Transv: Transversion, homo: homoplasmisch

An Position 15452 konnte bei Patient 5 eine homoplasmische Transversion C→A detektiert werden.

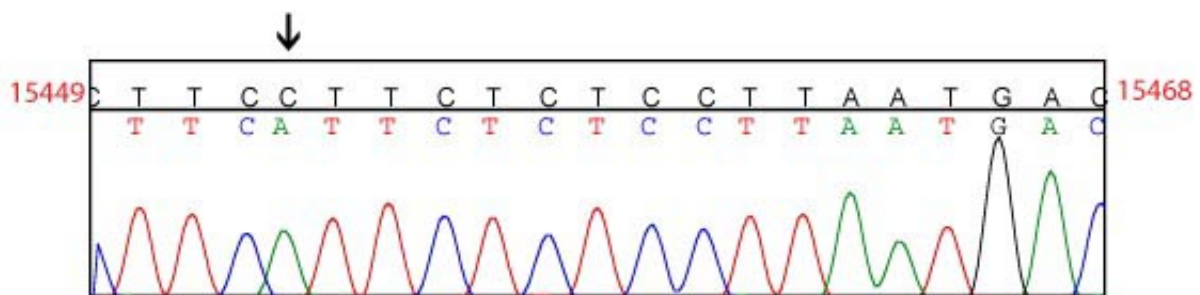


Abb. 15: Patient Nr. 5, np 15452: Homoplasmische Transversion C→A, die eine Änderung der kodierten Aminosäure Leucin zu Isoleucin bewirkt.

Tab. 29: Interspeziesvergleich im Bereich CYTB, Aminosäurepositionen 226-246

Pat. 5	226	I	K	D	A	L	G	L	L	L	F	I	L	S	L	M	T	L	T	L	F	S	246
Mensch	226	I	K	D	A	L	G	L	L	L	F	L	L	S	L	M	T	L	T	L	F	S	246
Schimpanse	226	I	K	D	I	L	G	L	F	L	F	L	L	I	L	M	T	L	T	L	F	S	246
Hund	226	I	K	D	I	L	G	A	L	L	L	L	L	I	L	M	S	L	V	L	F	S	246
Maus	226	I	K	D	I	L	G	I	L	I	M	F	L	I	L	M	T	L	V	L	F	F	246
Huhn	227	F	K	D	I	L	G	L	T	L	M	L	T	P	F	L	T	L	A	L	F	S	247
Zebrafisch	226	N	K	D	L	L	G	F	V	I	M	L	F	S	L	S	L	L	A	L	F	S	246
Fruchtfliege	227	F	K	D	I	V	G	F	I	V	M	I	F	I	L	I	S	L	V	L	I	S	247
Hefe	227	F	K	D	L	V	T	V	F	L	F	M	L	I	L	A	L	F	V	F	Y	S	247

Leucin an Position 236 ist wenig konserviert. Bereits bei der Maus steht an dieser Stelle Phenylalanin.

Diese Transversion bewirkt eine Änderung der kodierten Aminosäure Leucin zu Isoleucin. Diese Mutation betrifft das erste Basenpaar des Triplets und befindet sich im 236. von insgesamt 379 Codons des Gens. Die Mutation befindet sich in der Transmembrandomäne des Cytochrom B. Diese Genregion ist im Interspeziesvergleich wenig konserviert, eine Änderung von Aminosäuren dieser Region ist demnach wahrscheinlich ohne pathologische Relevanz.

4.1.7 Somatische Mutationen der tRNA

Im mitochondrialen Genom sind 22 tRNAs kodiert. Mutationen in den tRNAs wurden verschiedentlich mit mitochondrialen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Ein Patient wies eine somatische Mutation in diesen Genregionen auf.

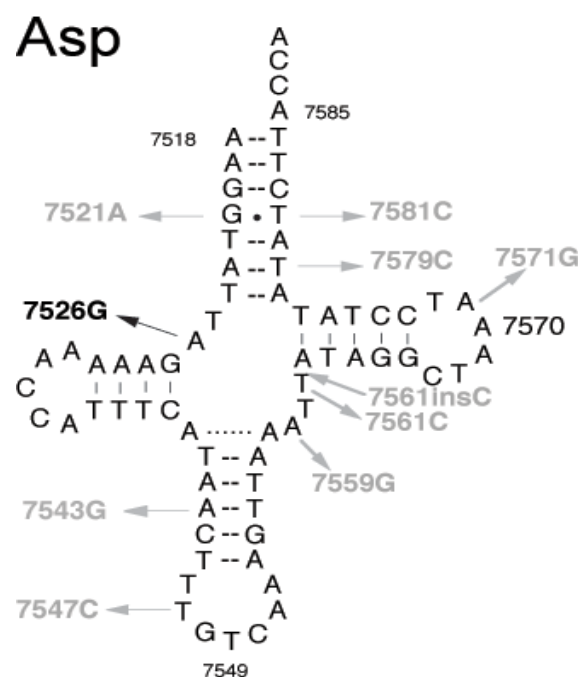


Abb. 16: Kleeblattstruktur der tRNA für Aspartat: Ebenfalls in dieser Abbildung dargestellt sind die Genloci, an denen bereits Mutationen der mtDNA detektiert werden konnten, so auch an np 7585, der letzten Basenposition der tRNA, an der sich die in dieser Arbeit detektierte Mutation befindet.

Tab. 30: Somatische Mutationen im Bereich der tRNA

Pat. Nr.	Position	Genregion	Mutation	homo-/heteroplasmisch	Aminosäure	vorbeschrieben
4	7585	TD	Trans A→G	homo-hetero	noncod	nein

Trans: Transition, homo: homoplasmisch, hetero: heteoplasmisch, noncod: nichtkodierende Genregion

Im Tumorgewebe dieses Patienten konnte eine heteroplasmische Transition A→G (Abb. 16) im Gen der tRNA für Aspartat (Abb. 17) nachgewiesen werden. Diese Mutation befindet sich an der Nukleotidposition 7585. Sie betrifft das letzte Basenpaar des Gens.

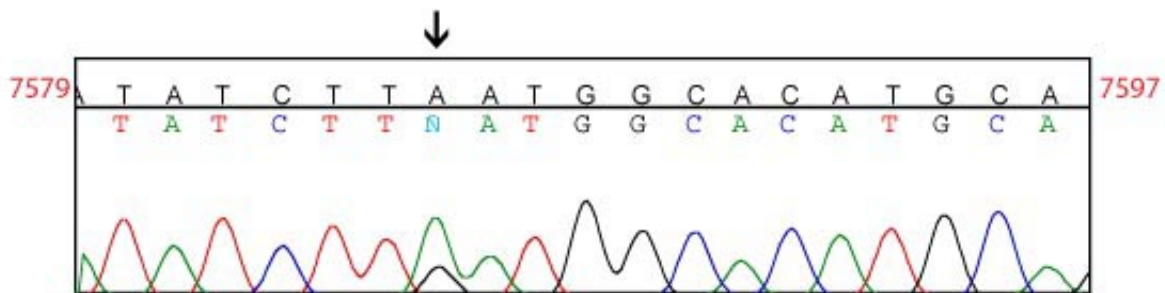


Abb. 17: Patient Nr 4, np 7585: Heteroplasmische Transition A →G. Deutlich sieht man den zweiten Peak des Guanins unter dem grünen Adenin-Peak, der an dieser Stelle der Referenzsequenz entspricht.

4.2 Keimbahnmutationen

Als Keimbahnmutationen wurden solche Abweichungen von der Referenzsequenz gewertet, die sowohl in den Tumor- als auch in den Blutproben auftraten.

In den untersuchten Proben trat eine Vielzahl von Keimbahnmutationen auf. Insgesamt konnten 268 Mutationen detektiert werden. Hierbei handelt es sich um 46 distinkte Mutationen. Die Höchstzahl der bei einem Patienten gefundenen Keimbahnmutationen betrug 27. Durchschnittlich fanden sich pro Patient 14 Abweichungen der mtDNA von der Referenzsequenz. In der Mehrzahl handelte es sich dabei um bereits beschriebene

Polymorphismen oder bekannte stumme Mutationen. Alle Keimbahnmutationen traten in homoplasmischer Form auf. 108 befanden sich in der D-loop-Region, 33 in Genabschnitten, die die mitochondrialen Ribosomen kodieren, sechs in tRNA kodierenden Bereichen und 121 in Genregionen der mitochondrialen Atmungskette.

Alle Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führten, lagen im Bereich der die Proteine der Atmungskette kodierenden Genregionen. Die nachfolgende Abbildung gibt einen Überblick über die Verteilung der Keimbahnmutationen (Abb. 18). Insgesamt 21 Mutationen wurden, da sich hier keine Entsprechungen in den Datenbanken fanden, als Neumutationen auf Keimbahnebene gewertet. Drei dieser Mutationen bedingten eine Änderung der kodierten Aminosäuren.

Verteilung Keimbahnmutationen

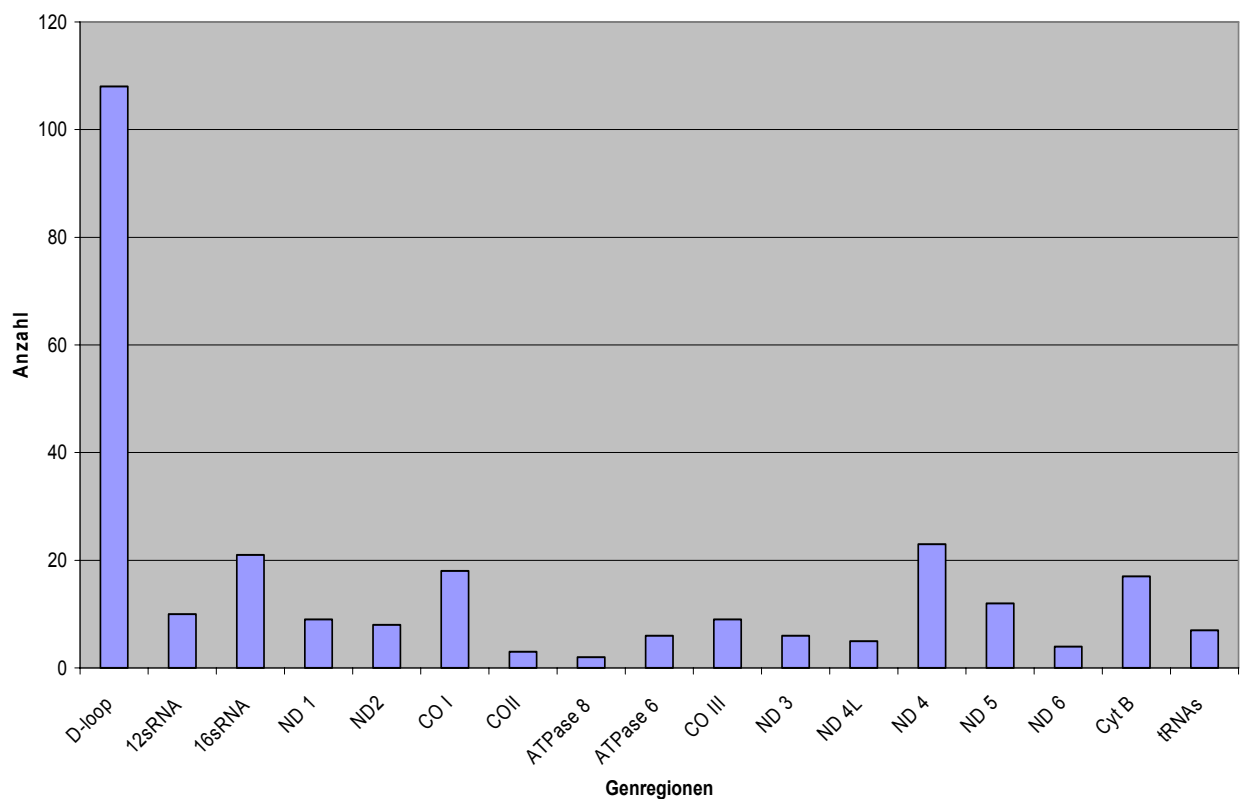


Abb. 18: Verteilung der Keimbahnmutationen: *Wiederum finden sich die meisten Mutationen im D-loop, die übrigen Mutationen liegen gleichmäßig über das gesamte mitochondriale Genom verteilt vor.*

Tab. 31: Bisher nicht beschriebene Keimbahnmutationen

Pat. Nr.	Position	Genregion	Mutation	Aminosäure
7	7193	CO1	Trans T→C	Phe
7	8547	ATP8	Trans T→C	Leu→Pro
7	10840	ND4	Trans A→G	Thr
10	14061	ND5	Trans C→T	Ile
11	1559	RNR1	Trans G→A	noncod
11	7780	CO2	Trans A→G	Try
12	397	D-loop, LSP	Trans T→C	noncod
12	13317	ND5	Trans G→A	Leu
13	5154	ND2	Transv C→A	Leu→Met
13	6533	CO1	Trans A→G	Leu
13	9770	CO3	Trans T→C	Ile
14	906	RNR1	Trans C→T	noncod
14	5186	ND2	Transv A→T	Trp→Cys
14	9614	CO3	Trans A→G	Val
14	12793	ND5	Trans T→C	Leu
14	15094	CYTB	Trans C→T	Gly
15	5489	ND2	Trans C→T	Ser
15	6356	CO1	Trans C→T	His
15	11071	ND4	Trans C→T	Ile
17	11353	ND4	Trans T→C	Ala
19	6425	CO1	Trans T→C	Pro

Trans: Transition, Transv: Transversion

Vertiefend eingegangen werden soll im Folgenden auf die Mutationen, die eine Änderung der kodierten Aminosäure zur Folge hatten:

Tab. 32: Keimbahnmutationen mit Änderung der kodierten Aminosäure

Pat. Nr.	Position	Genregion	Mutation	Aminosäure
7	8547	ATP8	Trans T→C	Leu→Pro
		ATP6		Ala
13	5154	ND2	Transv C→A	Leu→Met
14	5186	ND2	Transv A→T	Trp→Cys

Trans: Transition, Transv.: Transversion

Patient Nr. 7: Dieser Patient zeigte an Position 8547 eine Transition T→C. Diese Mutation betrifft sowohl die Genregionen der ATP6 als auch die der ATP 8, die an dieser Stelle überlappen.

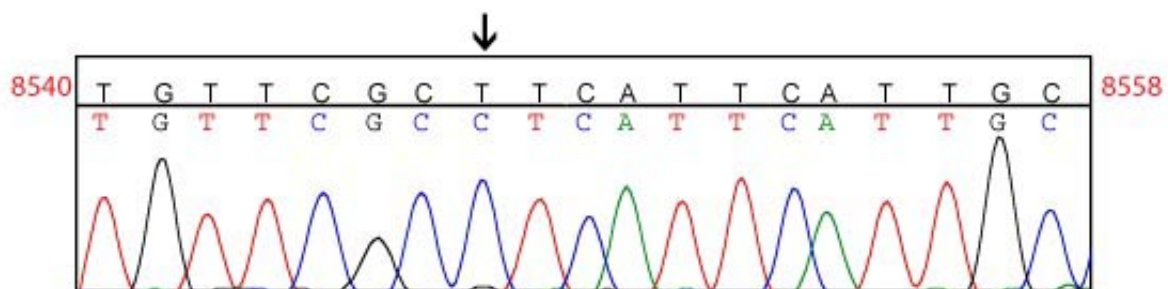


Abb. 19: Patient Nr. 7, np 8547: Homoplasmische Transition T→C, die sowohl ATP6 als auch ATP8 betrifft. Für ATP6 ist dies Transition stumm, für ATP8 ändert sie Leucin zu Prolin.

Im Bereich der ATP 6 kommt es zu keiner Änderung der kodierten Aminosäure Alanin, für die ATP 8 bewirkt die Mutation jedoch eine Änderung der Aminosäure von Leucin (unpolar) zu Prolin (unpolar). Die Mutation betrifft das zweite Basenpaar der 61. von 69 Aminosäuren der ATP 8. Die ATP 8 ist an dieser Stelle in der Evolution so wenig konserviert, dass ein Interspeziesvergleich mittels des BLAST-Algorithmus nicht möglich war. Es ist demnach davon auszugehen, dass es sich auch bei dieser Mutation um einen bisher unbeschriebenen Polymorphismus handelt.

Tab. 33: Interspeziesvergleich im Bereich ATP8, Aminosäurenposition 51-70

Pat. 23	51	W	E	P	K	W	T	K	I	C	S	P	H	S	L	P	P	Q	S	Ter	70
Mensch	51	W	E	P	K	W	T	K	I	C	S	L	H	S	L	P	P	Q	S	Ter	70
Schimpanse	52	W	E	P	K	W	T	K	I	Y	S	L	H	S	L	P	P	Q	S	Ter	70

Leucin ist an Position 61 kaum konserviert. Die umgebenden Regionen differieren zwischen den Spezies so stark, dass ein Vergleich mittels BLAST-Algorithmus nicht möglich war. Einzig der Schimpanse war genetisch ähnlich genug, um einen Vergleich zuzulassen.

Patient Nr. 13: Dieser Patient zeigte im Bereich der ND2 eine Transversion C→A an Position 5154. Das erste Chromatogramm zeigt die Mutation am Beginn der Sequenz. Da die Fehlerhäufigkeit zu Beginn und Ende einer Sequenz höher ist, wurde das Chromatogramm einer Sequenz, die mit einem weiteren Primer erstellt wurde, hinzugefügt. Auch hier zeigt sich wiederum die Transversion an der Nukleotidposition 5154, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich um eine echte Mutation und nicht um einen Sequenzierungsfehler handelt.

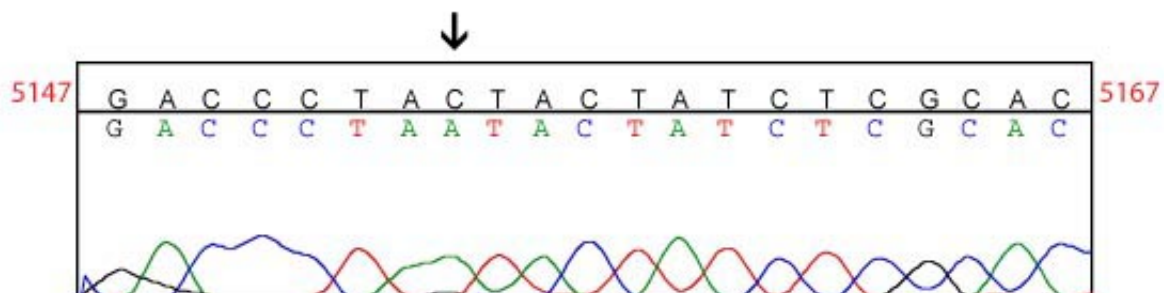


Abb. 20: Patient Nr. 13, np 5154: Homoplasmische Transversion C→A (Primer mtF ND2.2). Das Signal ist eher undeutlich, die Peaks sind nicht gut voneinander abgrenzbar, so dass mit Abbildung 21 eine weitere Darstellung erfolgt.

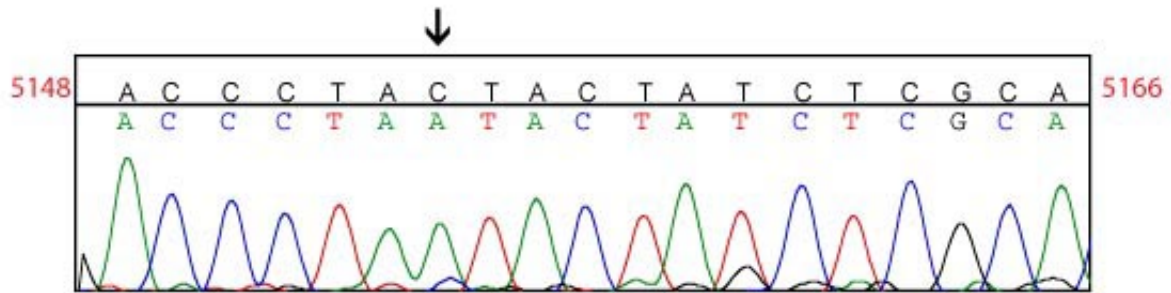


Abb. 21: Patient Nr. 13, np 5154: Homoplasmische Transversion C→A (Primer mtF ND2.1). In dieser Darstellung sind die Peaks eindeutig voneinander abgrenzbar. Dafür sieht man etwas mehr „Hintergrundrauschen“. In Verbindung mit Abb. 20 ist jedoch sicher, dass die Transversion vorliegt.

Diese Mutation führt zu einem Austausch der kodierten Aminosäure Leucin gegen Methionin. Die Mutation betrifft das erste Basenpaar des 229. Codons von insgesamt 348 Codons der ND2. Die Aminosäure Leucin ist an Position 229 in der Evolution wenig konserviert. Es darf daher angenommen werden, dass es sich bei dieser Mutation um einen nicht vorbeschriebenen Polymorphismus handelt.

Tab. 34: Interspeziesvergleich im Bereich ND2, Aminosäurepositionen 219-239

Pat. 13	219	L	N	L	N	S	-	-	S	T	T	T	L	M	I	S	R	T	W	N	K	L	T	W	239
Mensch	219	L	N	L	N	S	-	-	S	T	T	T	L	L	I	S	R	T	W	N	K	L	T	W	239
Schimpanse	219	L	N	L	N	S	-	-	S	T	T	T	L	L	I	S	R	T	W	N	K	L	T	W	239
Hund	219	F	M	L	N	S	-	-	S	T	T	T	L	S	L	S	H	M	W	N	K	F	P	L	239
Maus	219	L	M	L	N	N	-	-	S	M	T	I	N	S	I	S	L	L	W	N	K	T	Ü	A	239
Huhn	219	L	A	Q	I	K	V	L	K	L	S	T	L	L	I	S	-	-	W	T	K	P	W	M	239
Zebrafisch	219	L	K	V	L	S	-	-	A	T	K	I	N	T	L	T	T	T	W	P	K	S	P	I	239
Fruchtfliege	215	F	N	I	F	K	-	-	L	F	H	L	N	Q	L	F	S	W	F	V	N	S	K	-	235

Leucin ist an Position 229 evolutionär wenig konserviert, die Aminosäuren unterscheiden sich in der gesamten Proteinregion im Interspeziesvergleich deutlich.

Patient Nr. 14: Bei Patient Nr. 14 konnte eine Neumutation auf Keimbahnebene detektiert werden. An Position 5186 stellt sich im Bereich der ND2 eine Transversion

A→T dar. Diese Mutation bewirkt einen Aminosäureaustausch Tryptophan (polar) gegen Cystein (polar). Die Mutation betrifft das dritte Basenpaar des 239. Triplets. Insgesamt setzt sich die ND2 aus 348 Codons zusammen.

Das erste Chromatogramm zeigt die Mutation deutlich, jedoch zeigt es auch relativ starkes „Hintergrundrauschen“. Aus diesem Grunde wurde eine weitere Darstellung einer mit einem anderen Primer ermittelten Sequenz beigefügt, die die Mutation zwar als kleineren Peak, jedoch frei von störenden Verunreinigungen zeigt.

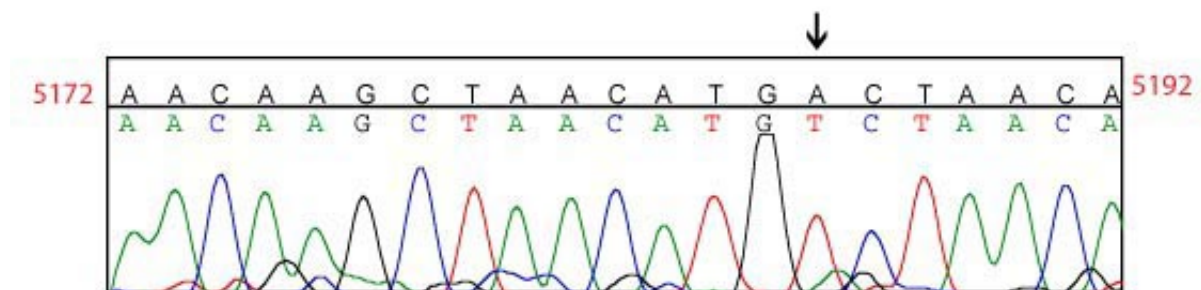


Abb. 22: Patient Nr. 14, np 5186: Homoplasmische Transversion A→T (Primer mtF ND2.2). Die Sequenz enthält viel Hintergrundrauschen, so dass eine weitere Darstellung (Abb. 23) erfolgt ist.

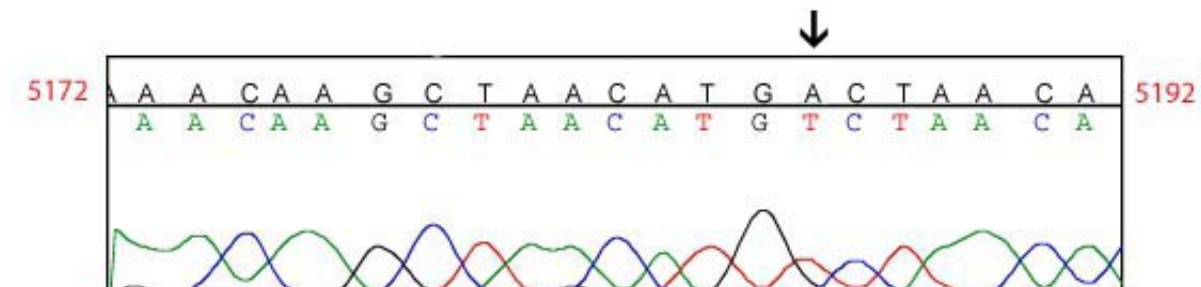


Abb. 23: Patient Nr. 14, np 5186: Transversion A→T (Primer mtF ND 2.1), hier mit deutlich geringeren Peaks aber ohne „Hintergrundrauschen“.

Der Interspeziesvergleich dieser Region ergibt, dass Tryptophan an dieser Position wenig konserviert ist. Schon bei niederen Vertebraten zeigen sich unterschiedliche Aminosäuren an dieser Position, so dass vermutet werden kann, dass es sich bei dieser Mutation um einen nicht vorbeschriebenen Polymorphismus handelt.

Tab. 35: Interspeziesvergleich im Bereich ND2, Aminosäurepositionen 229-249

Pat. 14	229	L	L	S	R	T	W	N	K	L	T	C	L	T	P	L	I	P	S	T	L	L	249
Mensch	229	L	L	S	R	T	W	N	K	L	T	W	L	T	P	L	I	P	S	T	L	L	249
Schimpanse	229	L	L	S	R	T	W	N	K	L	T	W	L	T	P	L	I	P	S	T	L	L	249
Hund	229	S	L	S	H	M	W	N	K	F	P	L	I	T	S	M	I	L	I	L	M	L	249
Maus	229	S	I	S	L	L	W	N	K	T	P	A	M	L	T	M	I	S	L	M	L	L	249
Huhn	229	L	I	S	-	-	W	T	K	T	P	M	L	N	A	T	V	M	L	T	L	L	249
Zebrafisch	229	T	L	T	T	T	W	P	K	S	P	I	L	A	A	I	A	T	L	V	M	L	249
Fruchtfliege	225	Q	L	F	S	W	F	V	N	S	K	I	L	K	F	T	L	F	M	N	F	L	245

Tryptophan ist an dieser Stelle wenig konserviert. Nur bei höheren Vertebraten stimmen die Aminosäuren überein.

Aufgrund der kleinen Stichprobe und den nur unzureichend zu ermittelnden Informationen betreffend den klinischen Verlauf und pathologischen Daten der PA wurde entgegen der ursprünglichen Absichten darauf verzichtet, Korrelationen zwischen dem Vorkommen somatischer mtDNA-Mutationen und dem Phänotyp oder klinischem Verlauf herzustellen oder Schlussfolgerungen daraus abzuleiten.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde den Frage nachgegangen, ob bei pilozytischen Astrozytomen Mutationen der mitochondrialen DNA auftreten und welcher Art diese sind. Dazu wurden Tumorproben und Blutproben von 19 Patienten mit pilozytischen Astrozytomen auf das Auftreten erworbener Mutationen im mitochondrialen Genom untersucht.

16 von 19 PA-Tumorproben (84 %) enthielten somatische Mutationen der mtDNA, insgesamt konnten 34 somatische Mutationen detektiert werden. 17 von 34 (50 %) Mutationen der mtDNA wurden in Genregionen gefunden, die Proteine der oxidativen Phosphorylierung kodieren. Dabei handelte es sich in vier Fällen um Insertionen, in den übrigen um Austausch einzelner Basen (28 Transitionen, zwei Transversionen). 31 Mutationen traten in homoplasmischer Form auf, drei davon waren heteroplasmisch. 31 Mutationen waren bereits als Polymorphismen registriert oder hatten keine Auswirkungen auf die kodierten Aminosäuren, so dass sie als stumme Mutationen betrachtet wurden.

Drei Mutationen führten zu einer Änderung der jeweils kodierten Aminosäure: M60V in der Untereinheit 6 der ATP-Synthase, L236I im Cytochrom B und L112M in der Untereinheit 1 der Cytochrom C Oxidase. Bei der Mutation im Bereich der ATP6 wurde das im evolutionären Verlauf nur wenig konservierte Methionin gegen Valin ausgetauscht. Es lässt sich daher vermuten, dass es sich bei dieser somatischen Mutation um einen bisher unbeschriebenen Polymorphismus ohne pathogenetische Auswirkungen handelt. Gleiches gilt für die somatische Mutation im Bereich CYTB, die zum Austausch der Aminosäure Leucin gegen Isoleucin führt. Leucin an dieser Position zeigt sich ebenfalls nur wenig evolutionär konserviert. Im Falle der CO1 wurde das an dieser Position stark konservierte Leucin gegen Methionin ausgetauscht. Jedoch ähneln sich Leucin und Methionin sowohl strukturell als auch in ihren biochemischen Eigenschaften.

Drei Probenpaare wiesen keinerlei Abweichungen von der Referenzsequenz auf, bei zwölf Patienten wurden ein bis zwei Mutationen gefunden. Zwei Probenpaare zeigten drei bis vier Mutationen, bei zwei Patienten konnten sechs bzw. sieben Mutationen detektiert werden.

Das deutliche Überwiegen von Transitionen ist konsistent mit den Ergebnissen vorangegangener Studien und könnte damit zu erklären sein, dass Mitochondrien über kein Mismatch-Reparatur-System für Transitionen verfügen [108]. Die Insertionen betrafen ausnahmslos den für seinen hohen Polymorphismusgrad bekannten Poly-C-Trakt des D-loops.

5.1 Verteilung der Mutationen im Genom

17 von 34 somatischen Mutationen (50 %) traten in Genregionen auf, die wichtige Bestandteile der oxidativen Phosphorylierung kodieren. Obwohl diese Mutationen sich insgesamt gleichmäßig im mitochondrialen Genom verteilen, ist ihre Häufung in proteinkodierenden Regionen unerwartet hoch. Die Anzahl der Mutationen in kodierenden Regionen der mtDNA, die in der vorliegenden Arbeit detektiert werden konnte, ist vergleichbar mit dem Vorkommen in hochmalignen Gliomen (32 %) oder Medulloblastomen (39 %). Verglichen dazu konnten in NF-1-assoziierten Tumoren keine mtDNA-Mutationen in proteinkodierenden Regionen gefunden werden. Drei der gefundenen Mutationen verursachten eine Änderung der kodierten Aminosäure: M60V in der ATP6-Untereinheit, L236I im Cytochrom B und L112M in der Cytochrom C Oxidase-Untereinheit 1. Die funktionellen Auswirkungen dieser Änderungen sind bis dato nicht bekannt. Es ist jedoch bekannt, dass die Freisetzung von Proteinen wie Cytochrom C, Apoptose-induzierender Faktor oder Endonuclease G aus dem Mitochondrium Apoptosekaskaden induzieren kann. Defekte im Cytochrom C wiederum können zur Akkumulation von ROS führen. In Verbindung mit verminderter apoptotischer Aktivität und verstärktem Zellwachstum kann dies wiederum zum Tumorwachstum beitragen.

Betrachtet man alle 34 gefundenen Mutationen, so liegt eine deutliche Häufung im Bereich des D-loops vor. Zwölf Mutationen traten allein in dieser Region auf. Dieses

Ergebnis stimmt mit anderen Studien überein, die den D-loop als „Hot Spot“ für Mutationen bei Tumorerkrankungen charakterisieren [109]. Aufgrund der Bedeutung des D-loops als Kontrollregion für die Replikation und Transkription der mtDNA könnten Mutationen in dieser Region eine verminderte Mitochondrienzahl oder veränderte Expression mitochondrialer Gene bedingen, die ihrerseits wiederum den mitochondrialen Metabolismus und die oxidative Phosphorylierung negativ beeinflussen.

Eine direkte pathogenetische Konsequenz lässt sich aus diesen Mutationen nicht ableiten, doch bestehen Hinweise darauf, dass eine erhöhte genetische Instabilität mit dem Auftreten von Tumorerkrankungen korreliert. Insbesondere deuten die Insertionen in den Poly-C-Regionen der HVI und HVII auf eine erhöhte genetische Instabilität hin.

Die übrigen 22 somatischen Mutationen liegen über das gesamte mitochondriale Genom verteilt vor. Weitere Anhäufungen im Sinne von „Hot Spots“ lassen sich nicht ausmachen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die geringe Fallzahl und die noch geringere Anzahl detektierter Mutationen, insbesondere solche, die pathogenetisch relevant sein könnten, doch war eine Konzentration der Mutationen auf einen Genlokus nicht zu erwarten.

Die 13 im mitochondrialen Genom kodierten Proteine sind allesamt Bestandteile der Atmungskette. Ebenfalls sind die in der mtDNA kodierten tRNA- und rRNA-Gene an der Expression dieser Gene beteiligt. Aufgrund dessen haben alle pathogenetisch relevanten Mutationen der mtDNA prinzipiell die gleichen Auswirkungen, nämlich eine Beeinträchtigung der Funktionen der Atmungskette. Infolge dieser Konvergenz können wirksame Mutationen über das gesamte mitochondriale Genom verteilt sein. Dies lässt sich am Beispiel hereditärer mitochondrialer Erkrankungen erklären. Hier besteht oft nur eine geringe Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp, insbesondere lässt sich die Ausprägung des Phänotyps häufig nicht durch die Lokalisation der zugrunde liegenden Mutation erklären, sondern korreliert mit dem Anteil mutierter Mitochondrien im erkrankten Gewebe (Heteroplasmiegrad, Schwellenwerteffekt).

5.2 Somatische Mutationen in proteinkodierenden Genabschnitten

Überraschenderweise konnte ein häufiges Vorkommen somatischer Mutationen in PA festgestellt werden (84 %). Vorangegangene Studien, die sich mit dem Vorkommen von Mutationen in Medulloblastomen beschäftigten, zeigten in 40 % der untersuchten Tumoproben somatische Veränderungen der mtDNA [Lueth et al., unpublizierte Daten]. Die mit NF1 assoziierten Neurofibrome wiesen in 43 % der Fälle mtDNA-Mutationen auf. Sogar in den weitaus maligneren Glioblastoma multiforme traten Mutationen der mitochondrialen DNA in geringerem Umfang als in PA auf (41 %). Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass somatische Mutationen der mitochondrialen DNA sich in Tumoren auch unabhängig vom WHO-Grad oder der Proliferationsrate entwickeln und vielleicht auch eine generelle Eigenschaft von pilozytischen Astrozytomen darstellen.

5.3 Polymorphismus versus somatische, stumme Mutation

25 der 34 detektierten somatischen Mutationen wurden bereits als Polymorphismen beschrieben. Vier Mutationen wurden als ebenfalls somatische Mutationen bei Patienten mit Karzinomen des Oropharynx detektiert. Je zwei Mutationen traten auch bei Untersuchungen von Patienten mit Prostatata- und Ovarialkarzinom auf. Je eine Mutation wurde auch bei Patienten mit Bronchial- und Schilddrüsenkarzinom gefunden, je eine bei Patienten mit M. Alzheimer, LHON und DEAF. Bei den Mutationen, die sowohl als Polymorphismus als auch als somatische Mutation in der Literatur vorbeschrieben sind, ist zu bedenken, dass nicht in allen Forschungsarbeiten den unterschiedlichen Haplotypen der mitochondrialen DNA genügend Beachtung geschenkt wird und somit haplotypspezifische Polymorphismen unter Umständen als spezifische Mutationen gewertet werden [110]. Auffällig ist, dass eine Vielzahl der gefundenen stummen Mutationen in gesunden Populationen als Polymorphismus bereits vorbeschrieben, also bereits auf Keimbahnebene vorhanden sind, während sie in der vorliegenden Untersuchung pilozytischer Astrozytome nur im Tumorgewebe auftraten.

Tab. 36: Somatische Mutationen

Pat. Nr.	Position	Mutation	Genregion	Aminosäure	vorbeschrieben als
3	228	konservierter Block	Trans G→A	noncod	Polymorphismus somatische Mutation bei Oropharynx-Ca
2	264	HVII	Trans T→C	noncod	Polymorphismus
15	303	HVII	Ins C	noncod	Polymorphismus
1	311	HVII	Ins C	noncod	Polymorphismus in Normalpopulation
6	311	HVII	Ins C	noncod	Polymorphismus
1	514	CA-Repeat-Region	Ins C	noncod	somatische Mutation bei Ovarial-Ca, Schilddrüsen-Ca, Brust-Ca
2	514	CA-Repeat-Region	Ins CA	noncod	somatische Mutation bei Ovarial-Ca, Schilddrüsen-Ca, Brust-Ca
1	827	RNR1	Trans A→G	noncod	somatische Mutation bei DEAF
3	1559	RNR1	Trans G→A	noncod	nicht vorbeschrieben
9	2416	RNR2	Trans T→C	noncod	Polymorphismus
13	2706	RNR2	Trans A→G	noncod	Polymorphismus
15	3480	ND1	Trans A→G	Lys	Polymorphismus somatische Mutation Prostata-Ca
10	5915	CO1	Trans C→T	Asp	Poylmorphismus
16	6237	CO1	Transv C→A	Leu→Met	nicht vorbeschrieben
10	6671	CO1	Trans T→C	His	Polymorphismus
5	6851	CO1	Trans C→T	Thr	nicht vorbeschrieben
4	7585	TD	Trans A→G	noncod	nicht vorbeschrieben
2	8610	ATP6	T→C	Pro	Polymorphismus
2	8614	ATP6	T→C	Leu	Polymorphismus
5	8697	ATP6	G→A	Met	Polymorphismus somatische Mutation bei Schilddrüsen-Ca
2	8704	ATP6	A→G	Met→Val	nicht vorbeschrieben
11	10115	ND3	Trans T→C	Ile	Polymorphismus
12	10873	ND4	Trans T→C	Pro	Polymorphismus
1	11251	ND4	Trans A→G	Leu	Polymorphismus in Normalpopulation
2	11719	ND4	Trans G→A	Gly	Polymorphismus
7	12130	ND4	Trans T→C	Phe	nicht vorbeschrieben

14	12372	ND5	Trans G→A	Leu	somatische Mutation bei Prostata-Ca Polymorphismus
5	14133	ND5	Trans A→G	Leu	Polymorphismus
5	15452	CYTB	Transv C→A	Leu→Ile	Polymorphismus bei LHON
5	16086	HVI	Trans T→C	noncod	Polymorphismus
18	16129	HVI	Trans G→A	noncod	Polymorphismus somatische Mutation bei Mundboden-Ca
5	16294	HVI	Trans C→T	noncod	Polymorphismus
2	16325	HVI	Trans T→C	noncod	Polymorphismus
15	16368	HVI	Trans T→C	noncod	Polymorphismus

Trans: Transition, Transv: Transversion. Die Darstellung zeigt, ob die gefundenen Mutationen bereits vorbeschrieben wurden. Auffällig ist, dass die Mutationen bei anderen neuroektodermalen Tumoren bisher nicht beschrieben wurden.

25 der gefundenen Mutationen sind bereits als Polymorphismen vorbeschrieben. Hier traten sie jedoch ausschließlich im Tumorgewebe auf und sind damit als stumme Mutationen zu betrachten. Bei diesen Mutationen handelt es sich bis auf die Transversion C15452A bei Patient 5, die zu einem AS-Austausch Leu-Ile führte, ausnahmslos um Mutationen ohne Auswirkungen auf die kodierten Aminosäuren, bzw. um Mutationen im wenig konservierten Teil des D-loops. Eine direkte pathogenetische Konsequenz lässt sich aus diesen Mutationen nicht ableiten. Polyak et al. wiesen jedoch darauf hin, dass auch Mutationen ohne direkte Auswirkung auf die Expression der Proteine der Atmungskette und damit auf deren Funktion im Zusammenspiel mit polymorphen Varianten der mtDNA (stummen Keimbahnmutationen) zu geringgradigen Änderungen der anfallenden Menge an ROS führen können. Leicht erhöhte Mengen an ROS wirken in hohem Grade mutagen.

Obwohl die gefundenen stummen Mutationen nicht direkt mit Störungen mitochondrialer Funktionen in Verbindung gebracht werden können, ist es denkbar, dass sie die Entstehung von ROS und dadurch indirekt die Pathogenese des Tumorwachstums begünstigen. Eine große Anzahl von stummen somatischen Mutationen der mtDNA kann auch Hinweis auf ein insgesamt erhöhtes Vorkommen von Mutationsereignissen im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe sein. Ein Grund dafür findet sich in der erhöhten Proliferationsrate maligner Zellen, ihrem erhöhten Sauerstoffverbrauch

und dem damit vermehrten Anfall an mutagenen ROS. Des Weiteren vermag auch die verminderte Apoptose- bzw. Mitoptoseaktivität von Tumorzellen zu einer Häufung mutagener Ereignisse beitragen. Ob die gefundenen Mutationen jedoch selbst mutagen sind oder zufällig auftreten, muss noch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.4 Homoplasmie und Heteroplasmie

Die gefundenen somatischen Mutationen waren fast ausnahmslos homoplasmisch. Die neuen Genotypen müssen also im Tumorgewebe akkumuliert haben. Dieses stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien überein, die in anderen Tumorentitäten ebenfalls vielfältige homoplasmisch auftretende somatische Mutationen der mtDNA aufzeigten und ist ebenfalls konsistent mit den durch Polyak et al. in Zellkulturen gemachten Beobachtungen [45]. Einen Erklärungsvorschlag dafür liefern Polyak et al., die die auffällige Homoplasmie durch eine höhere Replikationsrate mutierter Mitochondrien gegenüber dem Wildtyp erklären. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass in ihren Funktionen gestörte Mitochondrien eine Überreplikation ihres Genoms induzieren, vielleicht in dem Versuch, ihre verminderte Funktionsfähigkeit zu kompensieren. Hierdurch kann es sehr rasch zu einer Ausbreitung der mutierten Mitochondrienform innerhalb einer Zelle kommen. Klonales Wachstum dieser Zelle, entweder durch einen durch die mutierten Mitochondrien erworbenen oder durch eine nukleäre Mutation erlangten Selektionsvorteil erklärte das Überwiegen homoplasmischer Mutationen in Tumorzellen.

Geringgradige Heteroplasmien sind jedoch mit der Methode der direkten Sequenzierung nicht sicher detektierbar. Hier zeigen sich Methoden wie die TTGE (temporal temperature gradient gel electrophoresis) überlegen, mit deren Hilfe es möglich ist, auch nur kleinen Prozentteile veränderter mtDNA zu detektieren.

Diese Methode beruht auf dem unterschiedlichen Denaturierungsverhalten und der daraus resultierenden Laufgeschwindigkeit verschiedener DNA-Fragmente in einem denaturierenden Gel. Mit ihr ist eine sequenzspezifische Auftrennung von DNA-Fragmenten mit hoher Sensitivität und Spezifität möglich.

Die Durchführung der TTGE ist sehr zeitaufwendig. Die versuchsweise Etablierung der TTGE zeigte in dieser Arbeit nur unbefriedigende Ergebnisse, so dass auf Anwendung dieser Methode verzichtet werden musste. Die reduzierte Sensitivität gegenüber geringgradigen Heteroplasmien wurde in Kauf genommen, da das Vorliegen homoplasmischer Mutationen im Tumorgewebe aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse vorangegangener Studien erwartet werden konnte (s.o.)

5.5 Verteilung der Mutationen auf die Patienten

Die nachfolgenden Darstellungen geben einen Überblick über die Verteilung der gefundenen Mutationen auf die Patienten.

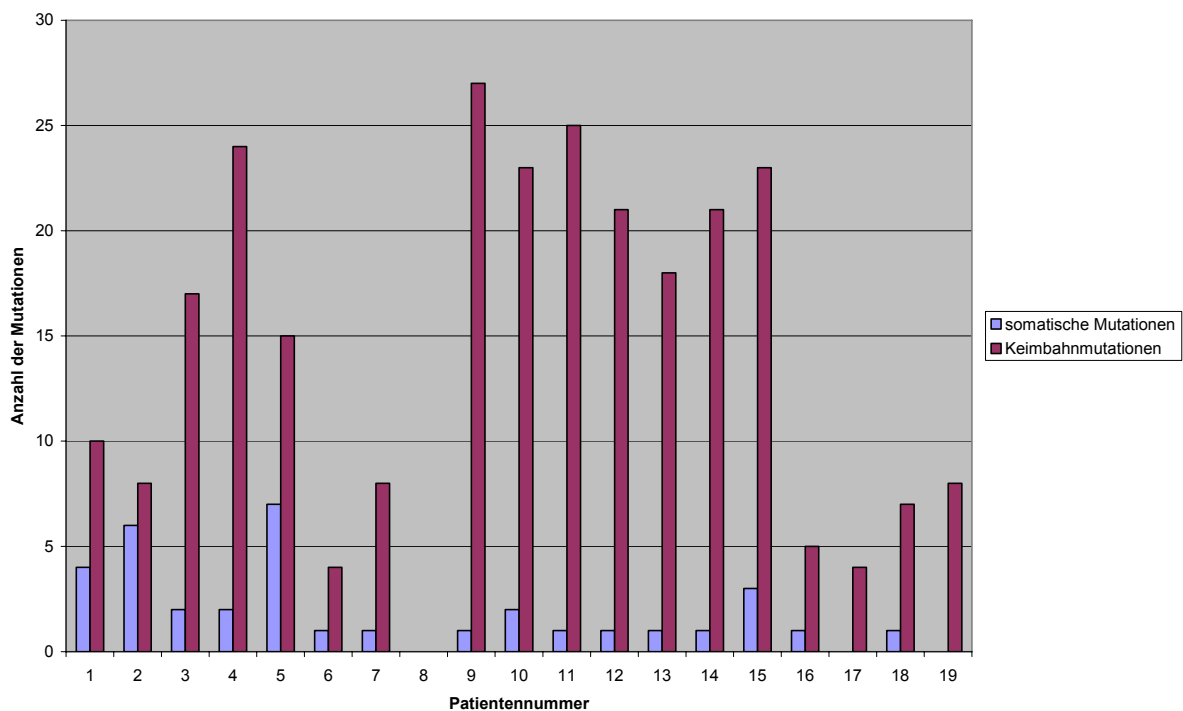


Abb. 24: Verteilung der Mutationen auf die Patienten

Auffällig sind hier insbesondere Patient Nr. 8, in dessen Tumormaterial sich keine einzige Mutation, weder somatischer Natur noch auf Keimbahnebene fand, und die Patienten Nr. 2 und Nr. 5, die sieben bzw. sechs somatische Mutationen aufwiesen.

Bei Patient Nr. 8 handelt es sich um einen Patienten, der trotz seines höheren Alters (37 Jahre bei Diagnosestellung) in die Untersuchung mit eingeschlossen wurde. Informationen zur Therapie, zum Auftreten eines Rezidivs oder zum derzeitigen klinischen Status waren nicht verfügbar, so dass lediglich Mutmaßungen über einen Zusammenhang zwischen dem Fehlen mitochondrialer Mutationen und dem höheren Lebensalter angestellt werden können. Dies wäre insofern zulässig, als mittlerweile davon ausgegangen wird, dass es sich bei juvenilen pilozytischen Astrozytomen um eine eigene Tumorentität handelt, die sich in ihrer Biologie und ihrem Verhalten von den pilozytischen Astrozytomen des Erwachsenenalters unterscheidet.

Der Tumor des Patienten Nr. 2 war in der Fossa posterior lokalisiert, der Patient erlitt trotz erfolgter Totalresektion ein Rezidiv und befindet sich nunmehr im Stadium der anhaltenden Remission.

Bei den bei diesem Patienten detektierten somatischen Mutationen handelt es sich in drei Fällen um Mutationen im Bereich der hypervariablen Regionen des D-loops, in drei weiteren Fällen um bereits als Polymorphismen beschriebene Mutationen in den Bereichen ND4 und ATP6, sowie in einem Fall um eine Mutation mit dadurch bedingter Aminosäureänderung im Bereich ATP6. Diese fand sich jedoch in einem wenig konservierten Abschnitt des Gens, so dass vermutet werden kann, dass diese Mutation keine große pathogenetische Relevanz besitzt.

Patient Nr. 5 erlitt nach Totalresektion und nachfolgender Chemotherapie eines im Cerebellum lokalisierten Tumors kein weiteres Rezidiv und befindet sich im Stadium der anhaltenden Remission.

Die sieben bei ihm detektierten Mutationen befanden sich in den hypervariablen Regionen des D-loops (2), im Bereich der ND5 (1), in der Region CO1 (1), der ATP6 (1) sowie im Bereich CYTB (1). Bei letztgenannter handelt es sich um eine bereits bekannte Mutation mit Änderung der kodierten Aminosäure. Aufgrund ihrer Lokalisation im wenig konservierten Bereich des Gens ist auch hier nur ein geringer Einfluss auf die Funktionalität des Gens wahrscheinlich.

Auch die Patienten Nr. 17 und 19 zeigten in ihren Tumorproben keine Abweichungen von der Referenzsequenz. Bei beiden Patienten befand sich der Tumor im Cerebellum und konnte in toto reseziert werden. Beide Patienten waren nachfolgend rezidivfrei.

Aus der Verteilung der detektierten Mutationen lässt sich im vorliegenden Material keine Korrelation zwischen Tumorlokalisierung und Auftreten somatischer Mutationen herstellen. Die Anzahl somatischer Mutationen der mtDNA reichte bei den untersuchten Patienten von einer bis acht Mutationen.

5.6 Keimbahnmutationen

Eine Vielzahl von Mutationen konnte sowohl in den Tumorproben als auch in den korrespondierenden Blutproben detektiert werden. Definitionsgemäß handelt es sich dabei um Mutationen auf Keimbahnebene. In der überwiegenden Mehrzahl handelte es sich hierbei um Polymorphismen ohne direkte pathogenetische Relevanz. Nur drei der insgesamt 268 Abweichungen von der Cambridge-Referenzsequenz bedingten eine Änderung der jeweils kodierten Aminosäure. Diese Mutationen befinden sich ausnahmslos in evolutionär wenig konservierten Genregionen. Die Annahme, dass es sich auch hierbei um bisher nicht beschriebene Polymorphismen handelt, ist damit gerechtfertigt.

5.7 Stärken und Limitierungen dieser Arbeit

Durch die Sequenzierung der Fragmente sowohl in 3'-5'- als auch in 5'-3'-Richtung konnte die Fehlinterpretation uneindeutiger Sequenzierungsergebnisse als Mutationen minimiert werden. Nur Mutationen, die sowohl in der Vorwärts- als auch in der Rückwärtssequenzierung oder in mehreren nebeneinander liegenden Fragmenten eindeutig identifizierbar waren, wurden in die Auswertungen mit einbezogen. Ebenfalls

wurde durch Verwendung einer Polymerase mit proof-reading Aktivität bei der Long Range PCR die Wahrscheinlichkeit von PCR-induzierten Pseudomutationen reduziert.

Ein Problem bei der Amplifizierung und Sequenzierung mitochondrialer DNA stellen die so genannten Pseudogene, auch NUMTS (Nuclear Mitochondrial DNA Sequences) genannt, dar. Diese ursprünglich ausschließlich mitochondrial enkodierten Sequenzen haben im Laufe der Evolution nukleäre Entsprechungen gefunden. Wallace et al. gelang der Nachweis von über 200 NUMTS beim Menschen [60].

Bei der Amplifizierung des mitochondrialen Genoms kann es deswegen leicht zu Co-Amplifikationen nukleärer Pseudogene durch fälschliche Primerbindung kommen. Das hier verwendete Primerset zeigte mehrfach nukleäre Sequenzentsprechungen. Durch das Vorschalten der Long-Range PCR vor die eigentliche Sequenzierung konnte dieses Problem vermieden werden. Die für die Long Range PCR verwendeten Primer zeigten im Blast-Programm keine nukleäre Sequenzentsprechungen. Auch die experimentelle Anwendung dieser Primer bei mitochondriendepletierten Zellen (ρ -Null-Zellen) zeigte keine PCR-Produkte.

Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten ist es bei Hirntumoren aus praktischen Gründen kaum möglich, aus den frischen chirurgischen Resektaten neben dem Tumorgewebe gesundes Referenzgewebe zu gewinnen. Möglich ist dies nur durch Mikrodissektion von in Paraffin eingebetteten Tumorproben. In der vorliegenden Arbeit wurde daher peripheres Blut als Referenzmaterial verwendet. Hierbei ist es möglich, dass geringgradige Heteroplasmien im den Tumor umgebenden gesunden Gewebe als somatische Mutationen im Tumor selbst fehlinterpretiert werden. Da die detektierten Mutationen jedoch ausnahmslos homoplasmischer Natur waren, kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse durch versteckte Heteroplasmie des Hirngewebes nicht beeinflusst wurden.

Eine weitere potentielle Fehlerquelle stellt die Tatsache dar, dass die chirurgischen Resektate nie gänzlich aus Tumormasse bestehen. Immer ist auch ein Teil gesundes Gewebe in der Probe enthalten. Eine deutliche Trennung von gesundem und tumorösen Gewebe lässt sich auch hier nur durch die Mikrodissektion erwirken. Jede Untersuchung am vermeintlichen Tumorgewebe birgt also die Gefahr, dass im umgebenden Gewebe vorkommende Mutationen fälschlicherweise als tumorspezifisch interpretiert werden. Auch hier macht es jedoch die Homoplasmie der Ergebnisse

unwahrscheinlich, dass unbeabsichtigt gesundes Gewebe untersucht wurde. Darüber hinaus zeigt die Arbeit von Kurtz et al., die das Mutationsspektrum in NF1-assoziierten Neurofibromen und umliegendem Gewebe betrachtet, dass in Abhängigkeit von der Nähe zum Tumor die Anzahl und der Homoplasmiegrad somatischer Mutationen der mtDNA ansteigen. In unmittelbarer Nähe zum Tumorgewebe ist demnach das Mutationsspektrum sehr ähnlich zum tumorzeleigenen Spektrum.

Von ursprünglich 37 in die Untersuchungen eingeschlossenen Patienten waren nur Tumor- und Blutproben von 19 Patienten komplett sequenzierbar. Nicht von allen Patienten waren konsistente Daten zur Tumorlokalisierung, Therapie, und Outcome erhältlich. Die geringe Fallzahl sowie die lückenhaften Informationen lassen keine validen Aussagen über das Auftreten spezifischer mitochondrialer Mutationen und Korrelationen zwischen dem Vorkommen von Mutationen und der Prognose pilozytischer Astrozytome zu. Eine Untersuchung eines weitaus größeren und homogeneren Patientenkollektivs ist nötig, um sichere Aussagen darüber treffen zu können.

5.8 Ausblick

Die Erforschung der Bedeutung der mitochondrialen Dysfunktion in der Krebsentstehung ist bereits seit langem von großem Interesse [31, 111, 112]. Obwohl die meisten Krebszellen somatische Mutationen der mtDNA enthalten, bleibt die Frage unbeantwortet, inwieweit diese Mutationen zur Karzinogenese beitragen. Bisher gibt es nur wenige Berichte, die eine direkte Korrelation zwischen Mutationen der mtDNA und der Krebsentstehung herstellen können.

Die Bedeutung von ROS in Hinblick auf Zellschäden ist mittlerweile gut erforscht, ebenso sind Hinweise dafür bekannt, dass Mutationen der mtDNA zu einer Zunahme der produzierten ROS führen [73]. Insbesondere kommt es zur Produktion von ROS, wenn der Komplex I der Atmungskette in seiner Funktion beeinträchtigt wird. Mutationen, die dies hervorrufen, sind verschiedentlich identifiziert worden [76, 113, 114]. Es erscheint verlockend zu spekulieren, dass andere mitochondriale Mutationen

mit bekannten Folgen für die Funktion der OXPHOS ebenfalls eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen [115].

Die meisten Modelle der Tumorentstehung berücksichtigen Mutationen in Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Telomerkontrolle. Aufgrund der wichtigen Funktion, die die Mitochondrien für die Regulation der Apoptose und der Generierung von ROS einnehmen, lassen sich die Mutationen der mtDNA jedoch schwerlich ignorieren. Die Mutationen, die sich in Mitochondrien finden, können die Apoptose mehr oder weniger direkt beeinflussen [77]. Die Tatsache, dass Tumorzellen, die eine mtDNA-Mutation tragen, schneller wachsen als Zellen mit identischen Nuklei aber unveränderten Mitochondrien [75], stützt die Theorie, dass Tumorzellen aufgrund ihrer bevorzugten Energiegewinnung aus anaerober Glykolyse einen Selektionsvorteil haben gegenüber Zellen, die auf die oxidative Phosphorylierung angewiesen sind, wenn angenommen wird, dass die veränderte mitochondriale DNA zu verminderter oder sogar fehlender Funktion der oxidativen Phosphorylierung führt. Diese Theorie wird bestärkt durch die Entdeckung einer MELAS-Mutation in einem Kolonkarzinom, führt doch insbesondere diese Mutation zu einer starken Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung [115].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass somatische Mutationen der mitochondrialen DNA in pilozytischen Astrozytomen in weitaus größerer Anzahl auftreten, als dies aus Forschungen an anderen neuroektodermalen Tumoren bekannt ist. Weitere Forschung wird notwendig sein, um die Rolle der mtDNA in der Pathogenese der pilozytischen Astrozytomen zu verstehen.

Es lässt sich jedoch feststellen, dass – übereinstimmend mit den Ergebnissen von Untersuchungen an anderen Tumorentitäten – in pilozytischen Astrozytomen somatische Mutationen der mitochondrialen DNA vorkommen und diese fast ausschließlich homoplasmischer Natur sind.

Der Nachweis von einer altersabhängigen Akkumulation von mtDNA-Mutationen in postmitotischen Zellen, aber auch in Stammzellen, die auch Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien haben können, untermauert die mitochondriale Theorie des Alterns. Hierin werden Zusammenhänge zwischen dem Auftreten mitochondrialer Mutationen und einem vermehrten Anfall von ROS hergestellt. Dies sowie die möglichen Auswirkungen mitochondrialer Mutationen auf die maligne

Transformation von Zellen im Rahmen der Karzinogenese wurden bereits im Kapitel „Einleitung und Grundlagen“ ausführlich dargestellt.

Die in dieser Arbeit detektierten Mutationen der mitochondrialen DNA in pilozytischen Astrozytomen können einen Zusammenhang zwischen mitochondrialen Defekten und der Karzinogenese nicht beweisen, sondern entsprechende Hypothesen lediglich deskriptiv stützen. Ebenfalls lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen keine Korrelationen zwischen Tumorlokalisation und –verhalten, insbesondere was das Auftreten von Rezidiven betrifft, herstellen.

Ziel weitergehender Forschung könnte es sein, aussagefähigere Belege für eine kanzerogene Wirkung mitochondrialer Funktionsdefekte zu finden. Dies könnte beispielsweise durch Experimente zur Auslösung genetischer Instabilität oder anhand von Tiermodellen, durch die bereits die mitochondriale Theorie des Alterns bestärkt werden konnte, geschehen [116].

Sollten sich dabei keine kausalen Zusammenhänge zwischen tumorassoziierten Mutationen der mtDNA und der Tumorgenese herausstellen, sondern die Ergebnisse lediglich die altersbedingte Akkumulation mitochondrialer Mutationen darstellen, so bleibt der Nachweis mitochondrialer Mutationen dennoch interessant. Insbesondere könnten sie als klonale Marker beim Nachweis minimaler Resterkrankung (MRD, minimal residual disease) von Nutzen sein. Da jede Zelle über bis zu mehreren hundert mitochondriale DNA-Kopien verfügt, könnte sich daraus ein Sensitivitätsvorteil bei der Verwendung mitochondrialer Mutationen in der MRD-Diagnostik um circa zwei Log-Stufen gegenüber der Verwendung nukleärer Mutationen in der Diagnostik ergeben.

ZUSAMMENFASSUNG

Die häufigsten primären Hirntumoren bei Kindern sind pilozytische Astrozytome. Genetische und molekulare Besonderheiten dieser Tumoren wurden bereits verschiedentlich erforscht, jedoch konnten daraus keine sicheren Zusammenhänge mit der Tumorbilogie abgeleitet werden. Da mehr und mehr mitochondriale Defekte mit Hirntumoren und anderen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden, wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob pilozytische Astrozytome (PA) Mutationen der mitochondrialen DNA enthalten. Hierfür wurde die Sequenz des gesamten mitochondrialen Genoms aus Tumorgewebe und korrespondierenden Blutproben von 19 Patienten mit pilozytischem Astrozytom analysiert. 16 von 19 PA-Tumorproben (84 %) enthielten somatische Mutationen der mtDNA, insgesamt konnten 34 somatische Mutationen detektiert werden. 17 von 34 (50 %) Mutationen der mtDNA wurden in Genregionen gefunden, die Proteine der oxidativen Phosphorylierung kodieren. Drei der Mutationen führten zu einer Änderung der kodierten Aminosäure: M60V in der Untereinheit 6 der ATP-Synthase, L236I im Cytochrom B und L112M in der Untereinheit 1 der Cytochrom C Oxidase. Es konnte damit gezeigt werden, dass Mutationen der mitochondrialen DNA in PA häufig vorkommen und oft in proteinkodierenden Regionen lokalisiert sind. Pilozytische Astrozytome zeigen den höchsten Prozentsatz mitochondrialer Mutationen verglichen mit den anderen bisher erforschten neuroektodermalen Tumorentitäten. Zur Erforschung der prognostischen Relevanz dieser Mutationen hinsichtlich der Tumorbilogie pilozytischer Astrozytome müssen sich weitere prospektive Studien mit größerem Patientenkollektiv anschließen.

SUMMARY

The most common brain tumors in childhood and adolescence are pilocytic astrocytomas (PA). Genetic and molecular abnormalities have been found, but were not consistently associated with any biologic feature. As an increasing number of mitochondrial defects has been related to brain tumors and cancer in general, we asked if PA harbor mutations of mitochondrial DNA (mtDNA). Thus, sequencing analysis of the complete mitochondrial genome of tumor tissue and corresponding blood samples from 19 patients suffering from pilocytic astrocytomas was performed. Sixteen out of 19 PA tissue samples (84 %) showed somatic mtDNA mutations and a total of 34 somatic mtDNA mutations were detected. Seventeen out of 34 (50 %) mtDNA mutations were found in genomic regions involved in important pathways of oxidative phosphorylation. Three of the mutations in protein coding regions were missense mutations: M60V in ATP synthase subunit 6, L236I in cytochrome b and L112M in cytochrome c oxidase subunit 1. We were able to demonstrate that mtDNA mutations occur in PA and that they are frequently located in protein coding regions. PA were found to have the highest percentage of mitochondrial mutations of any of the neuroectodermal tumor entities studied to date. In order to reveal the prognostic importance of these mutations for PA biology, larger series need to be studied prospectively.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Louis, D.N., H. Ohgaki, O.D. Wiestler, et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
2. Kaatsch, P., C.H. Rickert, J. Kuhl, et al., *Population-based epidemiologic data on brain tumors in German children*. Cancer, 2001. **92**(12): p. 3155-64.
3. *Deutsches Kinderkrebsregister*. 2007.
4. Burger, P.C., K.J. Cohen, M.K. Rosenblum, et al., *Pathology of Diencephalic Astrocytomas*. Pediatric Neurosurgery, 2000. **32**(4): p. 214-219.
5. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(6): p. 479-89.
6. Pietsch, T. and O.D. Wiestler, *Molecular Neuropathology of Astrocytic Brain Tumors*. Journal of Neuro-Oncology, 1997. **35**(3): p. 211-222.
7. Rumboldt, Z., D.L.A. Camacho, D. Lake, et al., *Apparent Diffusion Coefficients for Differentiation of Cerebellar Tumors in Children*. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. **27**(6): p. 1362-1369.
8. Pfister, S., W.G. Janzarik, M. Remke, et al., *BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas*. J Clin Invest, 2008. **118**(5): p. 1739-49.
9. Griffin, C.A., P.P. Long, B.S. Carson, et al., *Chromosome abnormalities in low-grade central nervous system tumors*. Cancer Genetics and Cytogenetics, 1992. **60**(1): p. 67-73.
10. Bhattacharjee, M.B., D.D. Armstrong, H. Vogel, et al., *Cytogenetic analysis of 120 primary pediatric brain tumors and literature review*. Cancer Genetics and Cytogenetics, 1997. **97**(1): p. 39-53.
11. Karnes, P.S., T.N. Tran, M.Y. Cui, et al., *Cytogenetic analysis of 39 pediatric central nervous system tumors*. Cancer Genet Cytogenet, 1992. **59**(1): p. 12-9.
12. Scheurlen, W.G. and L. Senf, *Analysis of the GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in childhood brain tumors*. Int J Cancer, 1995. **64**(4): p. 234-8.
13. Kimmel, D.W., J.R. O'Fallon, B.W. Scheithauer, et al., *Prognostic value of cytogenetic analysis in human cerebral astrocytomas*. Ann Neurol, 1992. **31**(5): p. 534-42.
14. Neumann, E., D.K. Kalousek, M.G. Norman, et al., *Cytogenetic analysis of 109 pediatric central nervous system tumors*. Cancer Genetics and Cytogenetics, 1993. **71**(1): p. 40-49.
15. Fujii, Y., T. Hongo, and Y. Hayashi, *Chromosome analysis of brain tumors in childhood*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. **11**(4): p. 205-15.
16. Agamanolis, D.P. and J.M. Malone, *Chromosomal abnormalities in 47 pediatric brain tumors*. Cancer Genetics and Cytogenetics, 1995. **81**(2): p. 125-134.
17. Orr, L.C., J. Fleitz, L. McGavran, et al., *Cytogenetics in pediatric low-grade astrocytomas*. Med Pediatr Oncol, 2002. **38**(3): p. 173-7.
18. Lang, F.F., D.C. Miller, S. Pisharody, et al., *High frequency of p53 protein accumulation without p53 gene mutation in human juvenile pilocytic, low grade and anaplastic astrocytomas*. Oncogene, 1994. **9**(3): p. 949-54.

19. Deimling, A., D.N. Louis, A.G. Menon, et al., *Deletions on the long arm of chromosome 17 in pilocytic astrocytoma*. Acta Neuropathologica, 1993. **86**(1): p. 81-85.
20. Kluwe, L., C. Hagel, M. Tatagiba, et al., *Loss of NF1 alleles distinguish sporadic from NF1-associated pilocytic astrocytomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(9): p. 917-20.
21. Janzarik, W.G., C.P. Kratz, N.T. Loges, et al., *Further evidence for a somatic KRAS mutation in a pilocytic astrocytoma*. Neuropediatrics, 2007. **38**(2): p. 61-3.
22. Reifenberger, J., G.U. Ring, U. Gies, et al., *Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression*. J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(7): p. 822-31.
23. Watanabe, K., O. Tachibana, K. Sata, et al., *Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas*. Brain Pathol, 1996. **6**(3): p. 217-23; discussion 23-4.
24. Jones, D.T., K. Ichimura, L. Liu, et al., *Genomic analysis of pilocytic astrocytomas at 0.97 Mb resolution shows an increasing tendency toward chromosomal copy number change with age*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(11): p. 1049-58.
25. Gnekow, A. (2006) *Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2006 Volume*,
26. J Kühl, R.K., *ZNS-Tumoren in: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, ed. G.G. H Gadner, CH Niemeyer, J Ritter. Vol. 777. 2006: Springer Verlag.
27. AK Gnekow, P.K., R Kortmann, O Wiestler, *HIT-LGG*. Klinische Pädiatrie, 2000. **212**(177).
28. Gnekow, A., *Therapie von Gliomen niedriger Malignität im Kindes- und Jugendalter*, in *Informationsschif der Aktion für krebskranke Kinder e.V.* 2003.
29. Parsa, C.F. and S. Givrad, *Juvenile pilocytic astrocytomas do not undergo spontaneous malignant transformation: grounds for designation as hamartomas*. Br J Ophthalmol, 2008. **92**(1): p. 40-46.
30. Gnekow AK, K.P., Kortmann R, Wiestler O, *HIT-LGG*. Klinische Pädiatrie, 2000. **212**(177).
31. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(2): p. 309–314.
32. Schulz, T.J., R. Thierbach, A. Voigt, et al., *Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited*. J. Biol. Chem., 2005: p. M511064200.
33. Sagan, L., *On the origin of mitosing cells*. J Theor Biol, 1967. **14**(3): p. 255-74.
34. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *Mitochondrial Evolution*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1476-1481.
35. Wallace, D.C., *Mitochondrial diseases in man and mouse*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1482-8.
36. Gyllensten, U., D. Wharton, A. Josefsson, et al., *Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice*. Nature, 1991. **352**(6332): p. 255-257.
37. Shitara, H., J.I. Hayashi, S. Takahama, et al., *Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage*. Genetics, 1998. **148**(2): p. 851-7.
38. Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrell, et al., *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature, 1981. **290**(5806): p. 457-65.
39. Nicholls, D.G., *Mitochondria and calcium signaling*. Cell Calcium, 2005. **38**(3-4): p. 311-317.

40. Saraste, M., *Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1488-1493.
41. Stuart, J.A., K.M. Brindle, J.A. Harper, et al., *Mitochondrial Proton Leak and the Uncoupling Proteins*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1999. **31**(5): p. 517-524.
42. Waris, G. and H. Ahsan, *Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions*. J Carcinog, 2006. **5**: p. 14.
43. Yamamoto, H., M. Tanaka, M. Katayama, et al., *Significant existence of deleted mitochondrial DNA in cirrhotic liver surrounding hepatic tumor*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992. **182**(2): p. 913-920.
44. Li, *Role of ROS in multistage carcinogenesis in oxygene radicals and disease progress*. Academic Press, 1997 p. 237-277.
45. Polyak, K., Y. Li, H. Zhu, et al., *Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours*. Nat Genet, 1998. **20**(3): p. 291-293.
46. Li, H., H. Zhu, C.-j. Xu, et al., *Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
47. Letai, A., M.C. Bassik, L.D. Walensky, et al., *Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2002. **2**(3): p. 183-92.
48. Wei, M.C., T. Lindsten, V.K. Mootha, et al., *tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c*. Genes Dev., 2000. **14**(16): p. 2060-2071.
49. Antonsson, B., S. Montessuit, B. Sanchez, et al., *Bax Is Present as a High Molecular Weight Oligomer/Complex in the Mitochondrial Membrane of Apoptotic Cells*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(15): p. 11615-11623.
50. Kuwana, T. and D.D. Newmeyer, *Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis*. Current Opinion in Cell Biology, 2003. **15**(6): p. 691-699.
51. Kroemer, G., *Mitochondrial control of apoptosis: an overview*. Biochem Soc Symp, 1999. **66**: p. 1-15.
52. Adams, J.M., *Ways of dying: multiple pathways to apoptosis*. Genes Dev., 2003. **17**(20): p. 2481-2495.
53. Du, C., M. Fang, Y. Li, et al., *Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition*. Cell, 2000. **102**(1): p. 33-42.
54. Green and John, C., nbsp, and D.R. Reed, *Mitochondria and Apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-1312.
55. Green, D.R. and G. Kroemer, *The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death*. Science, 2004. **305**(5684): p. 626-629.
56. Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, et al., *Bax and Adenine Nucleotide Translocator Cooperate in the Mitochondrial Control of Apoptosis*. Science, 1998. **281**(5385): p. 2027-2031.
57. Green, J., C., nbsp, and D.R. Reed, *Mitochondria and Apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-1312.
58. Skulachev, V.P., *Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms*. Molecular Aspects of Medicine, 1999. **20**(3): p. 139-184.

59. Tsuzuki, T., H. Nomiya, C. Setoyama, et al., *Presence of mitochondrial-DNA-like sequences in the human nuclear DNA*. *Gene*, 1983. **25**(2-3): p. 223-229.
60. Wallace, D.C., C. Stuard, D. Murdock, et al., *Ancient mtDNA sequences in the human nuclear genome: A potential source of errors in identifying pathogenic mutations*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(26): p. 14900-14905.
61. Shay, J.W., T. Baba, Q.M. Zhan, et al., *HeLaTG cells have mitochondrial DNA inserted into the c-myc oncogene*. *Oncogene*, 1991. **6**(10): p. 1869-74.
62. Parr, R.L., J. Maki, B. Reguly, et al., *The pseudo-mitochondrial genome influences mistakes in heteroplasmy interpretation*. *BMC Genomics*, 2006. **7**: p. 185.
63. Parfait, B., P. Rustin, A. Munnich, et al., *Coamplification of Nuclear Pseudogenes and Assessment of Heteroplasmy of Mitochondrial DNA Mutations*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998. **247**(1): p. 57-59.
64. Davis, R.E., S. Miller, C. Herrstadt, et al., *Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(9): p. 4526-4531.
65. Carew, J.S., Y. Zhou, M. Albitar, et al., *Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications*. *Leukemia*, 2003. **17**(8): p. 1437-47.
66. Croteau, D.L., R.H. Stierum, and V.A. Bohr, *Mitochondrial DNA repair pathways*. *Mutat Res*, 1999. **434**(3): p. 137-48.
67. Yakes, F.M. and B. Van Houten, *Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(2): p. 514-519.
68. Linnane, A.W., S. Marzuki, T. Ozawa, et al., *Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases*. *Lancet*, 1989. **1**(8639): p. 642-5.
69. Wallace, D.C., *Diseases of the mitochondrial DNA*. *Annu Rev Biochem*, 1992. **61**: p. 1175-212.
70. Wallace, D.C., *Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(19): p. 8739-46.
71. Wallace, D.C., G. Singh, M.T. Lott, et al., *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy*. *Science*, 1988. **242**(4884): p. 1427-30.
72. Holt, I.J., A.E. Harding, and J.A. Morgan-Hughes, *Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies*. *Nature*, 1988. **331**(6158): p. 717-9.
73. Liu, Y., G. Fiskum, and D. Schubert, *Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain*. *J Neurochem*, 2002. **80**(5): p. 780-7.
74. Mattiazzi, M., M. D'Aurelio, C.D. Gajewski, et al., *Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(33): p. 29626-33.
75. Petros, J.A., A.K. Baumann, E. Ruiz-Pesini, et al., *mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(3): p. 719-24.
76. Mattiazzi, M., C. Vijayvergiya, C.D. Gajewski, et al., *The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(8): p. 869-79.

77. Shidara, Y., K. Yamagata, T. Kanamori, et al., *Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis*. *Cancer Res*, 2005. **65**(5): p. 1655-63.
78. Kirches, E., C. Mawrin, R. Schneider-Stock, et al., *Mitochondrial DNA as a Clonal Tumor Cell Marker: Gliomatosis Cerebri*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2003. **61**(1): p. 1-5.
79. Liu, V.W.S., H.H. Shi, A.N.Y. Cheung, et al., *High Incidence of Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Human Ovarian Carcinomas*. *Cancer Res*, 2001. **61**(16): p. 5998-6001.
80. Wong, L.-J.C., M. Lueth, X.-N. Li, et al., *Detection of Mitochondrial DNA Mutations in the Tumor and Cerebrospinal Fluid of Medulloblastoma Patients*. *Cancer Res*, 2003. **63**(14): p. 3866-3871.
81. Máximo, V. and M. Sobrinho-Simões, *Hürthle cell tumours of the thyroid. A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance*. *Virchows Archiv*, 2000. **437**(2): p. 107-115.
82. Penta, J.S., F.M. Johnson, J.T. Wachsman, et al., *Mitochondrial DNA in human malignancy*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2001. **488**(2): p. 119-133.
83. Tan, D.-J., R.-K. Bai, and L.-J.C. Wong, *Comprehensive Scanning of Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Breast Cancer*. *Cancer Res*, 2002. **62**(4): p. 972-976.
84. Maximo, V., P. Soares, J. Lima, et al., *Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hurthle cell tumors*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(5): p. 1857-65.
85. Sharp, M.G., S.M. Adams, R.A. Walker, et al., *Differential expression of the mitochondrial gene cytochrome oxidase II in benign and malignant breast tissue*. *J Pathol*, 1992. **168**(2): p. 163-8.
86. Simonnet, H., N. Alazard, K. Pfeiffer, et al., *Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(5): p. 759-768.
87. Kurtz, A., M. Lueth, L. Kluwe, et al., *Somatic mitochondrial DNA mutations in neurofibromatosis type 1-associated tumors*. *Mol Cancer Res*, 2004. **2**(8): p. 433-41.
88. Nomoto, S., K. Yamashita, K. Koshikawa, et al., *Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(2): p. 481-7.
89. Nomoto, S., K. Yamashita, K. Koshikawa, et al., *Mitochondrial D-loop Mutations As Clonal Markers in Multicentric Hepatocellular Carcinoma and Plasma*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(2): p. 481-487.
90. Jeronimo, C., S. Nomoto, O.L. Caballero, et al., *Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids*. *Oncogene*, 2001. **20**(37): p. 5195-8.
91. Fliss, M.S., H. Usadel, O. Caballero, et al., *Facile Detection of Mitochondrial DNA Mutations in Tumors and Bodily Fluids*. *Science*, 2000. **287**(5460): p. 2017-2019.
92. Kirches, E., M. Michael, C. Woy, et al., *Loss of heteroplasmy in the displacement loop of brain mitochondrial DNA in astrocytic tumors*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999. **26**(1): p. 80-3.
93. Kirches, E., G. Krause, M. Warich-Kirches, et al., *High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples*. *Int J Cancer*, 2001. **93**(4): p. 534-8.

94. Kurtz, A., M. Lueth, L. Kluwe, et al., *Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Neurofibromatosis Type 1-Associated Tumors*. *Mol Cancer Res*, 2004. **2**(8): p. 433-441.
95. Barath, P., B. Albert-Fournier, K. Luciakova, et al., *Characterization of a Silencer Element and Purification of a Silencer Protein That Negatively Regulates the Human Adenine Nucleotide Translocator 2 Promoter*. *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**(6): p. 3378-3384.
96. Hunter, A.W. and L. Wordeman, *How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics*. *J Cell Sci*, 2000. **113**(24): p. 4379-4389.
97. Zabrecky, J.R. and R.D. Cole, *Binding of ATP to tubulin*. *Nature*, 1982. **296**(5859): p. 775-6.
98. Lee, G.M., *Characterization of mitotic motors by their relative sensitivity to AMP-PNP*. *J Cell Sci*, 1989. **94**(3): p. 425-441.
99. Hyman, A.A. and T.J. Mitchison, *Two different microtubule-based motor activities with opposite polarities in kinetochores*. *Nature*, 1991. **351**(6323): p. 206-211.
100. Giaretti, W., *A model of DNA aneuploidization and evolution in colorectal cancer*. *Lab Invest*, 1994. **71**(6): p. 904-10.
101. Löffler, M., J. Jöckel, and G. Schuster, *Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1997. **174**(1): p. 125-129.
102. Kunz, B.A., S.E. Kohalmi, T.A. Kunkel, et al., *International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability*. *Mutat Res*, 1994. **318**(1): p. 1-64.
103. Wong, L.-J.C., M.-H. Liang, H. Kwon, et al., *Comprehensive Scanning of the Entire Mitochondrial Genome for Mutations*. *Clin Chem*, 2002. **48**(11): p. 1901-1912.
104. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
105. Andrews, R.M., I. Kubacka, P.F. Chinnery, et al., *Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA*. *Nat Genet*, 1999. **23**(2): p. 147.
106. Bandelt, H.-J., A. Salas, and C. Bravi, *What is a 'novel' mtDNA mutation – and does 'novelty' really matter?* *Journal of Human Genetics*, 2006. **51**(12): p. 1073-1082.
107. Jazin, E., SoodyallHimla, JalonenPaula, et al., *Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism*. *Nat Genet*, 1998. **18**(2): p. 109-110.
108. Foury, F., J. Hu, and S. Vanderstraeten, *Mitochondrial DNA mutators*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(22): p. 2799-811.
109. Stoneking, M., *Hypervariable Sites in the mtDNA Control Region Are Mutational Hotspots*. 2000. **67**(4): p. 1029-1032.
110. Salas, A., Y.G. Yao, V. Macaulay, et al., *A critical reassessment of the role of mitochondria in tumorigenesis*. *PLoS Med*, 2005. **2**(11): p. e296.
111. Bianchi, N.O., M.S. Bianchi, and S.M. Richard, *Mitochondrial genome instability in human cancers*. *Mutat Res*, 2001. **488**(1): p. 9-23.
112. Bartnik, E., A. Lorenc, and K. Mroczek, *Human mitochondria in health, disease, ageing and cancer*. *J Appl Genet*, 2001. **42**(1): p. 65-71.
113. Vives-Bauza, C., R. Gonzalo, G. Manfredi, et al., *Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA*. *Neurosci Lett*, 2006. **391**(3): p. 136-41.

114. Lenaz, G., A. Baracca, V. Carelli, et al., *Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1658**(1-2): p. 89-94.
115. Lorenc, A., J. Bryk, P. Golik, et al., *Homoplasmic MELAS A3243G mtDNA mutation in a colon cancer sample*. Mitochondrion, 2003. **3**(2): p. 119-24.
116. Trifunovic, A., A. Wredenberg, M. Falkenberg, et al., *Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 417-23.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: PA, Makro- und Mikroskopie 14

Abb. 2: Therapieschema der pilozytischen Astrozytome 18

Abb. 3: Das mitochondriale Genom 22

Abb. 4: Die Atmungskette 24

Abb. 5: Die Apoptosekaskade 28

Abb. 6: Replikative Segregation 30

Abb. 7: Mutationen der mtDNA 35

Abb. 8: Verteilung der somatischen Mutationen 60

Abb. 9: Patient Nr 3, np 1559 (Primer mtF 12S) 63

Abb. 10: Patient Nr. 3, np 1559 (Primer mtF V) 63

Abb. 11: Patient Nr 7, np 12130 65

Abb. 12: Patient Nr 5, np 6851 66

Abb. 13: Patient Nr 16, np 6237 66

Abb. 14: Patient Nr. 2, np 8704 68

Abb. 15: Patient Nr. 5, np 15452 70

Abb. 16: Patient Nr. 4, np 7585 72

Abb. 17: Kleeblattstruktur der tRNA für Aspartat 72

Abb. 18: Verteilung der Keimbahnmutationen 73

Abb. 19: Patient Nr. 7, np 8547 75

Abb. 20: Patient Nr. 13, np 5154 76

Abb. 21: Patient Nr. 13, np 5154 77

Abb. 22: Patient Nr 14, np 5186 78

Abb. 23: Patient Nr. 14, np 5186 78

Abb. 24: Verteilung der Mutationen auf die Patienten 87

Tab. 1: Die Funktionen der Mitochondrien im Zellstoffwechsel 23

Tab. 2: Beispiele für mitochondriale oder mit mitochondrialen Defekten assoziierte
Erkrankungen 32

Tab. 3: Klinische Informationen zu den Patienten 41

Tab. 4: Vorwärtsprimer 44

Tab. 5: Rückwärtsprimer 45

Tab. 6: Primerpaare der Long Range-PCR 47

Tab. 7: Long Range-PCR Reaktionsansatz 48

Tab. 8: Long Range-PCR Reaktionsbedingungen.....	48
Tab. 9: Sequenzierungs-PCR Reaktionsansatz	51
Tab. 10: Sequenzierungs-PCR Reaktionsbedingungen	51
Tab. 11: Chemikalien.....	53
Tab. 12: Reagenziensysteme (Kits).....	54
Tab. 13: Enzyme und Zelllinie	54
Tab. 14: DNA-Präparationssystem	55
Tab. 15: DNA-Längenmarker, dNTPs.....	55
Tab. 16: Lösungen.....	55
Tab. 17: Primer.....	56
Tab. 18: Filmmaterial.....	56
Tab. 19: Software und Webseiten	56
Tab. 20: Geräte	57
Tab. 21: Somatische Mutationen im D-loop.....	61
Tab. 22: Somatische Mutationen in den Regionen RNR 1 und RNR 2.....	62
Tab. 23: Somatische Mutationen in den Genregionen ND 1-5	64
Tab. 24: Somatische Mutationen im Bereich der COI.....	65
Tab. 25: Interspeziesvergleich im Genlokus COI, Aminosäurenpositionen 102-123	67
Tab. 26: Somatische Mutationen im Bereich ATP6	68
Tab. 27: Interspeziesvergleich im Bereich ATP6, Aminosäurepositionen 50-70.....	69
Tab. 28: Somatische Mutationen im Bereich CYTB.....	70
Tab. 29: Interspeziesvergleich im Bereich CYTB, Aminosäurepositionen 226-246.....	70
Tab. 30: Somatische Mutationen im Bereich der tRNA	72
Tab. 31: Bisher nicht beschriebene Keimbahnmutationen	74
Tab. 32: Keimbahnmutationen mit Änderung der kodierten Aminosäure	75
Tab. 33: Interspeziesvergleich im Bereich ATP8, Aminosäurenposition 51-70	76
Tab. 34: Interspeziesvergleich im Bereich ND2, Aminosäurepositionen 219-239	77
Tab. 35: Interspeziesvergleich im Bereich ND2, Aminosäurepositionen 229-249:	79
Tab. 36: Somatische Mutationen.....	84

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. G. Henze für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, in einer solch freundlichen und engagierten Arbeitsgruppe forschen zu können.

Herrn Dr. med. P. Hernáiz Driever danke ich ganz besonders für die nimmermüde Betreuung, Beratung und motivierende sowie wissenschaftliche Begleitung meiner Arbeit.

Ich danke Frau M. Lüth, deren eigene Arbeiten der meinen voraus gingen, die mich in das Forschungsgebiet der mitochondrialen Mutationen einführte und mir die methodischen Grundlagen vermittelte.

Danke an meine Mitstreiterin Frau A. Giese für die gemeinsame Forschungszeit, das gegenseitige Mutmachen und die guten Ideen auf dem langen Weg bis hierhin.

Danke den Mitarbeiterinnen des Labors der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie der Charité für die geduldige Anleitung und Einweisung in die praktischen Arbeiten und ihre hilfreichen Vorschläge. Insbesondere danke ich auch Frau Dr. rer. nat. R. Kirschner-Schwabe und Frau Dr. rer. nat. C. Eckert, die mich mit fundiertem Hintergrundwissen und praktischer Laborerfahrung bei allen auftretenden Problemen stets kompetent und freundlich unterstützten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. A. von Deimling und Herrn Prof. Dr. med. T. Pietsch, die mir die Proben zur Verfügung stellten sowie Frau Dr. L.J. Wong, deren Primerset ich adaptieren durfte. Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Max-Delbrück-Zentrums, die mir ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite standen und mich als Gast ihre Geräte und Räumlichkeiten nutzen ließen.

Danke der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, die meine Arbeit durch ein Promotionsstipendium und Sachmittelzuschüsse so großzügig finanziell unterstützte.

Liebe Freunde, liebe Familie, danke, dass Ihr mich auf diesem Weg begleitet und immer unterstützt habt!

VERÖFFENTLICHUNGEN

Giese A, Kirschner-Schwabe R, Blumchen K, Wronski L, Shalapour S, Prada J, Driever PH, Brauer M, Schuelke M, Henze G, Seeger K „Prenatal manifestation of of pancytopenia in Pearson marrow-pancreas syndrome caused by a mitochondrial DNA deletion. “Am J Med Genet, 2007, 285-8 (143)

Lueth M¹, Wronski L¹, Giese A, Kirschner-Schwabe R, Pietsch T, von Deimling A, Henze G, Kurtz A, Driever PH „Somatic mitochondrial mutations in pilocytic astrocytoma“ Cancer Genet. Cytogenet. 2009 Jul;192(1):30-5.

(1: authors contributed equally)

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Ich, Lena Wronski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Mutationsanalyse des mitochondrialen Genoms bei pilozytischen Astrozytomen im Kindesalter“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift