

Identifizierung und Charakterisierung früher Genomveränderungen in benignen Hirntumoren

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin
Birgit Meyer
aus Berlin

Von der Fakultät III
Institut für Biotechnologie
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:
Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. H. Görisch
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. U. Stahl
Berichter: PD Dr. rer. nat. P. Nürnberg

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 29. November 2000

Berlin 2001

D83

Berichte aus der Biologie

Birgit Meyer

**Identifizierung und Charakterisierung früher
Genomveränderungen in benignen Hirntumoren**

D 83 (Diss. TU Berlin)

Shaker Verlag
Aachen 2001

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Meyer, Birgit:

Identifizierung und Charakterisierung früher Genomveränderungen
in benignen Hirntumoren / Birgit Meyer.

Aachen : Shaker, 2001

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Berlin, Techn. Univ., Diss., 2000

ISBN 3-8265-8753-7

Copyright Shaker Verlag 2001

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 3-8265-8753-7

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

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

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

Mein besonderer Dank gilt den beiden wissenschaftlichen Betreuern der Promotion Herrn PD Dr. Wolfgang Berger vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin, der den überwiegenden Teil der experimentellen Arbeit betreut hat und Herrn PD Dr. Peter Nürnberg vom Institut für Medizinische Genetik der Charité Berlin für ihre hilfreiche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei der Bearbeitung des Promotionsthemas.

Herrn Prof. Dr. Dipl.-Ing. U. Stahl vom Fachgebiet Mikrobiologie und Genetik am Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin möchte ich für die Unterstützung vor und während der Promotion sowie für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. H.-H. Ropers vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin, in dessen Abteilung der experimentelle Teil der Promotion stattfand, danke ich für die Bereitstellung eines Laborplatzes.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Szymas von der Abteilung für klinische Pathomorphologie der Universität für Medizinische Wissenschaften Poznan möchte ich mich besonders für die Bereitstellung der Patientenproben und seine Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herzlich danke ich Frau Dr. Karola Marczynek, der ich leider diesen Dank für die Einführung in das Promotionsthema und für ihre Hilfsbereitschaft nicht mehr persönlich ausrichten kann.

Frau Prof. Dr. G. Thiel und Frau K. Lehmann für die Unterstützung beim zytogenetisch ausgerichteten Teil der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung im Max-Planck-Institut und den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Genetik bedanken, insbesondere bei meinen Laborkollegen Renate Kirschner, Christina Zeitz, Mohammad Toliat, Uwe Schwahn und Dr. Steffen Lenzner sowie Karen Uhlmann, Heide Ritter und Regina Neumann für die gute Zusammenarbeit und ihre Unterstützung.

Herrn Mehdi Yahyawi vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik danke ich für seine freundliche Hilfe bei der Erstellung der Differenzklonbank.

Mein ganz herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und nicht zuletzt meinem Freund Eckhard, der immer zur Stelle war, wenn ich Rat und Zuspruch brauchte.

Inhaltsverzeichnis

I Theoretischer Teil

Die Rolle von Tumorsuppressorgenen in der Tumorgenese

1	Einleitung	1
2	Die Entdeckung von Tumorsuppressorgenen	2
2.1	Die Knudson-Theorie	3
2.2	Die Identifizierung und Charakterisierung des Retinoblastom-Gen	4
3	Eine funktionelle Klassifizierung der Tumorsuppressorgene	5
3.1	Die klassischen Tumorsuppressorgene	5
3.2	Die Mutatorgene	7
3.3	Die umgebungsmodifizierenden Gene	7
4	Neue Aspekte zur Wirkungsweise von Tumorsuppressorgenen in der Tumorgenese	8
4.1	Haplo-Insuffizienz und dominant negativer Effekt	9
4.2	Epigenetische Veränderungen	10
5	Tumorsuppressorgene und ihre Funktion in der Kontrolle des Zellzyklus	12
5.1	Der G1/S-Kontrollpunkt im Zellzyklus	13
5.2	Der Metaphase-Kontrollpunkt im Zellzyklus	16
6	Tumorsuppressorgene und ihre Bedeutung in Apoptose-Signalwegen	17
6.1	p53-induzierte Apoptosewege	18
6.2	Das <i>PTEN</i> -Gen und seine Bedeutung im PI3K/AKT-Signalweg	21
7	Ausblick	23

II Praktischer Teil

Identifizierung und Charakterisierung früher Genomveränderungen in benignen Hirntumoren

1	Einleitung	24
1.1	Klassifizierung und Eigenschaften von Gliomen, Meningiomen und Hypophysenadenomen	24
1.1.1	Gliome	24
1.1.2	Meningiome	26
1.1.3	Hypophysenadenome	26
1.2	Genetische Veränderungen in benignen Gliomen, Meningiomen und Hypophysenadenomen	28
1.2.1	Gliome	28
1.2.2	Meningiome	29
1.2.3	Hypophysenadenome	29
1.3	Zielsetzung	30
2	Material und Methoden	32
2.1	Patientenproben	32

2.2	Bakterienstämme	33
2.3	Plasmide	33
2.4	Oligonukleotide	33
2.4.1	Mikrosatellitenmarker	33
2.4.2	Sonstige Oligonukleotide	34
2.5	Chemikalien und Enzyme	34
2.6	Geräte	35
2.7	Isolierung von DNA	35
2.7.1	DNA-Isolierung aus Blut	35
2.7.2	DNA-Isolierung aus Tumorgewebe	35
2.7.3	Isolierung von Plasmid-DNA	36
2.8	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) und vergleichende Genomhybridisierung (CGH)	36
2.9	Restriktion von DNA	36
2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.11	Repräsentative Differenzanalyse (RDA)	37
2.11.1	Generierung der Amplikons	37
2.11.2	Hybridisierung und selektive Amplifizierung	38
2.11.3	Modifizierungen des RDA-Protokolls	39
2.12	Agarosegelelektrophoresen	40
2.13	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
2.14	Immobilisierung von DNA an Nylonmembranen	40
2.15	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	41
2.16	Hybridisierung von immobilisierter DNA	41
2.17	Klonierung von DNA-Fragmenten	42
2.18	Herstellung von Differenzklon-Banken	42
2.19	Sequenzierung	43
2.20	Sequenzanalyse	43
2.21	Mikrosatellitenanalyse	44
2.22	SSCP-Analyse	45
2.23	Lokalisierung von DNA-Fragmenten im menschlichen Genom	45
2.23.1	Monochromosomale Zelllinien	45
2.23.2	Kartierung mit dem Stanford G3 Radiation Hybrid Panel	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Untersuchungen verschiedener Gliome auf genetische Veränderungen	47
3.1.1	Darstellung der Gliome mittels CGH-Analyse	47
3.1.2	Identifizierung von Verlusten im genetischen Material von Gliomen mit Hilfe der RDA-Methode	49
3.1.2.1	Anwendung der RDA bei DNA-Proben von ausgewählten Patienten mit benignen Gliomen	51
3.1.2.2	Analyse des Differenzproduktes 16094	52
3.1.3	Charakterisierung einer 2D-Spot-Veränderung in 9q34	59
3.2	Untersuchungen von Meningiomen und Hypophysenadenomen auf genetische Veränderungen	64
3.2.1	Vorcharakterisierung der Tumore	64
3.2.1.1	Mikrosatellitenanalyse bei Meningiomen	64
3.2.1.2	Darstellung der Meningiome mittels CGH-Analyse	65
3.2.1.3	Darstellung der Hypophysenadenome mittels CGH-Analyse	67
3.2.2	RDA mit der Blut- und Tumor-DNA ausgewählter Meningiome und eines Hypophysenadenoms	68
3.2.2.1	Die Analyse der Differenzprodukte 16250 und 16738	70
3.2.3	Charakterisierung der Region 11q21-23 bei Hypophysenadenomen über Mikrosatelliten- und Mutationsanalysen	73

4	Diskussion	77
4.1	Darstellung der Tumore mit Hilfe der CGH-Analyse	77
4.2	Identifizierung von deletierten Bereichen in der Tumor-DNA mit Hilfe der RDA-Technik	84
4.2.1	Identifizierung von putativ tumorspezifischen Veränderungen bei benignen Gliomen mit Hilfe der RDA-Technik	85
4.2.2	Identifizierung tumorspezifischer Veränderungen bei benignen Meningiomen und Hypophysenadenomen mit Hilfe der RDA-Technik	89
4.2.3	Anwendbarkeit der RDA-Methode zur Identifizierung von genetischen Veränderungen in Hirntumoren	91
4.3	Charakterisierung eines 2D-Spot-Verlusts in benignen Gliomen in der chromosomalen Region 9q34	92
4.4	Charakterisierung einer in Hypophysenadenomen deletierten Region auf Chromosom 11q21-23	95
5	Zusammenfassung	98
6	Literaturverzeichnis	99
7	Anhang	122

Abkürzungsverzeichnis

5'-pd(N) ₆	Hexanukleotide zufälliger Zusammensetzung
A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAC	Bacterial artificial chromosome (artifizielles Bakterienchromosom)
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Copy DNA
CGH	Comparative genomic hybridization (Vergleichende Genomische Hybridisierung)
CHLC	Cooperative Human Linkage Center
CTAB	Cetyltriethylammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dest.	Destilliert
dGTP	Desoxyguanosen-5'-triphosphat
DHGP	Deutsches Humangenomprojekt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuracil-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPPS	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(3-propansulfonat)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HGP	Human Genome Project (Humangenomprojekt)
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie)
HSD	Heringsperma-DNA
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
Mb	Megabasen
NaOAc	Natriumacetat
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat
p	Kurzer Arm eines Chromosoms
P1	Bakteriophage P1
PAA	Polyacrylamid
PAC	P1 artificial chromosome (P1-abgeleitetes artifizielles Chromosom)
PEG	Polyethylenglykol
q	Langer Arm eines Chromosoms
RB	Retinoblastom
RDA	Representational difference analysis (Repräsentative Differenzanalyse)
RH	Radiation hybrid (Strahlungshybrid)
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro min)

RZPD	Ressourcenzentrum/Primäre Datenbank
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Sodium salt citrate (Natriumcitrat)
SSCP	Single-strand conformation polymorphism (Einzelstrang-Konformationspolymorphismus)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TE	Tris-ETDA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units (Enzymeinheiten)
UV	Ultraviolett
VHL	Von Hippel Lindau
Vol.	Volumen
XGal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YAC	Yeast artificial chromosome (artifizielles Hefechromosom)