

**Identifizierung Chromosom 3 spezifischer Gene, die an der
Entstehung oder Progression des Aderhautmelanoms beteiligt sind**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität Essen

vorgelegt von

Frank Tschentscher

aus Dortmund

Juni 2002

Die der Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. C. Redies

3. Gutachter: /

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. U. Schreiber

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2002

Berichte aus der Biologie

Frank Tschentscher

**Identifizierung Chromosom 3 spezifischer Gene,
die an der Entstehung oder Progression
des Aderhautmelanoms beteiligt sind**

Shaker Verlag
Aachen 2002

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Tschentscher, Frank:

Identifizierung Chromosom 3 spezifischer Gene, die an der Entstehung
oder Progression des Aderhautmelanoms beteiligt sind/

Frank Tschentscher. Aachen : Shaker, 2002

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Essen, Univ., Diss., 2002

ISBN 3-8322-0942-5

Copyright Shaker Verlag 2002

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-0942-5

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in folgenden Publikationen enthalten (in der Reihenfolge ihres Erscheinens): O: Originalarbeit, R: Review, K: Kommentar, B: Buchbeitrag

(O) **Tschentscher F**, Prescher G, Zeschnigk M, Horsthemke B, Lohmann DR (2000). Identification of chromosomes 3, 6, and 8 aberrations in uveal melanoma by microsatellite analysis in comparison to comparative genomic hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **122(1)**:13-7

(O) **Tschentscher F**, Prescher G, Horsman DE, White VA, Rieder H, Anastassiou G, Schilling H, Bornfeld N, Bartz-Schmidt KU, Horsthemke B, Lohmann DR, Zeschnigk M (2001). Partial Deletions of the Long and Short Arm of Chromosome 3 Point to Two Tumor Suppressor Genes in Uveal Melanoma. *Cancer Research* **61(8)**: 3439-42

(O) Anastassiou G, **Tschentscher F**, Zeschnigk M, Bornfeld N (2002). Cadherin expression in uveal melanoma. *Experimental Eye Research* **74(3)**: 423-5

(R) Anastassiou G, **Tschentscher F**, Zeschnigk M (2002): Prognostically relevant markers in malignant melanoma of the uvea. *Ophthalmologie* **99(5)**: 327-32

(O) Zeschnigk M, **Tschentscher F**, Lich C, Brandt B, Horsthemke B, Lohmann DR (2002). Methylation analysis of several tumor related genes shows low frequent methylation of *CDKN2A* and *RARB* in uveal melanomas. *Gene Function and Disease* - im Druck

(O) **Tschentscher F**, Hüsing J, Hölter T, Kruse E, Gana Dresen I, Jöckel KH, Anastassiou G, Schilling H, Bornfeld N, Horsthemke B, Lohmann DR, Zeschnigk M (2002). Tumor classification based on gene expression profiling shows that uveal melanomas with and without monosomy 3 represent two distinct entities. *eingereicht*

im gleichen Zeitraum erschienene Publikationen:

(R) Jaeckel S, Epplen JT, Kauth M, Mitterski B, **Tschentscher F**, Epplen C (1998). Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism or how to detect reliably and efficiently each sequence variation in many samples and many genes. *Electrophoresis* (18):3055-61

(K) **Tschentscher F** (1999). Too mammoth an undertaking. *Science* **286(5447)**: 2084

(O) Krings M*, Capelli C*, **Tschentscher F***, Geisert H, Meyer S, von Haeseler A, Grossschmidt K, Possnert G, Paunovic M, Pääbo S (2000): A view of Neandertal genetic diversity. *Nature Genetics* **26(2)**: 144-6

*gleichberechtigte Erstautorenschaft

(B) **Tschentscher F**, Capelli C, Geisert H, Krainitzki H, Schmitz RW, Krings M (2000): Mitochondrial DNA sequences from the Neanderthals. In: Orschiedt J, Weniger GC (Hg.), Neanderthals and Modern Humans – Discussing the Transition S. 303-314. *Wissenschaftliche Schriften des Neanderthal Museums*, Mettmann,

(O) Krüger R, Hardt C, **Tschentscher F**, Jäckel S, Kuhn W, Müller T, Werner J, Woitalla D, Berg D, Kuhl N, Fuchs GA, Santos EJ, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O (2000): Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* **07(5)**:553-62

(O) **Tschentscher F**, Kalt A, Hoffmann V, Epplen J, Hardt C (2000): Identification and efficient genotyping of an (A)_n/(T)_m polymorphism within the 5' untranslated region of the human IL6 gene. *European Journal of Immunogenetics* (1):1-3

(R) Capelli C, **Tschentscher F**, Pascali VL (2002). "Ancient" protocols for the crime scene? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis – *Forensic Science International* im Druck

„... das ist es doch eigentlich was Kunst soll, es regt die Gedanken und die Phantasie an. Vergangenes wird erinnert, Zukünftiges wird erahnt, eine gewisse zeitweilige Ruhelosigkeit der Gedanken in Form von Neugier und Interesse bemächtigt sich unser und das ist gut so, denn hier, in diesen Augenblicken, liegt das eigentliche Leben, frei von der Frage des Sinns und des Unsinn, frei von der Frage der Rentabilität und der Zeit, unsere eigentliche Nahrung.“

Berthold Welter

„Das Wasser folgt dem Weg des geringsten Widerstands. Das menschliche Verhalten, das in seinem Prinzip und fast allen seinen Handlungen determiniert ist, lässt nur wenige Gabelungen zu, und diese Gabelungen selbst werden kaum genutzt.“

aus: Michel Houellebecq, *Elementarteilchen*

Diese Arbeit ist **Gerd Bärtschneider** (1942-2002) gewidmet

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke für die Überlassung des spannenden Themas und die intensive Betreuung meiner Arbeit. Außerdem bedanke ich mich dafür, dass mir die Teilnahme an internationalen wissenschaftlichen Tagungen ermöglicht wurde. Die inspirierenden Literaturempfehlungen sollen auch dankend erwähnt werden.

In den besonderen Dank muss ich auch Herrn Dr. Michael Zeschnigk mit einschließen. Als mein unmittelbarer Betreuer hat er maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Mit Geduld beantwortete er jede einzelne meiner ca. 10⁵ Fragen.

Schließlich danke ich genauso herzlich Herrn PD Dr. Dietmar Lohmann, dem letzten (wertfrei) Mitglied der Aderhautmelanom-Gruppe am Institut für Humangenetik. Mit Witz und vor allem Verstand hat auch er maßgeblichen Anteil am Gelingen meiner Arbeit. Auch er war stets hilfsbereit zur Stelle, wenn der Lehrling mal nicht weiterwusste oder (seltenerweise) frustriert war.

Bianca Beyer, Birgit Brandt und Vera Trappe danke ich herzlich für die Hilfe bei den Laborarbeiten rund um unser Projekt.

Meinen Kolleginnen Christina Lich, Stephanie Groß, Martina Klutz und Bianca Beyer danke ich besonders herzlich für die nette, freundschaftliche Atmosphäre im Labor und nach Feierabend, dem Interesse an meinen Geschichten und der Hilfe bei verschiedenen Arbeiten.

Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpaß, IFZ, danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Einrichtung und Benutzung der Affymetrix-Genechip-Anlage.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie (Direktor: Prof. Dr. K.H. Jöckel), namentlich Tanja Hölter, Johannes Hüsing und Dr. Elisabeth Kruse, danke ich herzlich für die Hilfe bei der Bearbeitung der Datenmengen. Nachdem wir die Sprache des jeweils Anderen erlernt hatten, entstand eine äußerst fruchtbare Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeiter/innen der Augenklinik (Direktor: Prof. N. Bornfeld), namentlich Herrn Dr. G. Anastassiou, der uns stets mit Proben versorgte und uns fachlich zur Seite stand.

Herrn Professor E. Passarge und den anderen, namentlich nicht genannten Mitarbeiter/innen des Institutes für Humangenetik danke ich für das Interesse an mir und meiner Arbeit, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Klima im Labor (Karin und Maren: Danke fürs Tür-Abschließen ;-).

Dem Bildhauer Berthold Welter danke ich für die Erschließung einer neuen Welt, für viele Inspirationen, neue Sichtweisen und die Bereicherung unseres Lebensumfeldes.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meinen Eltern für mein Dasein und die immerwährende Unterstützung sowie meiner Frau Petra Bärschneider, die alle meine Launen sehr geduldig ertragen hat und immer für mich da war (und ist). Sie, die Kolleg/innen, Verwandten und Freunde haben meine Doktorandenzeit zu einem schönen Erlebnis gemacht.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Krebs.....	1
1.2	Das maligne Melanom der Aderhaut.....	3
1.2.1	Prognostische Parameter.....	5
1.3	Expressionsanalysen mit Microarrays.....	7
1.4	Zielsetzung.....	9
2.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	Material.....	10
2.1.1	Chemikalien.....	10
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	10
2.1.3	Enzyme.....	11
2.1.4	Kontrollproben.....	12
2.1.5	Oligonukleotid-Microarrays.....	12
2.1.6	Probenmaterial.....	12
2.1.7	Oligonukleotide und PCR Primer.....	12
2.1.8	Computerprogramme für die Expressionsanalyse.....	13
2.1.9	Geräte.....	13
2.2	Methoden.....	13
2.2.1	Präparation von DNA aus Blut.....	13
2.2.2	Präparation von DNA aus Tumorgewebe.....	14
2.2.2.1	Entfernung von Melanin aus DNA-Proben.....	14
2.2.3	Präparation von RNA aus Tumorgewebe.....	15
2.2.3.1	Präparation mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit.....	15
2.2.3.2	TRIZOL Methode.....	16
2.2.3.3	Clontech NucleoSpin Kit.....	17
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	17
2.2.5	PCR-Analysen.....	18
2.2.6	Reverse Transkription und Amplifikation der cDNA (RT-PCR).....	18
2.2.7	Elektrophorese und Analyse.....	19
2.2.7.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	19
2.2.7.2	Automatisierte Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Kapillarelektrophorese.....	20
2.2.7.3	Normalisierung der Ergebnisse und Berechnung von Allelverhältnissen (AR).....	20
2.2.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	21
2.2.9	Northern-Blot-Analyse.....	21
2.2.9.1	Blot.....	22
2.2.9.2	Radioaktive Markierung von DNA.....	22
2.2.9.3	Hybridisierung.....	23
2.2.9.4	Autoradiographie.....	23
2.2.10	Microarray-Analyse.....	23
2.2.10.1	Synthese von doppelsträngiger cDNA.....	24
2.2.10.2	Synthese von biotinylierter cRNA.....	26
2.2.10.3	Hybridisieren, Waschen, Färben und Scannen der Microarrays.....	27
2.2.10.4	Analyse der Daten und Auswertung der Kontrollen.....	28
2.2.11	Mathematische Auswertung der Microarray-Daten.....	30

2.2.11.1	Aufbereitung und Filtern der Daten.....	30
2.2.11.2	Wilcoxon Rangsummentest.....	30
2.2.11.3	Hierarchisches Clustern.....	31
2.2.12	<i>Real-Time</i> quantitative PCR.....	32
2.2.13	Sequenzierung von DNA.....	35
2.2.14	Komparative PCR.....	36
3.	ERGEBNISSE	37
3.1	Nachweis von prognostisch relevanten Chromosomenaberrationen bei Aderhautmelanomen.....	37
3.1.1	Bestimmung von chromosomalen Veränderungen durch Mikrosatellitenanalyse und Vergleich der Ergebnisse mit CGH-Daten.....	37
3.2	Untersuchung partieller Deletionen des Chromosoms 3.....	41
3.2.1	Identifizierung von Aderhautmelanomen mit partiellen Chromosom 3 Deletionen.....	41
3.2.2	Bestimmung und Feinkartierung der <i>smallest regions of deletion overlap</i> (SRO).....	43
3.3	Umfassende Expressionsanalysen von primären Aderhautmelanomen mittels Oligonukleotid-Microarrays.....	46
3.3.1	Voruntersuchungen.....	47
3.3.1.1	Northern-Blot-Analyse.....	47
3.3.1.2	RT-PCR.....	48
3.3.1.3	Analyse mit Test-Microarrays.....	50
3.3.2	Expressionsanalyse mit HG-U95Av2 Microarrays.....	51
3.3.3	Datenanalyse und weiterführende Experimente.....	53
3.3.3.1	Wilcoxon Rangsummentest und Identifizierung von Kandidatengenen.....	55
3.3.3.2	Verifikation ausgewählter Gene mittels <i>Real-Time</i> quantitativer PCR.....	58
3.3.3.3	Überprüfung der Kandidatengene.....	61
3.3.3.4	Hierarchische Clusteranalyse.....	62
4.	DISKUSSION	66
4.1	Vergleich von CGH und Mikrosatellitenanalyse.....	66
4.2	Die SRO-Regionen auf Chromosom 3.....	69
4.3	Expressionsanalysen.....	72
4.3.1	Kandidatengene.....	73
4.3.2	Globale Expressionsanalysen lassen auf zwei Tumorentitäten beim Aderhautmelanom schließen.....	77
4.4	Haploinsuffizienz?.....	78
5.	ZUSAMMENFASSUNG	81
6.	LITERATUR	82

ABKÜRZUNGEN UND FACHAUSDRÜCKE

A	Adenin
Ac	Acetat
AI	<i>allelic imbalance</i> , stärkere Amplifikation des einen Allels eines Markers
AR	<i>allele ratio</i> , Verhältnis der Allele von Mikrosatellitenmarkern, berechnet mit den Signalstärken der Fluoreszenzsignale
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i> , Kopie eines RNA Moleküls
cen	Centromer
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i>
Ci	Curie
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Orientierung
cpm	<i>counts per minute</i> , Impulse pro Minute
cRNA	<i>complementary RNA</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	expressed sequence tag – Teil einer exprimierten Sequenz
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²) oder: Gramm
G	Guanin
h	Stunde
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
kb	Kilobasenpaare
LOH	<i>loss of heterozygosity</i> - Verlust eines Allels
M	mol/l
min	Minute
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
Mb	Megabasenpaare
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MSA	Mikrosatellitenanalyse
NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA - zentrale Datenbank des Humangenomprojektes (www.ncbi.nlm.nih.gov)
OD	optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Primer	Startermolekül für die DNA-Synthese
QPCR	<i>Real Time</i> quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase</i> PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SRO	<i>smallest region of deletion overlap</i>
T	Thymin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan