

4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Kombination von alten und neuen Methoden der Tumorsuppressorgen-Forschung, ein neues Tumorsuppressorgen auf Chromosom 22q zu entdecken. Im Rahmen der Studie ist es gelungen, eine bisher nicht bekannte Deletionszone zu identifizieren. Eine andere, schon bekannte Deletionszone konnte näher eingegrenzt werden. Zusätzlich konnten bei fünf untersuchten Genen auf Chromosom 22q Mutationen ausgeschlossen werden. Ein Tumorsuppressorgen zu identifizieren, war jedoch nicht möglich. Die Leitfrage der folgenden Diskussion ist daher, warum diese Identifizierung mit den gewählten Methoden nicht gelang. Zuvor gilt es jedoch, die Ergebnisse und methodischen Ansätze der LOH-Studie, der Mutationsanalysen und der Mikroarray-Studie zu diskutieren und in den aktuellen Forschungsstand einzubetten.

4.1 LOH 22q: Methodischer Ansatz

Die PCR kann zur Unterscheidung von maternalem und paternalem Allel herangezogen werden. Im menschlichen Genom gibt es sich wiederholende Nukleotidsequenzen, so z.B. Dinukleotidsequenzen (C-A) n , Trinukleotidsequenzen oder Tetranukleotidsequenzen, wobei n von 10 bis 60 Wiederholungen reichen kann. Es handelt sich dabei um einen Längenpolymorphismus. Aufgrund der großen Variabilität von n sind diese Regionen polymorph und damit informativ. Unterschiede in der Anzahl von n zwischen maternalem und paternalem Allel können auf einem nach PCR-Produktgröße auftrennenden Harnstoffgel sichtbar gemacht werden (informativer Marker, Abbildung 16a). Hierbei werden polymorphe Marker mit bekannter chromosomaler Lokalisation vergleichend in Tumorgewebe und in nicht neoplastischem Kontrollgewebe desselben Patienten untersucht. Wenn die konstitutionelle (Blut-) DNS homozygot für einen bestimmten Marker ist, überlagern sich beide Allele bei der elektrophoretischen Auftrennung und es kann keine Information über einen Allelverlust im Tumor gewonnen werden. Der Marker wird dann als nicht informativ bezeichnet (nicht informativer Marker Abbildung 16b). Eine dritte Möglichkeit ist der Nachweis von einem Verlust eines der beiden Allele im Tumor. In diesem Fall hat das Tumorgewebe die Heterozygotie für das untersuchte Merkmal verloren und man spricht von einem „loss of heterozygosity“ (LOH) (Abbildung 16c).

Klassische LOH-Untersuchungen haben den Nachteil, dass man eine große Anzahl von Markern testen und die Daten durch quantitative Auswertung der Bandenintensität analysieren muss. Bei

der Auswertung der Gele muss man sich der Probleme bewusst sein, welche die Methode bieten kann. Es können zusätzliche Extra-Banden auftreten, sogenannte Stotterbanden, die schwächer unter- oder oberhalb der richtigen Allel-Banden zu sehen sind. Bei ihnen handelt es sich um PCR-Artefakte, die während des Amplifikationsprozesses entstehen [114]. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass die beiden konstitutionellen Allele unterschiedlich stark sein können, was die Beurteilung der Tumorallele erschwert. Die unterschiedliche Intensität wird mit einer preferentiellen Amplifikation eines der konstitutionellen Allele bei gleichen Konzentrationen erklärt [114]. Ein drittes Problem kann darin bestehen, dass die meisten pathologischen Tumorproben aus einer Mischung von Tumor- und Nichttumor- oder Stromagewebe bestehen und auch kleine Mengen von konstitutionellen DNS in allen Tumoren zum Beispiel durch endotheliale oder inflammatorische Zellen vorhanden sind [21]. Daher sieht man häufiger eine verringerte relative Intensität als das völlige Verschwinden der Bande eines Allels. Eine weitere Möglichkeit, die in Betracht gezogen werden muss, ist, dass der Tumor Subklone enthält, in denen beide Allele noch vorhanden sind.

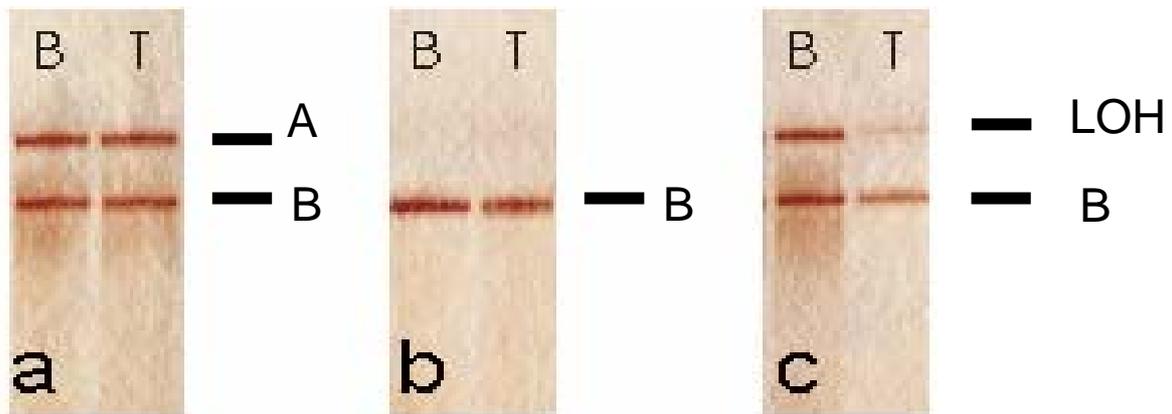


Abb.16) Beispiel eines molekularbiologischen Befundes anhand des Markers D22S530.

B= Leukozyten-DNS des Patienten

T= Tumor-DNS des Patienten

A= Allel A

B= Allel B

- a) Der Patient ist für diesen Marker heterozygot, mütterliches und väterliches Allel zeigen unterschiedliche Längenpolymorphismen, die Fragmente laufen in der Gelelektrophorese unterschiedlich weit und ermöglichen eine Aussage über einen Allelverlust. In diesem Fall zeigt sich kein Allelverlust im Tumor.
- b) Der Patient ist für diesen Marker homozygot und daher nicht informativ. Mütterliches und väterliches Allel wandern in der Gelelektrophorese gleich weit. Eine Aussage über einen Allelverlust ist daher nicht möglich.
- c) Der Patient ist heterozygot. Im Tumor zeigt sich ein Allelverlust des Allels A.

Alternative Methoden zur Mikrosatelliten-Analyse sind die fluoreszenz-vermittelte in situ Hybridisierung (FISH) und die mikroarray-basierte vergleichende Hybridisierung von Genomen (comparative genomic hybridisation, Array-CGH). Bei der FISH-Analyse werden Fluoreszenz-markierte chromosomale Abschnitte mit Schnittpräparaten der Tumoren inkubiert. Sind beide Allele vorhanden, so erhält man zwei kernständige Fluoreszenz Signale. Im Falle eines Verlustes eines Allels ist nur ein Signal nachweisbar. Vorteil der FISH Methode ist, zum einen dass keine Referenz-Leukozyten-DNS des Patienten notwendig ist, und zum anderen, dass der Patient für das untersuchte Merkmal nicht heterozygot sein muss, da FISH absolute Kopien eines Allels darstellt. Nachteil ist aber, dass die Methode mit einem erheblichen technischen, interpretatorischen und finanziellen Aufwand verbunden ist. Zusätzlich ist zu bedenken, dass es bei einem Teil der Tumoren zu einem Verlust eines der beiden Allele bei gleichzeitiger Verdopplung des verbleibenden Allels kommen kann. Dieser Mechanismus resultiert in dem Verlust eines Allels, aber in diesem Fall erhält man in der FISH-Untersuchung zwei Signale, da FISH nicht den Verlust der Heterozygotie anzeigt, sondern nur die Anzahl der vorhandenen Genkopien im untersuchten chromosomalen Abschnitt [115].

Bei der Array-CGH-Methode verwendet man für die Hybridisierung DNS-Mikroarrays. Mit dieser Methode ist es nicht nur möglich, Allelverluste, sondern auch andere Veränderungen der Kopienzahl, wie z.B. die Amplifikation von genetischem Material, zu detektieren [116]. Allerdings hat auch die Array-CGH-Methode den Nachteil, dass sie mit einem erheblichen technischen Aufwand verbunden ist.

Trotz der technischen Alternativen wurde in der vorliegenden Arbeit die mikrosatelliten-basierte Untersuchung verwendet, da diese Methode technisch und ökonomisch einfach durchführbar ist. Um die Anzahl der nicht informativen Fälle zu minimieren, wurde darauf geachtet, dass möglichst viele polymorphe Mikrosatellitenmarker verwendet wurden.

LOH-Analysen bildeten im letzten Jahrzehnt ein wichtiges Betätigungsfeld in der Krebsforschung. Die Untersuchungen lassen eine große Zahl von Tumorsuppressorgenen vermuten, aber Versuche der Positionsklonierung, die sich an solche Untersuchungen anschlossen, waren bis jetzt nur wenig erfolgreich [16]. Nach Ansicht von Devilee et al. ist es ein Fehler zu glauben, dass Tumorsuppressorgene genauso identifiziert werden können, wie Gene bei monogenetischen hereditären Erkrankungen [21].

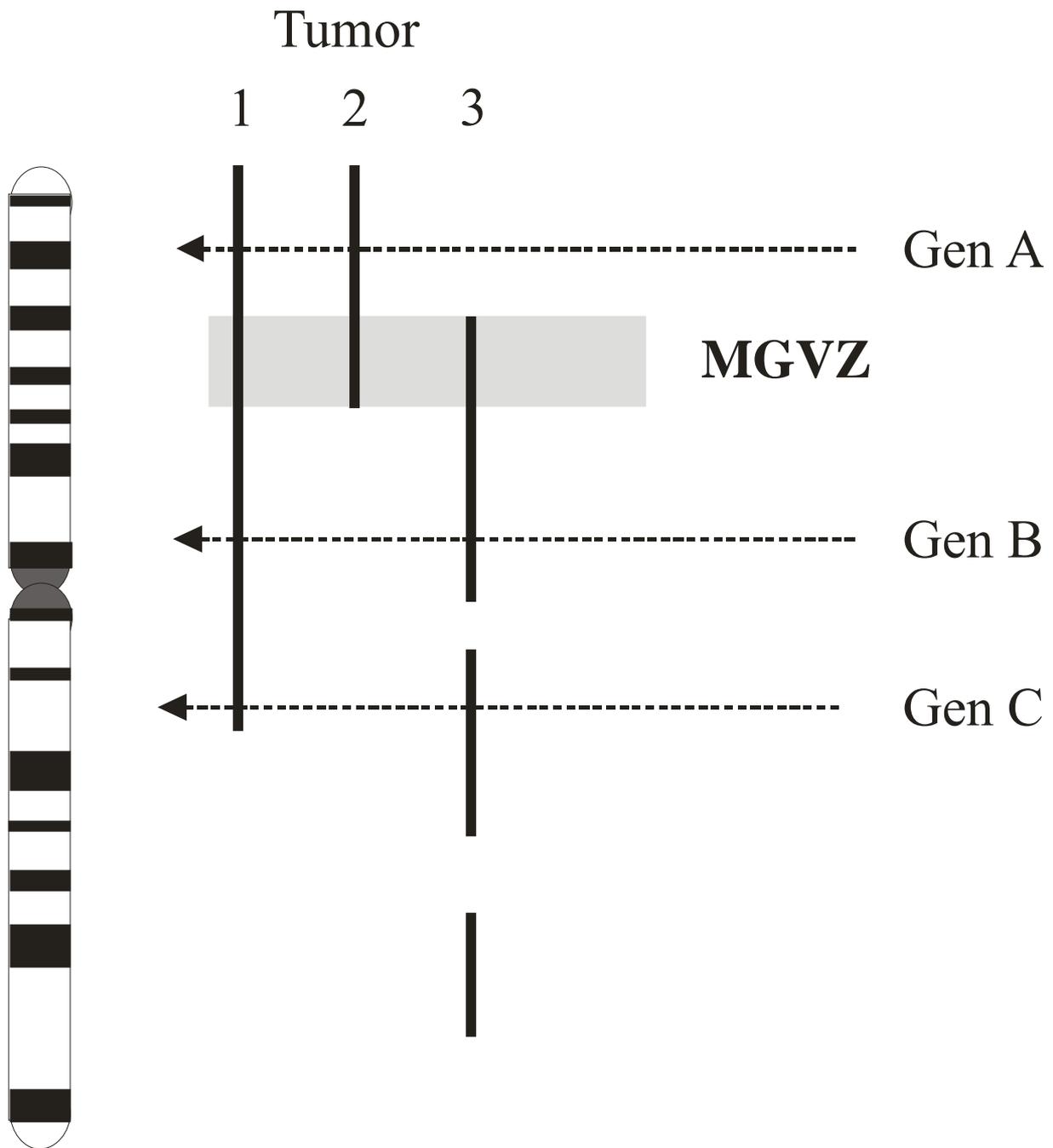


Abb. 17) Schematische Übersicht über die Fehlerquellen beim Bilden einer minimalen gemeinsamen Verlustzone (MGVZ) nach Devilee et al. [21]. Die senkrechten Linien stehen für einen LOH in der gekennzeichneten Region. MGVZ kennzeichnet die minimale gemeinsame Verlustzone bei allen drei Tumoren. Allerdings könnte in Tumor 1 und 2 das Gen A das für die Tumorentstehung wichtige Gen sein und im Tumor 3 Gen B oder C. Keines dieser Gene liegt in der MGVZ.

Devilee et al. sieht drei limitierende Faktoren für diesen Ansatz: zum einen die technischen Limitationen bei der Detektion von LOH. Zum anderen die klonale Heterogenität und zum dritten die biologische Heterogenität. In seinen Augen ist es nicht verwunderlich, dass so viele

Studien daran scheitern, eine gemeinsame minimale Deletionszonen zu bilden, da man Äpfel mit Birnen vergleicht, wenn man verschiedene Tumorentitäten, primäre und sekundäre Ereignisse und verschiedene genetische Regelkreise miteinander vergleicht. Zur Übersicht der möglichen Fehlerquellen siehe auch Abbildung 17. Die steigenden Zahlen an Studien mit immer größerer Anzahl von Tumoren und Markern würden nur komplexere Deletionsmuster aufzeigen [21].

Dieser Ansicht sind auch Seng et al., die mittels hochauflösender Array-CGH-Methode die Deletionszonen auf 22q bei Astrozytomen nicht weiter eingrenzen konnten. Seng schlussfolgert, dass auch die Array-CGH-Methode, trotz der höheren Auflösung, nicht zur Verkleinerung der Zone beitragen konnte. Er schätzt die Wahrscheinlichkeit gering ein, dass weitere Studien zu einer Verkleinerung der Zone beitragen können, da der chromosomale Arm 22q bereits in vielen verschiedenen Studien mit einer großen Anzahl an Tumoren untersucht wurde [45].

Ein weiteres Problem besteht darin, dass Tumoren normalerweise höchst anormale Karyotypen mit unzähligen numerischen und strukturellen Aberrationen aufweisen. Vielleicht sind einige der Heterozygotieverluste nur Nebeneffekte von spezifischen chromosomalen Instabilitätsmustern und keine Hinweise auf den Verlust eines Tumorsuppressorgens [16]. Trotz dieser Limitierungen ist es aber in der Vergangenheit gelungen, mit diesem Ansatz Tumorsuppressorgene zu identifizieren und er ist momentan noch die am meisten verwendete Methode. Auch der Vergleich von verschiedenen Tumorentitäten miteinander ist nicht prinzipiell auszuschließen, da es auch Tumorsuppressorgene gibt, die eine Rolle bei verschiedenen Tumorentitäten spielen, wie beispielsweise *TP53* [117].

4.2 LOH 22q bei Astrozytomen

Die Untersuchung mit 11 Mikrosatellitenmarkern bei 153 astrozytären Tumoren ergab eine Häufigkeit von 22q Allelverlusten in 32 % der Fälle. Dies entspricht der in der Literatur bereits beschriebenen Frequenz von Allelverlusten in Astrozytomen [35,36,43,45,46]. Aufgeschlüsselt nach Tumorgrad ergibt sich eine Häufigkeit von Allelverlusten 22q in 27 % der untersuchten A II, in 33 % bei A III und in 39 % der GBM. Diese Resultate stimmen mit den bereits publizierten Daten weitgehend überein (siehe auch Tabelle 8). Lediglich bei den A II unterscheidet sich die Frequenz der Allelverluste von den Arbeiten von Ino, Oskam und Seng et al. [36,45,46]. Sie haben bei den Astrozytomen WHO Grad II eine Häufigkeit von 5 bis 17 % beschrieben. Die in der hier vorliegenden Arbeit beobachtete Deletionshäufigkeit von 27 % kann damit erklärt werden, dass schwerpunktmäßig mehr Astrozytome WHO Grad II und III untersucht wurden.

Auch Hoang-Xuan et al. fand eine größere Anzahl von Allelverlusten auf 22q bei niedriggradigen Astrozytomen (siehe auch Tabelle 8).

In 32 Fällen der 153 untersuchten Tumoren zeigten sich partielle Deletionen, die auf das Vorhandensein von 2 Deletionszonen hindeuten. Dabei wurde eine neue, vorher nicht beschriebene Region (C-Region) entdeckt, die bei 22q11.23-22q12.1 liegt [118]. Die andere Deletionsregion (T-Region) 22q13.31-32 überlappt mit früher beschriebenen Zonen [36,46]. Eine später durchgeführte CGH-Array Studie von Seng et al. konnte häufige Verluste im Bereich der C- und T-Region bestätigen [45].

Tab. 8) Frequenz der Allelverluste 22q aufgeschlüsselt nach Tumorgrad und Publikation.

	Hoang-Xuan et al., 1995	Ino et al., 1999	Oskam et al., 2000	Seng et al. 2005	Eigene Resultate
LOH 22q gesamt	24%	30%	29%	32%	32%
LOH 22q A II	20%	17%	13%	5%	27%
LOH 22q AIII	31%	31%	20%	31%	33%
LOH 22q GBM	30%	38%	35%	36%	39%

Die Häufigkeit eines Verlustes der Heterozygotie hängt nicht nur von der Tumorentität ab, sondern auch vom Tumorgrad [33]. Besonders in höhergradigen Tumoren kommt es häufiger zu größeren chromosomalen Verlusten. Besonders davon betroffen sind die GBM, die zu einer genetischen Instabilität neigen und viele genetische Alterationen vorweisen, die nicht zwangsläufig von Bedeutung für den Tumor sind. A II dagegen weisen nur wenige Veränderungen auf. Chromosomale Verluste sind daher bei diesen Tumoren als spezifischer zu werten. Aus diesem Grund wurde die Analyse zum größten Teil an A II und A III durchgeführt.

Die LOH-Rate zwischen A II und GBM unterscheidet sich in dieser Studie nur um ungefähr 10 %, wie auch bei Hoang-Xuan et al. beschrieben [35]. Dies spricht gegen einen progressionsassoziierten Faktor, wie von Ino et al. und Oskam et al. [36,46] vorgeschlagen. Allerdings wurden in beiden Studien mehr GBM untersucht und man kann darüber spekulieren,

ob sich die Progressionsassoziation auf die von ihnen beschriebene Zone 22q13.3 und nicht auf das gesamte Chromosom 22 bezieht.

Unter den A II zeigten weniger Tumore einen Verlust des gesamten chromosomalen Arms als in A III und GBM. Dieses resultierte in einer höheren Anzahl von interstitiellen Deletionen, wenngleich die allgemeine Anzahl von LOH in A II und GBM höher war. Die interstitiellen Deletionen in niedriggradigen Astrozytomen tragen insbesondere dazu bei, die C-Region zu bilden. Die beschriebene C-Region ist bisher nicht in astrozytären Tumoren identifiziert worden. Zwei Studien haben eine erhöhte Anzahl von LOH proximal und distal der *NF2* Region gefunden [35,47]. Zwei andere Studien untersuchten eine große Anzahl von Gliomen und konnten keinen Anhalt für eine C-Region finden [36,46]. Allerdings wurden diese Studien hauptsächlich an Glioblastomen durchgeführt, die vor allem eine telomere Region verloren hatten. Dabei hatten jedoch 6 der 27 Fälle mit interstitiellen Deletionen einen Verlust, der die C-Region mit einbezieht. Außerdem war die centromere Region in diesen Studien nur mit zwei Markern abgedeckt. Vielleicht gelang die Identifizierung der C-Region in der vorliegenden Arbeit einerseits deswegen, weil besonders viele Marker in dieser Region benutzt wurden und andererseits, weil viele niedriggradige Astrozytome verwendet wurden [118].

Im Gegensatz zur C-Region, ist die T-Region, die zwischen 22q13.1-13.2 liegt, schon durch verschiedene Studien bestätigt worden [36,46]. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die Region 5 Mb umfasst. Nach kompletter Sequenzierung des Chromosoms 22q konnte jedoch festgestellt werden, dass die flankierenden Marker der Zone D22S280 und D22S282 10 Mb auseinander liegen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen jedoch nahe, dass die Zone, in der ein potentiell Tumorsuppressorgen liegen könnte, auf 2,7 Mb reduziert werden kann. Mehrere Faktoren sprechen für das Vorhandensein dieser reduzierten Zone. Zum einen zeigen dort mehrere Tumorentitäten einen Verlust [36,69,72,74] (siehe auch Abb. 13). Zum anderen beinhaltet diese Zone einen Translokationsbruchpunkt bei megakaryoblastischer Leukämie [78].

Vorherige Studien haben eine weiter telomer gelegene Region (22q13.31-32) hauptsächlich in Glioblastomen identifiziert [46], die in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden konnte. Eine mögliche Erklärung dafür ist zum einen die niedrige Anzahl an Mikrosatellitenmarkern, die in dieser Region verwendet wurden. Nur der Marker D22S532 deckte diese Region ab. Zum anderen lag der Untersuchungsschwerpunkt bei niedriggradigen Astrozytomen. Es wurden nur wenige Glioblastome in die Studie mit einbezogen.

4.3 Mutationsanalyse mittels SSCP: Methodischer Ansatz

Es sind eine Vielzahl von Methoden entwickelt worden, um Mutationen zu detektieren. Mit der single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) lassen sich gezielt einzelne Gene auf Mutationen untersuchen. Der Methode liegt zugrunde, dass einzelsträngige DNS Sekundärstrukturen ausbildet und schon der Austausch einer Base zu einer veränderten Sekundärstruktur und damit auch zu einem veränderten Laufverhalten im nicht-denaturierenden Acrylamidgel führt. Diese Sekundärstruktur ist determiniert durch die Primärsequenz und wird durch intramolekulare Interaktionen stabilisiert. Nach der Erstbeschreibung der Methode im Jahre 1989 [119,120] wurde sie häufig angewendet, um Substitutionen, Insertionen und Deletionen von DNS-Basen zu identifizieren.

Mittels der SSCP-Methode können keine Rückschlüsse auf die Art und den Ort der Mutation gezogen werden. Deshalb müssen die Proben sequenziert werden, die ein anderes Laufverhalten aufweisen, um Informationen über die Art der Veränderung zu bekommen. Ob sich Sequenzänderungen auch im elektrophoretischen Laufverhalten widerspiegeln, hängt von einer Reihe von Faktoren ab. Zum einen ist die Fragmentgröße für die Sensitivität entscheidend. Die optimale Größe liegt bei ca. 90-200 bp. Fragmente, die größer oder kleiner sind, zeigen eine geringere Sensitivität, was damit zusammenhängen kann, dass diese Fragmente weniger in der Lage sind, stabile Sekundärstrukturen auszubilden [121]. Zusätzlich zur Größe spielen auch physikalische Faktoren, wie Temperatur, Konzentration des Elektrophorese-Buffers und denaturierende Agenzien des Gels eine Rolle [122,123]. Deshalb müssen die optimalen Gelbedingungen empirisch ermittelt werden. Nachteil der SSCP-Analyse ist, dass Mutationen nicht in 100 % der Fälle detektiert werden und Experimente mit verschiedenen Konditionen wiederholt werden müssen, damit eine erhöhte Detektionsrate erreicht werden kann.

Trotzdem bietet die SSCP-Mutationsanalyse den Vorteil, dass damit auch Punktmutationen identifiziert werden können, wenn eine 50 bis 60 %ige Kontamination mit normalen Zellen vorliegt, was bei Tumor-DNS häufig der Fall sein kann. Direktes Sequenzieren hat hier den Nachteil, dass dadurch Mutationen übersehen werden können [124]. Zusätzlich bietet die SSCP-Methode den Vorteil, dass sie schnell und effizient durchzuführen ist [124].

4.4 Funktionelle Analyse mittels Internet-Datenbanken

Durch das Human Genome Project liegt die fast vollständige Sequenz des menschlichen Erbguts vor, welches die systematische Analyse einer interessanten Region erlaubt. Die identifizierten Zonen enthalten insgesamt 71 Gene und damit zu viele, um alle mittels Mutationsanalyse

systematisch zu untersuchen. Deshalb wurde der Versuch unternommen, die Suche nach potentiellen Kandidaten mittels computer-basierter Annotation einzuschränken. Es erfolgte der Vergleich der translatierten Aminosäuresequenz mit bekannten und charakterisierten Proteinen mittels der Datenbank BLAST. Computerprogramme können bei der Suche nach geeigneten Genkandidaten interessante Aufschlüsse liefern. Mit Hilfe der Computerprogramme kann man eine vollständige oder partielle DNS-Sequenz (oder die Aminosäuresequenz) eines menschlichen Gens in ein Programm eingeben, das sie mit allen anderen Sequenzen vergleicht, die in elektronischen Datenbanken gespeichert sind.

Dabei sind vor allem Gene von Interesse, welche in die Zellzyklusregulation oder in die Apoptose involviert sind oder im Aufbau Ähnlichkeiten mit bekannten Tumorsuppressorgenen zeigen. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass viele Tumorsuppressorgene, wie beispielsweise *NF2*, identifiziert wurden, obwohl sie zunächst nicht in diese Kategorie fielen.

4.5 Ergebnisse der Mutationsanalyse

Wenn man aber für die C-Region die oben genannten Kriterien anlegt, dann fallen zunächst 9 von 22 Genen heraus, weil die Proteinsequenz keine Ähnlichkeiten mit bekannten Aminosäuresequenzen hat. Bei diesen Genen war eine Annotation nicht möglich. Von den verbliebenen Genen erschien *MYO18B* als besonders interessant aufgrund beschriebener Mutationen und Hypermethylierung in Bronchial-Karzinomen [67]. Dieses Gen besteht aus 44 Exonen und ist 289 kb groß (siehe auch Abb.10). Es gehört zu der Myosin-Familie und ist das erste Gen dieser Genfamilie, welches bei Tumoren durch genetische und epigenetische Mechanismen alteriert ist, und so zur Entstehung von menschlichen Tumoren beitragen kann [125]. Da Myosin-Proteine eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von zellulären Prozessen spielen, mag auch *MYO18B* durch Regulation von Zellbewegungen und die Erhaltung der zellulären Integrität an der Tumorbildung und/oder deren Progression beteiligt sein [125]. Die genaue Funktion dieses Gens und die Beteiligung an der Entstehung von weiteren humanen Tumoren sind noch ungeklärt. Es wurden nur die Exone, in denen bereits Mutationen gefunden wurden, untersucht [67]. Somit ist es nicht auszuschließen, dass es nicht doch Mutationen in den anderen Exonen gibt. Es ist aber bei vielen Tumorsuppressorgenen bekannt, dass es so genannte „Hot Spot“ Regionen gibt, in denen die Mutationen fast ausschließlich vorkommen, wie z.B. in *TP53*, wo Mutationen häufig im Codon 175, 245, 249, 237 und 282 vorkommen [126]. Auch in den *RAS*-Genen kommen beispielsweise Punktmutationen fast ausschließlich im Codon 12, 13 oder 61 vor [126]. Trotz der bereits beschriebenen Rolle als Tumorsuppressorgen bei Bronchial-

Karzinomen, ließen sich keine Mutationen bei den untersuchten astrozytären Tumoren nachweisen.

In der telomeren Region wurden drei der potentiellen Tumorsuppressorgene untersucht. *DJI042K10.2* wurde als attraktives Kandidatengen der T-Region eingestuft, da die BLAST-Analyse eine TBC- und eine RUN-Domäne aufzeigte, welche in Rab-GAPs und Ras ähnlichen GTPasen gefunden wurden. GTP-bindende Proteine durchlaufen typische Zyklen von GTP-Bindung und Hydrolyse. Durch Bindung von GTP gehen die Proteine aus einem inaktiven in einen aktiven Zustand über. Die relativ geringe intrinsische Aktivität der GTP-bindenden Proteine wird durch GTPase aktivierende Proteine verstärkt. Durch Hydrolyse von GTP werden die Proteine in eine inaktive, GDP-bindende Form überführt. *RAS*-Gene gehören zu denjenigen Tumorgenen, die in menschlichen Neoplasien am häufigsten mutiert sind [126]. Als Folge der Mutation wird die GTPase-Aktivität der RAS-Proteine blockiert und die Proteine verbleiben in ihrer aktiven GTP-bindenden Form. Alle 20 untersuchten Exone dieses Gens zeigten jedoch keine Mutationen in den untersuchten Tumoren.

Ein weiteres in der T-Region gelegenes Gen, *MKLI*, erschien interessant, weil es bei der megakaryoblastären Leukämie zu einer Translokation kommt und das mit *MKLI* neu fusionierte Gen zur Leukämieentstehung beiträgt [78,127]. Das Gen umfasst 11 Exone und hat eine Größe von 25 kb. Die Blast Analyse ergab eine SAP-Domäne, welche vermutlich eine DNS-Bindungsdomäne ist und in diversen nukleären Proteinen gefunden wird. Außerdem ist sie in die chromosomale Organisation involviert. Auch hier ließen sich keine Mutationen in den 15 untersuchten Exonen nachweisen.

Das nächste Gen, das einer Mutationsanalyse unterzogen wurde, ist *EP300*. Es handelt sich um eine Histon Acetyltransferase [128], welche die Transkription durch Chromatin-Remodelierung reguliert und eine wichtige Rolle in der Zellproliferation spielt [129]. *EP300* acetyliert *TP53* bei DNS-Schädigung und reguliert so dessen transkriptionelle Aktivität [130,131]. *EP300* erschien als ein vielversprechendes Kandidatengen aufgrund der in epithelialen Tumoren beschriebenen Mutationen, welche in Primärtumoren (Mamma- und Kolon-Karzinom) und in Zelllinien (Mamma-, Kolon- und Pankreas-Karzinom) gefunden wurden [66]. Diese Mutationen resultierten in einem trunkierten Protein, welches die Histon-Acetylase-Aktivität verloren hatte, und war begleitet von einem Expressionsverlust des normalen *EP300* Gens. Es wurden in dieser Arbeit auch drei Gliomzelllinien untersucht, in denen keine Mutationen gefunden wurden [66].

Eine weitere Untersuchung an primären Tumoren erschien jedoch gerechtfertigt, weil die untersuchte Anzahl von 3 Zelllinien sehr klein ist und zumindest bei dem familiären Turcot-Tumorsyndrom ein Zusammenhang von epithelialen Tumoren und Gliomen auftritt. Beim Turcot Syndrom treten gehäuft Kolonkarzinome und maligne Gliome auf (siehe auch Einleitung). Eine weitere Studie hat missense Mutationen in 1 von 27 Colon- und in 1 von 2 Pankreas-Karzinomen gefunden, auch im Kontext des Verlustes des normalen Allels [132]. Des Weiteren scheint es eine Rolle in der Tumorentstehung zu spielen, da es ein Target von viralen Onkoproteinen ist [133] und bei der Entstehung von einem Fusionsprotein durch eine reziproke Translokation bei akuter myeloischer Leukämie beteiligt ist [134]. *EP300* besteht aus 31 kodierenden Exonen und umfasst ungefähr 90 kb (siehe auch Abbildung 10). In der vorliegenden Studie wurden aufgrund der Größe nur 9 Exone untersucht, in denen bereits Mutationen beschrieben wurden [66]. In den untersuchten astrozytären Tumoren konnten keine Mutationen festgestellt werden. In einer Studie, die an epithelialen Karzinomen durchgeführt wurde [66], konnte eine Mutation nur in 3 % der Fälle nachgewiesen werden. Eine weitere Studie von Tillinghast et al. [135] bestätigt das seltene Vorkommen von Mutationen und stellt die Hypothese auf, dass *EP300* selten als klassisches Tumorsuppressorgen agiert. Bryan et al. [136] untersuchten primäre Ovarial-, Mamma- und Kolon-Karzinome und konnten keine Mutationen nachweisen. Die Seltenheit von Mutationen im *EP300* Gen bei Tumoren, die häufig ein Allel in der Region 22q 13.3 verloren haben, impliziert, dass entweder ein anderes Gen für die Tumorentstehung wichtig oder *EP300* durch andere Mechanismen funktionell ausgeschaltet ist.

Zusätzlich wurde das *BIK*-Gen auf Mutationen untersucht, welches knapp unterhalb der T-Region liegt. Es gehört zur BCL2 Familie und umfasst ein 18-kDa proapoptisches Protein [52]. Es scheint eine Rolle in der Pathogenese von peripheren B-Zell Lymphomen zu spielen [52]. Die Array-CGH-basierte Analyse von Bredel et al. [50] bei Gliomen, ergab eine kleine minimale gemeinsame Deletionszone, in der das *BIK*-Gen liegt. Daher erschien das Gen zusätzlich als interessanter Kandidat, auch wenn es kurz unterhalb der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Zone liegt. Auch hier konnten in den untersuchten Exonen 2 bis 5 keine Mutationen gefunden werden.

Mutationen in den untersuchten Genen konnten nicht gefunden werden. Damit konnte eine Inaktivierung dieser Gene durch Mutationen im Sinne der Knudson-Hypothese ausgeschlossen werden. Es handelt sich daher bei keinem der untersuchten Gene um ein „klassisches Tumorsuppressorgen“. Trotzdem ist damit nicht ausgeschlossen, dass diese Gene nicht durch

alternative Mechanismen wie Promotermethylierung oder Haploinsuffizienz funktionell ausgeschaltet sind. Grundsätzlich muss zudem mit einbezogen werden, dass die SSCP-Methode für die Suche nach unbekanntem Mutationen bei fehlender Positivkontrolle weniger sensitiv ist. Trotzdem konnten mit der SSCP-Mutationsanalyse Polymorphismen detektiert werden. Somit spricht die Identifizierung von verschiedenen Polymorphismen für eine große Sensitivität der Untersuchung. Zum anderen gibt es auch einige Mutationen, die sich mittels der Untersuchung von genomischer DNS nicht nachweisen lassen. So erfordert beispielsweise der Nachweis der großen Inversion, die das Faktor-VIII-Gen unterbricht, oder der Mutation CFTR 3849, die eine kryptische Spleißstelle mitten in einem Intron aktiviert, einen Southern-Blot beziehungsweise eine RT-PCR [16].

4.6 Mikroarray-Analyse: Methodischer Ansatz

4.6.1 Normalisierung

Eine Normalisierung dient dem Zweck, Unterschiede in der Markierung und in der experimentellen Variabilität auszugleichen [137,138]. Unterschiede der Hybridisierungssignale können verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann es am Target liegen, etwa an variierenden Mengen an RNS, unterschiedlicher RNS-Qualität oder unterschiedlicher Effektivitäten der cDNS-Synthese. Zum anderen kann es an den Elementen liegen, z.B. durch Variationen der Pin-Geometrie, da verschiedene Pins divergierende Oberflächeneigenschaften aufweisen und damit unterschiedliche cDNS-Mengen transportieren. Zusätzlich spielen Markierungseffizienzen eine Rolle. Außerdem können Hybridisierungsparameter (Temperatur, Zeit, Waschpuffer) beteiligt sein oder durch Unterschiede beim Scannen verursacht werden [138]. Die Normalisierung gegen den Mittelwert des Quotienten aller Signalintensitäten ist generell sehr gut dazu geeignet, um Varianzen der Hybridisierung als solche (einschließlich der Markierungseffizienz und variierender Targetmengen) mathematisch zu kompensieren. Die dabei zugrunde liegende Annahme ist, dass keine massiven Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität der verwendeten Targets vorliegen, welche die Gesamtheit aller Gene betreffen. Dieses würde nämlich die durchschnittliche Signalintensität von allen Features beeinflussen. Ebenso darf kein starker Hintergrund auf dem Mikroarray vorhanden sein.

4.6.2 Cluster-Analyse

Im Rahmen der Cluster-Analyse werden diejenigen Gene, die ein sehr ähnliches Expressionsprofil zeigen, in direkte Nachbarschaft zueinander gebracht. Hierarchisches und nicht-hierarchisches Clustering bringt sowohl gegensätzliche als auch komplementäre

Ergebnisse. Daher werden für die meisten Mikroarray-Studien kombinierte Ansätze gewählt [139]. Nicht-hierarchisches Clustering erzeugt ein Porträt über die prädominante Gruppe in den Daten, aber die Daten können in vielen verschiedenen Arten gruppiert werden. Der Typ, der am meisten vorherrscht, muss nicht immer der biologisch Relevanteste sein. Hierarchische Analysen erlauben die Identifizierung von Gen-Gruppen, die mit Parametern korrelieren, die für den Untersucher von besonderem Interesse sind. Unter Umständen können biologische Unterschiede besser herausgearbeitet werden [139]. Durch die Stammbaumanalyse gelingt die Identifizierung von gleichen oder sehr ähnlichen Verläufen. Am einfachsten und anschaulichsten lassen sich derartige Gruppen in der oben schon erwähnten „Heat-map“ darstellen.

4.6.3 Statistische Auswertung

4.6.3.1 Analysis of Variance (ANOVA-Analyse)

Bei mehr als zwei verschiedenen Konditionen in einem Experiment, kann man die Ratio nicht einfach nur berechnen, sondern es wird ein generelles Konzept zur Bestimmung der relativen Expression benötigt [140]. Ein Ansatz, der bei der Analyse von Mikroarray-Daten häufig verwendet wird, ist die ANOVA-Analyse, die einen integrierten Ansatz zur Normalisierung, Genexpressionsmessung und zum Testen der differentiellen Genexpression bietet [141]. Die klassische ANOVA-Analyse ist eine Generalisierung des t -Tests, die einen Vergleich von mehr als zwei Proben erlaubt.

4.6.3.2 Significance Analysis of Microarrays (SAM-Analyse)

Obwohl massive Datenmengen mittels Mikroarray erhoben werden können, ist es wichtig festzustellen, ob die Auswertung statistisch signifikant ist. Methoden, die auf dem t -Test basieren, können dazu führen, dass die unterschiedliche Genexpression auf einem Zufall beruht. Deshalb wurde von einer Arbeitsgruppe von der Stanford Universität eine Software namens Significance Analysis of Microarrays (SAM-Analyse) entwickelt, mit der man die Signifikanz der ermittelten Genexpressionsunterschiede ermitteln kann [142].

4.7 Ergebnisse der Mikroarray-Analyse

Die Mikroarray-Analyse bei 20 Astrozytomen und 166 genspezifischen cDNS-Produkten ergab keine statistisch signifikanten Daten. Limitierend an dieser Analyse ist zum einen, dass nur wenige Tumoren hybridisiert wurden und, abgesehen von einigen anderen Kontrollgenen, nur Gene des Chromosoms 22q auf dem Array vorhanden waren. Zum anderen wurde mit den 166 genspezifischen Genprodukten nicht der gesamte chromosomale Abschnitt 22q abgedeckt, sondern nur die vorher identifizierten Zonen im Bereich von 22q 11.23-12.1 und 22q13.1-13.2.

Zusätzlich war es auch nicht möglich, die Tumoren bezüglich ihres LOH-Status oder des Malignitätsgrades zu clustern. Es ist in der Vergangenheit schon gut dokumentiert, dass die Tumoren bezüglich ihres Malignitätsgrades geclustert werden können. Insbesondere bei niedriggradigen Tumoren ist dies der Fall [44,91], wohingegen Glioblastome eher eine stärkere Heterogenität aufweisen [44,143]. Allerdings waren in diesen Studien für das Clustering meist viele Gene auf verschiedenen Chromosomen notwendig. In der vorgelegten Studie wurden jedoch insgesamt nur 166 Gene auf dem chromosomalen Abschnitt 22q untersucht.

Die Identifizierung eines Tumorsuppressorgens mittels Mikroarray stützt sich auf die Hypothese, dass die Mutation eines Tumorsuppressorgens in einer Reduzierung der mRNA resultiert. Es könnte theoretisch aber möglich sein, dass das Gen gleich oder vermehrt exprimiert wird, und nur das Protein aufgrund einer Basenveränderung nicht funktionsfähig ist. Es waren auch einige bekannte Tumorsuppressorgene, wie *TP53*, als Referenzgene mit auf dem Chip, welche auch kein auffälliges Expressionsmuster gezeigt haben. Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen dagegen resultiert zumeist in einer verminderten mRNA und hätte mittels Mikroarray-Analyse detektiert werden müssen. Die cDNA Mikroarray-Methode untersucht nur veränderte mRNA-Level und lässt damit keine Rückschlüsse auf Proteinkonzentrationen zu. Proteinkonzentrationen werden aber nicht nur über mRNA-Level beeinflusst, sondern es können auch posttranskriptionelle Mechanismen eine Rolle spielen [16].

Zusätzlich muss man bedenken, dass auch ein Allelverlust theoretisch zu einer Reduzierung der mRNA-Menge führen könnte. In zwei Studien, die sich mit Oligodendrogliomen beschäftigen, wurde eine Reduzierung der Genexpression um 50 % bei Tumoren gefunden, die einen LOH auf 1p und 19q aufweisen [95,96]. Masayeva et al. haben als einer der ersten systematisch untersucht, ob eine allelische Imbalance, hervorgerufen durch Allelverluste oder Amplifikationen, gut mit dem Expressionsprofil korreliert [144]. Sie fanden heraus, dass eine reduzierte Expression dort gefunden werden konnte, wo größere Abschnitte verloren gehen. Dies könnte ihrer Meinung nach dazu führen, dass mit der Mikroarray-Analyse auch Gene detektiert werden, die durch Zufall mit verloren gegangen sind und nichts mit der Tumorentstehung zu tun haben.

Durch das Bilden von minimalen Verlustzonen lag daher schon ein gewisser Bias in der Mikroarray-Studie. Es wäre vielleicht sinnvoller gewesen, entweder einen Array zu benutzen, der das gesamte Chromosom 22q berücksichtigt, oder einen Array, der mehr Gene auch auf verschiedenen Chromosomen abdeckt. Damit wäre es dann auch möglich, wie seit neuestem

favorisiert, komplexe Signalkaskaden nachzuvollziehen. Wenn man ein herunterreguliertes Gen identifiziert hat, kann man testen, ob auch die nachfolgenden Gene in einer Signalkaskade davon betroffen sind. Dies kann einen Hinweis auf die biologische Relevanz des jeweiligen Gens geben. Dieses Verfahren entspricht aber den allerneuesten Entwicklungen und war, als der für diese Arbeit verwendete Array hergestellt wurde, noch gar nicht der breiten Anwendung zugänglich [139]. Ein Array, der nahezu das gesamte Genom abdeckt, ist erst kürzlich von verschiedenen Firmen entwickelt worden [145]. Ein Array, der das gesamte Chromosom 22q repräsentiert, war zwar schon früher entwickelt worden [146-148], da die Sequenz des Chromosoms 22q als eines der ersten Chromosome durch das „Human Genome Project“ fertig gestellt wurde [149]. Leider standen die entwickelten Arrays der breiten Forschergemeinschaft damals noch nicht zur Verfügung.

Andererseits ist es Tews et al. mittels Mikroarray-Analysen der vorher identifizierten Genregionen auf 1p und 19q gelungen potentielle Tumorsuppressorgene in Oligodendrogliomen zu identifizieren [94]. Sie konnten insgesamt acht Gene identifizieren, die in den Tumoren mit 1p und 19q Allelverlust im Expressionslevel um mehr als 50 % erniedrigt waren. Dabei handelt es sich um die Gene *MGC4399*, *SRM*, *ICMT*, *RPL18*, *FTL*, *ZIN*, *FLJ10781* und *DBP*. Die Ergebnisse wurden mit einer unabhängigen Methode validiert, aber der endgültige Beweis, dass es sich bei den identifizierten um tumorauslösende Gene handelt, steht zur Zeit noch aus [94]. Zum einen untersuchten Tews et al. mehr Tumore und konnten damit die statistische Aussagekraft erhöhen. Zum anderen deuteten die bereits durchgeführten Mapping Studien zum Chromosom 19q darauf hin, dass es im Gegensatz zu 22q, nur eine Zone gibt, welche bei den Gliomen verloren gegangen ist. Dies hat die Identifizierung potentieller Tumorsuppressorgene vermutlich wesentlich erleichtert.

Den LOH-Status für die Mikroarray-Analysen zu kennen, ist von großem Wert, da eine allelische Imbalance zu einer veränderten Genexpression führt [144]. Daher war es wichtig zu wissen, wo die Tumoren einen LOH aufweisen, um besser nachvollziehen zu können, ob die verminderte Expression dem LOH-Muster entspricht und die verminderte Expression nur dadurch zustande kommt. Es konnte gezeigt werden, dass es Veränderungen der Genexpression gibt, die sich über große chromosomale Abschnitte erstrecken und in keinem Zusammenhang mit der malignen Progression stehen [144]. Das Phänomen der reduzierten mRNA, wenn ein Allel verloren gegangen ist, wurde auch von Mukasa et al. und French et al. beschrieben [95,96]. Ein großes Problem ist daher, zwischen Genen zu differenzieren, welche krankheitsauslösend sind

und solchen, die über komplexe Regelkreise reguliert und nicht krankheitsauslösend sind [150]. Auch Vogelstein et al. argumentieren in dieselbe Richtung und betonen, dass Veränderungen der Genexpression unzuverlässige Marker sind, um Gene zu finden, die ursächlich für einen Tumor sind. Denn die Störung in einem Netzwerk führt wiederum zu weiteren Störungen, die nur peripher mit dem Phänotyp vergesellschaftet sind [117]. Ohne bessere Methoden um festzustellen, ob ein nicht mutiertes aber interessantes Gen eine tumorrelevante Rolle spielt, werden Tumorforscher seiner Ansicht nach vermutlich weiterhin viel Zeit damit verbringen, Gene zu studieren, die nur peripher mit den eigentlichen Forschungsobjekt zu tun haben. Es werden daher laut Vogelstein et al. neue Modellsysteme benötigt, wie sie beispielsweise für Leukämien bereits entwickelt wurden, um die Ursächlichkeit in der Tumorgenese zu untersuchen [117].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mikroarray-Technologie, je nach Fragestellung und Versuchsaufbau, verschiedene Vor- und Nachteile bietet. Bei der Klassifikation von Gehirntumoren mittels Mikroarray hat sich die Technologie bereits bewährt [92]. Bei der Suche nach potentiellen Tumorsuppressorgenen dagegen wurden teilweise viele differentiell exprimierte Gene gefunden [94-96]. Zusätzlich kann ein Allelverlust zu einer um 50 % reduzierten Transkriptmenge führen [95,96,144] und erschwert die Analyse der Ergebnisse bei unbekanntem LOH-Status.

Untersuchungen, welche die Analyse komplexer Regelkreise miteinbeziehen, sollten aber dabei helfen, dieses Problem zu umgehen. Zusätzlich gibt es mittlerweile auch CGH-Arrays, die das gesamte Genom abdecken. Ein kombinierter Ansatz wäre daher empfehlenswert. Dies sind aber Entwicklungen, die zum Beginn dieser Doktorarbeit noch nicht abzusehen waren.

Insgesamt konnte diese Arbeit wesentliche Beiträge zu den Kenntnissen über genetische Veränderungen auf dem langen Arm von Chromosom 22 in astrozytären Tumoren liefern. Zwischenzeitlich bestätigten die unabhängigen Arbeitsgruppen von Seng et al. [45] und Markus Bredel von der Stanford University (Kongressbeitrag, unpublizierte Ergebnisse) mit der deutlich aufwändigeren CGH-Array Methode Teile der hier vorgelegten Ergebnisse. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten sind Grundlage für weiterführende Studien im Rahmen des vom BMBF Nationalen Genomforschungsnetztes 2 (NGFN2) des Institut für Neuropathologie Charité - Universitätsmedizin Berlin.