

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung des *SNF5/INI1*-Gens bei Plexustumoren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Joo-Hun David Eum
aus Weilburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. von Deimling
2. Prof. Dr. I. Petersen
3. Prof. Dr. T. Pietsch

Datum der Promotion: 07.12.2007

In Liebe und Dankbarkeit
meiner Familie gewidmet

ABKÜRZUNGEN

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AgNO ₃	Silbernitrat
APS	Ammoniumpersulfat
aq. deion.	Deionisiertes Wasser
BAA	Bisacrylamid
Bp	Basenpaare
CM	CentiMorgan
DATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCTP	Desoxycytidintriphosphat
DdNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DITP	Desoxyinosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EtOH	Ethanol
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ CO	Formaldehyd
H ₃ CCOOH	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HNO ₃	Salpetersäure
KCl	Kaliumchlorid
Lsg.	Lösung
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger-RNA
Na ₂ CO ₃	Natriumkarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NF2	Neurofibromatose Typ 2

PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Rb	Retinoblastom
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSCP	single-strand conformation polymorphism (Einzelstrangkonformationspolymorphismus)
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units (Einheiten)
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

1.	EINLEITUNG.....	
1.1	Charakterisierung der Plexustumore und ihre Einteilung in Subtypen.....	
1.2	Tumorassoziierte Gene und Loss of Heterozygosity.....	
1.2.1	Protoonkogene.....	
1.2.2	Tumorsuppressorgene.....	
1.3	Molekulargenetik von Plexustumoren.....	
1.3.1	Genetische Prädispositionen	
1.4	Das <i>SNF5/INI1</i> -Gen.....	
1.4.1	Aufbau und Funktion.....	
1.4.2	<i>INI1</i> -Mutationen in Malignomen.....	
1.5	Fragestellung der Arbeit.....	
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	
2.1	Geräte.....	
2.2	Chemikalien und anderes Material.....	
2.3	Puffer und Lösungen.....	
2.4	Mutationsanalyse des <i>INI1</i> -Gens.....	
2.4.1	Plexuspapillome und Kontrollgruppe.....	
2.4.2	DNA-Extraktion aus Blut und Tumorgewebe.....	
2.4.3	Amplifikation der DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion.....	
2.4.4	Agarosegelelektrophorese.....	
2.4.5	SSCP-Analyse.....	
2.4.6	Silberfärbung.....	
2.4.7	Isolierung Einzelstrang-DNA aus dem Polyacrylamidgel und.....	
	Reamplifikation durch PCR.....	
2.5	Mikrosatellitenanalyse.....	
2.5.1	Prinzip.....	
2.5.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese.....	
3.	ERGEBNISSE.....	
3.1	Mutationsanalyse des <i>INI1</i> -Gens.....	

4. DISKUSSION.....

5. ZUSAMMENFASSUNG.....

6. REFERENZEN UND WEITERE LITERATUR.....

1. EINLEITUNG

1.1 Charakterisierung der Plexustumore

Bei den Tumoren des Plexus choroideus handelt es sich laut Definition der WHO um intraventrikuläre, papilläre Neoplasien.

Die Plexustumoren werden nach WHO unterteilt in Plexuspapillome und Plexuskarzinome. Plexuspapillome entsprechen histologisch dem WHO Grad I und Plexuskarzinome dem WHO Grad IV.

Plexustumoren machen nur einen Anteil von 0,4 -0,6% aller Gehirntumoren aus, doch liegt die Häufigkeit bei Kindern bei 2% und bei Säuglingen im 1. Lebensjahr sogar bei 10% der intrakraniellen Tumoren. Plexuspapillome treten im Vergleich zu Plexuskarzinomen mindestens fünfmal häufiger auf (Kleihues and Cavenee). Ein Plexuspapillom kann man durch eine operative Entfernung kurativ gut behandeln.

Etwa 80% der Plexuskarzinome treten bei Kindern auf, wo sie einen Anteil von 20-40% der Plexustumoren ausmachen. Die jährliche Inzidenz liegt bei etwa bei 0,3 auf 1.000.000 (Rickert et al). Das Plexuspapillom zeigt eine gut abgegrenzte blumenkohlartig gestaltete Oberfläche, die an der Ventrikelwand haften kann. Zysten und Hämorrhagien können am Erscheinungsbild beteiligt sein. Plexuskarzinome sind dagegen invasiv wachsende Tumoren, die fest, hämorrhagisch und nekrotisch erscheinen (Kleihues und Cavenee).

Das histopathologische Bild der Plexuspapillome besteht aus feinen, fibrovaskulären Bindgewebssepten bedeckt von einer Schicht uniformer isoprismatischer bis hochprismatischer Epithelzellen mit einem runden, ovalen oder basal sitzendem monomorphem Zellkern.

Selten zeigen Plexustumore ungewöhnliche Merkmale wie eine onkozytische Veränderung, eine muzinöse Degeneration, eine Melanozytenanreicherung oder eine tubuloglanduläre Architektur, sowie eine Degeneration von Bindegewebe. Xanthomatöse Veränderungen und angiomatöses Wachstum von Blutgefäßen mit Knorpel- und Knochenumbau wurden in diesem Zusammenhang auch beschrieben (Kleihues und Cavane).e).

S-100 (Ca²⁺-bindendes Protein) ist bei über 90% der Fälle nachweisbar. GFAP (saures Gliafaserprotein) ist beim normalen Choroidplexus nicht vorhanden, doch bei 25-55% der Plexuspapillome.

Das Plexuskarzinom ist ein solider Tumor, der deutliche Malignitätszeichen aufweist, wie etwa pleomorphe Zellkerne, hohe Teilungsraten, ein hohes Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis, eine

erhöhte Zelldichte, ein unscharfes papillenförmiges Muster mit unscharf ausgebildeten Schichten von Tumorzellen, nekrotische Anteile und oft diffuse Infiltration in das Gehirn.

Immunhistochemisch bilden Plexuskarzinome Zytokeratine. Die Häufigkeit der Expression von S100-Protein und Transthyretin (Präalbumin) ist geringer als beim Plexuspapillom. Über 20% der Plexuskarzinome sind GFAP- positiv.

Die Unterscheidung zwischen Plexuspapillom und Plexuskarzinom ist nicht immer eindeutig, weil einige Tumoren nur eins oder wenige Merkmale von Malignität aufweisen, wie z.B. eine erhöhte mitotische Aktivität. Diese Tumoren werden als „atypische Choroid-Plexus-Papillome“ bezeichnet, klare diagnostische Kriterien wurden nicht festgelegt (Kleihues und Cavanee).

Folgende Abbildungen sind intraoperative Schnellschnitte, die uns aus dem Institut für Neuropathologie, Münster zur Verfügung gestellt wurden:

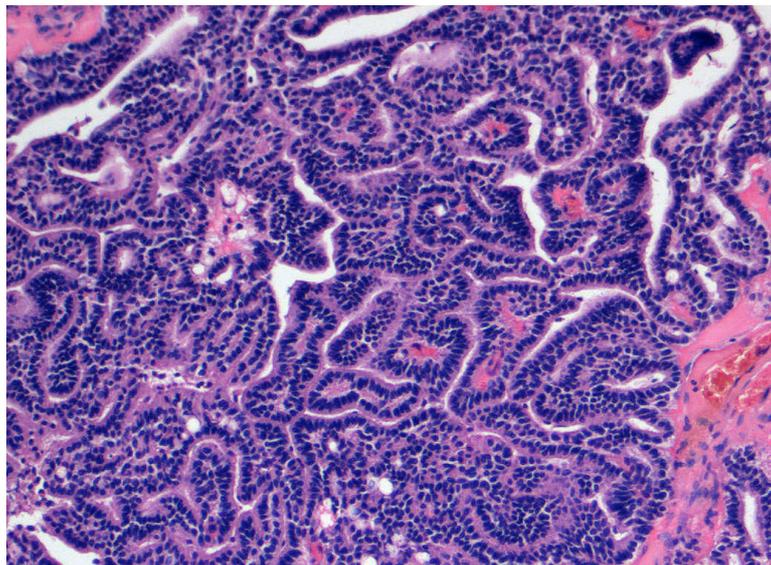


Bild A

Rezidiv eines Plexuspapilloms im Bereich des vierten Ventrikels bei einem 36-jährigem Mann

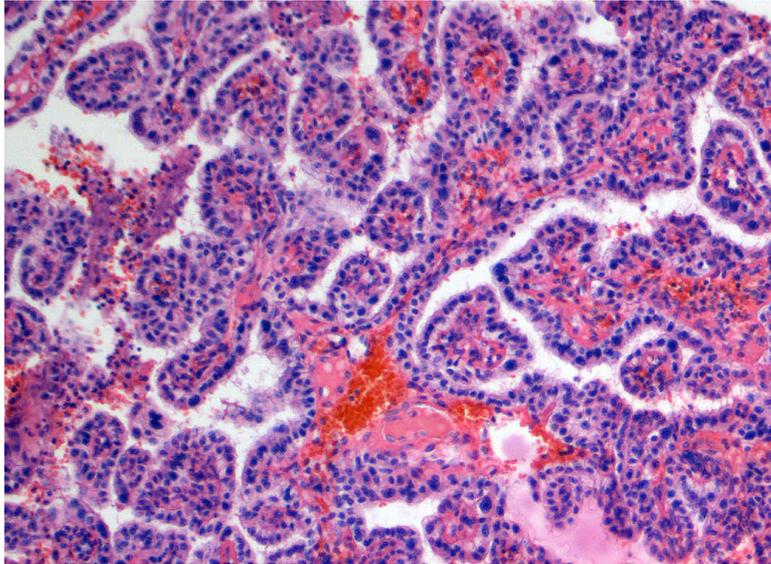


Bild B

Plexuspapillom im Bereich des vierten Ventrikels bei einem 30-jährigem Mann. Bisher kein Rezidiv.
(Beobachtungszeit 151 Monate)

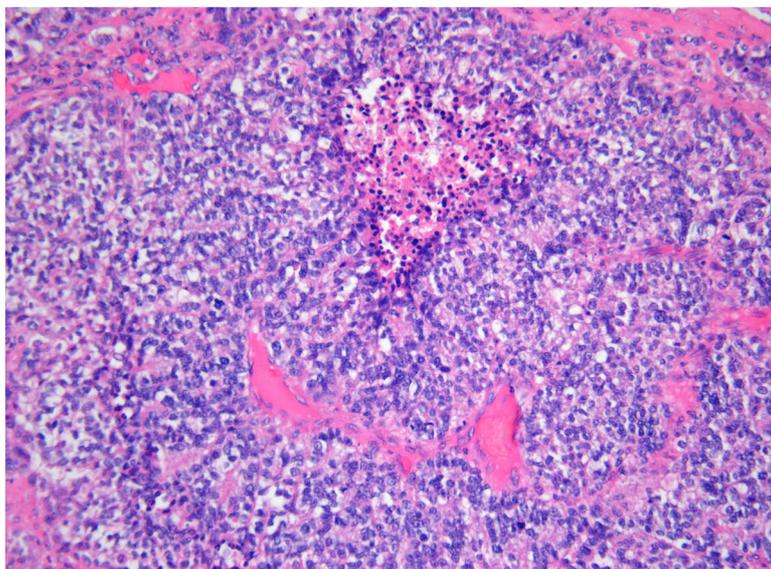


Bild C

Plexuskarzinom mit solidem Wachstum, Nekrosen, erhöhter Zelldichte und Kernpolymorphie sowie deutlich erhöhter mitotischer Aktivität im Bereich des Seitenventrikels bei einem dreijährigen Mädchen.

1.2 Tumorassoziierte Gene und Loss of Heterozygosity

Man geht heute davon aus, dass die Tumorentstehung in erster Linie von einer Fehlfunktion bzw. Fehlregulierung bestimmter Gene abhängig ist. Hier unterscheidet man unter anderem die Protoonkogene und die Tumorsuppressorgene.

1.2.1. Protoonkogene

Eine Gruppe von Genen kodiert für Proteine, die über eine Stafette von Signalübertragungen die Zellvermehrung steuert. Durch Punktmutation, Amplifikation, Translokation oder gesteigerte Genexpression werden sie überaktiviert und tragen zur Tumorentstehung und zum Wachstum bei. Diese Gene bezeichnet man in ihrer physiologischen Form als Protoonkogene und nach pathologischer Aktivierung als Onkogene. Die Onkogene haben eine dominante Wirkung, d.h., es genügt die Mutation einer elterlichen Genkopie, um eine übermäßige und nicht zyklusgerechte oder ungebremste tumorfördernde Wirkung auszulösen. Die Protoonkogene steuern über ihre Genprodukte (Onkoproteine) die Signalaufnahme im Bereich der Zellmembran, die Signalübermittlung im Zytoplasma oder die Signalumsetzung im Zellkern. Die Onkogene stellen DNS-Sequenzen dar, die z.B. durch Viren in eine normale Zelle gelangen (= Infektion) oder künstlich in eine normale Zelle gebracht werden (= Transfektion) oder anderweitig aktiviert werden und ein unkontrolliertes Zellwachstum auslösen. Bisher gibt es über 60 entdeckte Onkogene.

Ein Beispiel ist die Punktmutation im RAS-Onkogen, wo durch den Austausch einer einzigen Base im Onkogen, es zu einer Verminderung der GTP-ase-Aktivität der RAS-Proteine kommt und als Folge davon das GTP-RAS-Signal langsamer inaktiviert wird und dies zu einer überschießenden Aktivierung nachfolgender Signalkaskaden führt.

Bei der Translokation wie im Fall des Burkitt-Lymphoms (t8/14) gerät ein Onkogen unter den Einfluss eines anderen regulatorischen Systems, hierbei kommt das c-myc-Onkogen unter den Einfluss des Immunglobulinlokus. Die Folge ist eine konstitutive Aktivierung des Signaltransduktionsweges, auch wenn kein exogenes Wachstumssignal vorliegt.

Die Gen-Amplifikation schließlich ist ein bei den Gehirntumoren besonders häufig vorkommender Aktivierungsmechanismus von Protoonkogenen. Hierbei erhöht sich die Anzahl der Genkopien des betroffenen Protoonkogens von den regulär vorliegenden zwei Kopien auf bis

über hundert Genkopien. Die gesteigerte Genexpression resultiert aus der erhöhten „Gendosis“, von der aus RNA transkribiert werden kann. Dadurch ergibt sich eine immens gesteigerte Genexpression. In diesem Zusammenhang sind für die Protoonkogene charakteristisch, dass bereits die Mutation, Translokation oder Amplifikation nur eine der beiden ererbten Genkopien zur Tumorentstehung führen kann.

1.2.2 Tumorsuppressorgene und LOH

Es handelt sich um eine Gruppe von Genen, die unter physiologischen Bedingungen verlangsamernd auf die Zellvermehrung wirken. Sie werden auch als rezessive Onkogene oder auch Anti-Onkogene bezeichnet. Da eine Kopie eines solchen Gens ausreicht, um die Wachstumskontrolle aufrecht zu halten, macht sich der Defekt erst bemerkbar, wenn beide Allele betroffen sind (= rezessive Mutation). Man spricht hierbei auch von der „Two-hit“- Hypothese (Alfred Knudson, 1971).

Es ist anfangs meist nur ein Allel von einer ererbten oder somatischen Mutation betroffen. Eine Inaktivierung des zweiten Allels erfolgt dann durch den Verlust von chromosomalem Material, der sich als sogenannter „Loss of Heterozygosity (LOH)“ präsentiert. Hierbei handelt es sich meist um ausgedehnte Verluste des betroffenen Chromosoms. Immer wiederkehrende Verluste von umschriebenen chromosomalen Abschnitten sprechen dabei für das Vorliegen eines Tumorsuppressorgens in dieser Region.

Es wurden bisher beim Menschen über 100 Genloci nachgewiesen, die wahrscheinlich Sitz eines Tumorsuppressorgens sind.

Darunter wurde das Retinoblastomgen isoliert und identifiziert (Lee et al., 1987). Es steuert und zügelt die Zellteilung. Bei dem bösartigen Retinoblastom des Kleinkindes wurde eine mutationsbedingte Inaktivierung festgestellt und somit erstmals eine Ursache für eine Tumorentstehung gefunden. Bei Inaktivierung beobachtet man die Entstehung von Retinoblastomen und besonders aggressiv wachsenden Karzinomen und verschiedenen Sarkomen wie Osteosarkomen (Knudson, Strong u. Anderson, 1973, Cavane, 1986).

Häufiger kommt es auch zum Verlust des Wildtypallels, durch Mechanismen wie chromosomale Non-disjunction, meiotische Rekombination oder Genkonversion, sodass die meisten Tumore, die beide Allele des Antionkogens verloren haben, identisch mutierte Allele aufweisen.

Bei einer mitotischen Rekombination kommt es nur zum Verlust von Teilen des Chromosoms, welche distal zum Crossing-over liegen oder zu einer interstitiellen de Novo-Deletion führen. Bei Heterozygotie des Patienten führt dies zur Homo –oder Hemizygotie. Der Verlust der

Heterozygotie und die daraus resultierende Tumorprogression weisen auf die Existenz eines Tumorsuppressorgens hin. Häufige Aberrationen von Chromosom 22 bei Plexuskarzinomen (CPC), Plexuspapillomen (CPP) und peripheren malignen Scheidentumoren (MPNST) lassen die Existenz eines Tumorsuppressorgens auf diesem Chromosom vermuten, welche bei der Pathogenese für diese Tumore von Bedeutung sein könnten (Sévenet).

1.3 Molekulargenetik von Plexustumoren

Die meisten Studien beschreiben nur einzelne Fälle von Choroid Plexus Tumoren. Eine Ausnahme ist die Studie von Bhattarchajee et al. (1997). In dieser einzigen Studie sind die meisten Aberrationen in atypischen Pappillomen mit Zuwachs der Chromosomen 7, 12 und 20. CPC zeigten hyperdiploide Karyotypen. In einer anderen Studie von Rickert et al. wurden chromosomale Imbalancen in 32 von 34 CPP und in 15 von 15 CPC bestätigt. Darüber hinaus scheinen ein Zuwachs von 9p und ein Verlust von 10p eine vorteilhafte Prognose bei CPC zu sein (Rickert et al.). In dieser Studie von Rickert et al. sind Zuwächse von 7q und 7p die dritthäufigste Imbalance von allen untersuchten Tumoren überhaupt und bei CPP die meiste mit einer Häufigkeit von 65% der Fälle.

Der Materialverlust in Chromosom 22q war bei weitem die häufigste Veränderung bei 73% der CPC und 47% der CPP (Rickert et al).

1.3.1 Genetische Prädisposition und Molekulargenetik

Das CPC ist eine Tumormanifestation des Rhabdoid-Prädisposition-Syndroms. Als vererbliches Tumorsyndrom mit familiärer Häufung wurden kürzlich maligne Rhabdoidtumore, Plexuskarzinome und primitive neuroektodermale Tumoren beschrieben (PNET). Diese Syndrome entstehen durch Keimzellmutationen im *SMARCB1* (SWI/SNF related, matrix-associated, actin – dependent regulator of chromatin subfamily b, member 1) – Gen auch als *SNF5/INI1* (Integrase - Interactor 1) - Gen bezeichnet, welches sich auf dem Chromosomarm 22q11.2 befindet. Familiäre und wenige sporadische Fälle von CPC zeigten, dass sie *SNF/INI1*-Mutationen enthielten (Sévenet et al).

Das Li-Fraumeni-Syndrom (LFS) ist ein seltenes, dominant vererbtes Tumor-Prädispositionssyndrom, welches durch eine Keimbahnmutation in *TP53* verursacht wird. Individuen mit dem LFS haben ein erhöhtes Risiko, ein weites Spektrum von Tumorarten zu entwickeln:

Plexustumore, Rhabdoidtumore, Mamma-Ca, Sarkome, NNR-Karzinome, Tracheobronchial- und Kolorektalkarzinome, Gliome, Leukämien und Lymphome.

1.4 Das *SMARCB1/INI1* – Gen

1.4.1. Aufbau und Funktion

Das *SMARCB1/INI1* – Gen befindet sich auf Chromosom 22q11.2 und besteht aus 9 Exonen. Das Gen mit einer Größe von über 50 KB kodiert für die kleinste Einheit des ATP-abhängigen SWI/SNF- Komplexes, einem nukleären Multiproteinkomplex. Dieser hat die Funktion der Transkriptionsregulation, die er durch seine Fähigkeit die Struktur des Kernchromatins zu verändern, erreicht (Biggar et al., 1999).

Der SWI/SNF – Komplex, der gewebsspezifisch aus 8 - 15 Untereinheiten besteht, bindet dabei ATP-unabhängig an DNA (Wang, 1996) und ist unter ATP-Verbrauch in der Lage, die Struktur von Nukleosomen derart aufzulockern, dass diese das Doppelte ihrer ursprünglichen Größe einnehmen (Schnitzler, 1998; Armstrong, 1998). Durch diese Konfigurationsänderung des Chromatins werden Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren freigelegt, die zuvor einer Protein - DNA-Wechselwirkung nicht zugänglich waren (Bazett-Jones et al., 1999).

1.4.2 INI1 - Mutationen in Malignomen

Maligne Rhabdoidtumore (MRT) wurden ursprünglich im Zusammenhang mit der Niere als aggressive Variante von Wilmstumoren (Beckwith und Palmer 1987) beschrieben. Später wurden Rhabdoidtumore im Gehirn, im Abdomen oder im Weichteilgewebe beobachtet (Parham et al. 1994; Wick et al. 1995; Rorke et al. 1996; Burger et al. 1998). Die Beobachtung von wiederkehrenden Veränderungen von Chromosom 22 in renalen und extrarenalen malignen Rhabdoidtumoren hat den ersten Hinweis erbracht, dass für diese Tumoren eine gemeinsame genetische Basis für eine Tumorentität besteht. In rhabdoiden Tumoren bei Kindern wurden Mutationen des *INI1*-Gens entdeckt. Die Untersuchungen zeigten Frameshift - wie auch Nonsense-Mutationen des *INI1*-Gens in der Mehrzahl der untersuchten rhabdoiden Tumoren, welche mit dem Verlust des jeweils anderen Allels einhergingen (Versteeg et al., 1997).

Dieser äußerst aggressive maligne Tumor, welcher oft im Kindesalter auftritt, entsteht als Folge von Funktionsveränderung durch Deletion der 11.2 Region des Chromosoms 22.

Diese Beobachtungen lassen schlussfolgern, dass es sich bei *INI1* um ein Tumorsuppressorgen handelt. In den malignen Rhabdoidtumoren des Gehirns konnte eine Häufung von Mutationen im *INI1*-Gen gezeigt werden (Biegel et al. 1999).

Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass es sich bei *INI1* um ein Tumorsuppressorgen handelt, das mit großer Wahrscheinlichkeit bei der Pathogenese von Rhabdoidtumoren von Bedeutung ist. Auch in atypischen rhabdoiden Tumoren des ZNS konnte eine Häufung von Mutationen des *INI1*-Gens gezeigt werden (Biegel et al., 1999). Überraschend wurden auch *SNF5/INI1* Mutationen in den meisten Plexuskarzinomen und einigen Medulloblastomen und den primitiv neuroektodermalen Tumoren (PNET) des ZNS (Sévenet et al.) gefunden.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die Rolle des *SNF5/INI1*- Gens als Tumorsuppressorgen wurde in verschiedenen vererbaren Tumoren beschrieben.

Bei Funktionsverlust kommt es zur Entstehung von hochmalignen Tumoren wie z. B. zu den bereits erwähnten malignen Rhabdoidtumoren, den Medulloblastomen und den PNETs .

Die zytogenetische Auffälligkeit dieser Tumoren besteht neben der Mutation des einen Allels im Verlust genetischen Materials des zweiten Allels.

Bislang wurden *SNF5/INI1*-Mutationen in den Plexuskarzinomen bestätigt, doch es gab bisher keine systematische Untersuchung der benignen Plexuspapillome auf Punktmutationen.

Eine vor kurzem durchgeführte Studie mit vergleichender Genomhybridisierung bei Plexuspapillomen und Plexuskarzinomen bestätigt die bedeutende Rolle von Tumorsuppressorgen im Chromosomarm 22q für Plexuskarzinome (Rickert et al). Wir kamen so zu dem Schluss ähnliche Ergebnisse bei Plexuspapillomen zu finden. Es besteht die Vermutung, dass *SNF5/INI1* auch in der Pathogenese des benignen Gegenstücks des Plexuskarzinoms eine Rolle spielt.

Zur Untersuchung der potentiellen Rolle von *SNF5/INI1* führten wir eine SSCP-basierende Mutationsanalyse von 21 Plexuspapillomen in allen Exonen 1- 9 durch.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Computer	Power Book G4	Apple (Cupertino, USA)
Deionisierungsanlage	Milli Q UF plus	Millipore (Billerica, USA)
DNA-Sequenzierer	Modell 377	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Programme	Data Collection Programm, Version 1.2.0, Data Analysis Programm, Version D1-7.1, Sequence Editor, Version 1.0.3	Applied Biosystems
Färberahmen	Siehe Abb.	Eigenbau
Gelelektrophorese für Agarosegele	E 92	Biometra (Göttingen, BRD)
Gelelektrophorese für Acrylamidgele	Blue Sequ	Serva (Heidelberg, BRD)
Geltrockner	Gel Dryer	Serva
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, BRD)
Heizschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Biofuge 28 RS	Heraeus (Hanau, BRD)
Magnetrührer, heizbar		Cabinco (West Yorkshire, GB)
Membranpumpe	MZ 2C	Vacuubrand GmbH (Wertheim, BRD)
Netzgerät	Desatronic 500/500	Desaga (Nürnberg, BRD)

Netzgerät	Power all 5000V	Serva
pH-Meter		Hanna Deutschland GmbH (Kehl, BRD)
Pipetten	P10, P20, P200, P1000	Gilson (Middleton, USA)
Rotator	3025	Ges. f. Labortechnik (Burgwedel, BRD)
Software	Data Collection Version 1.2.0 Data Analysis Version D1-7.1	Applied Biosystems Applied Biosystems
Thermocycler	Unoblock	Biometra
Thermocycler	T-Gradient	Biometra
UV Bank		Intas (Göttingen, BRD)
Vakuumzentrifuge	Speed Vac	Heraeus
Vortex	Reax Top	Bender und Hobein (Ismaning, BRD)
Waage	BA 200	Sartorius (Göttingen, BRD)
Wasserbad	1003	Ges. f. Labortechnik
Zentrifuge	5414 C	Eppendorf
Zentrifuge	Fresco	Heraeus

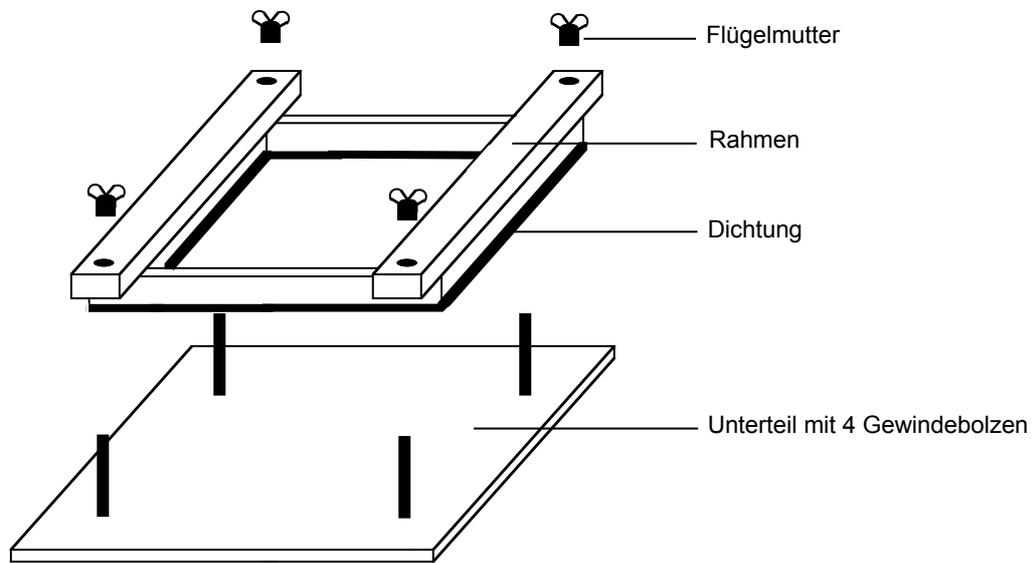


Abbildung 1: Rahmensystem für die Bearbeitung von Polyacrylamidgelen

2.2 Chemikalien und anderes Verbrauchsmaterial

Acrylamid	Sigma (Osterode, BRD)
Acrylamid (für Sequenziergele)	Bio Rad (Herules, USA)
Agarose	Sigma
Alconox	Aldrich (St. Louis, USA)
Ammoniumazetat	Merck (Darmstadt, BRD)
Ammoniumpersulfat	Sigma
Bisacrylamid	Sigma
Bisacrylamid (für Sequenziergele)	Bio Rad
Borsäure	Merck
Borsäure (für Sequenziergele)	Merck
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform	GT Baker
Dichlor-Dimethylsilan	Sigma
DNA-Längenstandard	MBI-Fermentas (St. Leon, BRD)
DNTP's	Sigma
EDTA	Sigma
EDTA (für Sequenzierung)	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Ficoll	Sigma
Filterpapier	Schleicher und Schuell (Einbeck, BRD)
Formaldehyd	Merck
Formamid	Flucca
Glyzerol	Merck
Harnstoff	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Magnesiumazetat	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma
Natriumazetat	Merck

Natriumkarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Nonidet P-40	Boeringer Mannheim (Mannheim, BRD)
Nylon-Membranfilter, 0,45 Mikron	Corning (New York, USA)
Paraffin dickflüssig	Merck
Phenol	USB (Cleveland, USA)
Proteinase K	Merck
Qia Quick-Säulen	Qiagen (Venlo, Niederlande)
Salzsäure	Merck
Salpetersäure	Merck
SDS	Sigma
Sequenzierungskit	PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems
Silbernitrat	Merck
Sucrose	Sigma
Taq-DNA-Polymerase	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
TEMED	Sigma
TRIS	Trizma®Base, Sigma
Triton X100	Sigma
Xylencyanol	Sigma

2.3 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Stammlösungen für SSCP-Gele:

Gel	Acrylamid (40%)	Bisacrylamid (2%)	10x TBE	H ₂ O
8% AA 1:29	13,53 ml	9,33 ml	7,0 ml	40,13 ml
8% AA 1:49	13,72 ml	5,60 ml	7,0 ml	43,68 ml
10% AA 1:29	16,92 ml	11,67 ml	7,0 ml	34,42 ml
10% AA 1:49	17,15 ml	7,0 ml	7,0 ml	38,85 ml
12% AA 1:29	20,30 ml	14,00 ml	7,0 ml	28,70 ml
12% AA 1:49	20,58 ml	8,40 ml	7,0 ml	34,02 ml
14% AA 1:29	23,68 ml	16,33 ml	7,0 ml	22,98 ml
14% AA 1:49	24,01 ml	9,80 ml	7,0 ml	29,19 ml
16% AA 1:29	27,07ml	18,67 ml	7,0 ml	17,27 ml
16 % A 1:49	27,44 ml	11,20 ml	7,0 ml	24,36 ml
18% A 1:29	30,45 ml	21,00 ml	7,0 ml	11,55 ml
18% AA 1:49	30,87 ml	12,60 ml	7,0 ml	19,53 ml

Lösungen für die Silberfärbung :

Ethanol	10% C ₂ H ₅ OH in H ₂ O dd
Salpetersäure	1% HNO ₃ in H ₂ O dd
Silbernitrat	2g AgNO ₃ in 2l H ₂ O dd
Entwickler	30g Na ₂ CO ₃ und 0,5 ml 37% H ₂ CO in 1l H ₂ O dd
Essigsäure	10% in H ₂ O dd

40% Acrylamid-Stammlsg.

für Sequenziergele :

Acrylamid 76 g
 Bisacrylamid 4 g
 H₂O dd ad 200 ml
 Nach dem Lösen mit Amberlite[®] mischen
 und durch 0,2 µm Filter filtrieren

DNA-Elutionspuffer

Ammoniumacetat 0,5 M
 Magnesiumacetat 10mM
 EDTA 1mM
 SDS 0,1%
 In H₂O dd

4,5%Acrylamidgel für Sequenziergele

18g Harnstoff
 7,5ml 30%ige AA-Lösung (1:30)
 6,0ml 10X TBE-Puffer
 23,0ml aqua bidest

Agarosegel-Ladepuffer

Bromphenolblau 0,25%
 Xylencyanol 0,25%
 Ficoll 15%
 In H₂O dd , vor Gebrauch 2:5 verdünnen

SSCP-Ladepuffer

Formamid 90%
 10x TBE 10%
 EDTA 1mM
 SDS 0,01 %
 Bromphenolblau 0,25%
 Xylencyanol 0,25%

2x Sucrose-Lösung

Sucrose 218 g
 TRIS 2,4 g
 MgCl₂ 2,03 g
 Triton-X-100 20 ml
 H₂O dd ad 1 l
 pH 7,6 mit HCl einstellen

10x TBE-Puffer

TRIS 108 g
 Borsäure 55g
 EDTA 0,5 M 40ml
 H₂O dd ad 1l

Tumor-TNE

TRIS 1M,pH 8 5 ml
 NaCl 5M 10 ml
 EDTA 2,1 g
 H₂O dd ad 500 ml

10x Warner's solution

Saline-EDTA-Lösung

NaCl	81,1 g	NaCl	2,19 g
KCl	3,7 g	EDTA	4,46 g
MgCl ₂	0,3 g	H ₂ O dd	ad 500 ml
H ₂ O dd	ad 1l	pH 8 mit NaOH einstellen	

Agarosegel-Standard

Standard V	1,5 µl
PCR-Puffer	1,0 µl
Dye	2 µl
H ₂ O dd	7,5 µl

PCR-Puffer

KCl	500 mM
TRIS/HCl pH 8,5	100 mM
MgCl ₂	5-25 mM
Gelatine	0,1%
In H ₂ O dd	

Proteinase-K-Lösung

500 mg in 50 ml H₂O dd

TE-Puffer

TRIS/HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1mM
In H ₂ O dd	

Ethidiumbromid-Lösung

10 mg/ml in H₂O dd

Primer

20 pMol in H₂O dd

DNTPs

dATP	2 mM
dCTP	2 mM
dTTP	2 mM
dGTP	2 mM
in H ₂ O dd	

Natriumacetat-Lösung

3 M, pH 5,5, in H₂O dd

PAGE-Ladepuffer

Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol	0,25%
Glycerol	30%
In H ₂ O dd	

2.4 Mutationsanalyse des *INI1*-Gens

2.4.1 Plexuspapillome und Kontrollgruppe

21 Plexuspapillome wurden zur Verfügung gestellt von Patienten, die in der Charité-Universitätsmedizin Berlin, den Unikliniken Münster und Göttingen und dem All India Institute for Medicine in Neu Delhi behandelt wurden. Alle Tumoren wurden nach den Richtlinien der WHO (Kleinhuus P, Cavanee WK) klassifiziert.

Bis auf die tiefgefrorenen Tumorproben, welche von der Neurochirurgischen Klinik, der Charité, Berlin zur Verfügung gestellt wurden, waren alle Tumorproben in Paraffinblöcken eingebettet.

Die Kontrollgruppe umfasste DNA aus peripheren Leukozyten, die wir aus Blutproben von verschiedenen gesunden, nichtverwandten Spendern aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Charité Campus Virchow-Klinikum erhielten.

Liste der verwendeten Plexuspapillome (Institut für Neuropathologie, Charité):

	ID #	ID #	
1	2410	11	22756
2	22700	12	22768
3	22706	13	22776
4	22716	14	22780
5	22718	15	22782
6	22720	16	22784
7	22724	17	22786
8	22726	18	22790
9	22728	19	22796
10	22732	20	22994
11	22738	21	22996

2.4.2 Extraktion der DNA aus Blut und Tumoren

Es wurden bei der Extraktion von DNA 20 ml Citrat-Blut (bei zu geringen Blutmengen aufgefüllt mit 1x Warner's Solution) mit der gleichen Menge 2x Sucrose-Lösung und 500 µl Nonidet-P40 gemischt und 1h bei 4000 UpM und 4°C zentrifugiert (Minifuge GL). Das dabei entstandene Pellet wurde in 2,5 µl Saline-EDTA-Lösung aufgenommen. Tumormaterial, welches frisch gefroren ist, wurde unter strengen hygienischen Auflagen zunächst im Mörser zerkleinert und mit jeweils 2,5 ml Saline-EDTA vermengt. Dieses Saline-EDTA Gemisch wurde dann, sowohl bei Tumor- als auch bei Blutextraktion mit 3,5 ml einer Lösung aus 2,7 ml Tumor-TNE, 600 µl 10% SDS-Lösung und 200 µl Proteinase K-Lösung (10mg/ml) versetzt und über Nacht bei 55°C im Wasserbad inkubiert.

Diese beschriebenen Arbeitsschritte, welche einige Tage dauern, führen zu einem Abbau bzw. einer Zerstörung der Zellwände, Zellmembranen und Proteinen.

Am folgenden Tag wurden die Proben extrahiert, zunächst 2x mit Phenol, anschließend 1x mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform.

Das Probengemisch wurde dann jeweils 15 min auf einem Rotator geschwenkt, bei 4000 UpM für 5 min zentrifugiert und die dabei entstandene wässrige Phase durch vorsichtiges Absaugen mit einer Plastikpipette in ein neues Röhrchen übernommen.

Die bisher beschriebenen Extraktionsschritte dienen der Entfernung von Proteinen und Lipiden. Dabei verbleiben die Nukleinsäuren in der oberen gewonnenen wässrigen Phase und können dann leicht abpipettiert und schließlich gefällt werden. Das Fällen der DNA erfolgte dann mit 10 mM KCL und 2,5 Vol. eisgekühltem 100% Ethanol, dann wurde die DNA mit einer über dem Bunsenbrenner ausgezogenen Pasteurpipette aufgenommen und in TE-Puffer gelöst.

2.4.3 Amplifikation der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine in-vitro Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen, sogenannten Starteroligonukleotiden (Primer) eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Mit diesen Primern wird dann in mehreren Zyklen die gewählte DNA-

Sequenz exponentiell amplifiziert. Jeder der Zyklen besteht dabei aus der Trennung der DNA-Einzelstränge (Denaturierung), der Anlagerung der Primer (Annealing) und der Synthese des DNA-Abschnittes zwischen den Primern durch Taq DNA-Polymerase (Extension). Die Sequenz der neu gebildeten DNA-Stränge ist komplementär zur Matrize. Die einzelnen Schritte jedes Zyklus sind dabei durch unterschiedliche Temperaturen definiert. Die Fragmentgröße der in der PCR amplifizierten DNA spielt eine große Rolle bei der SSCP-Analyse. Fragmente mit einer Größe von unter 200bp zeigen dabei die beste Detektionsrate von Laufveränderungen. Es wurden alle 9 Exone des INI1-Gens mit intronisch liegenden Primern einzeln amplifiziert. Die Primersequenzen der 9 Exone des INI1-Gens wurden uns freundlicherweise von M. Sévenet und M. Delattre aus Paris zur Verfügung gestellt. Die Synthese der Primer erfolgte über die Firma Boehringer (Mannheim). Ein zusätzliches neu entwickeltes, den alten Primer von Exon 9 überlappendes Primerpaar, wurde zum Ausschluß einer Kontamination der Tumorprobe mit PCR-Produkt verwendet.

Die Primer für das INI1 Gen wurden nach der DNA-Sequenz der Erstpublikation (O. Delattre 1997) ausgewählt. Ihre Sequenzen waren:

ID #	Name	Exon	Sequenz
79	SMARCB1-ex9f	9 sense	GCCTCTGTCCTTGCCAGAAG
80	SMARCB1-ex9r	9 antisense	ACTCATTGCCCTCCCCACTC
81	SMARCB1-ex5f	5 sense	CGCTGACTGTTGCTTCCATT
82	SMARCB1-ex5r	5 rückwärts	TGTTCCCACGTAACACACAG
94	SMARCB1-ex1f	1 sense	TCCTGATCCCTCGCAGCCCG
95	SMARCB1-ex1r	1 antisense	AGCCCGGGGAGGGCGAGAAC
96	SMARCB1-ex2f	2 sense	AATGAGCCTTCTTGCTTTAC
97	SMARCB1-ex2r	2 antisense	GTTTACAAACCCTTGTGAAG
98	SMARCB1-ex3f	3 sense	AGCAGAGTGACCCAGTGATG
99	SMARCB1-ex3r	3 antisense	AGAGATGCCCTGGCCAGGAA
100	SMARCB1-ex4f	4 sense	CCTATACTGACTGGGAGGAC
101	SMARCB1-ex4r	4 antisense	TGAGTGCAGCGATGCATCCA
102	SMARCB1-ex6f	6 sense	GCATCCCTTCCCTCTCCTGA
103	SMARCB1-ex6r	6 antisense	CCAGTGCTGGGTGAGAAGTC
104	SMARCB1-ex7f	7 sense	TGTGTCCTTTGGTTGTTGCC
105	SMARCB1-ex7r	7 antisense	GGAGAGACTCATGCATGATC
106	SMARCB1-ex8f	8 sense	CCTCTCACTGCCTCCCCTCC
107	SMARCB1-ex8r	8 antisense	TGTGGGCAGAGCCCAGGACC

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt.

Der Reaktionsansatz enthielt dabei 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 50 mM KCl, 0,01% Gelatine, 1,5 bis 2,0 mM MgCl₂ (primerspezifisch), je 20µM dATP, dGTP,dCTP und dTTP, je 20 pMol sense- und antisense-Primer, 0,05 U Taq-Polymerase und ca. 10 ng genomische DNA. Bis auf die DNA wurden alle Zutaten als Mix zubereitet und jeweils 9µl in eine 99 iger Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zufügen von jeweils 1µl DNA zu jedem Reaktionsansatz wurde die

Mikrotiterplatte luftdicht verschlossen. Das PCR-Programm, welches auf einem Thermocycler (Biometra Uno) durchgeführt wurde bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt von 94°C für 3 min, dann 30 Zyklen mit jeweils 40 sec bei 94°C, 30 sec bei der primerspezifischen Anlagerungstemperatur, 40s sec bei 72°C und einem abschließenden Extensionsschritt von 10 min bei 72°C.

Die für jedes Primerpaar spezifischen MgCl₂-Konzentrationen, Anlagerungstemperaturen und Produktgrößen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 1 : PCR-Bedingungen für das INI1-Gen :

Exon	Primer ID #	MgCl ₂	Anlagerungstemp.	Produktgröße
Exon 1	335/336	1,25 mM	49°C	282 bp
Exon 2	96/333	1,25 mM	58.5°C	221 bp
Exon 3	98/331	1,25 mM	58,5°C	167 bp
Exon 4	329/100	1,25 mM	54°C	236 bp
Exon 5	320/81	1,25 mM	61°C	272 bp
Exon 6	322/102	1,25 mM	61°C	223 bp
Exon 7	104/324	1,25 mM	61°C	207 bp
Exon 8	325/326	1,25 mM	63°C	276 bp
Exon 9	79/80	1,25 mM	59°C	188 bp

Die oben genannten Bedingungen mussten durch verschiedenes Ausprobieren verschiedener Temperaturen des Anlagerungsschrittes und MgCl₂ -Konzentrationen ermittelt werden.

Wenn die Bedingungen zu einer scharfen Bande des PCR-Produktes führten, wurde diese als optimal betrachtet.

Beim Durchführen der gesamten SSCP-Analyse wurde zur Kontrolle jeder PCR-Reaktion jeweils ein Kontrollansatz auf ein Agarosegel aufgetragen. In einem Agarosegel wurden DNA Fragmente per Elektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid, einem Farbstoff, der unspezifisch an DNA bindet und unter UV-Licht fluoresziert, sichtbar gemacht.

2.4.4. Agarosegelelektrophorese

Für die Herstellung eines 2% Agarosegels wurden 100 ml 0,6x TBE und 2g Agarose unter ständigem Rühren zum Kochen gebracht. Nach Zugabe von 2µl Ethidiumbromid wurde die leicht abgekühlte Flüssigkeit in eine Kammer gegossen, wo sie dann polymerisierte.

Auf das 2%ige Agarosegel wurden 5 µl des mit der gleichen Menge Ladepuffers (je 0,25% Bromphenolblau und Xylencyanol mit 15% Ficoll-400 in H₂O dd) versetzten PCR-Produktes aufgetragen, 10-15 min bei 160 V aufgetrennt und auf einer UV-Bank ausgewertet. Zur Identifizierung der Produkte wurde ein Längenstandard (Boehringer DNA-Standard V) mit aufgetragen.

2.4.5 SSCP-Analyse

Die SSCP-Analyse (single-stranded conformation polymorphism) ist eine Methode, mit der Basenveränderungen in einzelsträngiger DNA (Orita et. al 1989) nachgewiesen wird und stellt ein Verfahren dar, mit welchem man relativ schnell und günstig eine große Anzahl von Proben auf das Vorliegen einer Mutation testen kann. Die Methode beruht auf der Eigenschaft einzelsträngiger DNA-Moleküle, die unter nicht-denaturierenden Bedingungen eine gefaltete Konfiguration (Sekundärstruktur) einnehmen. Um nur einen DNA-Einzelstrang auf das Gel auftragen zu können, wird die DNA vor dem Laden auf das Gel, denaturiert, weil im Gel nicht-denaturierende Bedingungen vorliegen, können die Einzelstränge Sekundärstrukturen einnehmen. Bei der Wanderung durch das Gel bildet sich eine spezifische Sekundärstruktur aus, welche das Laufverhalten der Bande bestimmt. Diese Sekundärstruktur kommt durch Interaktionen innerhalb des DNA-Moleküls mittels partieller Basenpaarungen zustande.

Die Sequenz der DNA bestimmt die Art der Sekundärstruktur und somit ihre räumliche Beschaffenheit. Das Laufverhalten einzelsträngiger DNA in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel hängt also neben der Größe des DNA-Fragmentes auch in erheblicher Weise von ihrer räumlichen Sekundärstruktur, somit von ihrer Sequenz ab. Schon der Austausch nur einer Base kann die Sekundärstruktur und damit das Laufverhalten stark verändern, so zum Beispiel, wenn diese Base an einer stabilisierenden intramolekularen Basenpaarung beteiligt ist (SSCP = "single strand conformation polymorphism"). Ob sich Sequenzveränderungen im elektrophoretischen Laufverhalten widerspiegeln, hängt von einer Vielzahl von äußeren Bedingungen ab, so z.B. von der Temperatur, der Gelzusammensetzung oder der Fragmentgröße.

Es konnte gezeigt werden, dass die Detektionsrate von Mutationen bei 90% liegt, wenn man DNA-Fragmente um 200bp untersucht (Sheffield et al, 1993). Um eine optimale Auftrennung der DNA-Einzelstränge zu erreichen, müssen zunächst die Bedingungen durch Veränderung unterschiedlicher Parameter ausgetestet werden. Wichtige Parameter sind hier die Acrylamidkonzentration, das Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis, die Laufgeschwindigkeit der Elektrophorese und die Temperatur.

Für die SSCP-Analyse wurden 0,35 mm dicke nicht-denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Dazu wurden jeweils 70 ml Acrylamidlösung mit 20 µl TEMED und 180 µl 20%iger Ammoniumpersulfatlösung versetzt und zwischen zwei silanisierte Glasplatten gegossen. Anschließend wurde ein 30-zähliger Kamm zwischen die Platten geschoben, welcher nach abgeschlossener Polymerisation wieder entfernt wurde. Nach 1,5 h wurde das zwischen den Platten polymerisierte Gel in eine Elektrophorese-Apparatur (Blueseq) eingespannt, die Pufferkammern mit 1x TBE gefüllt und nach Laden der Proben die jeweilige Spannung angelegt. Pro Tasche wurden 10 µl PCR-Produkt, gemischt mit SSCP-Ladepuffer, 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und sofort geladen.

Zur Identifizierung der Doppelstränge wurde auf jedes Gel außerdem ein DNA-Längenstandard (Boehringer Standard V) und eine nicht-denaturierte Kontrollprobe aufgetragen. Die SSCP-Bedingungen (Zusammensetzung des Gels, Spannung der Elektrophorese, Laufzeit) mussten vor Beginn der Untersuchung empirisch ermittelt werden. Dabei wurden vorher im Institut verwendete und bereits veröffentlichte Bedingungen ausgetestet. Als optimal wurden beim INI1 Gen Bedingungen betrachtet, welche zu einer deutlichen Trennung der Einzelstränge im Gel führten. Auf die Darstellung jedes PCR Produktes bei zwei verschiedenen Bedingungen wurde aufgrund der Größe der untersuchten Serie verzichtet.

Die verwendeten Konditionen können der folgenden Tabelle entnommen werden:

Gen	Exon	% AA	BAA/AA	Temp.	P (W)	t (h)
<i>INI1</i>	1	12	1:49	4°C	3	16
<i>INI1</i>	2	12	1:49	4°C	3	16
<i>INI1</i>	3	12	1:49	4°C	3	16
<i>INI1</i>	4	12	1:49	4°C	3	16
<i>INI1</i>	5	12	1:49	4°C	3	16
<i>INI1</i>	6	8/14	1:49	4°C	3	16
<i>INI1</i>	7	12	1:49/ 1:29	4°C	3	22
<i>INI1</i>	8	14	1:49	4°C	3	16
<i>INI1</i>	9	16/18	1:49/ 1:29	4°C	3	16

Tabelle 2.: SSCP-Bedingungen für das *INI1* Gen, %AA = Acrylamidkonzentration des Gels, BAA/AA = Bisacrylamid/Acrylamid Verhältnis, Glyc. =Glycerolzusatz, RT = Raumtemperatur, P (W) = Spannung, t (h) = Laufzeit

2.4.6 Silberfärbung

Die Amplifikationsprodukte wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Silberfärbung ist eine nicht-radioaktive Methode zur Darstellung von DNA-Banden in Acrylamidgelen (Budowle et al., 1991). Hier macht man sich eine unspezifische Anlagerung von Silbernitrat an DNA und der Anfärbung dieses Produktes durch Reduktion mit Formaldehyd (Budowle et al., 1991; von Deimling et al., 1993b) zunutze. Beide Elektrophoreseglasplatten werden hierfür vorsichtig, ohne das Gel zu beschädigen, getrennt und das an einer Platte haftende Gel in einen am Institut entwickelten Färberahmen eingespannt (Bender et al., 1994). Durch das Einspannen entsteht ein wannenartiger Reaktionsraum, der durch seine Konstruktion mehrfache Inkubations- und Waschschrte mit den verschiedenen Färbelösungen erlaubt. Die genaue Abfolge der Inkubationsschritte ist wie folgt:

Lösung	Inkubationsdauer
10% Ethanol	10 min
1% Salpetersäure	30 sec
H ₂ O dd	1x waschen
Silbernitrat	Mind. 20 min
H ₂ O dd	3x waschen
Entwickler (Natriumkarbonat)	Mehrere Waschschritte, bis Banden sichtbar
10% Essigsäure	2 min
H ₂ O dd	1x waschen

Tabelle 3: Protokoll für die Silberfärbung

Nach der Färbung werden die Gele auf Filterpapier aufgezogen und unter Vakuum getrocknet (Slab Gel Dryer, Hoefer Scientific). In dieser Form können sie beschriftet und permanent archiviert werden. Es wurde zunächst nur Tumor-DNA untersucht. Bei gegenüber anderen Proben aberrantem Laufverhalten ("shift") der Probe wurde auch die korrespondierende Blut-DNA aufgetragen. Zeigte die Blutprobe ein normales Laufverhalten, wurde dies als Vorliegen einer somatischen Mutation interpretiert. Gleichmaßen abnormes Laufverhalten von Blut und Tumorprobe sprach für das Vorliegen eines Polymorphismus oder einer Keimbahnmutation. Aberrante DNA-Banden wurden aus dem Gel isoliert und sequenziert.

2.5 Polymorphe Mikrosatellitenanalyse

2.5.1 Prinzip

Polymorphismen aus kurzen direkten Wiederholungen (short tandem repeat polymorphisms, STRPs), auch Mikrosatelliten-Marker genannt, bestehend aus einer kurzen, in der Regel ein bis vier Nukleotide umfassenden Sequenz, welche sich vielfach wiederholt. Mikrosatelliten kommen im Genom verteilt durchschnittlich einmal pro 30 kb-Genom-Abschnitt vor und zeigen einen hohen Grad an Polymorphie durch eine variable Anzahl an Wiederholungen

(Louis et al., 1992). Solche Sequenzen werden im menschlichen Genom häufig als polymorphe Marker eingesetzt. Diese repetitiven Sequenzen werden mittels spezifisch flankierender Sequenzen (Startermoleküle, "primer") durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Die Amplikons werden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Insbesondere die anschließende Silberfärbung macht diese Methode im Vergleich zum Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus zu einer zeitsparenden, nicht-radioaktiven Methode (Budowle et al., 1991, von Deimling et al., 1993).

Name des Markers	D1S1608
Lokalisation	1q
MgCl ₂ -Konzentration	1,25 mM
Zyklus (30x)	94°C, 30' 57°C, 30" 72°C, 10"
PCR-Produkt-Größe	Bp

2.5.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung erfolgte in 8%igen, denaturierenden, 37x41 cm großen, 0,35 mm dicken Polyacrylamidgelen (7,74% Acrylamid, 0,26% Bisacrylamid, 50% Harnstoff, 1x TBE) mit einer Taschenbreite von 0,5 cm. Für ein Gel wurden 60 ml Acrylamidlösung mit 180 µl 20%iger Ammoniumpersulfat- (APS) Lösung und 20 µl TEMED versetzt, sorgfältig gemischt und zügig zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Der gesamte PCR-Reaktionsansatz (10 µl) wurde nach der PCR-Reaktion mit 5 µl PAGE-Ladepuffer (je 0,25% Bromphenolblau und Xylencyanol und 30% Glycerol in Wasser) versehen und unmittelbar vor dem Auftragen 5' bei 100°C im Heizblock denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Als Längenstandard wurde Standard V (Boehringer) benutzt. Hierzu wurden 0,3 µl Standard V mit 7,7 µl Wasser verdünnt, ebenfalls mit 5 µl Ladepuffer versehen, vor dem Auftragen denaturiert und auf Eis gestellt. Die Produkte wurden bei einer Spannung von 75 Volt für ca. 2 Std. aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht.

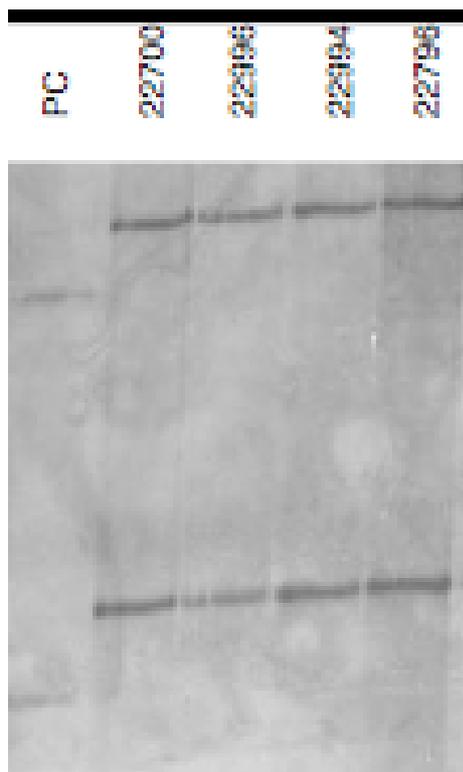
3. ERGEBNISSE

3.1 Mutationsanalyse des *SNF5/INI1*-Gens

Es wurden bisher zahlreiche Publikationen zu Plexuskarzinomen mit Punktmutationen in *SNF5/INI1* gemacht und es ist bekannt, dass Plexuskarzinome und – papillome spezifische Verluste genetischen Materials auf dem langen Arm von Chromosom 22 aufweisen. Dies brachte uns dazu Plexuspapillome weiter auf Punktmutationen zu untersuchen.

Es wurden in den Exons 1-9 von *SNF5/INI1* von 21 CPP Tumoren nach somatischen Mutationen gesucht. Die SSCP-Analyse ergab jedoch keine veränderten Bandenverschiebungen.

Positive Kontrollen von vorher bekannten Allelveränderungen in Exon 4, 5, 7 und 9 als auch von Mutationen in Exon 9 wurden benutzt um die Genauigkeit der Assays zu bestätigen.



Die Abbildung zeigt ein SSCP von Exon 9 auf dem *INI1* Gen in Plexuspapillomen. Das Muster der Banden zeigt keine Sequenzänderung an. Ein einzelner Basenverlust wurde in der bidirektionalen Sequenz einer DNA Positivkontrolle entdeckt (vorher publiziert Weber M). Die vier DNA Proben von Plexuspapillomen zeigen ein Wildtypmuster.

Bedingungen: 14% Acrylamid-bisacrylamidgel, 1:50, 3 Watt, 15 Stunden. (PC, Positivkontrolle)

4. DISKUSSION

Das letzte Jahrzehnt hat unser Verständnis für die genetische Grundlage der Tumorigenese deutlich erweitert. Zwei Arten von Veränderungen in der genetischen Expression wurden als Hauptmerkmale erkannt:

Der Verlust der genetischen Expression des Tumorsuppressorgens und die Überexpression von Onkogenen oder Expression von der veränderten Form des Tumorsuppressorgens. Diese genetischen Veränderungen resultieren aus genetischen Defekten in Form von Chromosomenverlust oder DNA Defekten, welche vererbt oder erworben werden. Die gemeinsame Folge wäre eine Zunahme der Zellproliferation. Diese Zunahme der Zellproliferation entsteht durch den Kontrollverlust im Zellzyklus an den Kontrollpunkten oder durch die Unfähigkeit die Apoptose einzuleiten.

Die SSCP- Analyse ist eine weit verbreitete Methode zum Screenen von veränderten Genom Sequenzen. Die Sensitivität und Reproduktivität erreichen 90%, abhängig von der Größe der analysierten DNA Fragmente und der Erfahrung des Untersuchers. Wir trafen die Wahl PCR – Produkte größer als 100bp und kleiner als 200bp zu verwenden. Denn es zeigte sich, dass die Untersuchung nach Veränderungen in dieser Größe eine hohe Genauigkeit erreicht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass *SNF5/INI1* ein unwahrscheinlicher Kandidat für einen CPP-assozierten Tumorsuppressorgen ist.

Nicht desto trotz sind häufige Verluste von 22q ein Hinweis darauf, dass diese Region ein Tumorsuppressorgen trägt, welches eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Hirntumoren spielt (Grill et al.).

SNF5/INI1 ein Bestandteil des Kerns vom SWI/SNF Chromatin Komplex ist ein potentes Tumorsuppressorgen, wessen Mechanismus noch weitgehend unbekannt ist. In einer Studie von Isakoff et. al wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von *SNF5/INI1* zu einer aberranten Hochregulation von E2F Zielen und einem erhöhtem Niveau von *p53* führt. Keimzellmutationen in *SNF5/INI1* bei Kindern prädisponieren nachweislich zu Rhabdoidtumoren. Es gibt einige wenige familiäre Fälle, wo dies beschrieben wurde. (Kristin et al.)

Wir haben uns bei den Plexustumoren auf das Tumorsuppressorgen *SNF5/INI1* konzentriert, welches bei Keimbahnmutation das vererbliche Rhabdoid Prädispositions Syndrom entstehen lässt. Dieses Prädispositions Syndrom ist mitverantwortlich für die Entstehung von renalen und

extrarenalen malignen Rhabdoidtumoren bei Kleinkindern, sowie bei ZNS Tumoren, inklusive Plexuskarzinome (CPC), atypische teratoide rhabdoide Tumore (ATRT) und einzelnen zentralen primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET). (Biegel JA et al.)

Die hohe Inzidenz von -22q in 47% von Plexuspapillomen (CPP) durch vergleichende Genomhybridisierung beschrieben von Rickert et al. weist darauf hin, dass auf dem langen Arm von Chromosom 22 außer *SNF5/INI1* noch ein weiteres Tumorsuppressorgen existieren kann. Es gibt nur sehr wenig molekulargenetische Daten. Bekannt ist aber, dass Abberationen in CPP und CPC sich unterscheiden. Während CPP häufig +7q, +5q, 7p, +5p, +9p, +9q, +12p, +12q, +8q und -10q, -10p, -22q zeigen, hat CPC häufig +12p, +12q, +20p, +1, +4q, +20q, +4p, +8q, +14q, +7q, +9p, +21 und -22q, -5p, -18q. Unterschiede gibt es auch zwischen Erwachsenen und Kindern mit CPP, während bei Kindern häufig +8q, +14q, +12 und 20q nachweisbar sind, zeigen Erwachsene hauptsächlich +5q, +6q, +15q, +18q und -22q. Interessant ist es, dass eine bedeutend längere Überlebensrate unter den Patienten mit CPC besteht, die +9p und -10q enthalten (Rickert et al.). Bei den Glioblastomen stellt dagegen -10q eine schlechte Prognose dar.

Es wurden jedoch auch Fälle von Plexustumoren beschrieben, die in Zusammenhang mit erblichen Tumorsyndromen wie dem Neurofibromatose Typ2 und der von Hippel-Lindau Krankheit auftraten. Letztere könnten auf die Beteiligung der Tumorsuppressorgene *NF2* und *VHL* auf 22q12 und 3p25-26 deuten.

Das *NF2* Gen wurde als wichtiges Gen für mehrere Tumore mit -22q wie etwa Schwannome, Meningiome und spinale Ependymome bei Erwachsenen identifiziert. *NF2* sollte in zukünftigen Studien weiterhin als potentieller Kandidat in Betracht gezogen werden. (Rutledge et al.)

Das von Hippel- Lindau Syndrom (VHL) ist ein seltenes autosomal dominant vererbtes Tumorsyndrom, welches sowohl mit benignen als auch malignen Tumoren, speziell in der Niere, Pankreas und dem Hirn im Zusammenhang auftritt. VHL Patienten sind heterozygot entweder mit einer Deletion oder Punktmutation auf dem Gen. Nierenzellkarzinome bei VHL zeigen Allelverluste auf Chromosom 3 bei der LOH Analyse. Dies weist auf die Abwesenheit einer Kopie hin. Das VHL Protein (pVHL) agiert auf verschiedenen Wegen. Bei Aktivierung korreliert es einerseits mit der neuronalen Differenzierung und andererseits bindet es auch an Transkriptionsfaktoren (Elongin C/ nd-B). In Degradation von HIF1 hat es eine angiogenetische Wirkung.

Bisher untersuchte Plexuspapillome entstanden auch im Zusammenhang mit dem Li-Fraumeni Syndrom (*TP53*-Gen), dem Gorlin Syndrom (*PTCH*-Gen), dem Turcot Syndrom (*APC*-Gen)

und dem Aicardi Syndrom (Palmér et al). Das seltene Aicardi Syndrom (*AIC*-Gen) wurde bisher im Zusammenhang mit gutartigen (z.B. Plexuspapillomen) und bösartigen Tumoren (z.B. Angiosarkom) beschrieben. Eine genetische Analyse vom *AIC*-Gen ließ eine Mutation auf dem kurzen Arm des X Chromosoms vermuten, ein Gebiet was auch bedeutend für die Tumorentwicklung sein könnte.

Bisher veröffentlichte Studien lassen schlussfolgern, dass *TP53* ein der am häufigsten betroffenen Tumorsuppressorgene ist. Es wurden bisher 12 Familien mit CPC beschrieben, die eine *TP53* Keimbahnmutation besaßen. In einer jüngeren Studie von Krutikova et al (2005) wurden fünf pädiatrische Patienten mit CPC auf *TP53* Mutationen untersucht. Nur einer der Fälle erfüllte die Kriterien für Li- Fraumeni Syndrom und nur drei Fälle (inkl. dem Li-Fraumani) erfüllten die Chompret Kriterien für *TP53* Keimbahn Mutationen. Der Zusammenhang von Kindern mit CPC und *TP53* Mutationen kann eine wichtige Bedeutung für die Angehörigen des Patienten darstellen, in Form eines erhöhten Krebsrisikos. Aufgrund der altersabhängigen Risiken von verschiedenen Krebsarten, könnte die Mutter eines Patienten mit diesem Tumor zum Beispiel ein sehr hohes Mamma-Karzinom Risiko bergen.

Für adoleszente und adulte Patienten kann eine vorhandene *TP53* Mutation ein erhöhtes Risiko einer sekundären Malignisierung bedeuten. Einige CPPs und fast alle CPCs zeigen eine immunhistochemische Positivität für *p53*, was auch die bedeutende Rolle von *p53* in der Entstehung der Plexustumore unterstreicht (Wyatt-Ashmead J et al). Der genaue Prädispositions Mechanismus mit Keimbahnmutationen in *TP53* bei Plexustumoren ist noch nicht vollständig geklärt.

Eine andere interessante chromosomale Region ist 10q, wo Verluste durch CGH (comperative genom hybridization) in pädiatrischen höhergradigen Astrozytomen, Meningiomen und Ependymomen festgestellt wurden. Hier sind die Tumorsuppressorgene *PTEN*, *MXII* und *DMBT1* lokalisiert. Diese Gene waren zuvor in einer höheren Anzahl von malignen ZNS Tumoren mitbeteiligt (Mollenhauer et al, Steck PA et al, Wechsler DS et al).

Das *MYO18B* Gen auf 22q12.1 gehört zu der Genfamilie der Myosine und ist nicht ein primärer Kandidat für ein Tumorsuppressorgen, es wurden jedoch Mutationen in Lungenkrebszelllinien und zwar bei beiden kleinzelligen und nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen festgestellt. Daher könnte *MYO 18B* auch ein Kandidat für CPP sein.

In einer Studie von Grill et al. (2002) wurden Ependymome und Plexustumore mit der CGH-Methode verglichen. Das zytogenetische Profil von Plexustumoren und Ependymomen ist

deutlich unterschiedlich. In Plexustumoren waren eher Zuwächse als Verluste vorhanden. Wie auch in anderen Studien waren hier Chromosom +7 und +12, sowie auch der Verlust von Chromosom 22 betroffen. Chromosom 22 zeigte aber wie bei uns auch keine somatische Mutation und auch keine homozygote Deletion von *SNF5/INI1*. Bei den Ependymomen waren es dagegen häufig Verluste von 6q oder Zuwächse von 1q.

Chromosomale Region	Genfunktion
Plexuspapillome	
-33p22-pter	<i>VHL</i> (Tumorsuppressorgen)
+5q12-14	<i>TRE</i> (Transkriptionfaktor)
+5q11.2-22	<i>FER</i> (Tyrosinkinase), <i>NPM</i> , <i>IL3</i> (Onkogen), <i>IRF1</i> (Transkriptionsfaktor)
+7q21-pter	<i>EGFR</i> (Tyrosinkinase), <i>ETV1</i> (Onkogen)
+7q21-31.2	<i>MET</i> (Tyrosinkinase), <i>WNT2</i> (Wachstumsfaktor)
+8q13-22	<i>MOS</i> , <i>LYN</i> (Tyrosinkinase), <i>MYBL1</i> , <i>MYC</i> (Transkriptionsfaktor), <i>ETO/MTG8</i> (Onkogen),
+9q12-22	<i>AF9</i> (Onkogen), <i>TRKB</i> (Tyrosinkinase)
-10q25-qter	<i>MXI1</i> (Tumorsuppressorgen)
+12q12-15	<i>CDK4</i> (Zellzyklus), <i>CHOP</i> (Onkogen), <i>HER3</i> (Tyrosinkinase), <i>WNT1</i> (Wachstumsfaktor), <i>GLI1</i> (Transkriptionsfaktor)
+15q22-qter	<i>FPS/FES</i> (Tyrosinkinase)
-22q	<i>NF2</i> , <i>BAM22</i> , <i>SNF5/INI1</i> (Tumorsuppressorgene)
Plexuskarzinome	
+1p31-pter	<i>AFIP</i> , <i>PAX7</i> , <i>BLYM</i> (Onkogene), <i>MYCL1</i> , <i>TALI</i> , <i>E2F2</i> , <i>JUN</i> (Transkriptionsfaktoren), <i>FGR</i> und <i>LCK</i> (Tyrosinkinasen)
+4q12-26	<i>KIT</i> (Tyrosinkinase), <i>AF4</i> , <i>IL2</i> (Onkogene)
-5q11.2-32	<i>MSH3</i> , <i>MCC</i> , <i>APC</i> (Tumorsuppressorgene)
+7q11.2-32	<i>MET</i> (Tyrosinkinase), <i>WNT2</i> (Wachstumsfaktor)
+8q21.1-22	<i>LYN</i> (Tyrosinkinase), <i>MYBL1</i> , <i>MYC</i> (Transkriptionsfaktoren), <i>ETO/MTG8</i> (Onkogen)
+12q12-22	<i>CDK4</i> (Zellzyklus), <i>CHOP</i> , <i>BTG1</i> (Onkogen), <i>HER3</i> , <i>ELK3</i>

	(Tyrosinkinase), <i>WNT1</i> (Wachstumsfaktor), <i>GLI1</i> (Transkriptionsfaktor)
+14q11.2-23	<i>FKH2/QIN</i> , <i>FOS</i> (Transkriptionsfaktoren)
+21q22	<i>AML1</i> , <i>ERG</i> (Onkogene), <i>ETS2</i> (Transkriptionsfaktor)
-22q	<i>NF2</i> , <i>BAM22</i> , <i>SNF5/INI1</i> (Tumorsuppressorgene)

Wir ziehen hieraus die Schlussfolgerung, dass die Abwesenheit von Punktmutationen im *SNF5/INI1*-Gen die Hypothese stützt, dass dieses Gen als Tumorsuppressorgen bei CPP nicht relevant ist.

Auf regulatoriver Ebene wurde festgestellt, dass eine Promotor-Methylierung einen Vorteil oder besser gesagt einen Hinweis für eine bessere Prognose darstellt. Die Erforschung der regulativen Ebene im Zusammenhang mit *SNF5/INI1* zeigte, dass diese die Transkription aktiviert und auch unterdrückt. (Isakof et al.) Hier besteht weiterhin auch noch ein Klärungsbedarf.

Andere Kandidaten sollten weiter identifiziert werden, wobei Kandidaten wie *MYO 18B* und *NF2* auch mehr Aufmerksamkeit verdienen. Die Diskrepanz von häufigen *SNF5/INI1*-Mutationen in CPC und das Fehlen solcher Veränderungen in CPP kann die Bedeutung von *SNF5/INI1* bei der Tumorgenese stützen oder schwächen, man sollte weiterhin in Zukunft auf andere molekulare Wege wie der transkriptionellen Regulation das Interesse richten.

An dieser Stelle ist noch zu erwähnen, dass sich in Hinsicht der Diagnostik auch einiges getan hat. In der Studie von Hasselblatt et al. wurde gezeigt, dass für die Diagnostik der Plexustumore spezifische Marker zur Geltung kommen könnten. Es wurden 46 Gene identifiziert, die im normalen Epithel des Plexus choroideus und auch bei den CPP auftauchen. Unter ihnen wurden elf genauer immunhistochemisch untersucht. Es kam heraus dass ein als Kalium Kanal dienendes Protein namens Kir7.1 im Plexus choroideus, beim CPP und beim CPC nachweisbar ist, wobei sie bei 100 anderen Primärtumoren nicht nachzuweisen ist. Ähnlich ist es auch bei Stanniocalcin-1, einem Glykoprotein, das im normalen Plexus choroideus, CPP und CPC auftaucht, aber nur in zwei von 100 weiteren Primärtumoren und Metastasen. Antikörper gegen Kir7.1 und Stanniocalcin-1 könnten somit als sensitive und spezifische Marker für Plexustumore dienen. Es ist bekannt, dass die Unterscheidung von CPC und atypische Rhabdoidtumore mit Hematoxylin- und Eosinfärbung schwierig ist. Unter Anwendung dieser Marker stellte sich heraus, dass einige als CPC befundete Tumore, sich im Nachhinein als atypische Rhabdoidtumore herausstellten.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde vor kurzem gezeigt, dass Plexuskarzinome Mutationen im *SNF5/INI1*- Gen auf dem Chromosomarm 22q11.2 tragen. Eine aktuelle Studie über Plexuspapillome- und karzinome zeigte auch, dass es häufig zu spezifischen Verlusten genetischen Materials auf dem langen Arm des Chromosoms 22 (-22q) kommt. Diese Region, welches der Sitz des *SNF5/INI1*Gens ist, war in 47% der Plexuspapillome und in 73% der Plexuskarzinome betroffen. Spezifischer genetischer Verlust (-22q) tritt dabei häufiger bei Erwachsenen mit Plexuspapillomen als bei Kindern auf. Dies könnte auf das Vorliegen von verschiedenen pathogenen Wegen hinweisen. Diese Beobachtungen könnten auf eine potentielle Tumorsuppressorgenfunktion von *SNF5/INI1* bei Plexuspapillomen hinweisen.

Um seine potentielle Rolle als Tumorsuppressorgen zu untersuchen, analysierten wir die Exons 1-9 vom *SNF5/INI1*-Gen durch SSCP bei 21 formalinfixierten und paraffingebetteten Plexuspapillomen.

Es wurden keine Bandenverschiebungen entdeckt. DNA Positivkontrollen von einer vorhergehenden Studie von uns, wurden dabei zum Vergleich mit dazu genommen. Dies zeigt, dass somatische Punktmutationen bei der Pathogenese von Plexuspapillomen keine Rolle spielen. Man könnte die These aufstellen, dass Plexuspapillome und – karzinome durch zwei verschiedene molekulare Wege entstehen.

6. REFERENZEN

Armstrong JA, Bieker JJ, Emerson BM. A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell* 1998; 95:93-104

Bazett-Jones D., Cote J., Landel C. et al. The SWI/SNF complex creates loop domains in DNS and polynukleosome arrays and can disrupt DNS-Histone contacts within these domains. *Mol Cell Biol.* , 19, 1470-1478, 1999

Beckwith JB, Palmer NF (1978) Histopathology and prognosis of Wilms tumors. *Cancer* 41:1937-1948

Bhattachjee MB, Armstrong DD, Vogel H, Cooley LD. Cytogenetic analysis of 120 primary pediatric brain tumors and literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 97: 39-53

Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, Stenstrom C, Wainwright LM, Fogelgren B(1999), Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res* 59:74-79

Biegel JA, Fogelgren B, Zhou JY et al. Mutations of the INI1 rhabdoid tumor suppressor gene in medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Clin Canc Res* 2000; 6: 2759-63

Biegel JA, Tan L, Zhang F, Wainwright L, Russo P, Rorke LB. Alterations of the hSNF5/INI1 gene in central nervous atypical teratoid/rhabdoid tumors and renal and extrarenal rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3461-7

Biggar S. and Crabtree G. Continuous and widespread roles for the SWI/SNF complex in transcription. *Embo J.*, 18, 2254-2264, 1999

Budowle B, Giusti AM, Wayne JS et al. Fixed-bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci, for use in forensic comparisons. *Am J Hum Genet*, 1992 Feb; 50(2): 440-3

Bultman S., Gebuhr T., Yee D et al. A BRG1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell*, 6, 1287-1295, 2000

Burger PC, Yu IT, Tihan T et al. (1998) Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system: a highly malignant tumor of infancy and childhood frequently mistaken for medulloblastoma, a pediatric oncology group study. *Am J Hum Gen* 55:1076-1082

Cavenee, W.K.: The genetic basis of neoplasia: the retinoblastoma paradigm. *TIG* December 1986

Cheng, S. W. G., Davies, K.P., Yung, E., Beltran, R.J., Yu, J., and Kalpana, G. V. c-Myc interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet*, 22: 102-5, 1999

von Deimling, A., Bender, B., Louis, D.N., Wiestler, O.D.: A rapid and non-radioactive PCR based assay for the detection of allelic loss in human gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 19, 524-529 (1993).

Ebert C., von Haken M., Meyer-Puttlitz B et al. Molecular genetic analysis of ependymal tumors: NF2 mutations and chromosom 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas. *Am. J. Pathol.*, 155: 627-632, 1999

Frayling IM, Methods of molecular analysis: mutation detection in solid tumours. *Mol Pathol* 2002; 55:73 -9

Flanagan J., Peterson C. A role for the yeast SWI/SNF complex in DNS replication. *Nucleic Acids Research*, 27, 2022-2028, 1999.

Grill J., Avet-Loiseau H., Lellouch-Tubiana A. et al. Comparative Genomic hybridization detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas. *Cancer genetics and Cytogenetics* 136 (2002) 121-125

Hasselblatt M., Böhm C., Tatenhorst L et al. Identification of novel diagnostic markers for choroid plexus tumors. *Am J Surg Pathol*, Vol 30, number 1, January 2006

Hogg A., Onadim Z., Baird P.N., Cowell J.K.: Detection of heterozygous mutations in the RB1 gene in retinoblastoma patients using single-strand conformation polymorphism analysis and polymerase chain reaction sequencing. *Oncogene* 7, 1445-1451 (1992).

Isakoff M.S., Sansam C., Tamayo P.: Inactivation of the Snf5 tumor suppressor stimulates cell cycle progression and cooperates with p53 loss in oncogenic transformation. *PNAS*, vol.102, no. 49, 17745-17750 (Dec. 2005)

James C.D., He J, Carlblom E et al. Loss of genetic information in central nervous system tumors in common to children and young adults. *Genes Chrom. Cancer*, 2: 94-102, 1990

Jay V, Ho M, Chan F, Malkin D. P53 expression in choroids plexus neoplasms: an immunohistochemical study. *Arch Pathol Laboratory Med* 1996; 120: 1061-5

Kalpana G., Marmon S., Wang W., et al. Binding and Stimulation of HIV-1 Integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science*, 266, 2002-2006, 1994

Kleihues, P& W. K., Cavenee (2000). Pathology and genetics of tumours of the nervous system World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press: Lyon.

Knudson, A.G., Jr., Strong, L.C, Anderson, D.E.: Heredity and Cancer in Man. *Prog. Med. Genet.* 9, 113-158 (1973).

Krutilkova V, Trkova M, Fleitz J, Gregor V, Sedlacek Z. Identification of five new families strengthens the link between childhood choroids plexus carcinoma and germline TP53 mutations. *Eur J Cancer*, 2005 Jul; 41(11): 1597-603

Louis, D.N., von Deimling, A., Seizinger, B.R.: A (CA)_n Dinucleotide Repeat Assay for Evaluating Loss of Allelic Heterozygosity in Small and Archival Human Brain Tumor Specimens. *Am. J. Pathology* 141, 777-782 (1992).

Marshall, C.J.: Tumor Suppressor Genes. *Cell* 64, 313-326 (1991, Übersichtsartikel).

Mazewski C, Soukup S, Ballard E, Gotwal B, Lampkin B. Karyotype studies in 18 ependymomas with literature review of 107 cases. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999, 113(1):1-8

Mine, N., Bando, K., Nagai, H., Araki, T. & Emi, M. (1999). Two single nucleotide polymorphisms of the hSNF5/INI1 gene. *J. Hum. Genet.*, 44, 354-5.

Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W et al. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumors. *Nat Genet* 1997, 17:32-39

Morozov, A., Yung, E., Kalpana, G.V. Structure- function analysis of integrase interactor 1/hSNF5L1 reveals differential properties of two repeat motifs present in the highly conserved region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 1120-5, 1998.

Mueller W., Eum J.-H. D., Paulus W. et al. No evidence of hSNF5/INI1 point mutations in choroid plexus papilloma, *Neuropathology and Applied Neurobiology* (2003), 30, 304-307

Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith WE Jr. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 1999; 20: 1177-85

Nie Z., Xue Y., Yang D., et al. A specificity and targeting subunit of human SWI/SNF family-related Chromatin-remodeling complex. *Mol cell boil*, 8879-8888, 2000

Nishioka M, Kohno T, Tani M et al. MYO18B, a candidate tumor suppressor gene at chromosome 22q12.1, deleted, mutated, and methylated in human, lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:12269-74

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K.: Rapid and Sensitive Detection of Point Mutations and DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain Reaction. *Genomics* 5, 874-879 (1989).

Palmér L, Nordborg C, Steneryd K, Aman P, Kyllerman M. Large-Cell Medulloblastoma in Aicardi Syndrome. *Neuropediatrics* 2004; 35 307-311

Parham DM, Weeks DA, Beckwith JB (1994) The clinico-pathologic spectrum of putative extrarenal rhabdoid tumors. *Am J Surg Pathol* 18:1010-1029

Parissi V., Caumont A., de Soultrait R. et al. Inactivation of the SNF5 transcription factor gene abolishes the lethal phenotype induced by the expression of HIV-1 integrase in yeast. *Gene*, 247, 129-136, 2000

Phelan ML, Sif S, Narlikar GJ, Kingston RE. Reconstruction of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell* 1999; 3: 247-53

Reyes J., Murchardt C. and Yaniv M. Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J. Cell Biol.*, 137, 263-274, 1997

Rickert C, Wiestler O, Paulus W. Chromosomal Imbalances in Choroid Plexus Tumors. *Am J Pathol* 2002, 160: 1105-1113

Roberts C., Galusha S., McMenamin M et al. Haploinsufficiency of SNF5 predispose to malignant rhabdoid tumors in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 97: 13796-13800, 2000

Rorke LB, Packer RJ, Biegel JA (1996) Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood: definition of an entity. *J Neurosurg* 85:56-65

Rousseau-Merck M.F., Versteeg I., Legrand I., et al. *hsnf5/INI1* inactivations is mainly associated with homozygous deletions and mitotic recombinations in rhabdoid tumors. *Cancer Res*, 59: 3152-6, 1999

Rousseau-Merck M.F., Ambros P., Handgretinger R., Aurias, A., and Delattre, O. Truncating mutations of *hsnf5/INI1* in aggressive paediatric cancer. *Nature*, 394: 203-6, 1998

Rutherford J, Chu CE, Duddy PM et al. Investigations on a clinically and functionally unusual and novel germline p53 mutation. *Br J Cancer* 2002; 86;: 1592-6

Schmitz U, Mueller W, Weber M, Sevenet N, Delattre O, von Deimling A. INI1 mutations in meningiomas at a potential hotspot in exon 9. *Br J Cancer* 2001; 84:199-201

Schnitzler G., Sif S. and Kingston R. Human SWI/SNF interconverts a nukleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell*, 94, 17-27, 1998

Seizinger B.R., Martuza R.L., Gusella J.F.: Loss of genes on chromosome 22 in tumorigenesis of human acoustic neuroma. *Nature* 322, 644-647 (1986).

Seizinger B.R., Rouleau G., Ozelius L.J. et al. Common Pathogenic Mechanism for Three Tumor Types in Bilateral Acoustic Neurofibromatosis. *Science* 236, 317-319 (1987a).

Shanahan F., Seghezzi W., Parry D., et al. Cyclin E associated with BAF155 and BRG1 of the mammalian SWI/SNF complex and alters the ability of BRG1 to induce growth arrest. *Mol Cell Biol.* , 19, 1460-1469, 1999.

Sheffield V.C., Beck J.S., Kwitek A.E. et al. The Sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for the Detection of Single Base Substitutions. *Genomics* 16, 325-332 (1993).

Sévenet N., Lellouch-Tubiana A., Schofield D. et al. (1999). Spectrum of hSNF/INI1 Somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet*, 8, 2359-68

Sévenet N., Sheridan E., Amran D. et al. Constitutional mutations of the hSNF5/INI1 gene predispose to a variety of cancers. *Am. J. Human. Genet.*, 65, 1342-1348, 1999

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997, 15:335-362

Taylor MD, Gogkoz N, Andrulis IL et al. Familial posterior fossa brain tumors of infancy secondary to germline mutation of the hSNF gene. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1403- 6

Versteeg I., Sevenet N., Lange J., et al. (1998): Truncating mutation of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394: 203-206

Versteeg I, Medjkane S, Rouillard D, Delattre O. A key role of the hSNF5/INI1 tumour suppressor in the control of the G1-S transition of the cell cycle. *Oncogene* 2002; 21: 6403-12

Vital A, Bringuier PP, Huang H et al., Astrocytomas and choroid plexus tumors in two families with identical p53 germline mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 1061-9

Wang W., Cote J., Xue Y., et al. Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI/SNF complex, *Embo J.*, 15, 5370-5382, 1996

Weber M, Stockhammer F, Schmitz U, von Deimling A. Mutational analysis of INI1 in sporadic human brain tumors. *Acta Neuropathologica* 2001; 101:479-82

Wechsler DS, Shelly CA, Petroff CA, Dang CV: MXI1, a putative tumor suppressor gene, suppresses growth of human glioblastoma cells. *Cancer Res* 1997, 57: 4905-4912

Wick MR, Ritter JH, Dehner LP (1995), Malignant rhabdoid tumors: a clinicopathologic review and conceptual discussion. *Sem Diagn Pathol* 12:233-248

Wyatt-Ashmead J, Kleinschmidt-DeMasters B, Mierau GW, et al. Choroid plexus carcinomas and rhabdoid tumors: phenotypic and genotypic overlap. *Pediatr Dev Pathol* 2001, 4 , 545-549

Zankl, H. and Zang, K.D.: Cytological and Cytogenetical Studies on Brain Tumors. IV. Identification of the Missing G Chromosome in Human Meningiomas as No.22 by Fluorescence Technique. *Humangenetik* 14, 167-169 (1972).

Sonstige Literatur

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.; Jaenicke, L. (Hrsg.): Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft mbH (1986).

Knippers, R., Philippsen, P., Schäfer, K.P., Fanning, E.: Molekulare Genetik. 5. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1990).

Nicholl D.S.T., Gentechnische Methoden . Spektrum Akademischer Verlag (1998)

Riede U, Schaefer H, Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme Verlag (1995)

Miller O. J., Therman Eeva: Human Chromosomes. 4th Edition Springer Verlag (2001)

7. PUBLIKATION

Mueller W., Eum J.-H. D., Laß U., Paulus W., Sarkar C., Bruck W. und von Deimling A.
„No evidence of hSNF5/INI1 point mutations in choroid plexus papilloma“, *Neuropathology and Applied Neurobiology* (2003), 30, 304-307

Erklärung

„Ich, Joo-Hun David Eum, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Bedeutung des *SNF5/INI1*-Gens bei Plexustumoren“ 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

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.