

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

DISSERTATION

Tumorsuppressorgen-Identifizierung auf Chromosom 22 in astrozytären Tumoren

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

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Astrid Nümann  
aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. von Deimling  
2. Prof. Dr. med. G. Reifenberger  
3. Prof. J.M. Kros, M.D., Ph.D.

Datum der Promotion: 23.03.2007

## INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis .....	6
1. EINLEITUNG .....	7
1.1 Gehirntumoren .....	7
1.2 Astrozytome und ihre Einteilungen in Subtypen .....	8
1.3 Epidemiologie der Astrozytome .....	8
1.4 Ätiologie der Astrozytome .....	9
1.5 Tumorassoziierte Gene und Allelverluste .....	10
1.6 Molekulargenetik der Astrozytome .....	13
1.6.1 Pilozytische Astrozytome WHO Grad I .....	13
1.6.2 Astrozytome WHO Grad II .....	14
1.6.3 Anaplastische Astrozytome WHO Grad III .....	15
1.6.4 Glioblastome WHO Grad IV .....	15
1.7 Astrozytome und der chromosomale Arm 22q .....	16
1.8 Andere Krebsarten und der chromosomale Arm 22q .....	19
1.9 Strategien zur Identifizierung von Tumorsuppressorgen .....	19
1.10 Mikroarrays und Gehirntumoren .....	20
1.11 Fragestellung der Arbeit .....	22
2. MATERIAL UND METHODEN .....	23
2.1 Verwendete Geräte .....	23
2.2 Chemikalien und anderes Verbrauchsmaterial .....	25
2.3 Puffer und Lösungen .....	27
2.4 Computerprogramme .....	29
2.5 Untersuchungsmaterial .....	30
2.5.1 Gewebesammlung .....	30
2.5.2 Extraktion genomischer DNS aus Vollblut .....	30
2.5.3 Extraktion genomischer DNS aus Tumorgewebe .....	30
2.5.4 Extraktion von Total RNS aus Tumoren .....	31
2.6 Untersuchungsmethoden .....	31
2.6.1 Amplifikation der DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	31
2.6.2 Agarosegelelektrophorese .....	32
2.6.3 Polymorphe Mikrosatellitenanalyse .....	32
2.6.4 Silberfärbung .....	33
2.6.5 Auswertung der Mikrosatellitenanalyse .....	34
2.6.6 Primer Design für die Mutationsanalyse .....	34
2.6.7 Single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) .....	35
2.6.8 Isolierung der Einzelstrang-DNS aus dem Polyacrylamidgel .....	36
2.6.9 Aufreinigung der DNS für die Sequenzierung .....	36
2.6.10 Sequenzieren der DNS .....	36
2.6.11 Funktionelle Genannotation mittels Internet-Datenbanken .....	37
2.7 Mikroarray .....	38
2.7.1 PCR-Primer-Design für die Mikroarray-Analyse .....	38
2.7.2 Herstellung der cDNS .....	39
2.7.3 Herstellung der PCR-Produkte für den Array .....	40
2.7.4 Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Agarose-Gel .....	40
2.7.5 Mikroarray-Spotting .....	40
2.7.6 Fluoreszenzmarkierung der cDNS .....	41
2.7.7 Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNS .....	43
2.7.8 Bildgewinnung und Datenanalyse .....	43

2.7.9	Normalisierung	44
2.7.10	Absicherung der Ergebnisse	44
2.7.11	Auswertung der Mikroarray-Analyse	44
2.7.12	Statistische Auswertung	45
2.7.13	Cluster-Analyse	45
3.	ERGEBNISSE	46
3.1	LOH bei astrozytären Tumoren	46
3.2	Resultat der Genidentifizierung in den Deletionsregionen auf Chromosom 22 und computerbasierte Analyse	49
3.3	Mutationsanalyse mittels SSCP	52
3.3.1	<i>DJ1042K10.2</i>	52
3.3.2	<i>MKLI</i>	52
3.3.3	<i>EP300</i>	52
3.3.4	<i>MYO18B</i>	53
3.3.5	<i>BIK</i>	54
3.4	Mikroarray	55
3.4.1	RNS-Qualität und Markierungseffizienz	55
3.4.2	Auswertung der gescannten Bilder	56
3.4.3	Normalisierung	56
3.4.1	Cluster-Analyse	57
3.4.2	Statistische Auswertung	58
4.	DISKUSSION	59
4.1	LOH 22q: Methodischer Ansatz	59
4.2	LOH 22q bei Astrozytomen	63
4.3	Mutationsanalyse mittels SSCP: Methodischer Ansatz	66
4.4	Funktionelle Analyse mittels Internet-Datenbanken	66
4.5	Ergebnisse der Mutationsanalyse	67
4.6	Mikroarray-Analyse: Methodischer Ansatz	70
4.6.1	Normalisierung	70
4.6.2	Cluster-Analyse	70
4.6.3	Statistische Auswertung	71
4.6.3.1	Analysis of Variance (ANOVA-Analyse)	71
4.6.3.2	Significance Analysis of Microarrays (SAM-Analyse)	71
4.7	Ergebnisse der Mikroarray-Analyse	71
5.	ZUSAMMENFASSUNG	75
6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	76
7.	LITERATURVERZEICHNIS	78
8.	DANKSAGUNG	85
9.	LEBENS LAUF	86
10.	PUBLIKATIONEN	88
11.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	90

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1)	Tumorsuppressor-Mechanismen nach Campisi et al.	11
Abb. 2)	Knudson-Modell für die Tumorsuppressorgen-Inaktivierung nach Delivee et al.	12
Abb. 3)	Schematische Übersicht über typische chromosomale und genetische Veränderungen bei Astrozytomen.	14
Abb. 4)	Übersicht über die bisher identifizierten Deletionszonen auf dem langen Arm von Chromosom 22 bei verschiedenen Tumorentitäten.	18
Abb. 5)	Schematische Darstellung eines Mikroarrays der Firma Scienion.	42
Abb. 6)	Minimale Verlustzonen auf 22q bei Astrozytomen.	47
Abb.7)	Übersichtsabbildung mit den bereits identifizierten Zonen bei verschiedenen Tumorentitäten.	48
Abb. 8)	Identifizierte Protein Domänen nach Translation der Sequenz für das <i>DJI042K10.2</i> Gen mittels BLAST Computerprogramm.	49
Abb. 9)	Die Abbildung zeigt eine Übersicht der Gene, die in der centromeren (A) und telomeren (B) minimalen Verlustzone liegen.	50
Abb. 10)	Schematische Abbildung der mittels SSCP untersuchten Gene <i>DJI042K10.2</i> , <i>MKL1</i> , <i>MYO18B</i> , <i>EP300</i> und <i>BIK</i> .	53
Abb. 11)	Typische Polymorphismen der untersuchten Gene.	54
Abb.12)	Überprüfung der RNS-Qualität mittels Agilent Bioanalyzer.	55
Abb. 13)	Mikroarray nach der Hybridisierung als Falschfarbendarstellung.	56
Abb. 14)	Graphische Darstellung mittels „Scatter-Plot“.	57
Abb. 15)	Clusteranalyse mit „Heat Map“ zur Darstellung relativer Expressionsstärken.	58
Abb.16)	Beispiel eines molekularbiologischen Befundes anhand des Markers D22S530.	60
Abb. 17)	Schematische Übersicht über die Fehlerquellen beim Bilden einer minimalen Verlustzone.	62

## Tabellenverzeichnis

Tab.1)	Übersicht über die verwendeten Mikrosatellitenmarker.	33
Tab. 2)	Gliomassoziierte Gene, die mittels Mikroarray-Analyse untersucht wurden.	39
Tab. 3)	Verwendete Kontrollgene für die Mikroarray-Analyse.	41
Tab. 4)	Tumorauswahl zur Mikroarray-Hybridisierung.	43
Tab. 5)	Ergebnis der Allelverluststudie 22q, aufgeschlüsselt nach Tumorgrad.	46
Tab. 6)	Übersicht über die Gene auf dem chromosomalen Arm 22q, die mittels BLAST Analyse als potentielle Kandidatengene identifiziert wurden.	51
Tab. 7)	Übersicht über die Gene auf dem chromosomalen Arm 22q, die durch die Literaturrecherche als potentielle Kandidatengene identifiziert wurden.	51
Tab. 8)	Frequenz der Allelverluste 22q aufgeschlüsselt nach Tumorgrad und Publikation.	64

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Astrozytome und Glioblastome gehören zu den häufigsten primären Gehirntumoren im Erwachsenenalter. Mutationen und eine veränderte Genexpression sind an der Genese von Gehirntumoren beteiligt. Einige Veränderungen sind bereits identifiziert worden, wie z.B. Mutationen im *TP53* Tumorsuppressorgen. Eine Vielzahl von Genen, die zur Tumorgenese beitragen, ist noch nicht bekannt. Die hohe Anzahl von Allelverlusten auf verschiedenen Chromosomen weist auf noch unbekannte Tumorsuppressorgene hin. Ein Verlust der Heterozygotie („loss of heterozygosity“, LOH) auf dem langen Arm von Chromosom 22 ist in astrozytären Tumoren mit einer Häufigkeit von 30 % beschrieben worden. Damit ergeben sich indirekte Hinweise, dass sich auf Chromosom 22 ein oder mehrere für Astrozytome wichtige, bisher unbekannte Tumorsuppressorgene befinden. Zur Identifizierung dieser potentiellen Tumorsuppressorgene wurde diese Studie durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden 153 astrozytäre Tumore mit 11 polymorphen Mikrosatellitenmarkern untersucht, die den gesamten chromosomalen Arm 22q abdeckten. Insgesamt zeigten 49 Gliome (32 %) einen Allelverlust auf 22q. Davon hatten 17 Gliome (35 %) den gesamten chromosomalen Arm verloren und 32 Gliome (65 %) zeigten interstitielle Deletionen. Die Deletionsmuster von Tumoren mit interstitiellen Deletionen wurden dazu verwendet, gemeinsame Verlustzonen einzugrenzen. Dabei gelang die Identifizierung von zwei verschiedenen Deletionszonen. Einer centromeren Region (22q11.23-22q12) mit einer Größe von 3 Mb und einer telomeren Region (22q13.31-32) mit einer Größe von 2.7 Mb. Die Gene in diesen minimalen Verlustzonen wurden in einem zweiten Schritt mittels Internet-Datenbanken annotiert. Fünf Kandidatengene (*MYO18B*, *DJI042K10.2*, *MKLI*, *EP300* und *BIK*) wurden mittels SSCP auf Mutationen untersucht. Dieser Mechanismus der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung konnte in den untersuchten Exonen ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden die Gene in den identifizierten Zonen einer Expressionsanalyse mittels Mikroarray unterzogen. Dabei wurden 10 Tumoren mit einem Allelverlust 22q mit 10 Tumoren ohne einen Allelverlust in ihrem Expressionsverhalten miteinander verglichen. Es wurden keine differentiell exprimierten Gene gefunden werden.

## 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A II	Astrozytom WHO Grad II
A III	Astrozytom WHO Grad III
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
ANOVA	Analysis of variance
APS	Ammoniumsulfat
BAA	Bisacrylamid
BLAST	Basic Alignment Search Tool (Programm für den Vergleich einer Ausgangssequenz gegen Sequenzdatenbanken)
Bp	Basenpaare
CGH-Array	Chromosomal Genomic Hybridisation
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Ethanol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
EST	Expressed Sequence Tags
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GBM	Glioblastom WHO Grad IV
H <sub>2</sub> CO	Formaldehyd
H <sub>3</sub> CCOOH	Essigsäure
HCL	Salzsäure
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure

Kb	Kilobasen
l	Liter
LOH	Loss of Heterozygosity
Lsg.	Lösung
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGVZ	minimale gemeinsame Verlustzone
mRNS	messenger RNS
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF2	Neurofibromatose Typ 2
OA II	Oligoastrozytom WHO Grad II
OA III	Oligoastrozytom WHO Grad III
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PXA II	pleomorphes Xantroastrozytom
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SSCP	Single-strand-conformation-polymorphism (Einzelstrangkonformationspolymorphismus)
SNP	single nucleotide polymorphism
Tab.	Tabelle
TBE	Tisbase mit Borsäure und EDTA
TEMED	Tetramethylethylenamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

## **8. DANKSAGUNG**

Die vorliegende Arbeit entstand am Neuropathologischen Institut der Charité - Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. von Deimling. Ihm danke ich für die Möglichkeit im Neuropathologischen Institut zu promovieren und für die wissenschaftliche Unterstützung der Arbeit. Herrn Dr. Christian Hartmann, in dessen Arbeitsgruppe die Studie entstand, möchte ich danken für seine Ideen, die Begleitung bei meiner ersten Begegnung mit der Molekulargenetik und die gute Betreuung meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch Frau Ulrike Laß, die mir immer bereitwillig in praktischen und technischen Problemen zur Seite stand. Ebenso danke ich Herrn Dr. Wolf Müller für die Unterstützung und Anregung in praktischen und wissenschaftlichen Fragen. Großer Dank gilt auch Herrn Sebastian Ullrich, der mir besonders in der letzten wichtigen Phase meiner Arbeit sehr geholfen hat.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während meines beruflichen Weges.

## **9. LEBENSLAUF**

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



## 10. PUBLIKATIONEN

### Originalarbeiten:

Kaulich K, Blaschke B, Nümann A, von Deimling A, Wiestler OD, Weber RG, Reifenberger G.

Genetic alterations commonly found in diffusely infiltrating cerebral gliomas are rare or absent in pleomorphic xanthoastrocytomas.

J Neuropathol Exp Neurol. 2002 Dec;61(12):1092-9.

Hartmann C, Nümann A, Mueller W, Holtkamp N, Simon M, von Deimling A.

Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytoma.

Int J Cancer. 2004 Mar 1;108(6):839-44.

Szekely AM, Bleichert F, Nümann A, Van Komen S, Manasanch E, Ben Nasr A, Cnaan A, Weissman SM.

Werner protein protects nonproliferating cells from oxidative DNA damage.

Mol Cell Biol. 2005 Dec;25(23):10492-506.

### Poster und Kongressbeiträge:

Progeroid syndrome of werner may be caused by lack of wrn protein to repair oxidative damage

Anna Szekely, Astrid Nümann, Franziska Bleichert, Hakim Ben Nasr and Sherman M. Weissman

Genetics Retreat Yale University, 17-18. Oktober 2003, New Haven

RNA interference mediated silencing of age-related genes induces early senescence and impaired DNA damage response in primary fibroblasts

Elisabet Manasanch, Astrid Nümann, Franziska Bleichert, Anna Szekely, Sherman M. Weissman

14th European Students Conference, 05-07.11.2003, Berlin

Werner protein is required for resistance to oxidative damage in non-proliferating cells.

Anna M. Szekely, Astrid Nümann, Brian Reed and Sherman M. Weissman, M.D.

Cold Spring Harbor Laboratories Meeting on "Molecular Genetics of Aging", October 6<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> 2004, USA

Chromosome 22q Tumor Suppressor Candidate Gene Identification in WHO grade II and III Astrocytomas

Christian Hartmann, Astrid Nümann, Ralf Jürgen Kuban, Nikola Holtkamp, Matthias Simon, Andreas von Deimling

Tagung der NeuroOnkologische Arbeitsgemeinschaft (NOA), Düsseldorf, 16.-17.09.2004

The Werner Syndrome protein is required for resistance to oxidative DNA damage in non-proliferating cells.

Anna M. Szekely, Astrid Nümann and Sherman M. Weissman, M.D.  
Presented at the “Aging and Human Disease”, IMMC/Cell Molecular Medicine Workshop, November 4-6<sup>th</sup>, 2004, Abbazia di Spineto, Italy

Chromosome 22q tumor suppressor gene candidate region fine mapping in astrocytomas.

Astrid Nümann, Christian Hartmann, Wolf Mueller, Nikola Holtkamp, Matthias Simon, Andreas von Deimling  
Brain Tumor 2004, 02-03. Dezember 2004, MDC, Berlin

## **11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich, Astrid Nümann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Tumorsuppressorgen-Identifizierung auf Chromosom 22 in astrozytären Tumoren“ 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.

Berlin, den

Astrid Nümann