

1.EINLEITUNG

Astrozytäre Tumoren gehören zu den wichtigsten Forschungsgebieten der Neuroonkologie. Dies liegt zum einen daran, dass sie im Vergleich mit anderen Tumoren des zentralen Nervensystems relativ häufig auftreten, zum anderen geht mit der Diagnose eines anaplastischen Astrozytoms oder Glioblastoms eine sehr schlechte Prognose einher. Die mediane Überlebensrate für Patienten mit höhergradigen Hirntumoren beträgt trotz Therapie lediglich 12 Monate. Leider hat sich dieser Wert in den letzten zwei Dekaden trotz großer Fortschritte in der Bestrahlungs- und Chemotherapie kaum verändert [1,2].

Neue Impulse erhofft man sich deswegen vor allem von der Identifizierung molekularer Mechanismen, die der Tumorentstehung zugrunde liegen, um Erkenntnisse für neue Therapieansätze zu gewinnen. Ein Zweig dieser Forschungsrichtung ist die Suche nach Tumorsuppressorgenen, deren Ausschaltung eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und -progression spielt und deren Reaktivierung einen möglichen Ansatz zur Therapie darstellen könnte [3]. In dieser Arbeit wird der lange Arm des Chromosoms 22 (22q) bei Astrozytomen untersucht, um dort mögliche Kandidaten für Tumorsuppressorgene zu identifizieren.

1.1 Gehirntumoren

Bei den malignen Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS) unterscheidet man zwischen primären und sekundären Gehirntumoren. Primäre Tumoren entstehen aus den Zellen des ZNS. Dagegen sind sekundäre Tumoren in das ZNS metastasierte Tumoren. Sie gehen von nicht hirneigenen Tumoren aus und kommen häufiger vor als primäre Gehirntumore. Tumoren des ZNS machen insgesamt etwa 2 % aller menschlichen Tumoren aus.

Die Geschichte der Klassifikation von Gehirntumoren begann in der Mitte des 19. Jahrhunderts mit der Arbeit von Rudolph Virchow. In seiner Vorlesung mit dem Titel „Die krankhaften Geschwülste“ beschrieb er die Neuroglia und brachte sie in Zusammenhang mit Gehirntumoren. Er unterschied die Gliome erstmalig von den „Psammonen“, „Melanomen“ und „Sarkomen“ des Zentralnervensystems [4]. Die Basis der Klassifikation von primären Gehirntumoren beruht dagegen auf der von Bailey und Cushing 1926 eingeführten Einteilung. Sie basiert auf dem histologisch vorherrschenden Zelltyp und der Ähnlichkeit bezüglich der vermuteten Ursprungszelle. Primäre Tumoren, die hauptsächlich aus Zellen bestehen, welche morphologisch Astrozyten ähneln, werden als Astrozytome klassifiziert. Analog dazu werden Tumoren, die Oligodendrozyten und Ependymzellen ähneln, als Oligodendrogliome und Ependymome bezeichnet [5].

Obwohl es zunehmend Arbeiten gibt, die einen komplexeren Prozess der Tumorentstehung postulieren, und kontrovers diskutiert wird, aus welchen Vorläuferzellen Gehirntumoren entstehen, bleibt das Bailey und Cushing Modell grundlegend für die Klassifikation von Gehirntumoren. Dies gilt auch für das in der vorliegenden Arbeit verwendete Grading System der World Health Organisation. Zunehmend wird auch die Rolle von neuronalen Stammzellen bei der Tumorentstehung näher untersucht [6-8].

1.2 Astrozytome und ihre Einteilungen in Subtypen

Zur Einteilung von astrozytären Tumoren wird heute das am weitesten verbreitete histologische Graduierungssystem der World Health Organisation (WHO) [9] verwendet. Die WHO Klassifikation umfasst nicht nur die Artdiagnose, sondern auch ein histopathologisches Graduierungssystem, das jedem Tumor einen Malignitätsgrad von WHO I (benigne) bis WHO Grad IV (maligne) zuordnet. Vereinfachend kann gesagt werden, dass Tumoren des WHO Grades I generell langsam wachsen und oftmals durch eine operative Entfernung geheilt werden können. Dies betrifft das pilozytische Astrozytom und das subependymale Riesenzellastrozytom. Das andere Extrem, WHO Grad IV, das Glioblastoma multiforme, ist ein klinisch sehr aggressiver Tumor. Astrozytome (WHO Grad II) und anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) liegen dazwischen.

Die WHO Graduierung spiegelt das biologische Verhalten dieser Tumore wieder. Die Tumore werden nach histologischen Kriterien klassifiziert und graduiert. Astrozytome WHO Grad II sind zellarme, isomorphe, gliale Tumoren, die ein Netzwerk zarter Fortsätze ausbilden und zumeist schmale Zytoplasmatasäume um die isomorphen, rundlich-ovalen Kerne bilden. Mitosefiguren sind nicht zu erkennen. Anaplastische Astrozytome WHO Grad III dagegen zeigen eine deutlich höhere Zelldichte, Zellen und Kerne sind pleomorph und es finden sich Mitosen. Glioblastome WHO Grad IV sind definiert durch das Vorliegen von glomerulumartigen Endothelproliferaten oder strichförmigen Nekrosen. Das pilozytische Astrozytom WHO Grad I ist ein astrozytärer Tumor vorwiegend des Kindesalters, der durch bipolare, piloide Tumorzellen gekennzeichnet ist. Die Tumorzellen zeigen mitunter eine mäßig gradige Pleomorphie und es kommen gelegentlich Gefäßproliferate zur Darstellung. Trotz dieser histologischen Eigenschaften ist das biologische Verhalten besser als das eines Astrozytoms WHO Grad II.

1.3 Epidemiologie der Astrozytome

Gliome kommen in allen Altersstufen vor. Ein erster Höhepunkt des Auftretens liegt im Kindesalter, wo die Tumoren etwa 20 % aller Tumorerkrankungen ausmachen und damit zu den

zweithäufigsten Tumoren nach den Leukämien zählen. Zum größten Teil zeigen sie in diesem Alter ein begrenztes Wachstum. Der zweite Höhepunkt des Auftretens liegt im mittleren Erwachsenenalter zwischen 45 und 70 Jahren. Hier machen die malignen Glioblastome den größten Teil der primären Hirntumoren aus. Die meisten Glioblastome entstehen de novo, ohne Nachweis einer niedrig maligneren Vorstufe, und werden als primäre Glioblastome bezeichnet. Glioblastome, die aus niedrig maligneren Astrozytomen hervorgehen, werden als sekundäre Glioblastome bezeichnet. Obwohl primäre und sekundäre Glioblastome histologisch nicht unterscheidbar sind, zeigen sie differierende genetische Alterationen und kommen in verschiedenen Altersklassen vor. Das mittlere Erkrankungsalter für Patienten mit einem primären Glioblastom liegt im Schnitt bei 55 Jahren. Bei sekundären Glioblastomen hingegen sind die Patienten durchschnittlich 10 bis 15 Jahre jünger. Daher scheinen primäre und sekundäre Glioblastome trotz der gemeinsamen schlechten Überlebenszeit und der ähnlichen Histologie zwei unterschiedliche molekulargenetische Entwicklungswege zu haben [10].

1.4 Ätiologie der Astrozytome

Die Ätiologie der primären Hirntumoren des Menschen ist noch weitgehend unklar. Bislang hat sich keine exogene Noxe als eindeutiger Risikofaktor für die Entstehung von Gliomen beim Menschen beweisen lassen. Einzige Ausnahme stellt die therapeutische Röntgenbestrahlung des Schädels dar, wie sie früher z.B. im Rahmen der Behandlung von Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie zur Prophylaxe einer leptomeningealen Aussaat durchgeführt wurde. Diese Kinder hatten ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Glioms als Zweitumor, weshalb diese Behandlungsmethode weitgehend verlassen wurde [11].

Die Mehrzahl der Gliome entsteht sporadisch, aber es gibt einige hereditäre Tumorsyndrome, bei denen es zu einer erhöhten Inzidenz von Gehirntumoren kommt. Ursächlich sind Keimbahnmutationen in bestimmten Tumorsuppressorgenen [12]. Hereditäre Tumorsyndrome umfassen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die sich durch eine genetisch bedingte Prädisposition für benigne und maligne Neoplasien in unterschiedlichen Organen auszeichnet. Ein Beispiel für ein Tumorsyndrom, bei dem es zu einem gehäuften Auftreten von Gehirntumoren kommt, ist das Li-Fraumeni Syndrom. Es handelt sich dabei um eine seltene autosomal dominant vererbte Erkrankung, die durch eine Prädisposition für die Entwicklung oftmals multipler Tumoren bereits im jungen Lebensalter gekennzeichnet ist und bei der es unter anderem auch zum Auftreten von Astrozytomen kommt. Ein weiteres Beispiel ist die Neurofibromatose Typ I, welche auch autosomal dominant vererbt wird und durch das häufige Auftreten von pilozytischen Astrozytomen gekennzeichnet ist. Zusätzlich gibt es auch

Tumorsyndrome, bei denen andere Tumorerkrankungen im Vordergrund stehen, wie beispielsweise bei der familiären adenomatösen Polyposis coli. Diese autosomal dominante Erkrankung ist vor allem durch epitheliale Tumoren, wie das Kolonkarzinom gekennzeichnet. Ursächlich ist eine vererbte Mutation im APC-Tumorsuppressorgen. Einige wenige Patienten entwickeln aber auch zusätzlich Medulloblastome oder maligne Gliome. Dies wird dann als Turcot Syndrom bezeichnet [13].

1.5 Tumorassoziierte Gene und Allelverluste

Tumorentstehung ist ein zelluläres Phänomen, das auftritt, weil Zellen abnormale Fähigkeiten akquirieren [14]. Der maligne Phänotyp der Tumorzellen zeichnet sich gegenüber einer normalen Zelle durch folgende essentielle Alterationen aus: Verlust der Wachstumskontrolle durch mangelnde Sensitivität gegenüber inhibitorischen Signalen oder durch eigene Wachstumssignale, Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod, replikative Immortalität und damit unbegrenzte Teilungsfähigkeit, Fähigkeit der Angiogeneseinduktion und zur Invasion in das umgebende Gewebe, Möglichkeit der Kolonisierung und Metastasierung [14,15]. Hanahan et al. postulierten, dass diese sechs Fähigkeiten den meisten und vielleicht sogar allen menschlichen Tumorarten gemeinsam sind [15].

Bisher sind drei Gruppen von Genen identifiziert worden, die für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht werden. Es handelt sich dabei um Mutatorgene, Onkogene und Tumorsuppressorgene. Mutatorgene vermitteln die Integrität des Genoms und die Zuverlässigkeit des Informationstransfers. Onkogene fördern die Zellproliferation und werden im nicht mutierten Zustand als Protoonkogene bezeichnet. Die Aktivierung erfolgt durch einen Funktionsgewinn. Dieser kann quantitativ sein (das Protein bleibt unverändert, aber die Menge nimmt zu) oder qualitativ (Erzeugung eines Proteins, das durch eine Mutation geringfügig verändert wurde, oder eines neuartigen Proteins von einem chimären Gen, das durch eine chromosomale Umstrukturierung entstanden ist). Die Umwandlung eines Protoonkogens in ein Onkogen erfolgt bereits, wenn eine Allel Kopie aktiviert ist [16]. Tumorsuppressorgene spielen eine große Rolle in komplexen Organismen mit erneuerbarem Gewebe. Es werden zwei Hauptstrategien der Tumorsuppression unterschieden. Zum einen durch „Caretaker“ Proteine, die das Genom davor schützen sollen, potentielle onkogene Mutationen zu akquirieren. Zum anderen gibt es „Gatekeeper“ Proteine, die das Wachstum von potentiellen Tumorzellen hemmen [14,17]. Für eine schematische Übersicht dieses Modells siehe auch Abbildung 1.

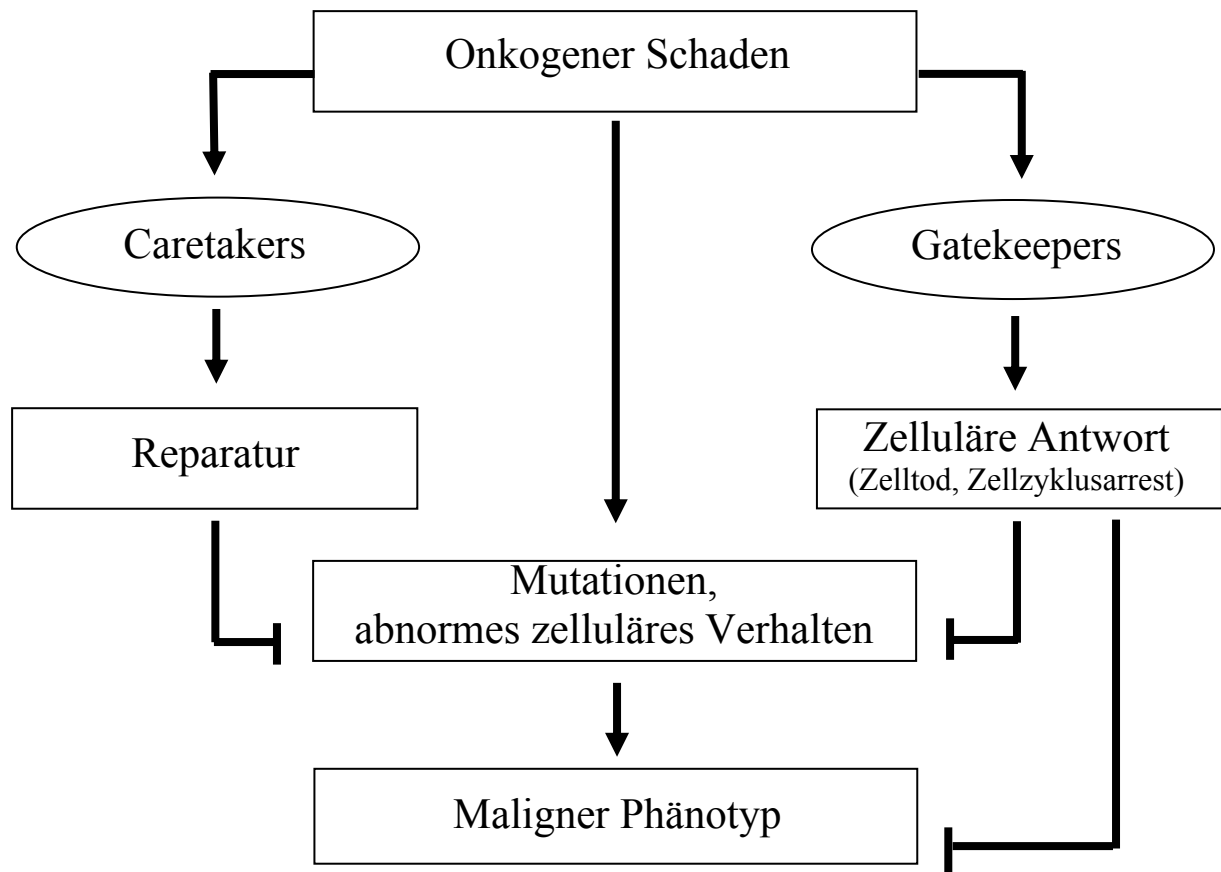


Abb.1) Tumorsuppressor-Mechanismen nach Campisi et al. [14]. Die DNS ist anfällig für Schäden, welche durch externe Ursachen, beispielsweise durch Umwelteinflüsse (wie Strahlung oder Chemikalien) oder intrinsische Faktoren ausgelöst werden. Vereinfacht dargestellt, reparieren die Caretaker diesen onkogenen Schaden. Gatekeeper dagegen vermitteln die zellulären Antworten auf den onkogenen Schaden, wie Apoptose und Zellzyklusarrest, welcher vorübergehend oder permanent sein kann.

Die ersten Hinweise auf Gene, die das Tumorwachstum unterdrücken können, wurden durch Zellfusionsexperimente gewonnen [18]. Diese zeigten, dass Tumorzellen ihre neoplastischen Wachstumseigenschaften einbüßen, wenn sie mit normalen Zellen fusioniert werden. Daraus entwickelte sich die Theorie, dass in den Tumorzellen bestimmte Gene inaktiviert bzw. verloren gegangen sind, die normalerweise das Tumorwachstum verhindern [19].

Die Tumorsuppressorgen-Forschung erhielt entscheidende Anstöße durch Alfred Knudson Anfang der 70er Jahre. Er stellte die Hypothese auf, dass Tumorsuppressorgene durch zwei genetische Mechanismen („two hits“) funktionell ausgeschaltet werden. Er entwickelte die Theorie anhand von Inzidenzkurven des Retinoblastoms. Es handelt sich dabei um einen

malignen Tumor, der vor allem im Kindesalter auftritt und sich aus Retinoblasten entwickelt. Die familiären Tumoren sind häufig beidseitig, während die sporadische Form immer nur einseitig auftritt. Knudson stellte fest, dass das Lebensalter, in dem die beidseitigen Tumoren auftreten, auf eine einzige Mutation hindeutet, während die sporadischen Tumoren einer Zwei-Treffer-Kinetik folgen. Er schloss daraus, dass alle Retinoblastome zwei „Treffer“ erfordern, dass aber bei der familiären Form ein Treffer bereits vererbt wird. Damit war das Konzept der rezessiven Tumorsuppressorgen-Inaktivierung als Basis für eine Tumor-Prädisposition aufgestellt. Im Jahre 1983 konnten Cavenee et al. zeigen, dass der zweite Treffer beim Retinoblastom durch einen Verlust von chromosomalen Material gekennzeichnet ist [20]. Dies wird als Verlust der Heterozygotie („Loss of heterozygosity“, LOH) bezeichnet. Der Verlust kann durch verschiedene Mechanismen entstehen. So kann z.B. eine Nondisjunktion (Nicht-Trennung) vorkommen, die zum Verlust eines ganzen Chromosoms führt. Oder eine mitotische Rekombination, die zum Verlust der Teile des Chromosoms führt, die distal zum crossing-over liegen. Auch eine de novo Deletion kann zum Verlust genetischen Materials führen (Siehe Abbildung 2).

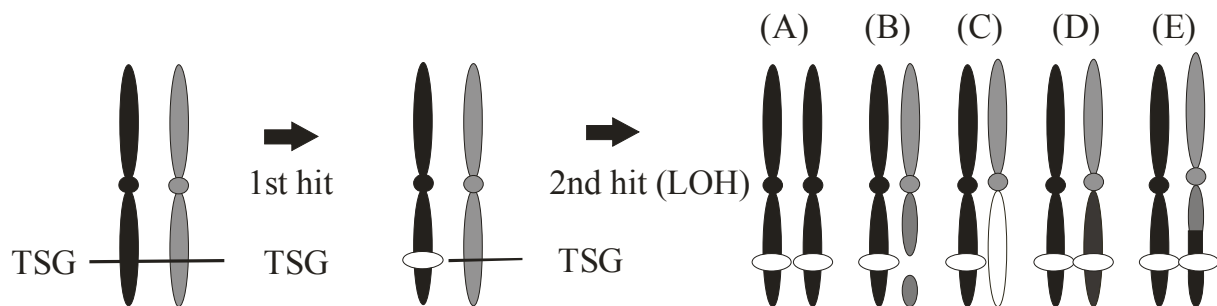


Abb.2) Knudsons Modell für die Tumorsuppressorgen-Inaktivierung nach Delivee et al. [21]. Der erste Mechanismus ist meist eine Mutation in der Sequenz des Gens, hier symbolisiert durch einen weißen Kreis. Diese Mutation kann entweder über die Keimbahn vererbt werden, wie bei den familiären Tumorsyndromen oder somatisch erworben werden. Der zweite Mechanismus (LOH) führt zumeist zur Hemi- oder Homozygotie der chromosomalen Region, welche das mutierte Gen enthält. Dies geschieht entweder durch nichtdisjunktalen Verlust mit Reduplizierung des mutierten Allels (A), subchromosomale Deletionen (B), unbalancierte Translokationen (C) oder mitotische Rekombinierung (D und E). Nur der Fall (B) und (C) führen zum physikalischen Verlust von genetischem Material in der Region. Die Mechanismen der epigenetischen Tumorsuppressorgen-Inaktivierung sind nicht abgebildet.

Diese Verluste chromosomalen Materials umfassen oft erhebliche Teile des betroffenen Chromosoms. Ein Umstand, der bei der Suche nach einem unbekanntem Tumorsuppressorgen einen indirekten Hinweis liefert, wo ein Tumorsuppressorgen lokalisiert ist. Ein immer wieder

auftretender Verlust von umschriebenen chromosomalen Abschnitten in definierten Tumorentitäten spricht für das Vorhandensein eines Tumorsuppressorgens in dieser Region.

Abgesehen von der Mutation gibt es zunehmend Hinweise, dass auch epigenetische Mechanismen eine wichtige Rolle für die Tumorenstehung spielen. Epigenetische Mechanismen resultieren in einer veränderten Genexpression, ohne die primäre DNS Sequenz zu verändern, beispielsweise durch Promotermethylierung [22,23] oder Histon-Modifizierung [24]. Diese Veränderungen resultieren in einer Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität des betroffenen Gens.

Promotermethylierung in Tumoren ist mit einer unterschiedlichen Häufigkeit gefunden worden und reicht von 9 % des *RBI* Gens in Retinoblastomen bis zu 33 % beim *VHL* Gen, das die Von Hippel-Lindau Krankheit verursacht, und zu 84 % Methylierung des *MLH1* Gens bei mikrosatelliteninstabilen Kolontumoren [23]. Zusätzlich wird diskutiert, ob auch andere Mechanismen, wie z.B. die Haploinsuffizienz, zur Tumorentwicklung beitragen können [25,26].

1.6 Molekulargenetik der Astrozytome

Bei den Astrozytomen konnten bisher eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die eine Rolle bei der Tumorentstehung und -progression spielen. Einen schematischen Überblick dazu gibt Abbildung 3.

1.6.1 Pilozytische Astrozytome WHO Grad I

Bisher ist wenig bekannt über die chromosomalen und genetischen Veränderungen bei den pilozytischen Astrozytomen. Die zytogenetische Untersuchung von 48 pilozytischen Astrozytomen mittels CGH zeigte lediglich eine chromosomale Imbalance bei nur 7 Tumoren [27]. Die häufigste Veränderung war eine Vermehrung von 9q34.1, was in drei Fällen gezeigt werden konnte. Die Mehrzahl der pilozytischen Astrozytome, welche mit der Neurofibromatose Typ I assoziiert sind, zeigen allelische Verluste des *NFI* Gen Locus bei 17q11.2 [28]. Bei sporadischen pilozytischen Astrozytomen konnte diese Assoziation zum *NFI* Gen nicht gefunden werden. Sie zeigten weder einen LOH noch *NFI* Mutationen und auch keine reduzierte mRNA Expression des *NFI* Gens [28,29]. Valide Daten über den Progress von einem pilozytischen Astrozytom zu einem höhergradigen Tumor liegen bisher nicht vor. Damit unterscheiden sich die pilozytischen Astrozytome nicht nur morphologisch und im Hinblick auf ihr biologisches Verhalten von den diffusen Astrozytomen, sondern auch bezüglich ihrer genetischen Alterationen.

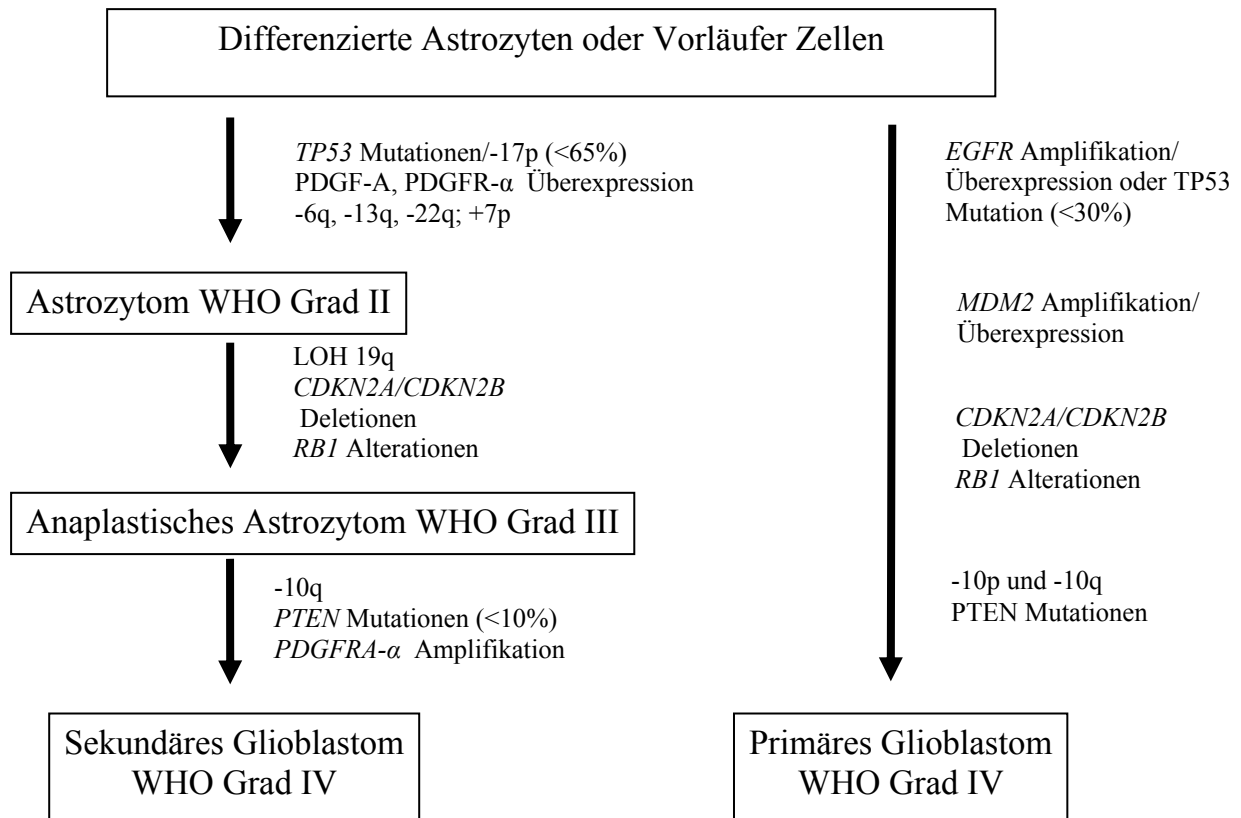


Abb.3) Schematische Übersicht über typische chromosomale und genetische Veränderungen bei der Progression von Astrozytomen (nach Reifenberger et al. und Kleihues et al. [30];[9]).

1.6.2 Astrozytome WHO Grad II

Über 60 % der Astrozytome WHO Grad II zeigen einen Verlust des Chromosoms 17p, inklusive des *TP53* Locus. Das verbleibende Allel ist in der Mehrzahl der Fälle mutiert [13]. Der Verlust des *TP53* Wild Typs ist daher eine der häufigsten genetischen Alterationen in Astrozytomen WHO Grad II (siehe auch Abbildung 3), was in einem nicht funktionierenden p53 Regelkreis resultiert [31]. Andere Gene, die an dem p53 Regelkreis beteiligt sind, wie *MDM2* und *p14ARF*, sind bisher nur in einer kleinen Anzahl untersucht worden, aber es fanden sich keine genetischen Veränderungen [13]. Eine Studie zu dem *TP53* assoziierten Gen *TP73* ergab auch keine Mutationen [32].

Die häufigste chromosomale Abnormität in Astrozytomen WHO Grad II ist die Trisomie oder Polysomie von Chromosom 7. Studien mittels CGH-Arrays konnten zeigen, dass eine Verdoppelung des Chromosom 7 oder des Arms 7p in ungefähr 50 % der Fälle vorkommt. Andere chromosomale Veränderungen, die in geringerer Häufigkeit auftreten, sind Allelverluste von 22q, 6q und 13q [13,30,33]. Bisher gibt es keinen Nachweis, dass Mutationen im *RBI* Gen des verbleibenden Allels bei 13q14.2 vorliegen [34] und auch bei dem bekannten

Tumorsuppressorgen auf Chromosom 22q dem *NF2* Gen sind keine Mutationen gefunden worden [35,36]. Deletionsstudien des chromosomalen Abschnitts 6q zeigten einen signifikanten Verlust. Es konnte bisher aber kein Tumorsuppressorgen identifiziert werden [37]. Eine erst kürzlich durchgeführte Array-CGH Studie identifizierte zwei minimale Deletionsregionen auf 6q mit insgesamt 3 Genen, die in dieser Region liegen [38]. Eine weitere Untersuchung dieser Gene steht noch aus [38]. Andere signifikante Veränderungen sind Überexpressionen des platelet-derived growth factor receptor α (*PDGFRA*) Gens und des korrespondierenden Liganden PDGF α [39,40].

1.6.3 Anaplastische Astrozytome WHO Grad III

Bei den anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III kommen *TP53* Mutationen und Polyplloidie 7 in der gleichen Häufigkeit, wie bei Astrozytomen WHO Grad II vor. Auch die Allelverluste ähneln denen, die auch in Astrozytomen WHO Grad II vorkommen. Sie betreffen 6q, 13q, 17p und 22q [13]. Eine Ausnahme ist der Allelverlust des chromosomalen Abschnitts 19q (siehe Abbildung 3), der vor allem in malignen Astrozytomen vorkommt [41]. Ungefähr 20 % der anaplastischen Astrozytome zeigen ähnliche genetische Veränderungen wie Glioblastome, die Gene des p53 Regelkreises, wie *MDM2* und *p14 ARF* oder den RB1 Regelkreis involvieren. Der RB1 Regelkreis spielt eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation, insbesondere beim Übergang von der G1 in die S-Phase [12].

1.6.4 Glioblastome WHO Grad IV

Auf der zytogenetischen Ebene zeigen die meisten Glioblastome multiple numerische und strukturelle Aberrationen [42]. Die häufigste chromosomale Veränderung in Glioblastomen ist der Allelverlust auf Chromosom 10, was häufig auch mit einer Monosomie verbunden ist [2]. Dagegen sind Allelverluste auf Chromosom 10 bei anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III und bei Astrozytomen WHO Grad II selten [43]. Die molekularbiologische Analyse hat gezeigt, dass sich die genetischen Veränderungen bei primären und sekundären Glioblastomen unterscheiden. Primäre Glioblastome sind durch eine Amplifikation und Überexpression des *EGFR* Gens in 40-60 %, *CDK4* Amplifikation, *MDM2* oder *MDM4* Amplifikation, *RB1* Mutationen oder Monosomie auf Chromosom 10 gekennzeichnet [13] und sind oft assoziiert mit einer Deletion von *INK4a/p14ARF* [44]. *TP53* Mutationen werden in ungefähr 30% der Fälle gefunden [30]. Sekundäre Glioblastome hingegen zeichnen sich durch *TP53* Mutationen in 60% der Fälle und durch eine Überexpression von PDGF und PDGF Rezeptor aus [44].

1.7 Astrozytome und der chromosomale Arm 22q

Chromosom 22 ist das zweitkleinste Chromosom der menschlichen Autosomen (49.6 Mb). Trotz seiner kleinen Größe ist es ein reiches Chromosom, das mehr als 500 Gene enthält [45], von denen einige bereits als krankheitsassoziiert identifiziert worden sind. Die meisten Gene befinden sich auf dem langen q-Arm. Der p-Arm dagegen besteht hauptsächlich aus Heterochromatin und ist größtenteils aus nichtkodierender repetitiver DNS zusammengesetzt [16].

Chromosom 22 steht bereits seit fast zwei Dekaden im Mittelpunkt von Untersuchungen zu Hirntumoren [45] und erscheint als besonders interessant, da hier ein oder mehrere Tumorsuppressorgene vermutet werden. Allelverluste des chromosomalen Abschnitts 22q sind in der Literatur mit einer Häufigkeit von 20 % bis 35 % in astrozytären Gliomen beschrieben worden [35,36,43,45,46]. Abweichend von diesen Ergebnissen ist die Arbeit von Muhammad et al. [47], die eine Allelverlusthäufigkeit 22q von insgesamt 74 % gefunden haben, und die Studie von Rey et al. [48], die Allelverluste in nur 10 % der Fälle nachgewiesen haben. Nachdem Allelverluste auf 22q in Gliomen 1988 erstmals beschrieben wurden [43], folgten weitere Studien, allerdings mit unterschiedlichen Ergebnissen. Es wurden Deletionen, die den Lokus 22q13 betreffen gefunden [48]. In einer anderen Studie wurde die Region zwischen 22q12 und 13 identifiziert [49] und weitere Studien beschrieben einen Verlust distal und proximal zum *NF2* Gen [35,47]. In der ersten detaillierten 22q Studie aus dem Jahre 1999 an 141 astrozytären Tumoren konnten zwei Deletionsmuster beschrieben werden [36]. Zum einen zwischen den Mikrosatellitenmarkern D22S280 und D22S282, was zwischen 22q12.3 bis 22q13.1 kartiert wurde. Mit dieser Studie gelang es, die bereits von Watkins et al. [49] gefundene Region weiter einzugrenzen. Zum anderen wurde eine zweite, telomere Region, welche nur bei Glioblastomen WHO Grad IV vorkam, identifiziert. Sie liegt im Bereich der chromosomalen Bande 22q13.2. Durch eine weitere Studie, in der vor allem Glioblastome untersucht wurden, konnte diese telomere Zone validiert werden [46]. Eine Übersicht über die bisher identifizierten Zonen gibt Abbildung 4.

Die neueren Studien haben mittels CGH-Array versucht, kleinere Deletionen zu finden. Seng et al. konnten die deletierte Region bei 22q12 bestätigen, sie aber nicht weiter eingrenzen, so dass sie mit 4,8 Mb und 44 bekannten Genen weiterhin sehr groß ist. Zusätzlich zu den bekannten Deletionszonen konnten bei zwei Tumoren eine homozygote Deletion in Bereich von 22q12.2-12.3 gefunden werden [45].

Bredel et al. dagegen untersuchten 54 Gliome mittels CGH-Array genomweit und identifizierten unter anderem eine kleine minimale gemeinsame Verlustzone bei 22q13.2, in der das *BIK* Gen

enthalten ist [50]. Es handelt sich dabei um ein Gen aus der BH3 BCL2 Subfamilie, welches Apoptose in verschiedenen Zelltypen, inklusive Gliomzellen, induzieren kann [51] und in peripheren B-Zell Lymphomen mutiert gefunden wurde [52]. Zusätzlich ist von mehreren Autoren beschrieben wurden, dass Deletionen in der Region 22q13.3-13.2 bei Astrozytomen progressions assoziiert sind [36,46].

Das Vorhandensein mehrerer Kandidatenregionen auf einem Chromosom ist nicht ungewöhnlich. Vergleichbare multiple Deletionsmuster finden sich bei Gliomen auch auf den Chromosomen 10 [53], 1p [54] und 14q [55].

Obwohl es mehrere bereits bekannte Tumorsuppressorgene auf 22q gibt, konnte bisher keines identifiziert werden, das in die Tumorgenese von sporadischen Astrozytomen involviert ist. Ein bereits bekanntes Tumorsuppressorgen auf dem chromosomalen Abschnitt 22q ist das *NF2* Gen, das auf 22q12 gelegen ist. Somatische Mutationen im *NF2* Gen wurden bereits in Schwannomen [56], Meningeomen [57] und Ependymomen [58] gefunden. Es konnten jedoch keine Mutationen in Astrozytomen nachgewiesen werden [59,60]

Ein weiteres Tumorsuppressorgen ist das *hSNF5/INI1* Gen, welches bei der Pathogenese von Rhabdoid-Tumoren [61], Plexuskarzinomen und in einer geringen Anzahl bei Meningeomen [62] beiträgt. Aber auch hier konnte keine Beteiligung an der Tumorentstehung bei Astrozytomen erkannt werden [63].

Das *hCHK2* Gen, das bei 22q11 liegt, erschien aus mehreren Gründen interessant. Zum einen aufgrund seiner Funktion in der Zellzyklusregulation, sowie seine Interaktion mit p53. Zum anderen, weil bei einigen Li-Fraumeni Patienten *hCHK2* Mutationen gefunden wurden, in denen keine *TP53* Keimbahnmutation nachgewiesen werden konnte [64]. Da bei Li-Fraumeni Patienten unter anderem häufig Gehirntumoren vorkommen, wurden in einer Studie 51 Gliome auf Mutationen untersucht. Dabei wurden jedoch keine Mutationen gefunden [65]. Weitere bekannte Tumorsuppressorgene sind *EP300*, welches selten bei der Entstehung von epithelialen Tumoren involviert ist [66], und *MYO18B*, das hypermethyliert und mutiert bei Bronchialkarzinomen [67] und Ovarialkarzinomen [68] gefunden wurde. Bisher liegen keine Arbeiten vor, welche die Rolle dieser Gene bei der Entstehung von Astrozytomen näher untersuchten.

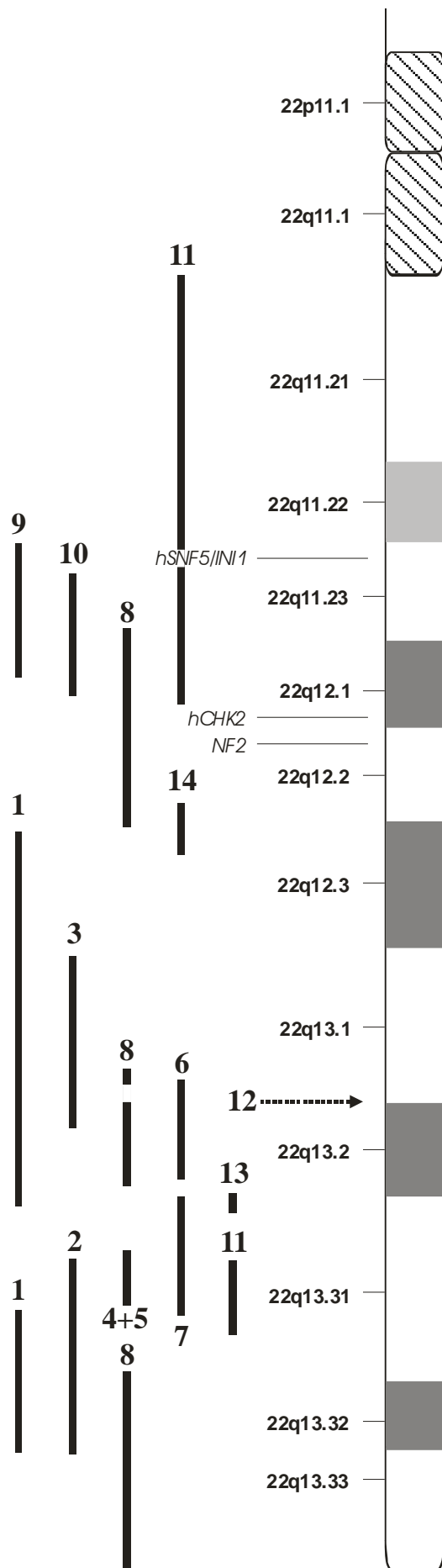


Abb.4) Übersicht über die bisher identifizierten Deletionszonen auf dem langen Arm von Chromosom 22 bei verschiedenen Tumorentitäten:
 1 Astrozytome [36], 2 Astrozytome [46], 3. Mammakarzinome [69], 4 Kolonkarzinome [70], 5 Mamma- und Kolonkarzinome [71], 6 Ovarialkarzinome [72], 7 Mundbodenkarzinome [73], 8 Mammakarzinome [74], 9 Ependymome [75], 10 Insulionome [76], 11 Ependymome [77], 12 t(1;22) Translokation bei Megakaryoblastischer Leukämie [78], 13 Astrozytome mittels CGH-Array [50], 14 Glioblastome [45]

1.8 Andere Krebsarten und der chromosomale Arm 22q

Allelverluste des chromosomalen Arms 22q kommen, abgesehen von Astrozytomen, Meningeomen und Ependyomen auch in anderen Krebserkrankungen vor. Insbesondere Mamma- [69,74], Kolon- [70,71], Ovarial- [72,79], Pankreas- [76] und Mundbodenkarzinomen [73] zeigen häufige Allelverluste. Die jeweiligen Tumorentitäten zeigen dabei zum Teil ein ganz eigenes Deletionsmuster, zum Teil gibt es aber auch Überlappungen. Eine Übersicht über die bisher identifizierten minimalen Deletionszonen gibt Abbildung 4. Im Gegensatz dazu steht der chromosomale Abschnitt auf Chromosom 19q, der hauptsächlich bei glialen Tumoren und nicht in anderen menschlichen Tumoren verloren geht. Zudem ist der Allelverlust auf diesem Chromosom die einzige genetische Alteration, die bei Astrozytomen, Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen in gleicher Häufigkeit vorkommt [80].

Des Weiteren ist das Chromosom 22 ein häufiger Fusionspartner bei chromosomalen Translokationen, die bei Leukämien und Sarkomen häufig vorkommen. Ein Beispiel ist die chronisch myeloische Leukämie, bei der es häufig zu einer reziproken Translokation der Chromosomen 9q und 22q kommt. Dabei entsteht ein neues Fusionsgen *BCR/Abl*, das zu einer erhöhten Tyrosinkinaseaktivität führt. Auch bei der megakaryoblastischen Leukämie kommt eine reziproke Translokation zustande, die das *MKL1* Gen auf 22q involviert [78]. Bei der myeloischen Leukämie kommen häufig Fusionen des *MNI* Gens auf 22q mit dem *TEL* Gen $t(12;22)(p13;q11)$ zustande. Aber auch beim Ewing Sarkom kommen häufig Translokationen vor, die das *EWS* Gen auf 22q12 involvieren, das mit vielen verschiedenen Genen fusioniert [16].

1.9 Strategien zur Identifizierung von Tumorsuppressorgenen

Vor 1980 waren nur wenige menschliche Gene als krankheitsspezifische Loci bekannt. In den achtziger Jahren bot die Gentechnik zum ersten Mal neue Möglichkeiten für die Kartierung und Identifizierung von Genen, die erblichen Störungen einzelner Gene oder somatischen Krebsarten zugrunde liegen [16]. Im Jahr 2004 waren mindestens 291 Gene bekannt, die eine Rolle in der Karzinogenese spielen [81]. Wenn man davon ausgeht, dass sich ungefähr 25 000 kodierende Gene im menschlichen Genom befinden, sind mehr als 1 % des Genoms in die Tumorentwicklung involviert [81].

Die meisten Gene wurden mittels Positionsklonierung identifiziert. Als Positionsklonierung bezeichnet man die Klonierung eines Gens, von dem außer der Zuordnung zu einer

chromosomalen Teilregion nichts bekannt ist [16,82,83]. Mit dieser Strategie wird zunächst versucht, ein für die Krebsentstehung wichtiges Gen im menschlichen Genom zu lokalisieren. Anschließend untersucht man, ob genetische Alterationen vorliegen. Hinweise darauf, wo ein potentiell Kandidatengen lokalisiert ist, kann man durch mehrere verschiedene Methoden erlangen, so z.B. durch chromosomale Umlagerungen, Veränderungen der DNS-Kopienzahl und LOH-Analysen. Bei familiären Tumorerkrankungen können Kopplungsanalysen durchgeführt werden. Damit gelang beispielsweise die Identifizierung der Tumorsuppressorgene *TP53* und *RBI*, die in vielen verschiedenen Tumorarten genetisch alteriert sind und auch als Keimbahnmutation vorliegen können. Eine kleine Anzahl von Kandidatengenen konnte durch biologische Assays identifiziert werden. Selten gelang dagegen die Identifizierung durch die Analyse von Genen, die nur durch ihre Funktion als plausible Kandidaten erschienen und daraufhin näher untersucht wurden [81].

Leider sind diese Methoden zum Teil sehr arbeitsaufwendig und nicht immer erfolgreich. Die große Zahl an Regionen, die in den verschiedenen Tumoren verloren gegangen sind und in den letzten 10 bis 15 Jahren identifiziert wurden, haben trotz der Fortschritte durch das „Human Genome Project“ nur in einigen Fällen zur Identifizierung von neuen Tumorsuppressorgenen geführt. Deshalb stellen Balmain et al. die Hypothese auf, dass die Identifizierung vor allem deshalb erschwert wird, weil die bisher unbekannt Genen in diesen Regionen sich nicht konform zu der von Knudson postulierten „two hit“ Hypothese verhalten [3,84]. Er ist der Ansicht, dass bei den bisher noch nicht identifizierten Tumorsuppressorgenen die epigenetischen Mechanismen, wie Promotermethylierung oder Haploinsuffizienz, eine große Rolle spielen, die mit dem Ansatz der Mutationsanalyse nicht gefunden werden können [84]. Daher werden neue Ansätze benötigt, um neue Tumorsuppressorgene zu identifizieren [3,85].

1.10 Mikroarrays und Gehirntumoren

Eine dieser Methoden, von denen man sich neue Erkenntnisse in der Tumorsuppressorgenforschung erhofft, ist die cDNS-Mikroarray Analyse. Die cDNS-Mikroarray Technik ermöglicht eine vergleichende Transkriptom Analyse, wobei simultan die Expressionsstärke von mehreren tausend Genen erfasst werden kann [86]. Diese Hochdurchsatz-Methode erlaubt die Untersuchung von multiplen Genen in einem Experiment, ohne etwas über die genaue Funktion oder Expression dieser Gene zu wissen [87]. Komplexe Veränderungen der Genexpression begleitet die Entstehung von Tumoren. Die Mikroarray Technologie ist ein neues und wichtiges

Verfahren, um diese komplexen Phänomene zu studieren [88,89]. Unter der Annahme, dass die Ausschaltung eines Tumorsuppressorgens zu einer verminderten Expression der Gene führt, erhofft man sich neue Erkenntnisse über potentielle Tumorsuppressorgene. Dazu werden Tumoren mit und ohne Allelverluste miteinander verglichen und bezüglich ihrer differentiellen Expression einzelner oder mehrerer Gene untersucht.

Die ersten Mikroarray Studien, die sich mit menschlichen Tumoren befassten, fokussierten hauptsächlich auf die Detektion von Expressionsunterschieden abhängig von Tumorgrad und Entität. Dabei kam heraus, dass Tumoren, die aus verschiedenen Ursprungszellen hervorgehen auch Unterschiede in der globalen Transkription zeigen [90]. Hierarchisches Clustering zeigte auch bei den Gehirntumoren unterschiedliche Expressionsprofile abhängig von Tumorgrad und Art des Tumors. Um eine Unterscheidung von normalem Gehirn und verschieden graduierter Tumoren untereinander zu erreichen, waren in der Studie von Shai et al. etwa 170 Gene nötig, welche die Diskrimination ermöglichte [91].

Die Weiterentwicklung der Technik führte zu neuen Fragestellungen. Nutt et al. beschäftigten sich mit der Frage, ob durch die Analyse der Genexpression die Tumore akkurater klassifiziert werden können, bei denen Pathologen sich über die Diagnose uneins sind. Dazu verglichen sie die Genexpression von klassischen Glioblastomen und klassischen Oligodendrogliomen und entwickelten ein System der expressionsbasierten Klassifizierung. Auf histologisch nicht-eindeutige Tumore angewandt, zeigte sich, dass dieses System tatsächlich die zuverlässigere Methode ist und dass die transkriptionelle Information mehr über die Überlebenszeit aussagte, als die histologische Untersuchung [92]. Auch Freije et al. zeigten, dass die genexpressionsbasierte Klassifikation von malignen Gliomen zuverlässiger und voraussagbarer in Bezug auf die Überlebenszeit ist als die histologische Einteilung und das Alter des Patienten [93].

Tews et al. [94] verwendeten die Mikroarray-Technologie dazu, um oligodendrogliom-assoziierte Tumorsuppressorgene auf 1p und 19q zu identifizieren. Sie verglichen dazu Oligodendrogliome mit LOH auf 1p und 19q mit Tumoren, die keinen Allelverlust aufwiesen. Dabei wurden mittels Mikroarray nur Gene untersucht, die in den zuvor identifizierten häufigen Verlustzonen auf 1p und 19q liegen. Es gelang die Identifizierung von acht Tumorsuppressorgen-Kandidaten. Mukasa und French et al. dagegen untersuchten Oligodendrogliome mit und ohne LOH 1p und 19q mittels eines Affymetrix Arrays, der mehrere tausend Gene enthält, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Sie fanden unterschiedliche Expressionsprofile in den beiden Gruppen und identifizierten eine lange Liste

von Genen, die differentiell exprimiert sind [95,96]. Eine Untersuchung der Genexpression mittels Mikroarray auf dem chromosomalen Abschnitt 22q bei Astrozytomen liegt bislang nicht vor.

1.11 Fragestellung der Arbeit

Zahlreiche LOH-Studien zum chromosomalen Arm 22q haben Hinweise ergeben, dass sich dort möglicherweise ein für die Progression von Gliomen wichtiges Gen befindet. Obwohl das Chromosom 22 daher bereits seit zwei Dekaden das Interesse der Forschung erregt, konnte dieses mögliche Tumorsuppressorgen noch nicht identifiziert werden. Das Ziel dieser Arbeit ist es, zu diesem Forschungsdesiderat einen Beitrag zu leisten, indem alte und neue Methoden der Tumorsuppressorgen-Forschung miteinander kombiniert werden. Im Einzelnen heißt dies, dass der klassische Ansatz, die Eingrenzung einer minimalen Verlustzone und die Suche nach Mutationen, mit dem neuen auf Mikroarrays basierenden Hochdurchsatz-Verfahren kombiniert wird.

Zunächst sollen eine oder mehrere minimale Verlustzonen identifiziert werden. Einige ausgewählte Gene, welche durch ihre Lokalisation und Funktion als Kandidaten in Frage kommen, werden anschließend mittels SSCP und konsekutiver Sequenzierung auf Mutationen hin untersucht. Gleichzeitig erfolgt eine Expressionsanalyse, bei der die Gene untersucht werden, welche in den bereits identifizierten Zonen liegen. Dabei soll eine Gruppe von astrozytären Tumoren mit und ohne LOH 22q miteinander verglichen werden. Gene, die in der Gruppe der Tumoren mit LOH 22q herunterreguliert gefunden werden, sind interessante Kandidaten als potentielle Tumorsuppressorgene. Das Gesamtziel dieser Arbeit lässt sich somit in verschiedene Teilziele untergliedern:

1. Zunächst Identifizierung einer gemeinsamen minimalen Deletionszone bei Astrozytomen auf dem chromosomalen Arm 22q.
2. Computerbasierte Analyse der in dieser Region lokalisierten Gene.
3. Mutationsanalyse von Kandidatengenen.
4. Differentielle Genexpression mittels Mikroarray: Daten der Tumore mit LOH 22q und ohne Allelverluste 22q werden miteinander verglichen.
5. Validierung der Mikroarray Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode.