

3. ERGEBNISSE

3.1 LOH bei astrozytären Tumoren

Es wurden insgesamt 153 astrozytäre Tumoren untersucht. Dabei handelte es sich um 52 Astrozytome WHO Grad II (A II), 70 anaplastische Astrozytome WHO Grad III (AIII), und 31 Glioblastome WHO Grad IV (GBM).

Mit 11 Mikrosatellitenmarkern konnte bei 49 von 153 untersuchten astrozytären Gliomen (32%) ein LOH auf dem chromosomalen Arm 22q festgestellt werden. Davon hatten 32 der 49 LOH-Fälle eine interstitielle Deletion (65%) und 17 Fälle (35%) zeigten einen Verlust des gesamten chromosomalen Arms (siehe Tabelle 5). Bei den A II zeigte nur einer von 52 untersuchten Tumoren den kompletten Verlust eines chromosomalen Arms, 13 dagegen wiesen einen interstitiellen Verlust auf. Bei den A III erhöhte sich die Anzahl der Verluste des ganzen Arms. Hier waren 9 von 70 (13%) Tumoren betroffen. Bei den GBM zeigte sich jedoch die höchste Anzahl an Verlusten des gesamten Arms mit 7 von 31 Tumoren (23%). Bei den höhergradigen A III und den GBM kamen dagegen weniger interstitielle Deletionen vor: 14 von 70 (20%) bei den A III und 5 von 31 (16%) bei den GBM.

Tab. 5) Ergebnis der Allelverluststudie 22q aufgeschlüsselt nach Tumorgrad.

Tumor	LOH	LOH alle Marker	LOH partiell
A II	27% (14/52)	2% (1/52)	25% (13/52)
A III	33% (23/70)	13% (9/70)	20% (14/70)
GBM	39% (12/31)	23% (7/31)	16% (5/31)
Total	32% (49/153)	35% (17/49)	65% (32/49)

Bei der Analyse (siehe Abbildungen 6 und 7) konnten zwei unterschiedliche Regionen identifiziert werden. Einerseits eine centromere Deletionsregion (C-Region) zwischen den

Markern D22S533 und D22S689 mit einer Größe von etwa 3 Mb. Bei 18 Fällen, die eine interstitielle Deletion aufwiesen, kam es zu Allelverlust im Bereich der C-Region. Andererseits fand sich eine telomere Region (T Region), in der 17 der Fälle mit einer interstitiellen Deletion einen LOH aufwiesen. Sie befindet sich zwischen den Markern D22S530 und D22S417 mit einer Größe von etwa 2,7 Mb. Bei insgesamt 7 Tumoren konnte ein kombinierter Verlust beider Deletionszonen nachgewiesen werden. Drei davon (A II 25646, A III 4882, A III 25618) hatten sowohl einen Verlust in der C-Region als auch in der T-Region. Dazwischen waren beide Allele vorhanden. Zusätzlich zeigten drei Gliome (A III 25474, GBM 21601, GBM 20990) Deletionen, die oberhalb der C-Region lagen. Ein astrozytärer Tumor (A II 3166) verlor den chromosomalen Arm telomer zur T-Region (siehe Abbildung 6).

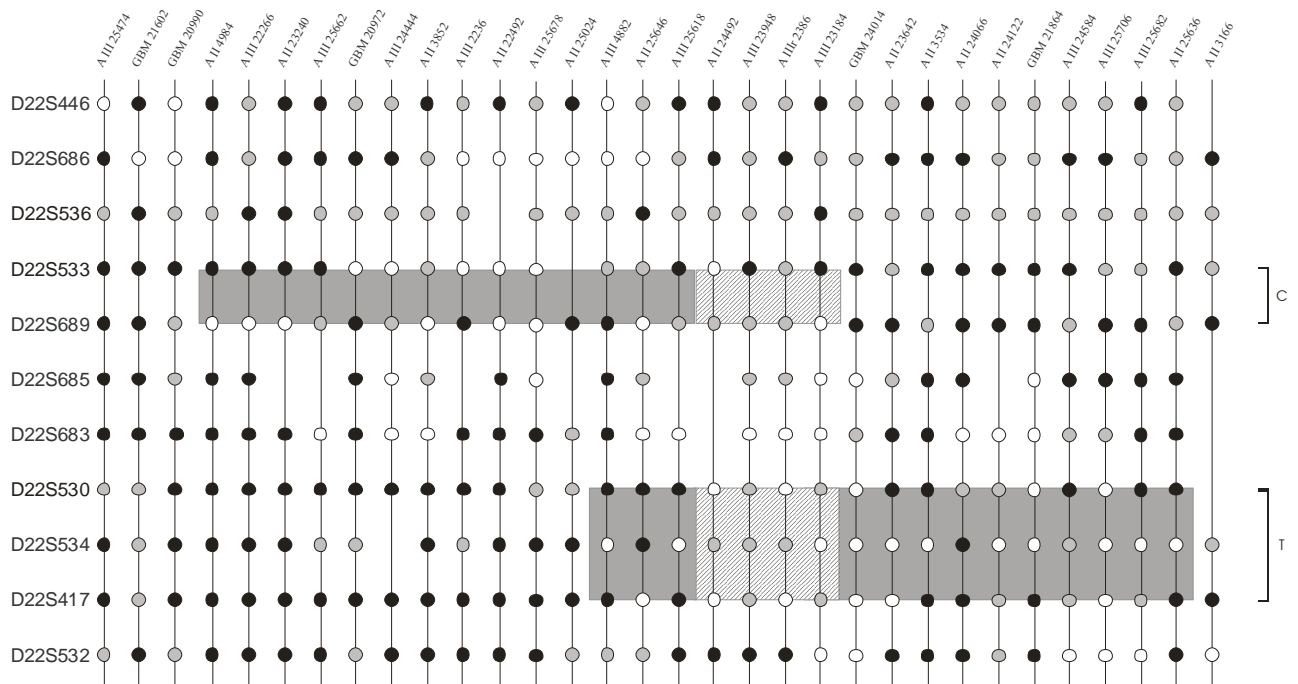


Abb. 6) Minimale Verlustzonen auf 22q bei Astrozytomen. Insgesamt 32 Tumoren zeigten eine interstitielle Deletion und wurden in die Analyse einbezogen. C bezeichnet die centromere Region und T die telomere Region. Die schwarzen Kreise symbolisieren, dass kein Allelverlust vorliegt. Graue Kreise stehen für einen nicht informativen Marker. Die weißen Kreise stehen für einen Allelverlust. Die gestreift unterlegte Region kennzeichnet Tumoren, welche in beiden Regionen Allelverluste aufweisen.

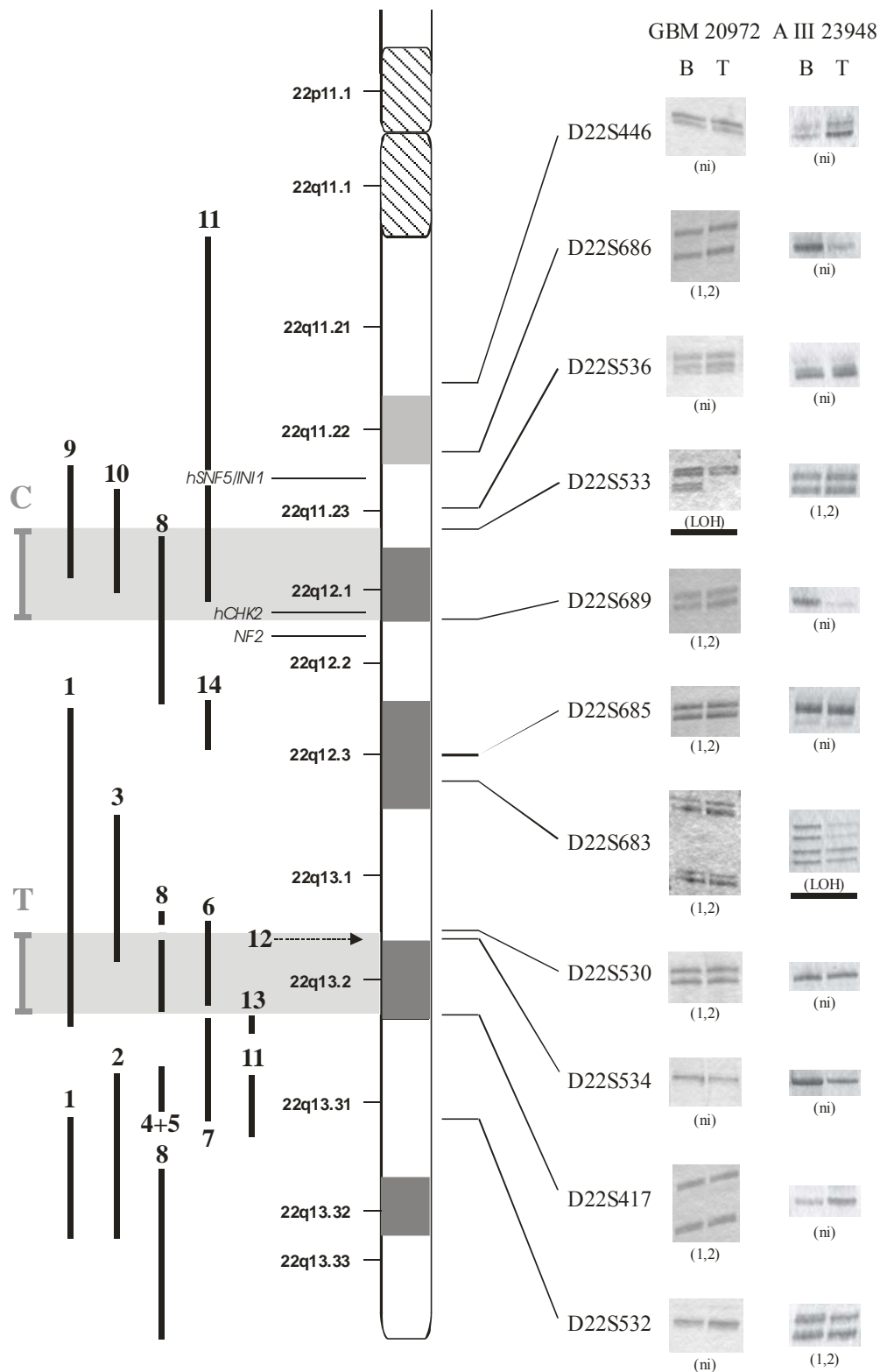


Abb. 7) Übersichtsabbildung mit den bereits identifizierten Zonen bei verschiedenen Tumorentitäten (siehe Abbildung 4 zum Vergleich) und den neu identifizierten minimalen Verlustzonen, welche mit C für die centromere Region und T für die telomere Region bezeichnet sind. Auf der rechten Seite der Abbildung sind exemplarisch zwei Tumoren mit interstitiellen Deletionen dargestellt. B steht für Blut (aus Leukozyten isolierte DNS des Patienten) und T für Tumor-DNS, 1,2 bedeutet, dass beide Allele vorhanden sind, ni steht für nicht informativ und LOH für den Verlust der Heterozygotie.

3.2 Resultat der Genidentifizierung in den Deletionsregionen auf Chromosom 22 und computerbasierte Analyse

In der C-Region, die 3 Mb umfasst, konnten 11 RefSeq-Gene und 11 mRNS identifiziert werden (siehe Abbildung 9A). Zwei zusätzliche mRNS wurden ausgeschlossen, da sie als „single exon genes“ erschienen und keine korrespondierenden hEST zu finden waren. Die T-Region umfasst 2,7 Mb und beinhaltet 39 RefSeq-Gene und 10 mRNS basierte Gene (siehe Abbildung 9B). Hier wurden 4 mRNS von der Kandidatenanalyse aus den genannten Gründen ausgeschlossen. Um die Kandidatengene weiter einzugrenzen, wurden diese Gene einer computerbasierten Analyse mittels BLAST auf Ähnlichkeiten mit bekannten Tumorsuppressorgenen unterzogen. Zusätzlich wurde mit Hilfe der PubMed-Datenbank versucht, mehr über die Funktion der Gene und eine mögliche Involvierung in bekannte Tumorregelkreise zu erfahren. In der C-Region erschien von den charakterisierten Genen *MYO18B* am interessantesten, da Mutationen dieses Gens bei Lungenkrebs gefunden werden konnten [67]. Dagegen konnten 9 von 22 Genen nicht weiter charakterisiert werden. In der T-Region fanden sich drei Gene, die als Tumorsuppressorgen-Kandidaten in Frage kamen. Zum einen das Gen *DJ1042K10.2* aufgrund der in der BLAST-Analyse identifizierten RUN-Domäne, die hauptsächlich in Rab und Rap GTPasen vorkommt (Abbildung 8). Zusätzlich *MKL1*, das für ein Protein kodiert, welches eine Rolle bei der megakaryozytischen Leukämie spielt und *EP300*, ein in den p53 Regelkreis involviertes Tumorsuppressorgen. In der T-Region konnten 14 Gene nicht weiter charakterisiert werden.

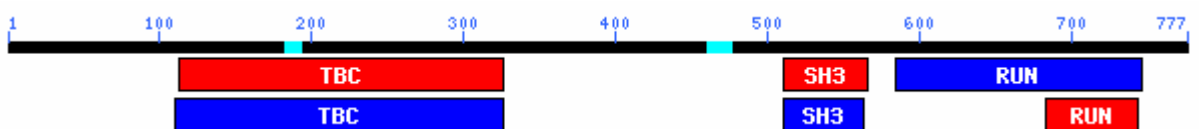


Abb.8) Identifizierte Protein Domänen nach Translation der Sequenz für das *DJ1042K10.2*-Gen mittels BLAST Programm. Die RUN-Domäne wird vor allem in Proteinen gefunden, die in den Ras-Regelkreis involviert sind. Die TBC-Domäne ist weit verbreitet und gibt den Hinweis, dass es sich um eine GTP-ase aktivierende Domäne handelt. Die SH3-Domäne bindet an Zielproteine durch Sequenzen, die Prolin oder hydrophobe Aminosäuren enthalten.

Zusätzlich wurde der gesamte chromosomale Arm 22q einer Analyse mittels BLAST und PubMed unterzogen, um Gene zu identifizieren, die aufgrund ihrer Funktion als Tumorsuppressorgen-Kandidaten in Frage kommen. Diese Gene wurden dann mit in die Mikroarray-Analyse eingeschlossen. Eine Übersicht über die zusätzlich identifizierten Kandidaten bieten Tabellen 6 und 7.

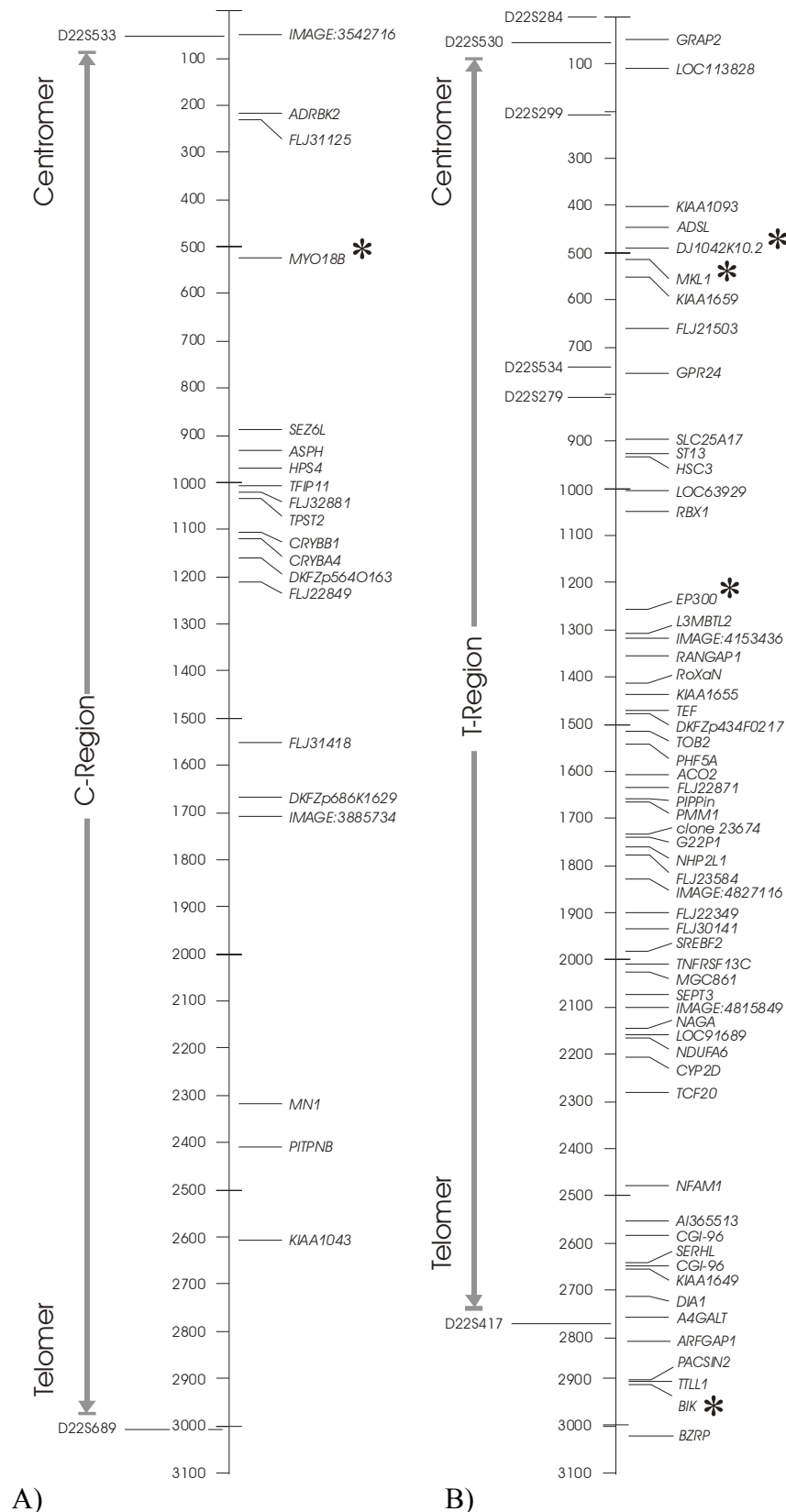


Abb. 9) Die Abbildung zeigt eine Übersicht der Gene, die in der centromeren (A) und telomeren (B) minimalen Verlustzone liegen. Die mit einem Stern gekennzeichneten Gene wurden einer Mutationsanalyse unterzogen. Die Nummern auf der linken Seite korrespondieren mit der Kb-DNS-Sequenz.

Tab.6) Übersicht über die Gene auf dem chromosomalen Arm 22q, die mittels BLAST-Analyse als potentielle Kandidatengene identifiziert wurden.

Nr.	Gen	Name	vermutete Funktion aufgrund der BLAST-Analyse
1	<i>BID</i>	BH3 interacting domain death agonist	Proapoptotisches Protein
2	<i>GSCL</i>	Goosecoid-like	Transkriptionelle Regulation
3	<i>HIRA</i>	Histone cell cycle regulation defective	Zellzyklusregulation
4	<i>CDC45L</i>	CDC45-like	Zellzyklusregulation
5	<i>PNUTL1</i>	Septin 5	Zellzyklusregulation
6	<i>RANBP1</i>	RAN binding protein 1	GTPase aktivierendes Protein
7	<i>CRKL</i>	V-crk sarcoma virus CT10 oncogene	Ähnlichkeiten mit dem epidermal growth factor-receptor-binding protein GRB-3
8	<i>LZTR1</i>	Leucine-zipper-like transcription regulator	Transkriptionelle Regulation
9	<i>MAPK1</i>	Mitogen-activated protein kinase	Familie der Protein Kinasen
10	<i>KIAA0015</i>	KIAA0015	Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase, Apoptose
11	<i>GANZ</i>	Guanine nucleotide binding protein	Ras Homolog
12	<i>RTDR1</i>	Rhabdoid tumor deletion region protein	Rab Familie
13	<i>RAB36</i>	RAB36, member RAS oncogene family	Ras Familie
14	<i>BCR</i>	Breakpoint cluster region	Rho/Rac/Cdc42-like GTPases
15	<i>MMP11</i>	Matrix metalloproteinase 11	Metalloprotease
16	<i>SEC14L2</i>	SEC14-like 2	Ähnlichkeit mit dem <i>S. cerevisiae</i> phosphatidylinositol transfer protein (Sec14p) und mit den RhoGAPs, RhoGEFs und RasGEF
17	<i>PES1</i>	Pescadillo homolog	Ähnlichkeit mit der BRCA1 c-terminalen Domäne
18	<i>SMTN</i>	Smoothelin	p53 Target Ähnlichkeit
19	<i>ZNF278</i>	Zinc finger protein 278	Transkriptionsfaktor
20	<i>YWHAH</i>	Tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase	Domäne die in die Growth factor Regeglkreis involviert ist
21	<i>RAYL</i>	Member of RAS oncogene family-like 4	Ras Familie
22	<i>RAC2</i>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	Ras Familie
23	<i>CARD10</i>	Caspase recruitment domain protein 10	CARD Familie, die Apotose reguliert und den NF-kappaB Regelkreis reguliert
24	<i>MAFF</i>	transcription factor MAFF	Homologie zum Fibrosarkoma Onkogen
25	<i>ATF4</i>	activating transcription factor 4	Transkriptionsfaktor

Tab. 7) Übersicht über die Gene auf dem chromosomalen Arm 22q, die durch die Literaturrecherche als potentielle Kandidatengene identifiziert wurden.

Nr.	Gen	Name	Literaturrecherche
1	<i>SMARCB1</i>	SWI/SNF related, matrix associated	Tumorsuppressorgen in Sarkomen
2	<i>EWSR1</i>	Ewing sarcoma breakpoint region 1	Translokationspartner bei verschiedenen Sarkomen
3	<i>RRP22</i>	RAS-related on chromosome 22	Potentiell Tumor suppressorgen aus der RAS Familie
4	<i>NF2</i>	Neurofibromin 2	Tumorsuppressorgen
5	<i>DRG1</i>	Developmentally regulated GTP binding protein 1	spielt eine Rolle bei der Gehirnentwicklung bei Mäusen
6	<i>MCM5</i>	Minichromosome maintenance deficient protein 5	DNS Replikationsfaktor
7	<i>PDGFB</i>	platelet-derived growth factor beta	Mitogen

3.3 Mutationsanalyse mittels SSCP

Insgesamt wurden fünf Gene mit unterschiedlichen Funktionen aufgrund der oben genannten Kriterien mittels SSC- Analyse auf Mutationen untersucht. Eine schematische Übersicht über die untersuchten Gene und Exone gibt Abbildung 10.

3.3.1 *DJI042K10.2*

Das Gen *DJI042K10.2* besteht aus 20 Exonen und es waren 25 Primerpaare notwendig, um die gesamte genomische Sequenz des Gens zu untersuchen. Es wurden 35 Tumoren untersucht, davon waren 9 A II, 10 A III, 12 GBM, 2 pleomorphe Xantroastrozytome WHO Grad II (PXA II) und 2 Oligoastrozytome WHO Grad II (OA II). In 8 Fällen waren beide Allele des Chromosom 22q vorhanden und in 27 Fällen lag ein LOH 22q vor.

Es wurden keine Mutationen, aber Polymorphismen gefunden. Bei folgenden Tumoren wurde ein Polymorphismus gefunden: ID 22088 (OA II) zeigte einen Polymorphismus im Exon 2, ID 2386 (A III) in Exon 8, ID 20892 (A III) in Exon 10 und die Tumoren ID 2392 und 4882 (beide A III) in Exon 11.

3.3.2 *MKL1*

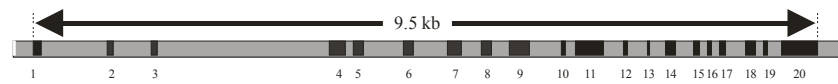
Insgesamt wurden 35 Tumoren auf Mutationen untersucht. Dabei handelte es sich um: 8 A II, 12 A III, 11 GBM, 2 PXA II und 2 OA II. Ein LOH 22q lag bei 29 Tumoren vor, bei 6 Tumoren waren beide Allele des Chromosom 22q vorhanden. Die 15 Exone des Gens wurden mit 31 Primerpaaren untersucht. Es wurden keine Mutationen, aber wiederum Polymorphismen gefunden. Das Exon 12 zeigte sich sehr polymorph und auch im Exon 10 zeigten sich viele Polymorphismen: ID 20980 (PXA II), ID 20990 (GBM), ID 21804 (GBM), 22266 (A III), ID 22912 (A III), ID 24004 (GBM). Im Exon 11 dagegen zeigte nur ein einzelner Tumor ID 4948 (A II) einen Polymorphismus.

3.3.3 *EP300*

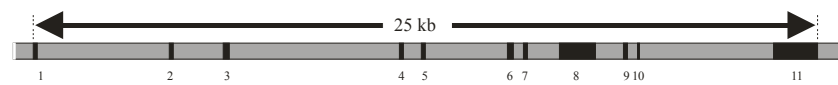
Das gesamte Gen besteht aus 32 Exonen. Aufgrund der großen Zahl an Exonen wurden nur Exone untersucht, in denen bereits Mutationen beschrieben wurden [66]. Folgende Exone wurden untersucht: 8, 14, 16, 17, 18, 25, 26, 30 und 31. Dabei ist das Exon 31 so groß ist, dass es mit 14 Primerpaaren untersucht werden musste, um das gesamte Exon abzudecken. Insgesamt wurden 27 Primerpaare verwendet. Es wurden wieder 35 Tumoren untersucht: 11 A II, 10 A III, 11 GBM, 2 PXA II und 1 OA II. Von den 35 Tumoren hatten 7 keinen Allelverlust des

Chromosom 22q und bei 28 Fällen lag ein LOH 22q vor. Das Exon 17 zeigte sich polymorph und abgesehen davon hatten zwei Tumoren, ID 20990 (GBM) und 22176 (A II), einen Polymorphismus in Exon 31. Es konnten in den untersuchten Exonen keine Mutationen festgestellt werden.

A.) *DJ1042K10.2*



B.) *MKLI*



C.) *MYO18B*



D.) *EP300*



E.) *BIK*

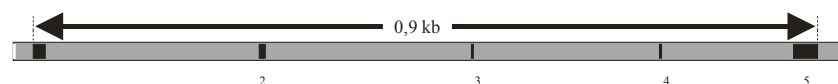


Abb. 10) Schematische Abbildung der mittels SSCP untersuchten Gene *DJ1042K10.2*, *MKLI*, *MYO18B*, *EP300* und *BIK*. Die senkrechten schwarzen Kästen symbolisieren die einzelnen Exone. Nur die Exone, die untersucht wurden, sind mit einer Zahl versehen. Die genomischen Distanzen sind in den einzelnen Bildteilen nicht maßstabsgerecht eingezeichnet.

3.3.4 *MYO18B*

Bei dem Gen *MYO18B* wurden auch wieder nur selektiv ausgesuchte Exone untersucht, da das Gen mit 289 kb sehr groß ist. Folgende Exone, in denen Mutationen beschrieben sind [67], wurden mit 15 Primerpaaren auf Mutationen untersucht: 4, 8, 20 und 43. Es wurden 36 astrozytäre Tumoren untersucht: 2 A II, 18 A III und 16 GBM, davon hatten die Hälfte ein Allel auf 22q verloren und die andere Hälfte hatte beide Allele 22q vorhanden. Erneut wurden in den untersuchten Exonen keine Mutationen, sondern nur Polymorphismen gefunden. In Exon 4 fand sich bei 4 Tumoren ein Polymorphismus: ID 21864 (GBM), 23120 (GBM), welcher auch im Exon 8 polymorph war, ID 23158 (GBM) und ID 23252 (GBM). Auch in Exon 43 zeigten 4

Tumore einen Polymorphismus: ID 21820 (GBM), ID 25618 (A III), ID 25626 (AIII) und ID 25632 (A III).

3.3.5 *BIK*

Da Mutationen des *BIK* Gens bei B-Zell Lymphomen gezeigt werden konnten, wurde es in der vorliegenden Arbeit analysiert [52]. Eine Mutationsanalyse von Exon 2 bis 5 mit 4 Primerpaaren in Astrozytomen ergab keine Mutation. Es wurden insgesamt 35 Tumoren mit LOH 22q untersucht: 13 GBM, 8 A II, 14 A III. Es fanden sich lediglich Polymorphismen in den Exonen 2 und 3 in dem Tumor mit der ID 24004 (GBM). Das Exon 4 zeigte sich hochpolymorph.

Eine Auswahl der gefundenen Polymorphismen in den Genen *DJ1042K10.2*, *MKL*, *MYO18B*, *Ep300* und *BIK*, zeigt Abbildung 11.

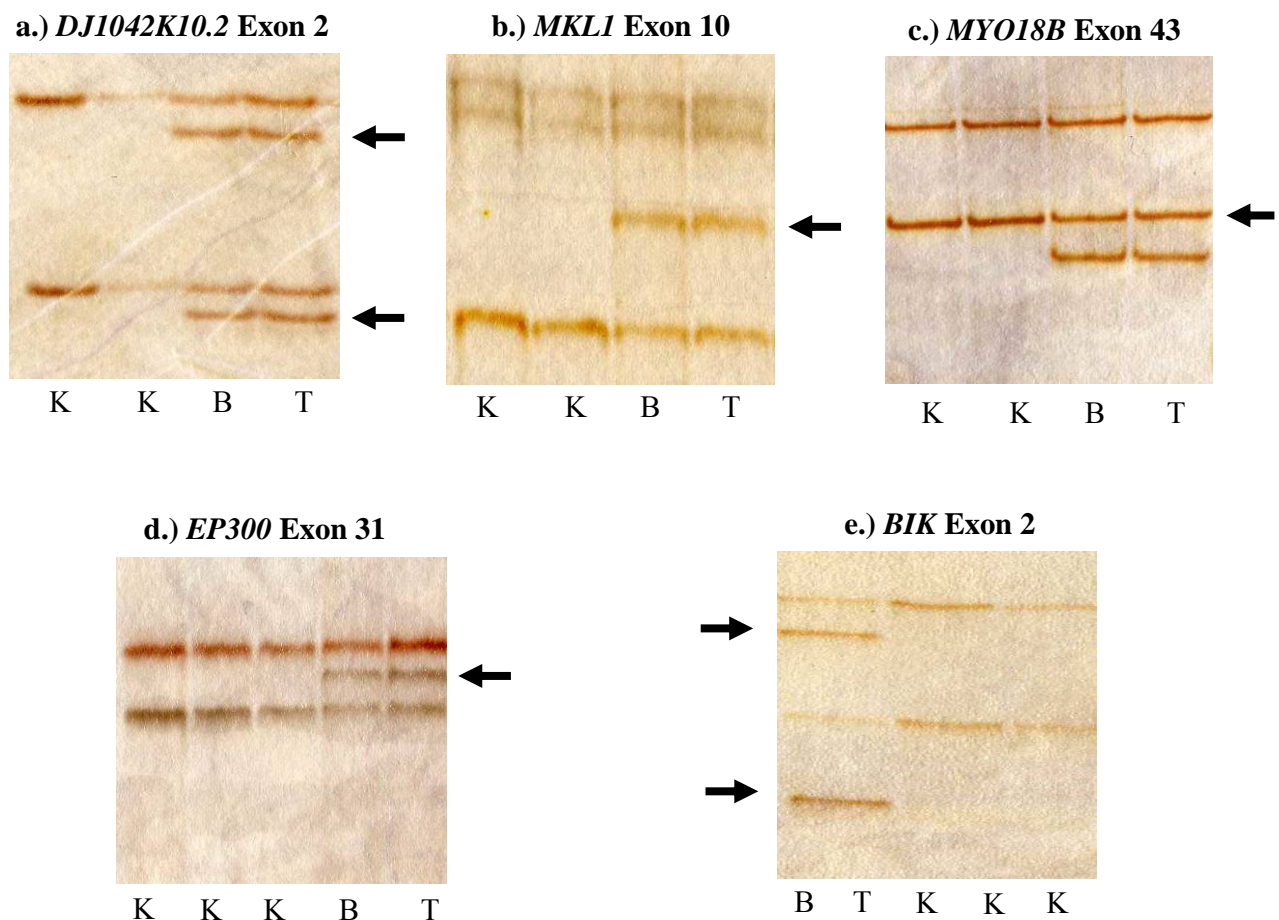
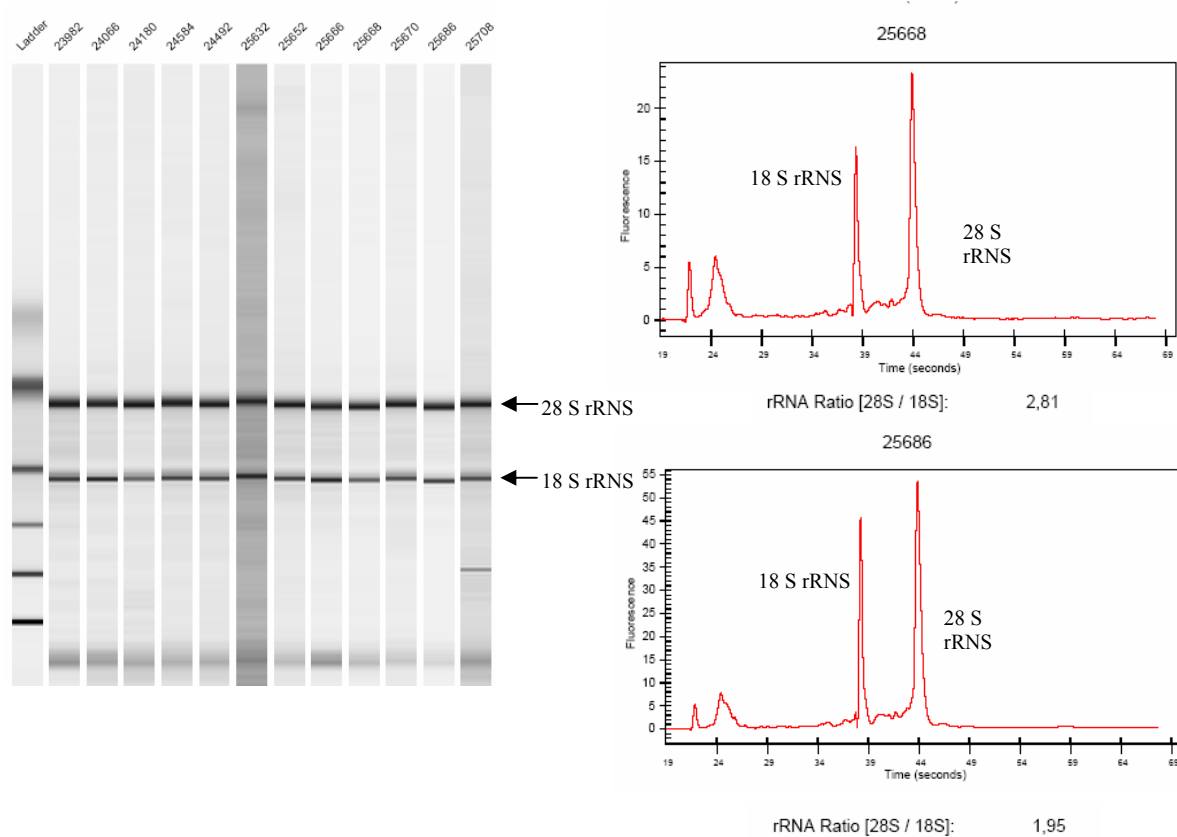


Abb. 11) Typische Polymorphismen der untersuchten Gene. Dabei steht K für Kontrolle (Leukozyten-DNS aus einer Vergleichspopulation) B für Blut (aus Leukozyten isolierte DNS des Patienten) und T für Tumor-DNS. Die aberranten Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Nur wenn Leukozyten-DNS und Tumor-DNS ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen, liegt eine Mutation im Tumor vor (hier nicht abgebildet).

3.4 Mikroarray

3.4.1 RNS-Qualität und Markierungseffizienz

Die Qualitätskontrolle der einzelnen RNS-Proben, die aus den verschiedenen Tumoren extrahiert wurden, erfolgte durch die Analyse eines Aliquots mittels eines Agilent Bioanalyzer. Die RNS-Proben zeigten größtenteils Profile, die auf eine gute RNS-Qualität schließen lassen. In der Abbildung 12 sind exemplarisch ein Gelbild und zwei Elektropherogramme abgebildet. RNS Proben, bei denen die Qualität nicht ausreichend war, wurden von dem Hybridisierungsexperiment ausgeschlossen.



A.) Gelbild der RNS-Analyse.

B) Elektropherogramme einzelner RNS-Proben

Abb.12) Überprüfung der RNS-Qualität mittels Agilent Bioanalyzer. Die Abbildung 12.A) zeigt ein Gelbild der RNS-Analyse. Die isolierte RNS sollte im Gel distinkte ribosomale Banden der 18 und 28 S RNS aufweisen. Die obere Bande ist die 28 S rRNS-Bande, die ungefähr doppelt so dick, wie die darunter gelegene 18 S rRNS-Bande sein sollte. Die Abbildung 12.B) zeigt das Elektropherogramm der Proben 25668 und 25686. Das Intensitätenverhältniss 28:18 S rRNS sollte nahe 2:1 liegen.

Ausgehend von den RNS-Proben ließen sich in allen Fällen durch die Aminoallylmodifikation und die anschließende Markierung cDNS-Targets von sehr guter Qualität generieren. Sämtliche fluoreszenz-markierte cDNS-Targets zeigten nach der gelelektrophoretischen Analyse durchweg eine sehr gute Größenverteilung über den gesamten Trennbereich und eine hohe Markierungseffizienz.

3.4.2 Auswertung der gescannten Bilder

Durch die Hybridisierung konnten starke Signalintensitäten erzeugt werden, die den zur Verfügung stehenden dynamischen Bereich völlig ausschöpften. In Abbildung 13 ist exemplarisch ein Mikroarray als Falschfarbendarstellung abgebildet.

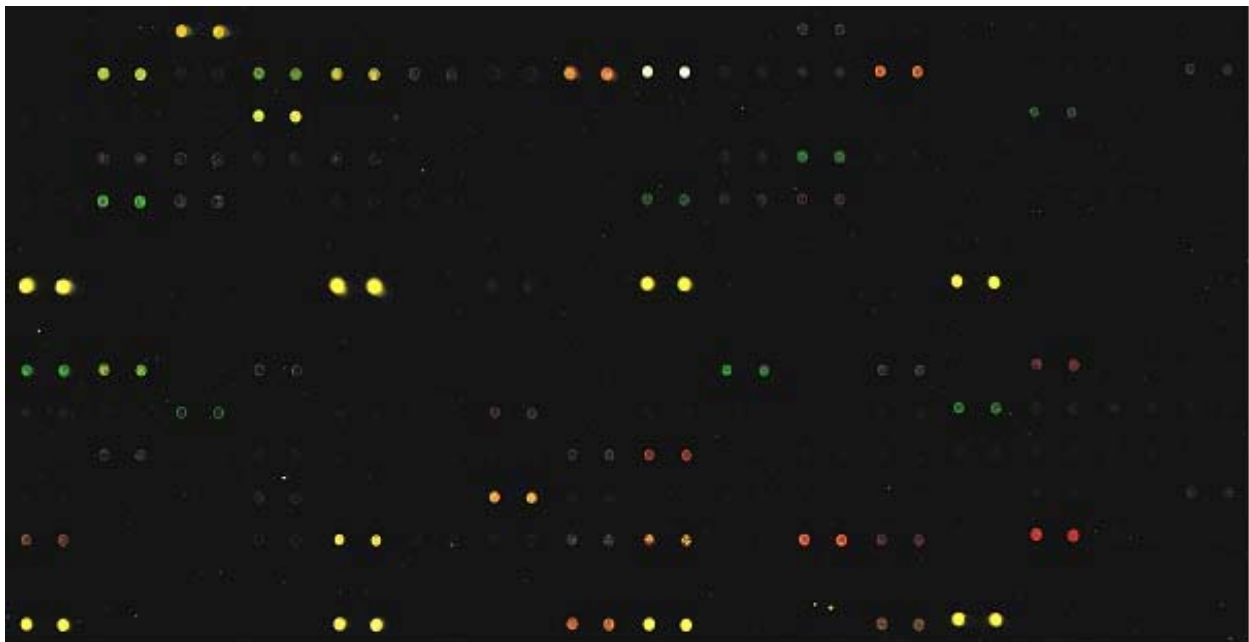


Abb. 13) Mikroarray nach der Hybridisierung als Falschfarbendarstellung. Das hybridisierte cDNS-Target 22528 wurde mit Cy5 markiert und ist rot dargestellt, die Referenz ist grün (Cy3). Spots, die mit beiden cDNS gleichermaßen hybridisieren, erscheinen gelb.

3.4.3 Normalisierung

In der vorliegenden Arbeit wurden nur wenige Gene mittels Mikroarrays untersucht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass nur wenige Gene unter den gewählten experimentellen Konditionen verändert sind. Dadurch ist die Normalisierung gegen den Mittelwert eine einfache Methode der Wahl. Um zuvor aber abzuklären, ob die Daten aus einer normalverteilten Population stammen, kann man die so genannte graphische „Scatter-Plot“-Darstellung verwenden. Von der Annahme ausgehend, dass die meisten Gene keine großen Fluktuationen

aufweisen, sollten die meisten Punkte auf einer Geraden liegen. Idealerweise ist diese Gerade als Winkelhalbierende in Form des „Scatter-Plots“ dargestellt. Die Linearität kann dann als ein Indiz für die Normalverteilung verwendet werden [112]. Exemplarisch ist ein solcher Scatter-Plot für die Tumorprobe 22528 in Abbildung 14 dargestellt. Auch die Daten für die anderen hybridisierten Proben zeigten weitgehend eine Normalverteilung der Werte, weshalb die Normalisierung gegen den Mittelwert durchgeführt werden konnte.

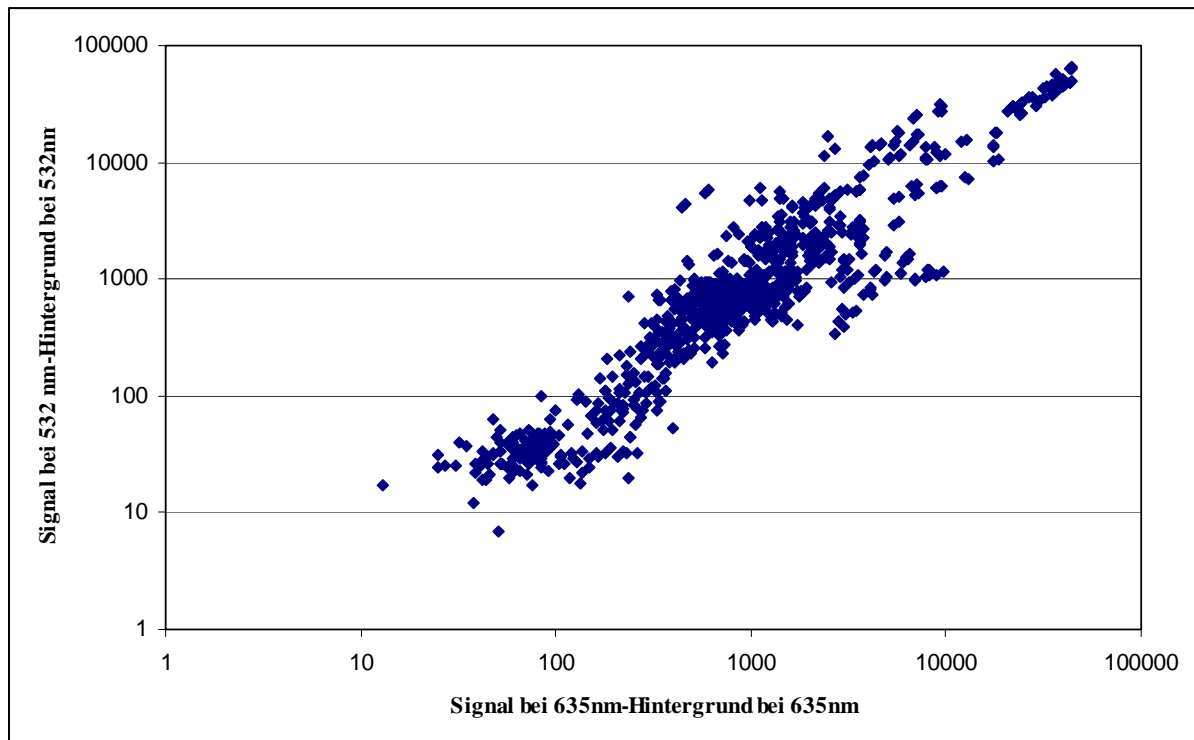


Abb. 14) Graphische Darstellung mittels „Scatter-Plot“. Ohne Anwendung der in Text beschriebenen Normalisierungsmethode. Der Datensatz wurde anhand der gescannten und analysierten Hybridisierungsbilder erzeugt. Die Probe 22528 wurde mit Cy5 markiert, im 635 nm Kanal detektiert und auf der Abszisse dargestellt. Die Referenz, welche mit Cy3 (532 nm) markiert wurde, ist auf der Ordinate aufgetragen. Es sind jeweils die hintergrundkorrigierten Signalintensitäten in einer doppeltlogarithmischen Darstellung aufgeführt.

3.4.1 Cluster-Analyse

Eine nicht-hierarchische Cluster-Analyse zeigte verschiedene Gruppenbildung (Abbildung 15). Es konnte keine Korrelation zwischen LOH Status 22q und der Gruppenbildung gefunden werden.

3.4.2 Statistische Auswertung

Eine erste Auswertung mit den gängigen Computerprogrammen ANOVA und SAM ergab keine differentielle Genexpression zwischen den beiden Gruppen. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, wenn man die Gliome mit Allelverlusten 22q mit der Gruppe ohne Allelverluste 22q verglich.

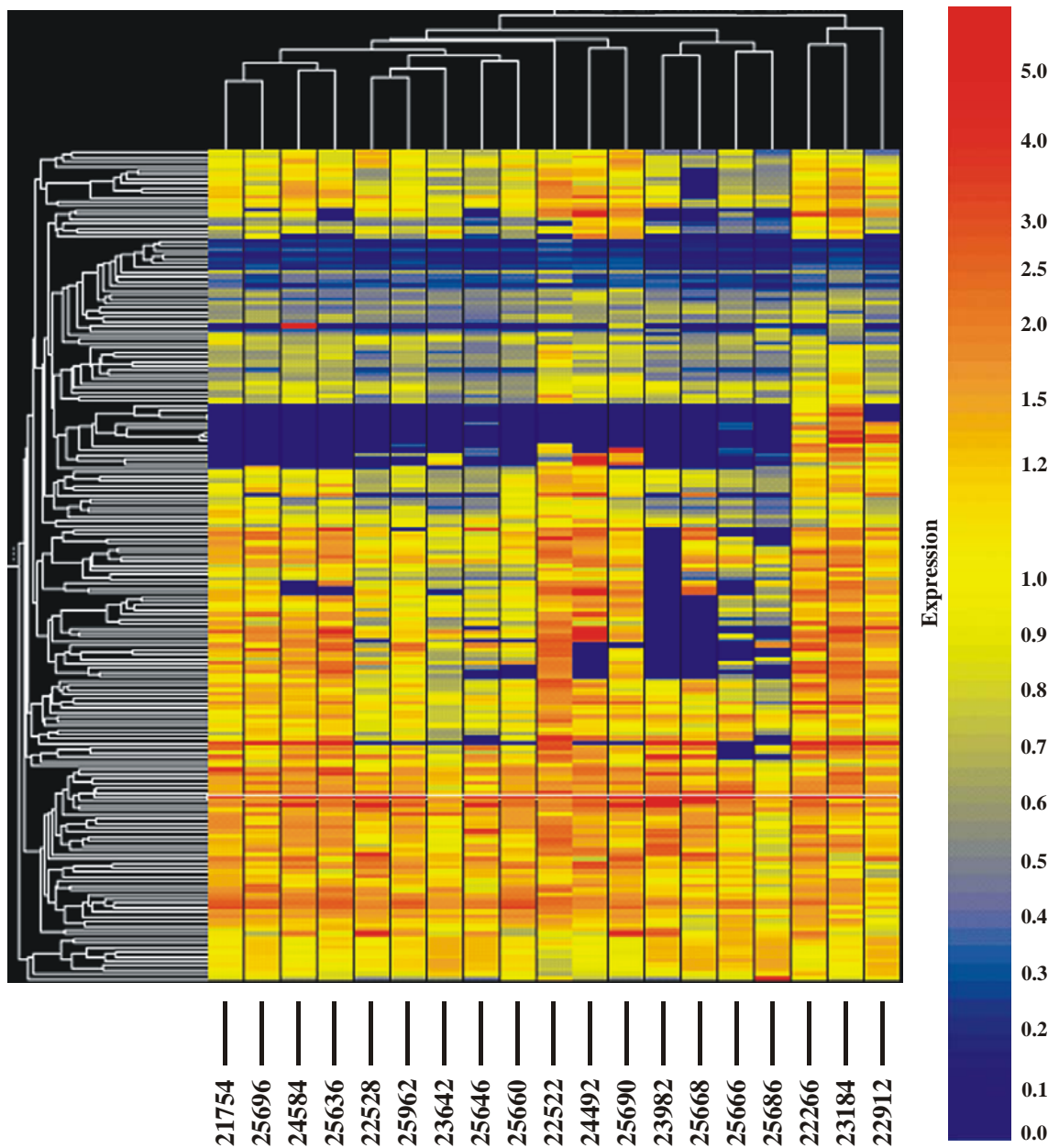


Abb. 15) Cluster-Analyse mit „Heat-Map“ zur Darstellung relativer Expressionsstärken. Hierbei werden relative Transkriptionsmengen in verschiedenen Farben dargestellt (rot: sehr hohe Expression; dunkelblaue Farbe: sehr geringe Expression).