

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie -  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens -

# **Genomische Amplifikationen und Koamplifikationen in ZNS-Tumoren**

INAUGURAL- DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Wobser, Rika Angela

aus Bonn

2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. med. Michael C. Frühwald

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Martin Hasselblatt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie -  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens  
Referent: Prof. Dr. Dr. med. Michael C. Frühwald  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Martin Hasselblatt

## ZUSAMMENFASSUNG

### Genomische Amplifikationen und Koamplifikationen in ZNS-Tumoren

von Rika Wobser

Die molekulare Grundlage der Entstehung solider ZNS-Tumoren ist noch nicht vollkommen geklärt. Eine genomische Veränderung im Rahmen der Tumorigenese liegt in der Vervielfachung bestimmter DNA-Abschnitte, der sogenannten Amplifikation. Für manche Tumoren stellt der Amplifikationsstatus spezifischer Gene einen wichtigen prädiktiven Faktor in bezug auf Tumorprogression und Therapieansprechen dar. So wird der Amplifikationsstatus des Gens *MYCN* auf Chromosom 2p24 in Neuroblastomen als prognostischer Marker genutzt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Häufigkeit von genomischen Ko-/Amplifikationen auf 2p24 (*MYCN*, koamplifizierte Gene *NAG* und *DDXI*) und 5p15 (*hTERT*, *irx1*) in Tumorgewebe und -zelllinien solider Hirntumoren zu untersuchen. Diese Genregionen beeinflussen die Proliferation und Alterungsprozesse sowie die neuronale Entwicklung.

Voruntersuchungen mittels RLGS und CGH zeigten Auffälligkeiten dieser Genregionen, welche sodann mittels realtime-PCR mit SYBR Green bestätigt und quantifiziert wurden. Im Untersuchungskollektiv konnten für die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und KCN die in der Literatur vorbeschriebenen Amplifikationen auf 2p24 bestätigt werden. In 1/7 embryonalen Tumoren konnte ebenfalls eine signifikante Amplifikation von *MYCN* sowie Koamplifikation der benachbarten Gene *DDXI* und *NAG* nachgewiesen und quantifiziert werden. In 13 der untersuchten 37 soliden Hirntumoren konnten Amplifikationen auf 5p15.33 gezeigt werden. Erstmals wurden nicht nur signifikante *hTERT*- sondern auch *Irx1*-Amplifikationen in Tumoren des ZNS nachgewiesen.

Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob hier ebenfalls Koamplifikationen bedeutsam sind. Die pathogenetische Relevanz und die prognostische Bedeutung dieser Genveränderungen bleiben Untersuchungen an einem größeren Kollektiv sowie zusätzlich auf Expressionsebene vorbehalten.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2011

## Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

### **Genomische Amplifikationen und Koamplifikationen in ZNS-Tumoren**

in der

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin,

Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

Universitätsklinikum Münster

unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. M.C. Frühwald

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Freiburg, den 28.6.2011

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Amplifikation</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Tumoren neuroektodermalen Ursprungs</b>	<b>3</b>
1.2.1. Embryonale Tumoren (WHO IV)	4
a. cPNET (ZNS primitiver neuroektodermaler Tumor)	4
b. Das Medulloblastom	5
c. Hereditäre Syndrome	7
1.2.2. Choroid-Plexus-Tumoren	8
a. Plexuspapillom (Choroid plexus papilloma, CPP, WHO I)	8
b. Plexuskarzinom (Choroid plexus carcinoma, CPC, WHO III)	9
c. atypisches Plexuspapillom (atypical choroid plexus papilloma, APP, WHO II)	9
1.2.3. Maligne Astrozytome (WHO III/IV)	10
a. Anaplastisches Astrozytom	10
b. Glioblastoma multiforme	10
1.2.4. Prolaktinom (WHO I)	11
1.2.5. Atypischer teratoider/rhabdoider Tumor AT/RT (WHO IV)	11
<b>1.3. MYCN und ko-amplifizierte Gene</b>	<b>12</b>
1.3.1. <i>DDXI</i>	14
1.3.2 <i>NAG</i>	14
<b>1.4. Iroquois Gene</b>	<b>15</b>
<b>1.5. HTERT (Telomerase reverse Transkriptase)</b>	<b>16</b>
<b>1.6. Referenzgene BCMA und SDC4</b>	<b>17</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Patientenkollektiv</b>	<b>18</b>

2.1.1. Zelllinien:	18
2.1.2. Tumorproben:	19
<b>2.2. DNA Isolierung aus Zelllinien und Tumoren</b>	<b>19</b>
<b>2.3. Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)</b>	<b>20</b>
<b>2.4. PCR Bedingungen</b>	<b>21</b>
a. Primer Referenzgene	22
b. Primer Zielgene	22
<b>2.5. RT-PCR</b>	<b>22</b>
<b>2.6. Real-Time PCR mit SYBR GREEN</b>	<b>23</b>
2.6.1. Auswertung qPCR:	25
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Voruntersuchungen:</b>	<b>26</b>
3.1.1. Detektion von Amplifikationen mittels RLGS in PNET/ MB	26
3.1.2. Detektion von Amplifikationen in Hirntumoren mittels CGH	27
<b>3.2. Detektion von Amplifikationen mittels qPCR</b>	<b>27</b>
3.2.1. Referenzgene:	27
3.2.2. Genlocus 2p24 ( <i>MYCN, DDX1, NAG</i> )	28
3.2.3. Genlocus 5p15.33 ( <i>Irx1</i> und <i>hTERT</i> )	32
a. Amplifikationen in Tumorzelllinien	33
b. Amplifikationen in primitiven neuroektodermalen Tumoren	34
c. Amplifikationen in weiteren Hirntumoren	35
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>37</b>
<b>Genetische und epigenetische Veränderungen in Tumoren und deren pathogenetische Relevanz</b>	<b>37</b>
<b>Evaluation und Diskussion des methodischen Ansatzes zur Detektion genomischer Amplifikationen</b>	<b>40</b>
<b>Genomische Amplifikationen und Koamplifikationen der Genregion 2p24</b>	<b>43</b>

<b>Genomische Amplifikationen und Koamplifikationen der Genregion 5p15.33</b>	<b>45</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>50</b>
<b>6. ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>58</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Amplifikation

Kennzeichnend für die Entstehung von Hirntumoren ist eine Akkumulation von Veränderungen in Genen, welche den Prozess der Zellproliferation, der -differenzierung und des -todes regulieren.

Wie bei anderen Tumoren spielen sowohl (Proto-)Onkogene als auch Tumorsuppressorgene eine entscheidende Rolle. Tumorsuppressorgene kodieren Proteine, die das Zellwachstum hemmen und sind in Tumoren typischerweise durch inaktivierende Mutation oder Deletion verändert. Onkogene kodieren zumeist für Proteinprodukte, die Zellwachstum, Proliferation, Invasion und Metastasierung fördern. Diese Gene werden typischerweise durch aktivierende Mutationen oder Amplifikationen für den Entstehungsprozess von Tumoren relevant.

Der Begriff DNA-Amplifikation bedeutet eine Vervielfachung bestimmter Genbereiche. Werden transkribierbare Templates amplifiziert, kann somit die Expression des betroffenen Gens gesteigert sein.

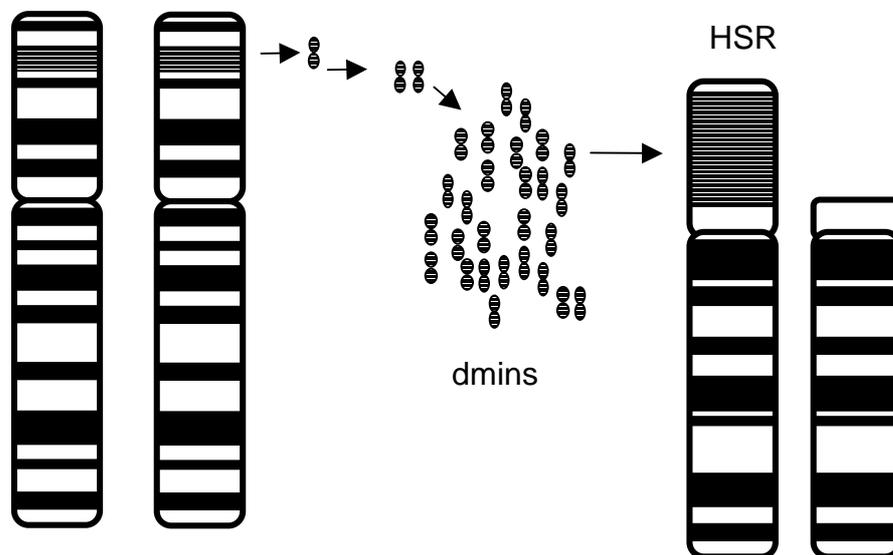
Genomische Amplifikationen wurden erstmals als pathogenetisch relevant identifiziert in Bezug auf zelluläre Resistenzentwicklung gegen metabolische Inhibitoren. So kann dieser Mechanismus der genomischen Amplifikation gehäuft in Tumorzellen nachgewiesen werden, die gegen ein Chemotherapeutikum resistent geworden sind. Studien an derartig veränderten Zellen haben zwei karyotypische, zytologisch sichtbare Veränderungen gezeigt, die mit dem Prozess der Amplifikation der DNA assoziiert sind:

Die Kopien der amplifizierten DNA können zum einen extrachromosomal als *double minutes* vorliegen. Hierbei handelt es sich um kleine Chromosomen-ähnliche Strukturen, die meist kein Zentromer besitzen.

Amplifizierte DNA-Sequenzen können jedoch auch in normale zentromerische Chromosomen integriert sein und als abnorme Regionen innerhalb des Chromosoms zytologisch auffallen. Sie bilden *homogeneously staining regions*, gleichartig gefärbte Regionen des Chromosoms. Das charakteristische Wechselspiel zwischen hellen und dunklen Banden wird in betroffenen Chromosomen durch sie durchbrochen, so dass

solche Chromosomen zumeist schon anhand der veränderten Musterung erkennbar werden.

Diese chromosomale Integration ist reversibel, so dass *double minutes* und *homogeneously staining regions* als untereinander austauschbare Formen amplifizierter DNA angesehen werden. Da *double minutes* zumeist kein Zentromer besitzen, ist ihre Vererbung bei der Zellteilung nicht regelmäßig. Somit bedeutet die Integration der amplifizierten Loci in ein Chromosom, das heißt die Ausbildung von *homogeneously staining regions*, einen Übergang in eine stabil aufrechterhaltene Form von amplifizierter DNA.



**Abbildung 1:** Prozess der Genamplifikation: Eine große DNA-Region (schraffiert), die das Zielgen enthält, wird dupliziert und bildet ein, vermutlich zirkuläres, extrachromosomales Element oder Episom. Dieses besitzt kein Zentromer, sodass keine regelmäßige Verteilung während eines mitotischen Zyklus zwischen den Tochterzellen erfolgt. Beispielsweise aufgrund von Wachstumsvorteilen akkumulieren die Episome in einem Teil der Zellen. Im Lichtmikroskop darstellbare Episome werden „double minutes“ (dmins) genannt. Werden diese dmins linear in ein beliebiges Chromosom integriert, werden sie zu sogenannten „homogeneous staining regions“ (HSR) und sind damit stabil und regelmäßig vererbbar. (11)

In zytologischen Untersuchungen normaler Säugetierzellen findet man äußerst selten *double minutes* und *homogeneously staining regions*. Der Vorgang der DNA-Amplifikation scheint darum kein gewöhnlicher Prozess in der Entwicklung der Säuger zu sein. Demgegenüber sind in Tumorzellen DNA-Amplifikationen bis zu 1000x häufiger als in normalen Zellen zu finden. Diese genetische Instabilität spielt eine

besondere Rolle in der Entstehung von Tumoren. Besonders dann, wenn die amplifizierte Region einen Selektionsvorteil verspricht, expandieren Zellpopulationen, die diese DNA-Amplifikation in sich tragen. Die gesteigerte Expression amplifizierter Gene kann für die Tumorzellen zu einem selektiven Wachstumsvorteil führen, insbesondere, wenn es sich bei dem amplifizierten Locus um ein zelluläres Onkogen handelt. Dementsprechend kann das Aufspüren spezifischer Genamplifikationen in Tumorzellen einen entscheidenden Hinweis auf zelluläre Gene geben, die an der Kontrolle des Wachstumszyklus und somit auch der Tumorigenese beteiligt sind.

Demgegenüber werden auch sporadische Amplifikationen in Tumoren gesehen, die möglicherweise einen Sekundäreffekt darstellen, der die Expression von Onkogenen steigern kann, die durch andere Mechanismen aktiviert wurden.

Als Beispiel für die klinische Relevanz solcher genomischer Amplifikationen kann das Neuroblastom herangezogen werden. Hier ist ein Screening auf Amplifikation des Onkogenes *MYCN* etabliert. Es besteht eine Korrelation zwischen Amplifikation von *MYCN* und fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung (12) sowie Tumorprogression (78). Anhand des *MYCN*-Status erfolgt u.a. die Einteilung in verschiedene Risikokategorien mit unterschiedlicher Prognose und Therapieansprechen.

Auch in Mammakarzinomen stellt eine genomische Amplifikation, in diesem Fall des Onkogenes *HER2*, einen wichtigen prädiktiven Faktor für das Therapieansprechen und damit einen prognostischen Indikator dar.

## **1.2. Tumoren neuroektodermalen Ursprungs**

Zu den primären Tumoren des zentralen Nervensystems zählen eine große Vielfalt von Tumorarten, die ihren Ursprung in den verschiedenen Zellen des Nervensystems haben. Sie unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihres histologischen Ursprungs, sondern auch in Hinblick auf Lokalisation, Wachstumsverhalten, Aggressivität, Ansprechen auf verschiedene therapeutische Ansätze und Prognose.

Primäre ZNS-Tumoren werden nach der WHO-Klassifikation eingeteilt anhand ihres histologischen Bildes sowie entsprechend ihrer biologischen Wertigkeit und ihres Wachstumsverhaltens (Graduierung).

Die Einteilung der Tumoren des ZNS erfolgt in 4 Grade nach WHO, anhand derer nicht nur die individuelle Prognose, sondern auch die therapeutischen Optionen beurteilt werden.

WHO Grad I	Histologisch gutartige Tumoren, können z.B. durch operative Entfernung geheilt werden
WHO Grad II	Histologisch gutartig, aber häufig infiltrativ wachsend und erhöhte Neigung zur Rezidivbildung
WHO Grad III	Histologisch bösartig, nach der Operation sind Strahlen- und/oder Chemotherapie notwendig
WHO Grad IV	hochmaligne, rasches Tumorwachstum und -progression, nach der Operation sind Strahlen- und/oder Chemotherapie notwendig

**Tabelle 1: WHO-Gradierung von Tumoren des Nervensystems**

Im Folgenden werden exemplarisch ZNS-Tumoren näher beschrieben, deren genetisches Material Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

### **1.2.1. Embryonale Tumoren (WHO IV)**

#### **a. cPNET (ZNS primitiver neuroektodermaler Tumor)**

Unter diesem Begriff wird eine heterogene Gruppe von Tumoren zusammengefasst, die v.a. bei Kindern und Jugendlichen auftreten und aggressives Wachstumsverhalten aufweisen. Primitive neuroektodermale Tumoren sind hochmaligne Tumoren, die aus kleinen, blaugefärbten, undifferenzierten runden Zellen bestehen und neuronale, gliale oder mesenchymale Elemente enthalten. Tumoren mit nur neuronaler Differenzierung werden ZNS Neuroblastome, Tumoren, die zusätzlich neoplastische Ganglionzellen enthalten, werden ZNS Ganglioneuroblastome genannt. Desweiteren zählen zu den cPNET die Medulloepitheliome sowie die Ependymoblastome (57).

cPNET treten gewöhnlich vor dem 10. Lebensjahr auf, können sich jedoch auch zu jedem Zeitpunkt der Kindheit manifestieren. Beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen.

Diese Tumoren können spontan (85) über den Liquor ausstreuen. Darum wird sowohl eine radiologische Bildgebung als auch eine Liquoruntersuchung bei jedem cPNET-Patienten benötigt. Im CT stellen sich cPNET als Läsionen von hoher Dichte mit Kontrastmittelanreicherung dar. Das Tumorgewebe ist von einem perifokalen Ödem umgeben. Gewöhnlich kommt es zur Mittellinienverlagerung unter der Falx. Das MRT zeigt homogene bis gemischte Signalintensitäten im Tumor. Im T2-gewichteten Bild stellt sich das Tumorgewebe nahezu isointens zu normalem Hirngewebe dar, zeigt nach Kontrastmittelgabe aber eine deutliche Anreicherung.

Eine komplette Tumorexzision wird angestrebt, ist in den meisten Fällen jedoch nicht möglich. Dexamethason lindert das zerebrale Ödem. cPNET sind radiosensibel und können auf Chemotherapie ansprechen. Die Bestrahlung der gesamten kraniospinalen Achse ist aus o.g. Gründen notwendig, wird jedoch aufgrund der konsekutiven Wachstumsretardierung sowie mentalen Einschränkung wenn möglich vor dem 3. Lebensjahr vermieden. Das durchschnittliche 3- bzw. 5-Jahres-Überleben beträgt ca 54,4% bzw 48,3%. (84, 27).

## **b. Das Medulloblastom**

Das Medulloblastom ist ein primitiver neuroektodermaler Tumor der hinteren Schädelgrube. Es entsteht typischerweise histologisch als klein-, blau-, rundzelliger Tumor im Bereich des Kleinhirnwurms (75%) oder im Bereich des vierten Ventrikels, mit oder ohne Ausbreitung in die Kleinhirnhemisphären. Histologisch werden vom klassischen Medulloblastom entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation 2007 vier verschiedene Typen als eigene Entitäten unterschieden: das desmoplastische/noduläre Medulloblastom, das Medulloblastom mit extensiver Nodularität, das anaplastische und das großzellige Medulloblastom (57, 27).

Mit einem Anteil von ca 20% aller primären ZNS-Tumoren bei Kindern unter 19 Jahren ist das Medulloblastom der häufigste maligne Hirntumor im Kindesalter (1). Die höchste Inzidenz (ca 90%) liegt bei Kindern in der ersten Lebensdekade, bei einem Rezidiv dann zumeist in der zweiten Dekade. Etwa 70% der Medulloblastome werden vor dem 20. Lebensjahr diagnostiziert. In den meisten Studien zeigt sich eine männlich-weibliche Geschlechtsverteilung von 3:2 (8, 73). Der Tumor weist ein schnelles Wachstum auf. Als Initialsymptom treten häufig Hirndruckzeichen und klinische

Zeichen der tumorbedingten Irritation des vierten Ventrikels auf (Erbrechen 58%, Kopfschmerzen 40%, Gangunsicherheit 20%, Torticollis 10%, Nystagmus und Ataxie). Der Tumor lässt sich mittels CT oder MRT gut darstellen, ist vaskularisiert und zeigt nach Kontrastmittelgabe eine deutliche Anreicherung.

Die Kombination aus chirurgischer Exstirpation, Radiotherapie und Chemotherapie verbessert die Prognose der Kinder mit Medulloblastom. Die Operation ermöglicht eine histologische Aufarbeitung, verringert das Tumolvolumen und entlastet einen Hydrocephalus bei tumorbedingter Obstruktion des vierten Ventrikels. Der chirurgische Eingriff sollte soviel Tumormasse wie möglich entfernen und zugleich so wenig neurologische Folgeschäden wie möglich hervorrufen. Zumeist ist hierbei die Nähe zum Hirnstamm der limitierende Faktor. Der operativen Behandlung folgt gewöhnlich eine externe Radiotherapie der kraniospinalen Achse mit einem zusätzlichen Boost auf das ursprüngliche Tumorbett, da unbehandelt ca 50-70% Lokalrezidive in der hinteren Schädelgrube auftreten. Zwar verbessert eine höhere Strahlendosis die Tumorkontrolle, jedoch ist die Radiatio der kraniospinalen Achse mit neurologischen Komplikationen und v.a. kognitiven Einschränkungen der Patienten verbunden (86). Neuroendokrine Störungen, wie z.B. Wachstumsretardierung bei Wachstumshormonmangel oder auch andere Funktionsstörungen, wie z.B. Hörverlust, sind nach der Therapie häufig. Darum wird bei Kindern unter 3 Jahren nach Möglichkeit auf eine Strahlentherapie verzichtet und bei älteren Patienten die Strahlendosis minimiert. Aufgrund des Risikos der Strahlentherapie für ernsthafte Komplikationen spielt die Chemotherapie eine ergänzende Rolle im multimodalen Therapiekonzept (32).

Medulloblastome entstehen überwiegend (>90%) sporadisch, ohne Hinweis auf eine genetische Prädisposition. Die häufigste zytogenetische Veränderung in bezug auf sporadische Tumoren betrifft das Chromosom 17. Ungefähr 40-60% der sporadischen Medulloblastome weisen einen Verlust großer Teile des kurzen Arms p von Chromosom 17 (Loss of Heterozygosity LOH) auf (24). Nach einer zusätzlichen Duplikation des langen Arms q liegt Chromosom 17 zytogenetisch als sog. Isochromosom 17q vor. Diese Duplikation führt möglicherweise zu einem Wachstumsvorteil für die Tumorzelle (5).

Andere chromosomale Auffälligkeiten sind weniger häufig. In einigen seltenen Fällen wurden Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen gezeigt. Das Chromosom 1

betreffende Deletionen und Translokationen konnten gefunden werden, jedoch ohne Identifikation einer konsistenten Zielregion. Kool et al zeigten, dass das Medulloblastom eine heterogene Erkrankung ist. Sie fanden mindestens 5 Subtypen, die sich molekularbiologisch anhand ihrer unterschiedlichen Genaberrationen und Mutationen unterscheiden. Aufgrund dieser spezifischen Gensignatur können sogenannte Cluster gebildet werden, anhand derer eine Assoziation zu klinisch-pathologischen Parametern, wie z.B. Metastasierung, desmoplastische Histologie oder häufigstes Erkrankungsalter möglich ist (50).

### **c. Hereditäre Syndrome**

Die Identifizierung spezifischer Mutationen, die zu hereditären Syndromen mit erhöhter Inzidenz an primären Hirntumoren führen, haben wichtige Einblicke in die Tumorentstehung gegeben. Bei ca 5 % der erkrankten Kinder ist eine vererbte Keimbahnmutation bekannt, die u.a. die Entwicklung von Medulloblastomen mit sich bringt. Zu nennen sind hier u.a. das Li-Fraumeni-Syndrom, hervorgerufen durch Inaktivierung des *p53*-Tumorsuppressorgens, und das Gorlin-Syndrom, assoziiert mit Mutationen im *PTCH1*-Gen (70).

Das LI-FRAUMENI-SYNDROM wird autosomal dominant vererbt und ist vor allem durch das Auftreten von Weichteil- und Knochensarkomen sowie Brusttumoren gekennzeichnet. Zudem treten gehäuft Hirntumoren, Leukämien und adrenokortikale Tumoren vor dem 45. Lebensjahr auf. In den meisten Fällen liegt diesem Syndrom eine Keimzellmutation, die das Tumorsuppressorgen *p53* betrifft, zugrunde. Eine zweite heterozygote Keimzellmutation, welche ein Gen mit regulatorischer Funktion im Mitosezyklus tangiert, prädisponiert möglicherweise bei den Betroffenen für die Tumorformation.

Vom GORLIN-SYNDROM betroffene Kinder weisen einen Hochwuchs, Makrozephalie, multiple skelettale Anomalien und Radiohypersensitivität auf. Hinzu kommt mit fortschreitendem Lebensalter das Auftreten verschiedener Malignome wie multiple und frühe Basalzellkarzinome, Medulloblastome (Inzidenz 3-5%, typischerweise desmoplastische Medulloblastome), Meningeome, ovarielle Sarkome sowie Fibrome. Das Gorlin-Syndrom geht einher mit einer Heterozygotie im *patched-1* (*PTCH-1*)-Lokus auf Chromosom 9. Das *patched-1*-Protein (transporterähnlich

aufgebaut mit 12-transmembran-Domänen) ist der Hauptrezeptor für das hedgehog Protein (HH) und spielt im „sonic hedgehog“ Signalweg (SHH), der die embryonale Entwicklung verschiedener Organe beeinflusst, eine bedeutende Rolle.

Bei dem autosomal-dominant vererbten TURCOT-Syndrom sind Formen der adenomatösen Polyposis coli mit dem Auftreten von primären Hirntumoren assoziiert. Beim Turcot-Syndrom Typ 1 tragen die Patienten Keimbahnmutationen in DNA-Mismatch-Reparaturgenen wie *hMLH1* oder *hPMS2* und bilden gehäuft Glioblastome sowie hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinome aus. Dem Turcot-Syndrom Typ 2 liegt eine Keimbahnmutation des APC-Gens auf Chromosom 5 zugrunde. Betroffene Patienten leiden unter der familiären adenomatösen Polyposis sowie unter primären Hirntumoren, mehrheitlich Medulloblastomen (6).

## **1.2.2. Choroid-Plexus-Tumoren**

0,4-1% aller intrakraniellen Tumoren sind Tumoren des Plexus choroideus. Sie können in jedem Lebensalter auftreten, 70% der Patienten sind jedoch jünger als 2 Jahre (9). Bei Kindern sind diese Tumoren zumeist im Seitenventrikel lokalisiert, bei Erwachsenen findet man sie v.a. infratentoriell (insbesondere im Bereich des posterioren Velum medullare) (23).

### **a. Plexuspapillom (Choroid plexus papilloma, CPP, WHO I)**

CPP werden nach der World Health Organization WHO als Grad I Neoplasien eingestuft.

Es handelt sich hierbei um intraventrikuläre Tumoren, die langsam wachsen. Histologisch ähnelt ihr Gewebe normalem Plexus-Choroideus-Gewebe. Es besteht aus gleichförmigen Zellen ohne signifikante zytologische Atypien. CPP zeigen keine deutlich erhöhte Wachstumsfraktion (<2%). Computertomographisch zeigen CPP oftmals Verkalkungen sowie ein kräftiges Enhancement nach Kontrastmittelgabe. Gelegentlich sind sie schwer von Ependymomen zu unterscheiden.

Die Therapie besteht in der Resektion, bei kompletter Resektion ist eine Rezidivrate selten. Eine adjuvante Radiotherapie ist nicht generell indiziert, kann jedoch bei rezidivierenden inoperablen Tumoren angewandt werden.

### **b. Plexuskarzinom (Choroid plexus carcinoma, CPC, WHO III)**

CPC sind nach der WHO-Einteilung Grad III Neoplasien. Diese aggressiven Tumoren zeichnen sich durch eine hohe Zellularität, nukleäre Pleomorphismen, Mitosen, fokale Nekrosen, Verlust der papillären Architektur und neurale Invasion aus. Im Gegensatz zum CPP kann bei einem CPC ein extraventrikulärer Einbruch in das Hirnparenchym vorliegen.

Aufgrund dieser Nekrosen und parenchymalen Invasivität stellen sich CPC bildmorphologisch inhomogener als CPP dar.

Differentialdiagnostisch sollte besonders bei Erwachsenen ein metastasiertes Adenokarzinom, bei jungen männlichen Patienten ein Teratom sowie bei Kindern ein Medulloepitheliom in Erwägung gezogen werden.

Aufgrund des aggressiven und invasiven Wachstums besteht die Therapie typischerweise in einer kompletten Resektion. Die Prognose ist schlecht, das Ausmaß der Resektion ist entscheidend. Das 10-Jahres-Überleben von Patienten mit komplett resezierten Plexuskarzinomen liegt ungefähr bei 35% (39, 57).

### **c. atypisches Plexuspapillom (atypical choroid plexus papilloma, APP, WHO II)**

Das APP steht in seiner Dignität zwischen dem CPP und CPC. Es unterscheidet sich vom CPP durch eine erhöhte mitotische Aktivität. Eine kurative Resektion ist möglich, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit der Rezidivrate signifikant erhöht.

### **1.2.3. Maligne Astrozytome (WHO III/IV)**

Astrozytome sind primäre Hirntumoren, die vom Stützgewebe des Gehirns ausgehen. Sie werden nach ihrem Stadium der Differenzierung klassifiziert und nach ihrem histologischen Grad der Malignität eingeteilt.

Astrozytome weisen in der Häufigkeit ihres Vorkommens ein Verhältnis von 5:3:2 auf (Glioblastom: anaplastisches Astrozytom: low-grade Astrozytom). Die altersabhängige Inzidenz verhält sich proportional zu der Graduierung: ca 34 Jahre für low-grade Astrozytome, 41 Jahre für anaplastische Astrozytome und 53 Jahre für Glioblastome (79). Low-grade Astrozytome können durch maligne Transformation zu malignen Astrozytomen dedifferenzieren, diese können jedoch ebenfalls *de-novo* entstehen.

#### **a. Anaplastisches Astrozytom**

Anaplastische Astrozytome sind maligne Tumoren mit einer deutlichen Proliferationstendenz. Sie werden gemäß der WHO-Klassifikation als WHO-Grad III-Tumoren eingeteilt. Histopathologisch und MR-Tomographisch liegen sie zwischen dem niedriggradigen Gliom und dem Glioblastoma multiforme. Sie zeigen vermehrte mitotische Aktivität, aber keine endotheliale Proliferation oder Nekrosen.

#### **b. Glioblastoma multiforme**

Das Glioblastoma multiforme ist das Astrozytom mit der höchsten Malignität (WHO IV) und gleichzeitig der häufigste intrakranielle Hirntumor. Histologisch zeigen Glioblastome wie anaplastische Astrozytome Hyperzellularität und ein pleomorphes Zellbild, zusätzlich jedoch Nekroseareale z.T. mit Pseudopalisadenbildung und Neovaskularisation mit endothelialer Proliferation (13).

Die Prognose ist schlecht. Ein junges Alter, ein hoher Karnofsky-Index, eine Operation mit großzügiger Zytoreduktion sind u.a. Prädiktoren für eine bessere Prognose. Ziel der Therapie liegt in Verbesserung und Erhaltung der Lebensqualität. Die Standardtherapie besteht in operativer Tumorverkleinerung in Kombination mit Radiatio. Die Chemotherapie hat nur einen geringen Effekt auf die Überlebensrate; wohingegen die Menge an entferntem Tumorgewebe signifikant korreliert mit der Zeit bis zur Tumorprogression bzw. dem medianen Überleben (47).

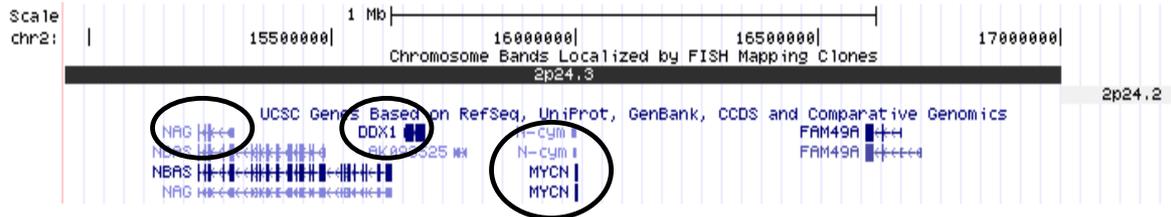
#### **1.2.4. Prolaktinom (WHO I)**

Das Prolaktinom ist das häufigste Adenom der Hypophyse, welches das Hormon Prolaktin produziert und sezerniert. Nach der Größe teilt man ein in Mikro- ( $\varnothing < 10$  mm) und Makroadenome ( $\varnothing > 10$  mm). Mikroprolaktinome – zumeist bei Frauen- sind immer, Makroadenome sind meistens gutartig. Das klinische Bild ist geprägt durch die Hyperprolaktinämie, welche zu sexuellen Funktionsstörungen führt. Bei der Frau führt der hormonelle Überschuss zu einer Amenorrhoe und Galaktorrhoe, beim Mann kommt es zu Libidoverlust und sexueller Impotenz. Desweiteren kann es zu Sehstörungen mit Gesichtsfeldausfällen, Kopfschmerzen bis zur kompletten Hypophyseninsuffizienz kommen. Therapiert wird hauptsächlich mit Dopaminagonisten, welche eine Reduktion z.T. bis zum Verschwinden des Tumors bewirken können. Die chirurgische Intervention ist nur im Ausnahmefall notwendig, z.B. bei fehlendem Ansprechen auf die medikamentöse Therapie oder bei Hirndruckzeichen nach einer Tumoreinblutung.

#### **1.2.5. Atypischer teratoider/rhabdoider Tumor AT/RT (WHO IV)**

Der atypische teratoide rhabdoide Tumor ist ein sehr seltener, jedoch hoch maligner Tumor des zentralen Nervensystems, der vor allem in der frühen Kindheit auftritt. Aufgrund der Seltenheit und Ähnlichkeit zu anderen Tumoren wird dieser Tumor erst seit den Jahren nach 1980 als eigenständige Entität angesehen (54, 72). Die Differentialdiagnose beinhaltet Medulloblastom, cPNET, Ependymom und Plexuskarzinom. AT/RT ist der erste pädiatrische Hirntumor, für den ein Tumorsuppressorgen identifiziert wurde: In der Mehrzahl der AT/RT liegt eine Mutation oder Deletion des *INI1/hSNF5*-Gens vor. Die meisten Patienten erhalten eine multimodale Therapie. Größtmögliche Tumorsektion ist wichtig, der AT/RT ist chemotherapiesensibel. Das mediane Überleben liegt bei ca. 50 Monaten (52, 67).

### 1.3. MYCN und ko-amplifizierte Gene



**Abbildung 2:** Genlokus 2p24.3, nach UCSC genome browser

Erstmals isolierten Kohl et al. 1983 ein genomisches DNA-Segment, welches homolog zum *MYC*-Onkogen ist und in Neuroblastomzelllinien als amplifiziert gefunden wurde (49). Es ist auf dem distalen kurzen Arm von Chromosom 2 (2p23-24) lokalisiert (75). Das *MYCN*-Gen kodiert ein nukleäres Protein, welches die Transkription von Genen steuert, die wiederum die Zellproliferation beeinflussen (z.B. Inhibition wachstumshemmender Gene).

*MYCN* (2p24) gehört zusammen mit *MYC* (8q24-ter) und *MYCL* (1p32) zur Familie der *MYC*-box-Gene, deren gemeinsames Merkmal in zwei hochkonservierten DNA-Domänen liegt. Es war das erste amplifizierte Onkogen mit klinischer Relevanz.

Der Amplifikationsstatus des *MYCN* Onkogens stellt derzeit den am besten untersuchten molekularbiologischen Marker in Bezug auf Prognose und Outcome von Neuroblastompatienten dar und hilft in der Einteilung von Behandlungsgruppen. Das erwartete Überleben von Patienten mit *MYCN*-Amplifikation liegt bei weniger als 30% in den ersten 6 Jahren nach Diagnosestellung (27).

Untersuchungen ergaben, dass die Anzahl der Kopien von *MYCN* in verschiedenen Tumorproben eines Patienten immer gleich ist, sowohl bei Proben von verschiedenen Tumorlokalisationen als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten *in vivo*. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Amplifikation des Onkogens eine intrinsische biologische Eigenschaft eines Neuroblastoms darstellt, und dass, falls *MYCN* in einem Tumor amplifiziert wird, dies schon zum Zeitpunkt der Diagnose vorliegt (10).

*MYCN* ist initial in Expressionsanalysen von Onkogenen an humanen Neuroblastomzellen, die *double minutes* oder *homogeneous staining regions* vorwiesen, identifiziert worden. Nähere Analysen zeigten hier nicht nur gesteigerte Expression sondern ebenfalls deutliche genomische Amplifikation von *MYCN* sowohl in Neuroblastomzelllinien als auch in Tumorgewebe. *MYCN*-Amplifikation ist nicht

spezifisch für das Neuroblastom, sondern auch in anderen neuralen Tumoren zu finden wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, Retinoblastomen, malignen Gliomen sowie primitiven neuroektodermalen Tumoren PNET.

Stadium bei Diagnosestellung	MYCN Amplifikation	3J-Überlebensrate (%)
benignes	0/64 (0%)	100
low stages (1,2)	31/772 (4%)	90
Stage 4s	15/190 (8%)	80
advanced stages (3,4)	612/1974 (31%)	30
Total	658/3000 (22%)	50

**Tabelle 2:** Korrelation von MYCN-Kopienzahl mit Stadium und Überleben anhand von 3000 Neuroblastompatienten. (12)

Bei Tumoren mit Amplifikation von *MYCN* besteht ebenfalls eine starke Expression des Onkogens (69, 65). Allerdings haben auch einige Tumoren ohne Amplifikation eine erhöhte Expression, was in diesen Fällen jedoch nicht mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist (16, 65, 80). Zusammenfassend sehen die überwiegenden Studien einen Zusammenhang zwischen erhöhter Expression von *MYCN* und schlechter Prognose. (38, 42).

Der amplifizierte DNA-Bereich ist zumeist wesentlich größer als der alleinige Transkriptionsbereich des einzelnen Onkogens. Es sind amplifizierte DNA-Bereiche von einer Größe um 300kb bis >1Mb bekannt. Konsistent sind hierbei 100-200kb große Kerndomänen, die den Genbereich von *MYCN* enthalten.

Die Größe der ebenfalls amplifizierten *MYCN*-umgebenden Bereiche auf Chromosom 2 warf die Frage nach zusätzlichen koamplifizierten Genen auf.

Gehäuft wurde eine Koamplifikation zweier Gene, die auf Chromosom 2p23-25 in enger Nachbarschaft zu *MYCN* liegen (s. Abbildung 2), in verschiedenen Tumorgeweben beobachtet, *DDXI* (DEAD-Box-Homeoprotein-1; Genlocus 2p24) und *NAG* (Neuroblastoma-amplified-gene, Genlocus 2p23-24), welche im folgenden kurz vorgestellt werden.

Da sowohl *DDXI* als auch *NAG* nur in solchen Zellen amplifiziert sind, die auch eine *MYCN* Amplifikation aufweisen, scheint *MYCN* verantwortlich zu sein für diese genomische Amplifikation auf 2p24. Tiefergehende Analysen zeigten keinen

zusätzlichen prognostischen Effekt durch das Vorhandensein weiterer koamplifizierter Gene (*DDXI* und *NAG*).

### **1.3.1. *DDXI***

*DDXI* liegt auf Chromosom 2p24, 340kb telomerisch zu *MYCN* und kodiert ein 2,7kb-Transkript für ein Proteinprodukt aus 740 Aminosäuren (82,4 kDa). Die Proteinprodukte der *DDXI*-Genfamilie sind ATP-abhängige RNA-Helicasen, die ein charakteristisches hochkonserviertes Sequenzmotiv (D(Asp)-E(Glu)-A(Ala)-D(Asp)-box) beinhalten. Proteine dieser Familie sind an der Ausbildung der Sekundärstruktur (Processing) der RNA beteiligt. Sie können so Translation, Splicing und Zusammensetzung von Ribosom und Splicesom beeinflussen. *DDXI*-Genen wird eine Rolle in der zellulären Proliferation und Tumorigenese wie auch in antiproliferativen Prozessen zugeordnet (16).

*DDXI* hat in Zellen neuroektodermalen Ursprungs eine regulatorische Funktion und wird besonders in Retina, Hirn und Rückenmark exprimiert. Normalerweise ist das *DDXI*-Protein im Nucleus lokalisiert. In amplifizierten Zellen konnte es jedoch sowohl in Nucleus als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. In vitro zeigen *DDXI*-transfizierte Zellen gesteigerte Wachstumsraten und weniger Kontaktinhibition.

### **1.3.2 *NAG***

Ein weiteres koamplifiziertes Gen, *NAG*, liegt auf Chromosom 2p24-p23, distal von *MYCN*, enthält 52 Exons und ist 420 kb groß. In 1 von 6 (17%) *MYCN*-amplifizierten Zelllinien und 10 von 50 (20%) *MYCN*-amplifizierten Tumoren konnte eine begleitende Amplifikation von *NAG* nachgewiesen werden (76, 77). Tumoren ohne *MYCN*-Amplifikation zeigen keine *NAG*-Amplifikation.

Das *NAG*-Protein ist 155,9 kDa groß. Es kann keiner bekannten Genfamilie zugeordnet werden, weder das Nukleotid noch die Proteinsequenz weist eine Homologie zu bereits bekannten menschlichen Sequenzen auf. Auch die genaue Funktion des Genproduktes ist bislang noch unbekannt.

## 1.4. *Iroquois* Gene

Die Gruppe der *Iroquois* Gene gehört zur Familie der TALE (three amino acid loop extension) Homeobox Gene, denen eine hochkonservierte Homeodomäne gemeinsam ist (hohe evolutive Konservierung mit einer Aminosäureidentität von 90 - 100%). Homeoboxproteine sind von Nematoden bis zum Menschen zu finden.

Die *Iroquois* Proteine besitzen als wesentliche Struktur diese Homeodomäne mit Helix-Schleife-Helix-Motiv und eine weitere gemeinsame Domäne, die aus 13 Aminosäuren besteht, die sogenannte *irobox* oder *Iro*-Domäne (14). Sie ist spezifisch für alle *Iroquois*-Proteine und zeichnet sich ebenfalls durch eine hohe evolutive Konservierung innerhalb der Genfamilie aus. Die *Iro*-Domäne dient der Protein-Protein-Interaktion.

Als dritte interessante Region weist das *Irx1*-Protein eine MAP-Kinase-Erkennungstelle auf. Über sie kann die Aktivität des *Irx1*-Transkriptionsfaktors reguliert werden (34). Die Aktivität als Transkriptionsfaktor wird durch saure Regionen, die sich auf der carboxyterminalen Seite des Proteins befinden, möglicherweise unterstützt.

In Mäusen und Menschen sind sechs *Iroquois* Gene bekannt, die in zwei Genclustern aus je drei *Iroquois*genen (2,2 Mb und 111 Mb) angeordnet sind.

Cluster *Irx* A wird von *Irx1*, *Irx2* und *Irx4* in der menschlichen Genregion 5p15.3 gebildet. Cluster *Irx* B besteht aus *Irx3*, *Irx5* und *Irx6* und liegt auf Chromosom 16q12. Daten lassen vermuten, dass die beiden *Irx*-Cluster der Vertebraten durch chromosomale Duplikation aus einem Vorgänger-Cluster entstanden sind. So sind *Irx1* und *Irx3*, *Irx 2/5* und *Irx 4/6* Paare von Paralogen, welche in derselben Leserichtung transkribiert werden. Zudem werden die Paraloge in einigen Geweben identisch exprimiert, was eine zusätzliche Duplikation spezifischer regulatorischer Elemente vermuten lassen kann.

Die *Iroquois* Gene spielen in vielen Entwicklungsprozessen eine Rolle und werden durch Moleküle des Hedgehog- und TGF- $\beta$ - Signalweges reguliert. Ihr Expressionsmuster weist auf eine Rolle in der neuronalen Entwicklung hin. Sie beeinflussen die Spezifizierung des Neuroektoderms, so z.B. die Unterteilung in anterior-posteriore und dorso-ventrale Achse des Neuroektoderms (35).

In Bezug auf die humanen *Iroquois* Gene gibt es bislang jedoch noch keine suffiziente funktionelle Beschreibung. Für das *HIRX2* liegen erste funktionelle Hinweise aus

Untersuchungen an menschlichen Brustkrebszellen (55) vor. Im *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) konnte den *Iroquois*-Genen *Xiro1*, *Xiro2* und *Xiro3* eine Rolle während der Neurogenese zugeschrieben werden (3, 34). Im Huhn wurden bisher *cIrx2*, *cIrx3* (37), *cIrx4* (2) identifiziert. Dabei zeigen erste Hinweise, daß *cIrx4* eine wichtige Rolle während der Herzentwicklung spielt und *cIrx3* während der Coelombildung von Bedeutung ist (2; 37).

## 1.5. *HTERT* (Telomerase reverse Transkriptase)

*HTERT* ist auf Genlokus 5p15.33 lokalisiert und besteht aus 16 Exons und 15 Introns, die ca 35 kb umfassen. Das Gen kodiert für die katalytische Untereinheit der Telomerase. Die Telomerase ist ein reverse-transkriptase-Enzym, das die bei jeder Zellteilung stattfindende Verkürzung der Chromosomenenden (Telomere) verhindert. Sie besitzt neben der Proteineinheit „Telomerase Reverse Transkriptase“ hTERT eine essentielle Telomerase-RNA-Komponente hTR, welche als Template für die Basenaddition an den Telomeren durch hTERT dient. Die Telomere, die Endstruktur eukaryotischer Chromosomen, bestehen aus spezialisierten Nukleoproteinkomplexen (7). Die DNA der Telomere setzt sich aus repetitiven G-reichen Sequenzen zusammen, die innerhalb der eukaryotischen Spezies große Homologien aufweist (61). Menschliche Telomere bestehen aus vielen Kilobasen-langen 5'-TTAGGG-3'-Wiederholungseinheiten (sogenannte tandem-repeats) zusammen mit verschiedenen assoziierten Proteinen. In humanen Chromosomen haben die Telomere eine Länge von 5-15 kbp (62).

Die Aufgabe der Telomere besteht darin, die Chromosomen zu stabilisieren, sie vor Degradation und Rekombination zu bewahren sowie eine komplette Replikation bei jeder Zellteilung zu gewähren. Sie spielen eine Rolle in der Steuerung der Genexpression und beeinflussen Zellalterung und Tumorentstehung. Die Telomerase katalysiert die *de-novo*-Synthese telomerer DNA-Sequenzen. hTERT ist hierbei der limitierende Faktor für die Enzymaktivität (62). Beim Menschen ist die Telomeraseaktivität lediglich in Keimzellen, adulten Stammzellen sowie aktivierten

Immunzellen ausgeprägt. In Abwesenheit der Telomerase bzw. bei schwacher Aktivität im Verhältnis zum replikativen Verlust wird die Apoptose getriggert. Diese Zellen besitzen also nur eine begrenzte Teilungsfähigkeit. Die Aktivität der Telomerase kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden, vorwiegend transkriptionell. Hier kommt es durch Transkriptionsfaktoren wie c-Myc oder Sp1 (56) zu einer Aktivierung des Promotors. Hingegen kann unter Einfluss anderer Faktoren (z.B. Tumorsuppressorgen *p53*) bzw. durch Methylierung der GC-reichen Promotorsequenz oder Histondeazetylierung eine Repression induziert werden (51). Auch eine posttranslationale Modifikation wie Phosphorylierung und alternatives Splicing (87) moduliert die Enzymaktivität. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Tumorentitäten neben diesen Aktivierungsebenen auch die genomische Amplifikation des *hTERT*-Gens zu einer erhöhten Telomeraseaktivität führen kann (25, 91).

## **1.6. Referenzgene *BCMA* und *SDC4***

Das Gen *BCMA* (B-Cell Maturation Factor) ist lokalisiert auf Chromosom 16p13.1, besteht aus 3 Exons und kodiert für ein 184-Aminosäuren-Protein mit einer einzigen Transmembrandomäne.

Das Gen *SDC4* (Syndecan 4) auf 20q12-13 kodiert ein transmembranöses Heparansulfatproteoglykan, welches eine Rolle als Rezeptor oder Ko-Rezeptor in der intrazellulären Kommunikation zu spielen scheint.

Es wurde gezeigt, dass diese beiden Genregionen in Neuroblastomen kaum genetische Veränderungen aufweisen. De Preter et al. 2002 benutzten diese Gene bereits als Referenzgene, um Amplifikationen der Gene *MYCN*, *DDX1* und *NAG* in Neuroblastomen zu identifizieren (21).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patientenkollektiv

Gegenstand der Untersuchung auf Amplifikation von spezifischen Genen sind verschiedene Tumorzelllinien sowie u.a. die in den Voruntersuchungen ausgewählten soliden zerebralen Tumoren.

Untersucht wurden insgesamt 40 Proben auf Amplifikationen: sieben Tumorzelllinien, davon zwei Neuroblastom-, drei Medulloblastom-, eine spinale PNET- und eine supratentorielle PNET-Zelllinie. Das übrige genetische Material entstammt folgenden Tumoren: sieben primitive neuroektodermale Tumoren, davon fünf Medulloblastome, ein atypischer teratoider rhabdoider Tumor AT/RT, 17 Choroidplexuspapillome CPP, ein Choroidplexuskarzinom CPC, ein anaplastisches Astrozytom, ein Glioblastoma multiforme, drei Hypophysen-Karzinome, ein Ependymom sowie ein Prolaktinom. Sämtliche Tumorproben wurden freundlicherweise vom Children`s Hospital in Columbus Ohio (USA) und aus der Neuropathologie der Universitätsklinik Münster (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Unmittelbar nach der chirurgischen Resektion der Tumoren wurde das Tumorgewebe in Flüssigstickstoff eingefroren.

Nachfolgend die tabellarische Übersicht der einzelnen Zelllinien und Primärtumoren, mit denen gearbeitet wurde.

#### 2.1.1. Zelllinien:

Probe	Tumortyp	Herkunft
SMS-KCN	Neuroblastom	R. Ross, Fordham University, NY, USA
IMR-32	Neuroblastom	ICLC, Genova, Italy
UW-228	Medulloblastom	J.Silver, Washington State University, USA
PFSK	stPNET	ATCC, Rockville, USA
D425 Med	Medulloblastom	D.Bigner, Duke University, USA
MHH-PNET5	spinaler PNET	T.Pietsch, Universität Bonn, Germany
D341 Med	Medulloblastom	ATCC, Rockville, USA

**Table 3:** Tumorzelllinien, n=7

## 2.1.2. Tumorproben:

Probe	Alter	Geschlecht	Entität
P67	6	f	Anaplastisches Astrozytom
P141	16	m	Glioblastoma multiforme
P178	51	f	Prolaktinom
P180	34	m	Hypophysen-Ca
P181	44	f	Hypophysen-Ca
P183	35	f	Hypophysen-Ca
P194	12	f	Plexuspapillom I
P204	26	m	Plexuspapillom I
P215	39	m	Plexuspapillom I
P216	46	f	Plexuspapillom I
P218	37	m	Plexuspapillom I
P221	34	f	Plexuspapillom I
P224	38	m	Plexuspapillom I
P228	11	m	Plexuspapillom I
P229	73	f	Plexuspapillom I
P238	12	m	Plexuspapillom I
P240	11	m	Plexuspapillom I
P241	31	m	Plexuspapillom I
P242	71	f	Plexuspapillom I
P244	36	m	Plexuspapillom I
P247	29	m	Plexuspapillom I
P248	62	m	Plexuspapillom I
P249	44	m	Plexuspapillom I
P252	5 mon	m	Plexuskarzinom III
P429	21	m	klarzell.Ependymom II
9609P256	6	m	Medulloblastom
9503P010	9	m	Medulloblastom
9501P003	3	m	cPNET
9805P620	7	f	cPNET
PNO1	8	m	Medulloblastom
9712P611	12	f	Medulloblastom
Para 23	4	m	Medulloblastom
PNO 194	5	f	AT/RT

**Tabelle 4:** Primärtumoren, n= 33

## 2.2. DNA Isolierung aus Zelllinien und Tumoren

Mittels des Protokolls Genomic Tip Cell DNA (Blood & Cell Culture DNA Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) erfolgt die DNA-Isolierung. Hierfür wird ein

Zellpellet mit je 2ml C1-Puffer sowie 6ml kaltem H<sub>2</sub>O gemischt und ca 10 min auf Eis gekühlt. Im Anschluss erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C über 15 Minuten mit 5100rpm. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird erneut mit 1ml C1-Puffer sowie 3ml kaltem H<sub>2</sub>O versetzt und vermischt im Vortexer. Erneute Zentrifugation wie oben beschrieben. Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde, wird das Zellpellet mit 5ml G2-Puffer resuspendiert und 10-30 Sekunden gemischt im Vortexer. Nun gibt man 200µl Proteinase K hinzu und inkubiert bei 50°C für 30-60 Minuten, bis die Lösung klar ist. Anschließend wird die im Kit mitgelieferte Säule mit 4ml QBT-Puffer genässt. Aus dem Ansatz wird ein erstes Aliquot von 300µl entnommen. Die Probe erneut im Vortexer gut mischen, in die Säule geben und vollständig durch den Filter der Säule laufen lassen. Hierbei bindet die DNA an die Säule, wohingegen andere Zellbestandteile hindurchlaufen. Zweites Aliquot von erneut 300µl abnehmen. Die Säule zweimal mit 7,5 ml QC-Puffer waschen und drittes Aliquot von 600µl entnehmen. Die Säule nun über ein sauberes Tube setzen. Mit 5ml 50°C warmen QF-Puffer die gebundene DNA eluieren, aus dem Durchlauf erneut ein Aliquot von 300µl entnehmen. Nun zu dem Durchfluß 3,5ml Isopropanol geben, schwenken und „fischen“ der ausgefallten DNA Gelingt dies noch nicht wird die Lösung erneut über 15Minuten bei 4°C mit ca 20000rpm zentrifugiert. Die Pellets werden dann mit 70% Ethanol gewaschen und wie zuvor 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet an der Luft über 5-10 Minuten getrocknet, und abschließend mit 20 µl TE-Puffer resuspendiert.

Zur Kontrolle erfolgt eine Elektrophorese auf einem 0,8% Agarose-Gel von Proben sowohl aus den Aliquots als auch der „gefischten“ DNA.

### **2.3. Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)**

Die RLGS-Analysen wurden nach dem Protokoll von Smiraglia *et al.* (18) durchgeführt.

Notwendig ist hochqualitative, hochmolekulare DNA um unspezifische radioaktive Markierung zufälliger Bruchstellen zu vermeiden. Es wurden insgesamt 3 Restriktionsenzyme benutzt, die die sogenannten „Landmarks“ erstellen. Der erste

Enzymverdau erfolgte mit Not1, einem methylierungssensitiven Enzym, welches seine Schnittstelle in CG-reichen Sequenzen findet (GC↓GGCCGC). Durch Hinzugabe von radioaktiv-markierten Nukleotiden ( $^{32}\text{P}$ -cCTP und  $^{32}\text{P}$ -cGTP) erhielt man radiomarkierte unmethylierte Schnittstellen. Der zweite Enzymverdau erfolgte mit EcoRV, welches häufiger schneidet und damit kleinere DNA-Fragmente produziert und somit in der ersten Elektrophorese eine adäquate Separation erlaubt. Diese Elektrophorese wurde über Nacht in einem 60cm 0,8% Agarose-Röhrengel durchgeführt. Anschließend erfolgte der dritte Enzymverdau mit HinfI innerhalb des Gels, um *in situ* kleinere DNA-Fragmente zu erhalten, welches in der zweiten Dimension eine adäquate Separation der Fragmente erlaubt. Nach diesem dritten Verdau wurde das Röhrengel in Puffer auf ein 5% Acrylamidgel gelegt und über Nacht elektrophorisiert. Anschließend wurde durch das getrocknete Gel ein Autoradiograph belichtet, sodass man ein RLGS-Profil erhielt, welches über 2000 radiomarkierte Not1-Schnittstellen darstellte.

Alle Tumor-RLGS-Profile wurden mit den Kontroll-Profilen von drei normalen Kleinhirnen-, einem adulten Großhirn- und vier peripheren Blutlymphozyten-Profilen verglichen. Die RLGS-Profile wurden dabei durch direktes Aufeinanderlegen der Tumor-Profile mit den normalen Profilen analysiert, wobei Unterschiede der Fragmentintensität markiert wurden. Die Fragmentbenennung erfolgte dabei in Übereinstimmung mit dem Masterprofil (PBL-DNA). Die Intensität der DNA-Fragmente auf dem Autoradiographen korreliert direkt mit der DNA-Kopienzahl.

## 2.4. PCR Bedingungen

Alle Primer wurden mit Hilfe der Software Primer Express 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) designed und bei Invitrogene (Karlsruhe, Deutschland) bestellt. Die Spezifität wurde mit den aktuellen BLAST Daten kontrolliert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Um maximale Effektivität und Sensitivität zu erhalten, wird besonderes Augenmerk gerichtet auf das Vermeiden von Selbst- und Hetero-Dimeren, der Selbstkomplementarität, auf Primerlänge und –schmelztemperatur. Es wird eine Ampliconlänge von 80-120 Basenpaaren und ein GC-

Gehalt der fünf letzten 3`End-Nukleotiden von maximal 40% eingehalten. Der Schmelzpunkt der Primer liegt jeweils bei ca. 60°C. Diese Primer können sowohl für RT-PCR als auch real-time qPCR genutzt werden.

Schmelzkurvenanalysen werden am Ende jedes qPCR-Assays durchgeführt, um die Spezifität zu kontrollieren. Spezifische Reaktionen sollten zu einem einzelnen Schmelzpunktmaximum korrespondierend zum amplifizierten Produkt führen. Hingegen zeigen verschiedene Schmelzpunkt-Peaks, dass die Reaktion unspezifisch ist und entweder auf mehr als ein Amplicon zurückgeht oder aber dass Primer-Dimere gebildet werden. Jedes Primerpaar, dass mehr als ein Schmelzpunktmaximum aufweist, wird verworfen. Jedes PCR-Produkt zeigt eine spezifische Bande der erwarteten Größe.

### a. Primer Referenzgene

Gen	F Primer	R Primer	Produkt
BCMA	CGA CTC TGA CCA TTG CTT TCC	AAG CAG CTG GCA GGC TCT T	101 bp
SDC4	CAG GGT CTG GGA GCC AAG T	GCA CAG TGC TGG ACA TTG ACA	129 bp

### b. Primer Zielgene

Gen	F Primer	R Primer	Produkt
MYCN	CGC AAA AGC CAC CTC TCA TTA	TCC AGC AGA TGC CAC ATA AGG	118 bp
DDX1	CCC AAC TGA TAT CCA GGC TGA A	TCC AGC AGA TGC CAC ATA AGG	105 bp
NAG	AAC ATG GAC TCG AGA AAC CAA TTT	TTA CTC ACT TCC GGC CAG TGT	111 bp
IRX	CAA CTA CAG CGC CTT CCT G	CCA GGG TTG TCC TTC AGT TC	108 bp
hTERT	CGT GGT TTC TGT GTG GTG TC	CCT TGT CGC CTG AGG AGT AG	114 bp

## 2.5. RT-PCR

PCR-Master-Mix:

- dNTP (10mM: je 0,2mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP, Q-Biogene, Heidelberg, Deutschland)
- DMSO(100%, Serva, Heidelberg, Deutschland)
- MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Q-Biogene, Heidelberg, Deutschland)

- 10×Puffer (Q-Biogene, Heidelberg, Deutschland)
- Taq-Polymerase (5U/μl, Q-Biogene, Heidelberg, Deutschland)
- ddH<sub>2</sub>O (Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland)

F- und R-Primer (20μM, Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland)

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA)

Agarose für 1,8%iges Agarose-Gel (Serva, Heidelberg, Deutschland)

Das Volumen der PCR-Reaktion beträgt 25μl.

Pro Reaktion wird zu 1μl cDNA (bzw. bei der Negativkontrolle zum ddH<sub>2</sub>O) der PCR-Master-Mix, bestehend aus 1μl Forward Primer(20 μM), 1μl Reverse Primer (20 μM), 1μl dNTP (10mM, zusammengesetzt aus je 0,2mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP), 1μl DMSO (100%), 1μl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,5μl 10×Puffer sowie 0,25μl Taq-Polymerase (5U/μl) und den restlichen 16,5μl ddH<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 25μl gegeben.

Die PCR-Reaktion wird durchgeführt in dem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Im Rahmen der PCR werden die Proben zunächst für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Die folgenden 35 Zyklen bestehen jeweils aus drei Phasen. Die erste Phase von 30 Sekunden dient bei einer Temperatur von 96°C der Denaturierung (der neusynthetisierten) DNA. In der zweiten Phase (30s) werden die Primer bei 60°C an die DNA gebunden. Die Primer sind so designed, dass sie jeweils bei gleicher Temperatur (60°C) optimal an die DNA binden. Dieser Phase schließt sich die Elongationsphase (Wachstum neusynthetisierter DNA) bei 72°C für 1 Minute an. Nach Durchlaufen der 35 Zyklen beginnt die finale Elongation bei 72°C für 5 Minuten.

Die Probenauftrennung erfolgt nach abgeschlossener RT-PCR mittels Gelelektrophorese auf einem 1,8%igen Agarosegel bei 110V für ca. 45 Minuten.

## **2.6. Real-Time PCR mit SYBR GREEN**

Die Real-time-PCR ist eine Methode, mit deren Hilfe man PCR-Produkte während ihrer Bildung quantitativ erfasst. Aus dem exponentiellen Wachstum der Menge an

amplifiziertem PCR-Produkt läßt sich die Menge eingesetzter Template-DNA bestimmen. Damit kann sodann bei Einsatz genomischer DNA als Template die Anzahl von Kopien bestimmter Gene ermittelt werden, und die Spezifität des Assays verifiziert werden. Spezifische PCR-Produkte lassen sich anhand des jeweiligen Schmelzpunktes von nicht spezifischen bzw. gebildeten Primer-Dimeren mit unterschiedlichen Schmelzkurven unterscheiden. Um ungenaue Quantifizierung zu vermeiden und die Spezifität zu erhöhen, werden zusätzlich optimierte Lösungen benutzt (74).

Man verwendet entweder sequenzspezifische Sondenmoleküle oder aber wie in diesem Fall DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR GREEN. Solche Farbstoffe lagern sich mit hoher Spezifität in doppelsträngige DNA. Vorteilhaft ist hierbei, dass die kostenintensive Synthese und Markierung der sequenzspezifischen Sonden entfällt. Jedoch ist die geringere Spezifität dieser Methode ein kritisch zu betrachtendes Problem, was die Analyse produktspezifischer Schmelzkurven im Anschluss an die Reaktion notwendig macht. SYBR Green markiert nicht nur die entstehenden spezifischen PCR-Produkte, sondern bindet an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle, also auch an nicht-spezifische PCR-Produkte und Primer-Dimere, die dann zum Fluoreszenzsignal beitragen. Mittels einer Schmelzkurvenanalyse, die in der Software der Real-Time-Cycler integriert ist, kann eine solche Interferenz aufgedeckt werden

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland):

- 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix:

- HotStar Taq DNA Polymerase
- QuantiTect SYBR Green PCR Puffer (Tris-Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,7 (20°C))
- Fluoreszenz-Farbstoffe SYBR Green I und ROX
- dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP/dUTP)

- ddH<sub>2</sub>O (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

F- und R-Primer (Invitrogen Karlsruhe, Deutschland)

384-Well-Platte (ABI Prism Optical 384-Well Reaction Plate, No Barcode, Applied Biosystems, Foster City, CA)

ABI Prism Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, Foster City, CA )

ABI Prism 7900HT Sequence Detection System mittels SDS Enterprise Database 2.2.2. (Applied Biosystems, Foster City, CA)

Das Volumen der q-PCR beträgt jeweils 15µl.

Der 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix enthält eine spezielle HotStar Taq DNA Polymerase, die erst durch einen 15-minütigen Inkubationsschritt bei 95°C aktiviert wird und so die Bildung unspezifischer Produkte und Primer-Dimer verhindert, was zu hoher PCR Spezifität und akkurater Quantifikation führt. Der enthaltene Puffer besitzt einen pH von 8,7 (20°C). Als fluoreszierender Farbstoff dient SYBR Green I, der bei Bindung doppelsträngiger DNA ein Fluoreszenzsignal emittiert. Als interne Referenz zur Normalisierung des SYBR Green I Signals ist der ebenfalls fluoreszierende Farbstoff ROX im Mix vorhanden. Des weiteren enthält der Master Mix einen dNTP Mix. Zu 7,5 µl dieses Master Mix werden 6,35 µl ddH<sub>2</sub>O, jeweils 0,075 µl Forward und Reverse Primer sowie jeweils 1 µl gDNA zugegeben.

Die realtime-PCR-Reaktion erfolgt auf einer folienversiegelten 384-Well-Platte im ABI Prism 7900HT Sequence Detection System mittels SDS Enterprise Database analog des ABI Systems Standardprotokoll mit je 40 PCR-Zyklen. Die Auswertung erfolgt m.H. der ABI Prism 7000 SDS Software sowie SDS 2.2.2 für ABI Prism. Es werden bei jedem Assay sowohl für zwei Referenzgene (BCMA und SDC4), sowie für die jeweiligen zu testenden Gene Verdünnungsreihen (0,1ng/µl, 1ng/µl, 10ng/µl, 50ng/µl, 100ng/µl, 200ng/µl und 500ng/µl) mit Normalgewebe (PNO 225 = normales Cerebellum) erstellt. Die Probe-DNA wird in einer Konzentration von je 10ng/µl getestet.

Jeder Lauf enthält Negativkontrollen, jede Probe wird viermal analysiert, die Normalisierung der Proben erfolgt m. H. einer Referenzprobe von normalem Kleinhirn (PNO 226).

### **2.6.1. Auswertung qPCR:**

Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten DNA -Menge und dem Ct-Wert (Cycle Treshold = Schwellenwert-Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz

anstieg). Eine Standardkurve kann durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den Ct konstruiert werden, wenn die Ausgangsmenge bekannt ist. Durch die Geradengleichung der Standardkurve ( $x=(Ct\text{-value} - b)/m$ ) kann dann für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden. Alle Proben werden mittels einer internen Referenz (normales Hirngewebe) normiert. Der Amplifikationsstatus einer Proben lässt sich als Quotient (Kopienzahl Testgen (normalisiert)/ Kopienzahl Referenzgene (normalisiert)) darstellen und beschreibt eine n-fache Amplifikation.

Für jeden PCR-Lauf wird die Effizienz E aus der Steigung der Standardkurve („slope“) der Verdünnungsreihe berechnet nach der Formel Effizienz  $E= 10^{-1 / slope}$ . Eine optimale Effizienz ergibt sich, wenn die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt wird. Für valide Ergebnis muss E nahe dem Optimalwert sein ( $E > 1,8$ ).

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Voruntersuchungen:**

Aufgrund der Seltenheit von genomischen Amplifikationen in Hirntumoren und der begrenzten Menge an Probenmaterial bei zum Teil nur verhältnismäßig kleinen Tumoren wurden im Vorfeld dieser Arbeit einige Untersuchungen durchgeführt, welche das initiale Probenmaterial bereits selektionierten. Die ermittelten Daten der u.g. Untersuchungen bilden die Grundlage für die vorliegende Arbeit.

#### **3.1.1. Detektion von Amplifikationen mittels RLGS in PNET/ MB**

Mittels RLGS (restriction landmark genomic scanning), einer Methode, die auch Amplifikationen mit geringerer Kopienzahl detektieren kann, wurden im Vorfeld PNET/ Medulloblastome untersucht (29).

In 5 von 25 untersuchten Tumoren (20%) konnte so eine genomische Amplifikation detektiert werden. In 3 der 25 Tumoren (12%) betraf diese Amplifikation eine Region auf Chromosom 2p24, in welcher *MYCN* und die *MYCN*-koamplifizierten Gene *NAG* und *DDX1* lokalisiert sind. Ein Tumor zeigte eine mögliche Amplifikation auf 5p15. Diese Amplifikationen wurden jeweils mit zwei verschiedenen Methoden (CGH + RLGS bzw. RLGS + Southern Blot) bestätigt (29).

### **3.1.2. Detektion von Amplifikationen in Hirntumoren mittels CGH**

Die komparative genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization CGH) ist eine molekular-zytogenetische Methode, um chromosomale Veränderungen darzustellen. Die Methode basiert auf der Hybridisierung von fluoreszenz-gelabelter Test-DNA sowie Kontroll-DNA mit normalen Metaphase-Chromosomen. Anhand des unterschiedlichen Fluoreszenzmusters können mittels quantitativer Bildanalyse unbalanzierte Veränderungen chromosomaler Regionen (Zugewinne sowie Verluste) detektiert werden. Die CGH kann Amplicons ab einer Grösse von ca 1 Mb darstellen. Anhand dieser Methode konnten 24 cerebrale Tumoren ermittelt werden, welche einen Materialzugewinn im Bereich des kurzen Armes von Chromosom 5 aufweisen und welche Gegenstand der folgenden Untersuchungen wurden (herzlichen Dank an PD Dr. Ch. Rickert, Neuropathologie und Paidopathologie, Vivantes Klinikum Berlin).

## **3.2. Detektion von Amplifikationen mittels qPCR**

### **3.2.1. Referenzgene:**

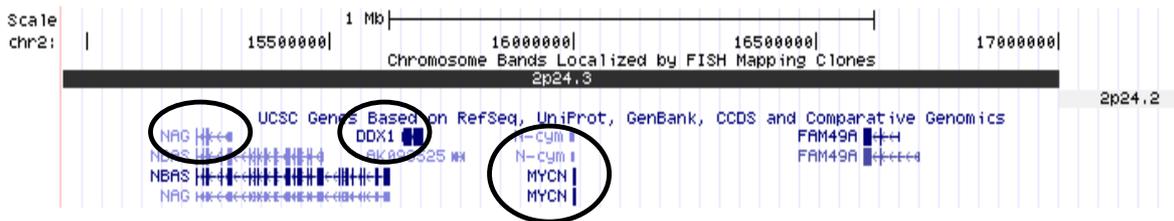
Die ausgewählten Referenzgene liegen in Genregionen, die in Hirntumoren wenig genetische Abnormitäten aufzuweisen scheinen (22).

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Gene *BCMA* und *SDC4* auch in den Tumoren, die im Rahmen dieser Dissertation Gegenstand der Untersuchung sind, valide disome Referenzgene darstellen:

In insgesamt 36 Proben (16 CPP, 1 CPC, 1 anaplastisches Astrozytom, 1 GBM, 3 Hypophysen-Ca, 1 Ependyom, 3 Medulloblastome, 1 cPNET, 1 AT/RT, 6 Tumorzelllinien und zwei normale Cerebelli) wurde das Verhältnis der Genkopien von *BCMA/SDC4* bestimmt. Das ermittelte Verhältnis ergab 0,994 +/- 0,04 SD, damit nicht signifikant unterschiedlich zu 1 (p<0,05).

Es erfolgt die Etablierung eines qPCR-Protokolls zum Nachweis genomischer Amplifikationen (s. Methodenteil).

### 3.2.2. Genlocus 2p24 ( *MYCN*, *DDX1*, *NAG* )



**Abbildung 2:** Genlokus 2p24.3, nach UCSC genome browser

Im Genbereich 2p24 liegt der Genlocus *MYCN*, benachbart zu *MYCN* stromaufwärts ist das Gen *DDX1* lokalisiert sowie etwas weiter stromaufwärts das Gen *NAG*.

Zunächst wurden die in der RLGS detektierten Amplifikationen im Genbereich 2p24 (Genlocus *MYCN*) mittels der komplementären Methode der qPCR bestätigt und quantifiziert. Besonderes Augenmerk wurde auf die mit *MYCN* koamplifizierten Gene *DDX1* und *NAG* gelegt.

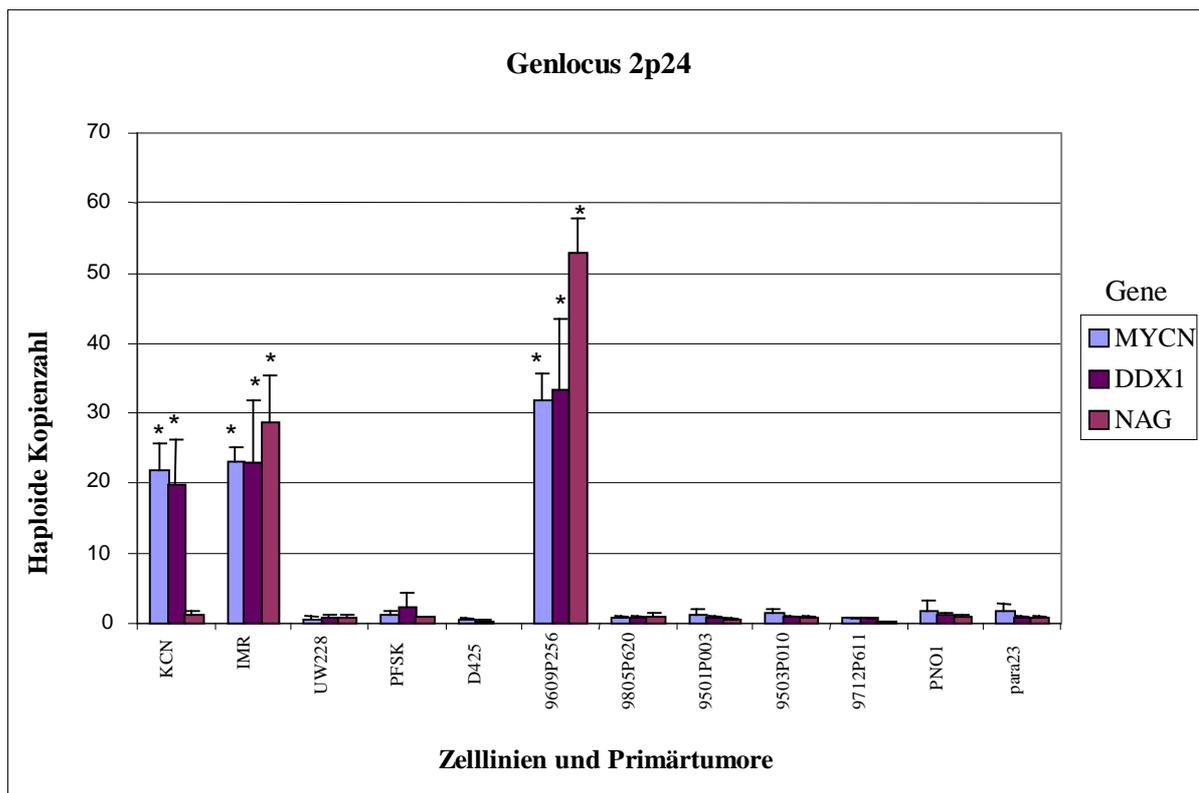
Untersuchungsgegenstand waren fünf Tumorzelllinien (drei Medulloblastom-, zwei Neuroblastomzelllinien) sowie sieben embryonale Hirntumoren (fünf Medulloblastome, zwei cPNET).

Als interne Positivkontrolle dienten die beiden Neuroblastomzelllinien, für die in der Literatur bereits eine *MYCN*-Amplifikation vorbeschrieben ist.

Anhand unseres Protokolls zeigte sich für die erwähnten Neuroblastom-Zelllinien IMR und KCN eine circa 20fach erhöhte Kopienzahl des *MYCN*-Gens. Zudem zeigte sich eine Koamplifikation von benachbart liegenden Genen.

In der Zelllinie IMR stellte sich der komplette Genbereich 2p24 signifikant amplifiziert dar, sowohl *DDX1* als auch *NAG* lagen in deutlich erhöhter Kopienzahl vor, wobei die Anzahl der Kopien der einzelnen Gene nicht signifikant voneinander abwich.

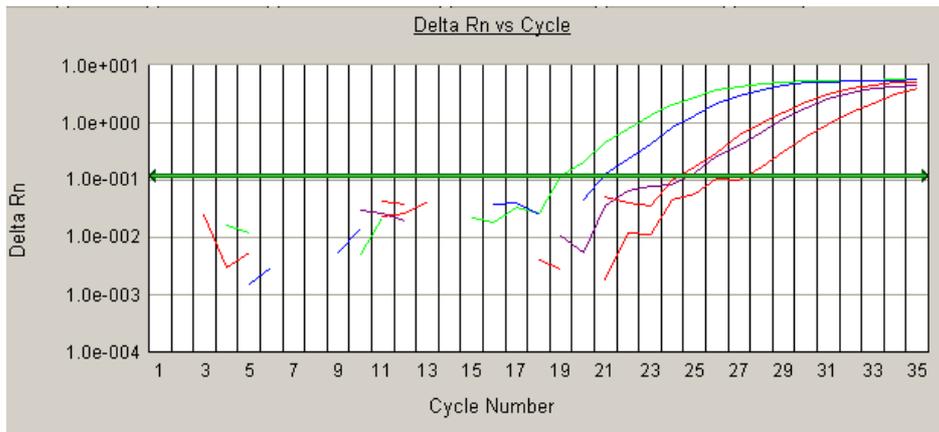
In der Zelllinie KCN war *MYCN* ebenfalls deutlich amplifiziert (s.Abb.5). Es zeigte sich eine numerisch äquivalente Koamplifikation von *DDX1*, *NAG*, das etwas weiter telomerisch auf Chromosom 2p lokalisiert ist (s.Abb.2), lag nicht mehr auf dem Amplikon, d.h. lag nicht in erhöhter Kopienzahl vor.



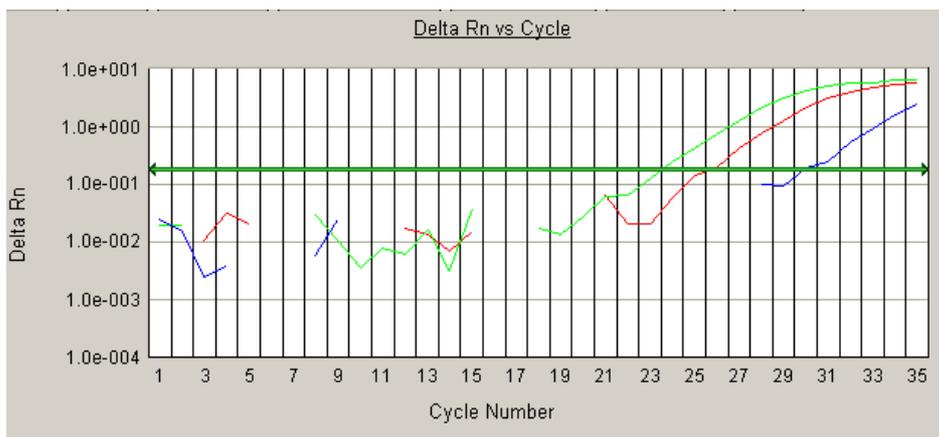
**Abbildung 3:** Amplifikationsstatus von *MYCN*, *DDX1* und *NAG* auf 2p24 in Zelllinien und Primärtumoren, n= 12

**Abbildungen 4-9: Quantitative SYBR-Green-Realtime-PCR-Analyse.**

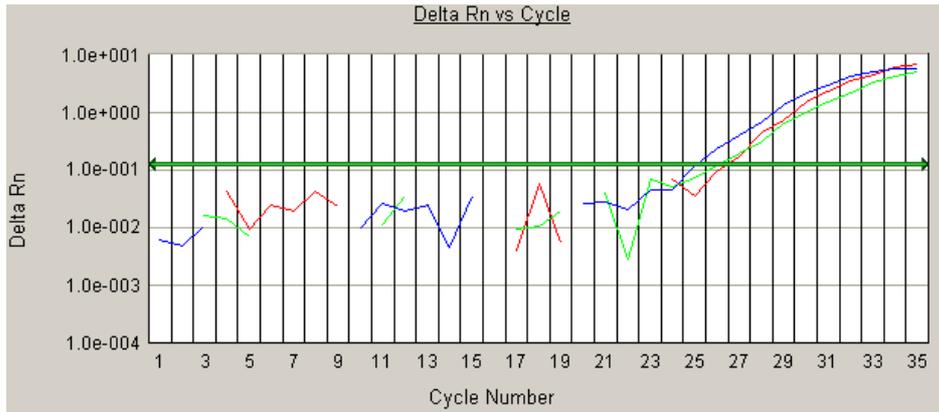
DNA von Tumor-, Zelllinien- und normalen Kleinhirnproben wurde in realtime-PCR-Reaktionen analysiert. Die Zyklusnummer, bei der die Fluoreszenz ( $\Delta R_n$ ) den Detektionsschwellenwert threshold erreicht, wird bestimmt (Ct-Wert). Je früher dieser Schwellenwert erreicht wird, desto höher ist die Kopienzahl des untersuchten Gens. Für jedes Gen erfolgte pro realtime-PCR-Analyse eine Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Standardkurve, m.H. derer die Kopienzahl einer unbekanntes Probe errechnet werden kann. Jede Analyse erfolgte vierfach, jeder Lauf enthielt Negativkontrollen, es erfolgte eine Normalisierung der Proben gegen normales Kleinhirngewebe, Daten hier nicht gezeigt.



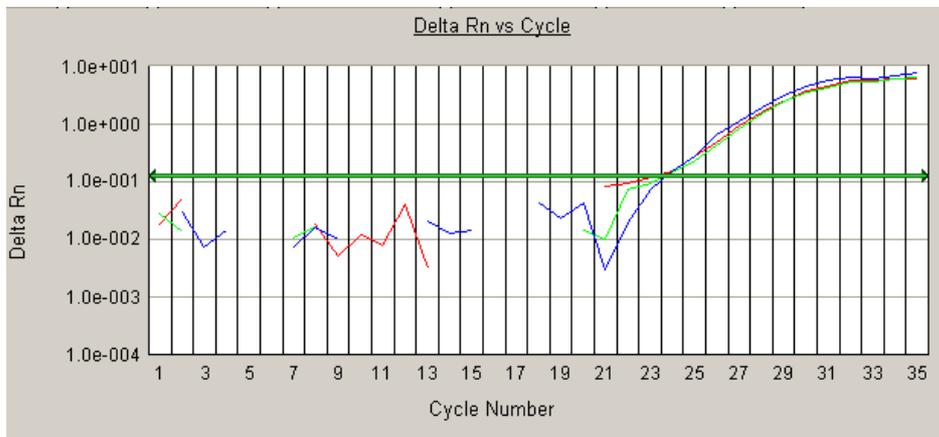
**Abbildung 4:** quantitative realtime-PCR-Analyse für das **Gen MYCN** in verschiedenen Proben. Signifikante MYCN-Amplifikationen zeigen sich in der Tumorzelllinie IMR sowie der Tumorprobe 9609P256. (Proben: PNET 5: rot, UW228: lila, 9805P620 pink, IMR: grün, 9609P256: blau)



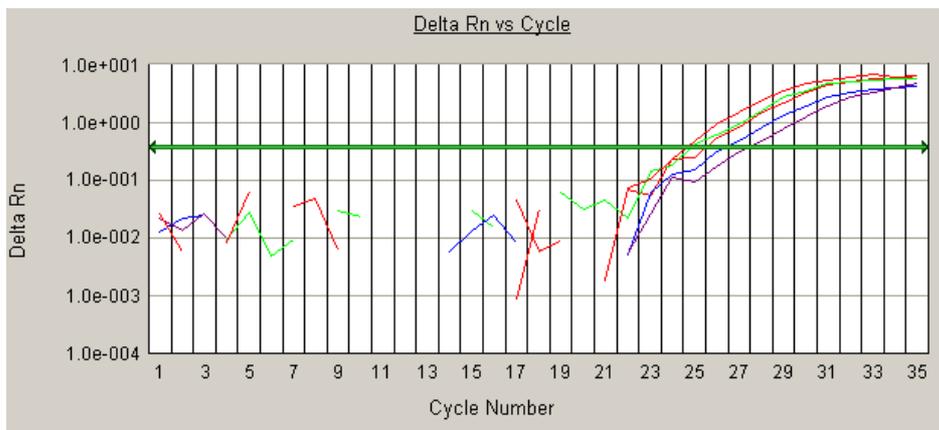
**Abbildung 5:** quantitative realtime-PCR-Analyse mit **Tumorzelllinie KCN**. Es zeigen sich Amplifikationen von MYCN und DDX1, NAG ist nicht koamplifiziert (untersuchte Gene: MYCN: rot, DDX1: grün, NAG: blau)



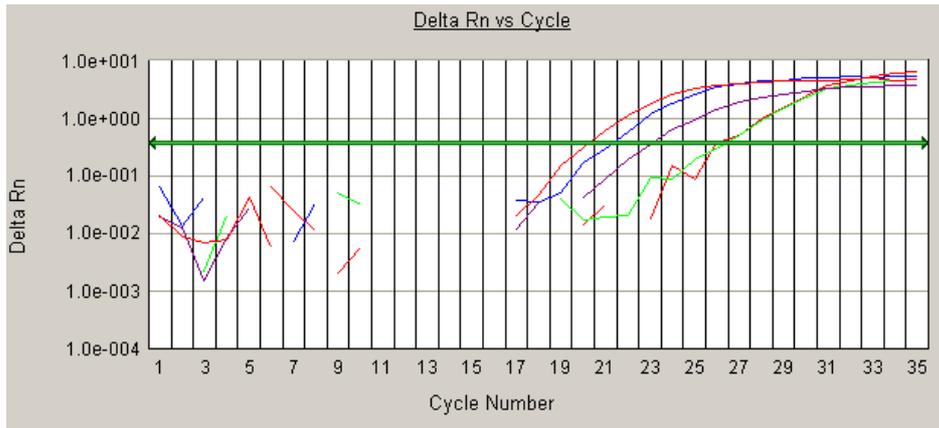
**Abbildung 6:** quantitative realtime-PCR-Analyse mit **Tumorzelllinie PFSK**, es sind keine Amplifikationen nachweisbar (untersuchte Gene: *MYCN*: rot, *DDX1*: grün, *NAG*: blau)



**Abbildung 7:** quantitative realtime-PCR-Analyse mit **Tumorzelllinie UW228**, es sind keine Amplifikationen nachweisbar (untersuchte Gene: *MYCN*: rot, *DDX1*: grün, *NAG*: blau)



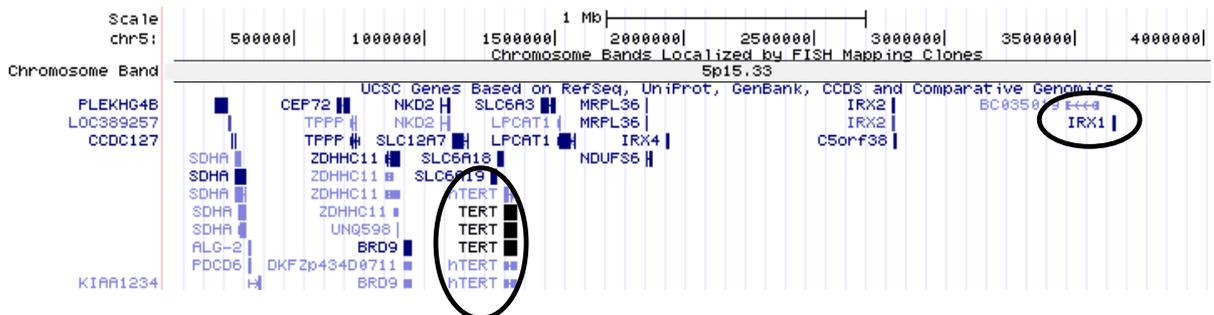
**Abbildung 8:** quantitative realtime-PCR-Analyse mit **Tumorgewebe 9805P620**. Es sind keine signifikanten Veränderungen der Kopienzahlen der untersuchten Gene darstellbar. (Referenzgene *BCMA* (rot) und *SDC4* (grün); *MYCN* (lila), *DDX1* (blau) und *NAG* (pink))



**Abbildung 9:** quantitative realtime-PCR-Analyse mit **Tumorgewebe 9609P256**. Es zeigen sich Amplifikationen von *MYCN* (lila), *DDXI* (blau) und *NAG* (pink), im Vergleich die beiden Referenzgene *BCMA* (rot) und *SDC4* (grün).

Bereits in den Voruntersuchungen mittels RLGS konnten 3 Tumoren identifiziert werden mit Zugewinn auf Chromosom 2p24. Nun wurden u.a. auch diese mittels qPCR weitergehend untersucht. Allerdings konnte lediglich in einem Medulloblastom (9609P256) eine signifikante *MYCN*-Amplifikation bestätigt werden (s. Abb.9). In den übrigen Tumoren sind möglicherweise eng benachbarte Regionen, die jedoch nicht die drei untersuchten Gene betreffen, verändert (s. Abb.8). Probe 9609P256 zeigte sowohl eine signifikante Amplifikation von *MYCN* als auch eine Koamplifikation der beiden benachbarten Gene *DDXI* und *NAG*. Es handelt sich hier also erneut um ein relativ großes Amplikon.

### 3.2.3. Genlocus 5p15.33 (*Irx1* und *hTERT*)



**Abbildung 10:** Genlocus 5p15.33, nach UCSC genome browser

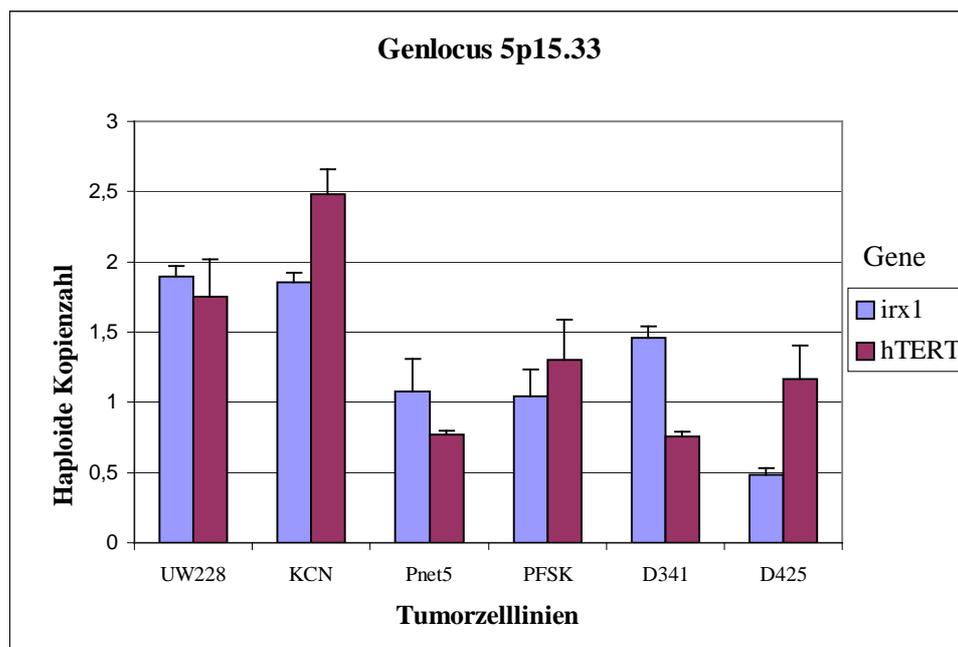
Im Bereich 5p15.33 liegen zwei Gene von Interesse, zum einen *hTERT*, welches für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert sowie weiter stromabwärts *IRX1* aus der Genfamilie der *Iroquois* Gene. Es wurde mittels qPCR analysiert, ob der in der CGH gezeigte Zugewinn chromosomalen Materials auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 einer selektiven Amplifikation im Bereich 5p15.33 entspricht, indem repräsentativ der Amplifikationsstatus der in dieser Genregion lokalisierten Gene *Irx1* und *hTERT* ermittelt wurde. Desweiteren wurde beleuchtet, inwieweit Begleiteffekte wie Koamplifikation aufgrund benachbarter geographischer Lage vorliegen.

Aufgrund der Seltenheit genomischer Amplifikationen und der verhältnismäßig kleinen Untersuchungszahlen, wurden wie o.g. die verwendeten Tumorproben anhand Voruntersuchungen gescreent. Weitergehend untersucht wurde u.a. solches Tumormaterial, welches in Voruntersuchungen mittels CGH einen Zugewinn an genetischen Material auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 aufwies.

### a. Amplifikationen in Tumorzelllinien

Im Folgenden wurden 6 Tumorzelllinien auf Amplifikationen im Bereich des Chromosoms 5p15.33, speziell der Gene *Irx1* und *hTERT* untersucht.

Es fanden sich in den untersuchten 6 Tumorzelllinien keine signifikante Amplifikation der Gene *Irx1* und *hTERT* auf Chromosom 5p15.33.



**Abbildung 11:** Amplifikationsstatus von *Irx1* und *hTERT* auf 5p15.33 in Tumorzelllinien, n=6

Es zeigte sich rein nominell eine Verdoppelung der Kopienzahl von *hTERT* in der Neuroblastomzelllinie KCN sowie in der Medulloblastomzelllinie UW228.

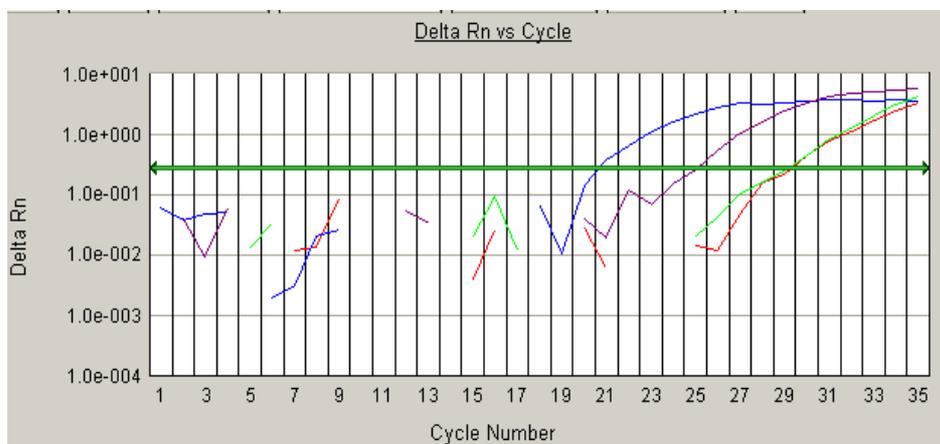
Das Signifikanzniveau war in beiden Fällen jedoch nicht erreicht. Auch scheint diese Veränderung nicht die einzelnen Gene, sondern die gesamte Genregion zu betreffen. Eine signifikante Differenz zwischen den Kopienzahl von *Irx1* und *hTERT* lag nicht vor.

### **b. Amplifikationen in primitiven neuroektodermalen Tumoren:**

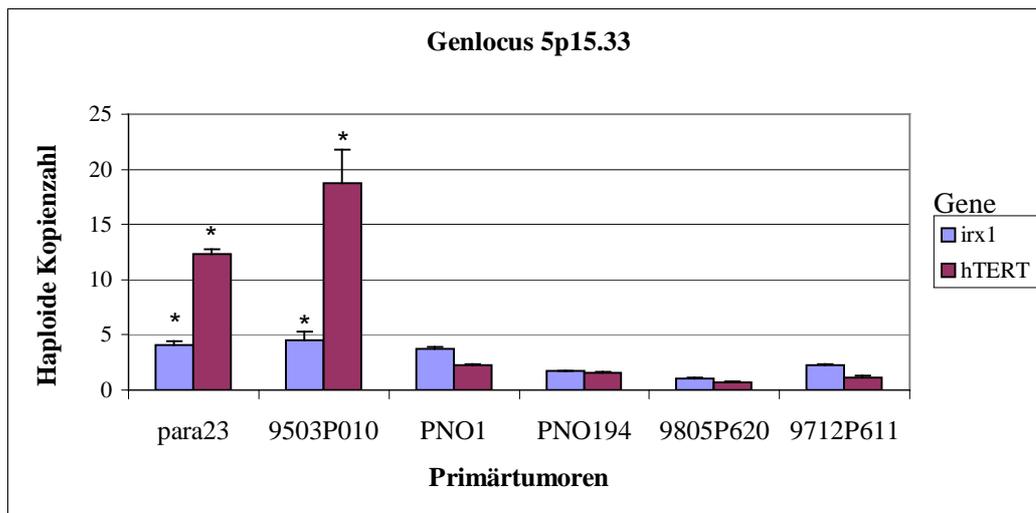
Die untersuchten cPNET-Proben zeigten in 33% (zwei von sechs Fällen) einen signifikanten Zugewinn der Kopienzahl im Bereich 5p15.33.

Die Untersuchung der Tumor-DNA sowohl von para 23 als auch PNO 9503P010 ergab eine signifikante Amplifikation im entsprechenden Genbereich.

Mittels qPCR zeigte sich eine Vervierfachung der vorliegenden haploiden Kopienzahl des Genes *Irx1* ( $p < 0,05$ ) sowie eine ca. zwölf bzw. knapp zwanzigfach erhöhte haploide Kopienzahl von *hTERT* ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 12:** quantitative realtime-PCR-Analyse, **Probe: 9503P010**. Es zeigt sich ein deutlich erniedrigter CT-Wert, entsprechend einer signifikant erhöhten Kopienzahl der Gene *hTERT* (blau) und *Irx1* (lila); Referenzen *BCMA* rot, *MYCN* grün dargestellt, beide in dieser Tumorprobe nicht amplifiziert.



**Abbildung 13:** Amplifikationsstatus von *Irx1* und *hTERT* auf 5p15.33 in Primärtumoren, n=6 (4 MB, 1 AT/RT, 1 cPNET)

In diesen beiden Tumoren (para 23 und 9503P010) waren die Kopienzahlen der beiden benachbarten Gene *Irx1* und *hTERT* auf 5p15.33 signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle, jedoch auch im Ausmaß der Amplifikation signifikant unterschiedlich. In beiden Fällen lag eine signifikant höhere Kopienzahl von *hTERT* im Vergleich zu *Irx1* vor.

### c. Amplifikationen in weiteren Hirntumoren:

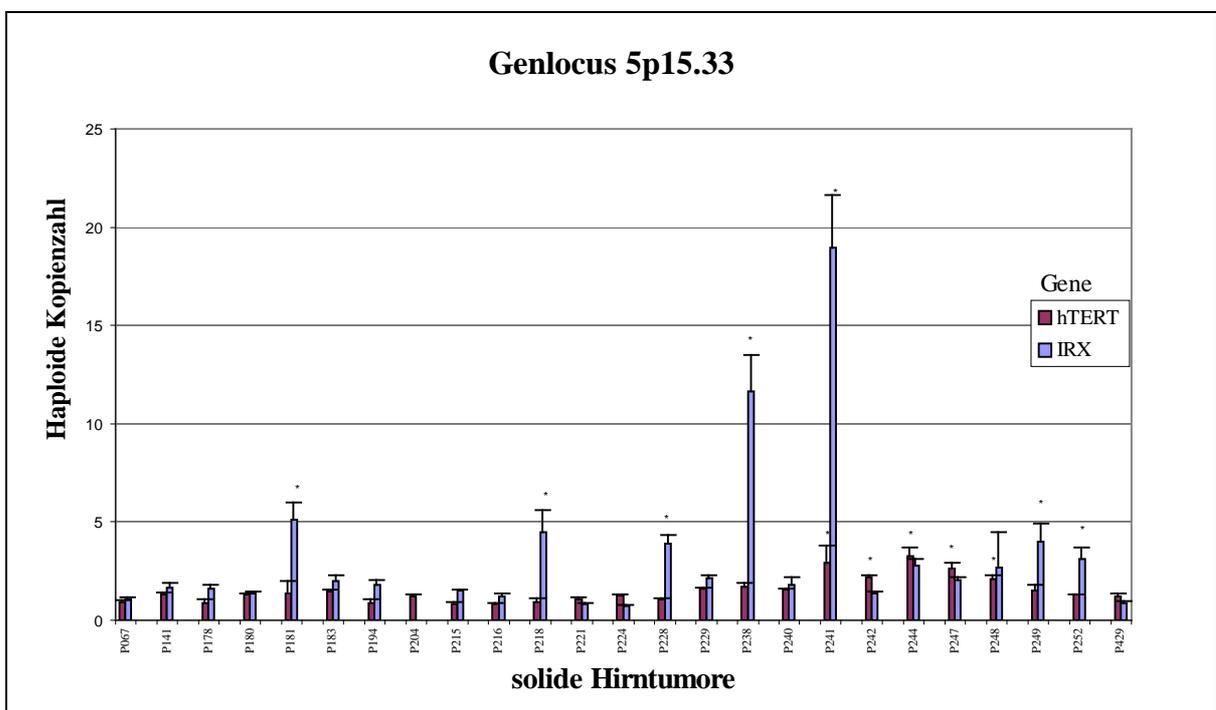
In der Analyse der 25 weiteren Hirntumoren zeigten 7/25 Proben (28%) einen signifikanten Zugewinn der Anzahl der Genkopien von *Irx1*. Es handelte sich hierbei um 5 Plexuspapillome, ein Plexus-Carcinom und ein Hypophysen-Carcinom.

6/7 Patienten waren männlichen Geschlechts, der Altersdurchschnitt lag bei 25,6 Jahren, wobei der jüngste Patient erst 5 Monate alt war.

Die Höhe der Amplifikation variierte hierbei von 5 bis hin zur 20-fach erhöhter Genkopienzahl.

Die Analyse dieser 25 Hirntumoren auf Amplifikation des *hTERT*-Gens ergab in 5/25 Proben (20%) eine signifikante Erhöhung der Kopienzahl. Es handelte sich in allen 5 Fällen um Proben von Plexuspapillomen, (4/5 männliche Patienten, Durchschnittsalter 45,8 Jahre).

In insgesamt 11/25 der untersuchten Hirntumoren (44%) konnten genomische Amplifikationen im Bereich des kurzen Armes von Chromosom 5, auf 5p15.33, gefunden werden. Betroffen waren sowohl das Gen *hTERT* als auch das Gen *Irx1* (in 7 respektive 5 Tumoren). Es fand sich jedoch lediglich ein Tumor (P241), ein Plexuspapillom I° eines 31-jährigen Mannes, in dem beide Gene auf 5p15.33 amplifiziert waren. Hier zeigte sich eine Verdreifachung der haploiden Kopienzahl von *hTERT* und eine 21fach erhöhte Kopienzahl des Gens *Irx1*.



**Abbildung 14:** Amplifikationen von *hTERT* und *Irx1* auf 5p15.33 in soliden cerebralen Tumoren, n=25

## 4. Diskussion

Die Diskussion der vorliegenden Arbeit soll sich schwerpunktmäßig mit folgenden Themen befassen:

- 1) Genetische und epigenetische Veränderungen in Tumoren und deren pathogenetische Relevanz
- 2) Evaluation und Diskussion des methodischen Ansatzes zur Detektion genomischer Amplifikationen
- 3) Diskussion der dargestellten Ergebnisse zu genomischen Amplifikationen und Koamplifikationen auf Chromosom 2 und 5

### Ad 1)

#### **Genetische und epigenetische Veränderungen in Tumoren und deren pathogenetische Relevanz**

Primäre Hirntumoren kommen in der Gesamtbevölkerung mit ca 2% deutlich seltener vor als z.B. Lungen-, Darm-, Brust- oder Prostatakarzinome. Im Kindesalter jedoch sind Tumoren des zentralen Nervensystems die häufigsten soliden Tumoren und nach den Leukämien die zweithäufigsten Tumoren insgesamt. Die Ursache dafür ist bislang ungeklärt. Ebenso sind die molekulargenetischen Mechanismen, die für die Entstehung primärer Hirntumoren ursächlich sind, noch weitestgehend unbekannt.

In Tumoren werden zahlreiche genetische Veränderungen (wie z.B. Mutation, Deletion, Amplifikation), aber auch epigenetische Phänomene (Methylierung, Demethylierung usw.) beobachtet, die zu einem gestörten Gleichgewicht zwischen Genen mit wachstumsfördernder und –hemmender Wirkung führen können. Das Wissen über solche Veränderungen ermöglicht eine gezielte Suche nach Angriffsstellen im Entstehungsprozess von Tumoren bzw. nach weiteren Therapiemöglichkeiten. Im folgenden werden einige dieser Veränderungen kurz beschrieben.

Die Methylierung der Cytidin-Basen der DNA ist die wichtigste epigenetische Veränderung. Dabei werden durch die DNA-Methyltransferasen DNMT postranskriptionell solche Cytidine methyliert, die innerhalb von Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden liegen. Diese GC-reichen chromosomalen Regionen, auch CpG-islands

genannt, liegen oft in Genpromotorbereichen. Die DNA-Methylierung in einer Promotorregion ist mit der Transkriptionshemmung, d.h. Inaktivierung, der assoziierten Gene vergesellschaftet (26, 43). Beispielsweise wird in ca 80% der Medulloblastome eine Hypermethylierung des Tumorsuppressorgenes *RASSF1A* auf Chromosom 3p21.3 beobachtet, welches eine pathogenetische Rolle bei der Tumorigenese des Medulloblastoms einnehmen soll (58).

Die am längsten bekannten genetischen Veränderungen betreffen die Basensequenzen in Form von Mutationen. Bei Medulloblastomen ist beispielsweise ein Isochromosom 17 (Loss of Heterozygosity LOH) als häufigste genetische Veränderung in 30-50% nachweisbar (53), welches möglicherweise zu einem Wachstumsvorteil für die Tumorzelle führt (5). An der Bruchstelle für die LOH, lokalisiert auf 17p11.2, ist eine epigenetische Veränderung zu beobachten: die CpG-Inseln weisen an diesem Genort eine Hypermethylierung auf. Ein durch diese Hypermethylierung inaktiviertes Suppressorgen konnte jedoch bislang nicht identifiziert werden. Das Tumorsuppressorgen *P53*, das distal von 17p13.1- p12 lokalisiert ist, ist nach heutigem Wissensstand für die Medulloblastomentstehung nicht bzw. nur in sehr seltenen Fällen relevant (6).

Die Identifizierung spezifischer Mutationen, die zu hereditären Syndromen mit erhöhter Inzidenz an zerebralen Tumoren führen, wie u.a. das Li-Fraumeni-, das Gorlin- oder das Turcot-Syndrom, haben wichtige Einblicke in die Tumorentstehung und Erforschung möglicher Therapieoptionen gegeben. Beispielsweise ist in ca 5 % der an Medulloblastomen erkrankten Kinder eine vererbte Keimbahnmutation bekannt.

Das Gorlin-Syndrom geht einher mit einer Heterozygotie im *patched-1* (*PTCH-1*)-Lokus auf Chromosom 9. Das *patched-1*-Protein (transporterähnlich aufgebaut mit 12-Transmembran-Domänen) spielt im Sonic Hedgehog Signalweg (SHH) eine bedeutende Rolle (83). Dieser ist eine essentielle embryonale Signalkaskade, die in verschiedenen Entwicklungsprozessen die Differenzierung von Stammzellen und Vorläuferzellen reguliert. Das Transmembranprotein „Smoothed homologue“ (SMO) aktiviert den Hedgehog-Signalweg, wohingegen *PTCH-1* als inhibierender Zelloberflächenrezeptor die Aktivierung des Signalweges unterdrückt durch eine Inhibierung von SMO. Hedgehog-Liganden heben durch eine Bindung an *PTCH-1* die inhibierende Wirkung auf SMO auf und führen so zu einer Aktivierung der Signalkaskade.

Mutationen im Hedgehog-Signalweg führen zu Störungen in dem kritischen Entwicklungsprozess der Kleinhirnreifung und unterstützen die Entstehung von Medulloblastomen. Im Mausmodell resultiert beispielsweise die heterozygote Deletion des murinen *PTCH-1*-Homologs *ptc1* in der Entwicklung von Medulloblastomen in etwa 1/3 der Mäuse bis zu ihrem 25. Lebensmonat (36). Dahingegen führt die Hemmung der Hedgehog-Signalkaskade durch SMO-Inhibitoren (z.B. Cyclopamin) und durch Hedgehog-Antagonisten zu einer Regression von Medulloblastomen in *ptc 1 +/-* - Mäusen (4, 71). In humanen Medulloblastomen konnten Jensen et al. (53) in ca 30% eine Aktivierung des HH-Signalweges nachweisen. Aktuell befindet sich der selektive SMO-Inhibitor GDC-0449 mit oraler Bioverfügbarkeit in einer Phase-I- klinischen Studie.

Auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gen *Irx1* der Iroquois-Familie wird durch den o.g. Hedgehog-Signalweg reguliert und kontrolliert (15).

Neben Punktmutationen und Deletionen bilden die Amplifikationen eine weitere wichtige genetische Veränderung in dem Prozeß der Tumorentstehung. Amplifikationen werden insgesamt weitaus weniger häufig als die übrigen Mutationen beobachtet. Der molekulargenetische Ablauf dieser Vervielfachung von Genbereichen wurde bereits einleitend erläutert. Beispielhaft für die Bedeutung von Amplifikationen spezifischer Gene kann das Gen *erbB2* (*HER2/neu*) beim Mammakarzinom genannt werden, dessen Proteinprodukt als membranständiger Oberflächenrezeptor zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren gehört (44). Es hemmt die Apoptose, den programmierten Zelltod, über den mTor-Signalweg. Über den RAS-MAP-Kinase-Signalweg kann es die Zellproliferation stimulieren. In etwa 20-25% aller invasiven Mammakarzinome ist dieser Rezeptor überexprimiert und kann ebenfalls als genomisch amplifiziert nachgewiesen werden. Diese Onkogen-Amplifikation korreliert mit der Malignität des Brusttumors (19). Der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab bildet eine hieraus resultierende spezifische Therapiemöglichkeit bei sogenannten „HER2/neu-positiven Tumoren“. Trastuzumab (Herceptin®) ist gegen den extrazellulären Teil des ErbB2-Rezeptors gerichtet, blockiert diesen und damit seine intrazelluläre Wirkung und seinen Einfluß auf die Tumorprogression.

In Neuroblastomen wird das Gen *MYCN* als Tumormarker genutzt. Sein Amplifikationsstatus in den einzelnen Tumoren gibt Hinweise auf den Krankheitsverlauf, Therapieansprechen bei Diagnosestellung sowie die Rezidivwahrscheinlichkeit.

Demgegenüber werden jedoch auch sporadische Amplifikationen in Tumoren gesehen, die möglicherweise einen Sekundäreffekt darstellen, der die Expression von Onkogenen steigert, die durch andere Mechanismen aktiviert wurden.

Das Ziel der Untersuchungen auf tumorspezifische genetische oder epigenetische Veränderungen und damit auch das Ziel der vorliegenden Arbeit liegt im Auffinden von molekularen Markern, welche die Diagnose, Prognose und Therapie einzelner Tumorentitäten beeinflussen und möglicherweise spezifische molekulare Therapieansätze darstellen (als Beispiele wurden u.a. GDC-0449 und Herceptin genannt). Zudem könnte in ihnen eine Möglichkeit liegen, Patienten in Risikogruppen einzuteilen, wie es bereits anhand des *MYCN*-Amplifikationsstatus in Neuroblastomen erfolgt. Würden Patienten mit einer schlechteren Prognose zuverlässig identifiziert werden, könnten sie schon initial intensiver behandelt werden. Dagegen könnte bei Patienten mit voraussichtlich besonders gutem Therapieansprechen die Therapieintensität verringert werden, um therapieassoziierte Spätfolgen, wie z.B. eine Retardierung nach Radiatio der kraniospinalen Achse bei Kindern, sowie das Risiko für Zweittumoren zu reduzieren.

## **Ad 2)**

### **Evaluation und Diskussion des methodischen Ansatzes zur Detektion genomischer Amplifikationen**

Es bestehen verschiedene methodische Ansätze, um genetische Veränderungen, speziell Amplifikationen, nachzuweisen.

Die Comparative Genomic Hybridization (CGH) ist eine Methode zur molekulargenetischen Analyse von Tumoren. Mittels eines einzelnen Hybridisierungsvorganges ist es möglich, einen Überblick über Veränderungen der DNA-Kopienzahl (Verluste, Deletionen und Zugewinne, Amplifikationen)

nachzuweisen und anhand normaler Referenz-Chromosomen vergleichend darzustellen, ohne dass die veränderten Regionen vorweg lokalisiert waren (45).

Eine weitere Methode ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), welche genutzt wird, um definierte Nukleinsäuresequenzen in zellulären Präparaten durch die Hybridisierung mit komplementären Probesequenzen (Sonden) zu visualisieren. Bei der FISH sind diese Sonden mit speziellem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Der Einsatz mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis verschiedener Strukturen.

Die RLGS (restriktion landmark genomic scanning) nutzt (zumeist methylierungsspezifische) Restriktionsenzyme, um die DNA zu verdauen und anschließend die radio-gelabelten Fragmente mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufzutrennen und Genalterationen darzustellen. Durch den Vergleich mit Kontroll-DNA können sowohl genetische als auch epigenetische Veränderungen gefunden werden, welche mit Hilfe einer spezifischen „Schnittstellen-Bibliothek“ Genklonen zugeordnet werden können (18). Zumeist dient die RLGS der Detektion von DNA-Methylierung und -Demethylierung, kann jedoch auch Amplifikationen darstellen. Die Intensität der Fragmente auf dem Audiographen korreliert dabei direkt mit der DNA-Kopienzahl.

Desweiteren kann die Polymerasekettenreaktion PCR zum Nachweis genomischer Amplifikationen genutzt werden, welcher sowohl semiquantitativ als auch quantitativ erfolgen kann. Der quantitative Nachweis ist mittels der realtime-PCR möglich. Bei dieser Methode wird jeweils eine Region von Interesse bzw. ein bestimmtes Gen vorweg festgelegt, um auf Amplifikationen untersucht zu werden. Es ist eine sehr spezifische Methode, die jedoch den Vorteil der absoluten Quantifikation im Gegensatz zu den vergleichenden Verfahren hat. Nachteile der realtime-PCR liegen zum einen in den recht hohen Kosten. Werden Taqman-Sonden benutzt, ist für jedes Gen von Interesse die Herstellung einer eigenen Sonde notwendig. Die kostengünstigere Variante liegt in der Benutzung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green, mit dem ohne targetspezifisch-gelabelte Proben viele verschiedene Zielgene analysiert werden können. SYBR Green bindet jede doppelsträngige DNA unter Ausstrahlung eines Fluoreszenzsignals. Ein zweiter Fluoreszenzfarbstoff ROX dient als interne Referenz zur Normalisierung des SYBR Green Fluoreszenzsignals und als Korrekturfaktor um

Pipettiergenauigkeit und Fluoreszenzfluktuationen in den einzelnen Probelösungen auszugleichen. Um Primerdimere und „Mispriming“ möglichst zu minimieren wird eine spezielle Pufferlösung sowie eine HotStarTaq-DNA-Polymerase verwendet, die während eines 15-minütigen Inkubationsschrittes bei 95°C erst aktiviert wird. Um die Spezifität des Amplifikationsproduktes darzustellen, werden Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. Im optimalen Falle sollte lediglich ein Maximum (Wendepunkt der Kurve) in Höhe des spezifischen Schmelzpunktes des amplifizierten Produktes entstehen. Sind mehrere Wendepunkte bei niedrigeren Temperaturen dargestellt, besteht hierbei eine Amplifikation von Primerdimeren und die Probe muss verworfen werden. (65) Für jeden PCR-Durchlauf wird die spezifische PCR-Effizienz mit Hilfe der Steigung  $m$  einer Standardkurve berechnet ( $E = 10^{-1/m}$ ). Nur bei einer Effizienz  $E$  von  $> 1.8$  handelt es sich um zuverlässige Ergebnisse (66,67).

Um neben der Effizienz der PCR-Reaktion den DNA-Gehalt der Probe absolut zu quantifizieren, werden in jedem PCR-Durchlauf genspezifische Standardkurven produziert. Hierbei handelt es sich um Verdünnungsreihen normaler DNA mit einem DNA-Gehalt von 0,1 bis 500 ng/μl. Die Proben selbst werden standardisiert mit einem DNA-Gehalt von 10 ng/μl aufgetragen. Jedoch auch hier sind Pipettiergenauigkeiten nicht sicher auszuschließen. Um zuverlässigere Ergebnisse zu erhalten, werden die Verdünnungsreihen je zweifach, die Proben mindestens dreifach untersucht. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen PCR-Durchläufen herzustellen, werden sämtliche Proben zusätzlich gegen Normalgewebe normalisiert. Pipettiergenauigkeit stellt also eine wichtige Fehlerquelle dar. Benutzt werden 384-well-Platten, wobei beim Pipettiervorgang eine hohe Konzentration zwingend notwendig ist. Wie o.g. wird jedes Gen mindestens dreifach untersucht, um „Probenfehler“ möglichst auszuschließen.

Ein systematisches Problem liegt in der Tatsache, dass lediglich einzelne Gene betrachtet und untersucht werden. Möglicherweise liegt das eigentliche Zentrum der genetischen Amplifikation auf einem benachbart liegenden Gen und es werden nur Koamplifikationseffekte dargestellt.

Aufgrund des Wissens über solche Koamplifikationen, wie anhand des Gens *MYCN* mit *NAG* und *DDXI* als koamplifizierte Gene dargestellt, liegt der Fokus der weiteren Untersuchungen dieser Arbeit speziell auf zwei benachbart liegenden Genen in einem Genbereich mit gehäuft auftretenden Amplifikationen (Chromosom 5p15.33). Der

Vergleich und die Korrelation von Amplifikationsmuster und –häufigkeit der beiden Gene erhält somit eine spezielle Bedeutung.

Es muss jedoch betont werden, dass es sich bei den genannten Beobachtungen lediglich um genetische Amplifikationen handelt. Inwieweit diese die Expression des untersuchten Genes beeinflusst und verändert, ist ein weiterführender Gesichtspunkt, der in Folgeuntersuchungen beleuchtet werden sollte. Eine Aussage über klinische Konsequenzen fällt in Zusammenschau der Ergebnisse auf genomischer sowie Expressionsebene deutlich leichter und ist wesentlich aussagekräftiger.

In der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen Verfahren zur Detektion genomischer Amplifikation kombiniert. Aufgrund der Seltenheit von genomischen Amplifikationen in Tumoren wurde in den Voruntersuchungen anhand weniger spezifischer Verfahren (wie CGH und RLGS) auf Genbereiche mit Amplifikationen gescreent. Regionen von Interesse und mögliche Zielgene wurden ermittelt, welche sodann durch qPCR geprüft und im Falle von Amplifikationen absolut quantifiziert wurden. Durch diese Selektion in den Voruntersuchungen erhält man jedoch letztendlich eine überrepräsentativ hohe Zahl an Amplifikationen, da lediglich solche Tumoren weitergehend untersucht wurden, die im entsprechenden Genbereich bereits Veränderungen vermuten ließen. Dieser ausgeprägte Bias wurde jedoch u.a. aufgrund des spärlichen Tumormaterials wissentlich in Kauf genommen.

### **Ad 3)**

#### **Genomische Amplifikationen und Koamplifikationen der Genregion 2p24**

In Neuroblastomen tritt eine Amplifikation von *MYCN* auf Chromosom 2p24 in ca 25% der Fälle auf und ist mit einer schlechten Prognose, raschem Tumorprogress und einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium assoziiert.

Es konnte gezeigt werden, dass das Amplicon 2p24 in vielen Fällen nicht nur *MYCN* sondern auch koamplifizierte Gene enthält, wie z.B. *DDXI* und *NAG*, die im gleichen Genlocus weiter stromaufwärts auf Chromosom 2p liegen. Eine Koamplifikation von *DDXI* im Rahmen einer *MYCN*-Amplifikation liegt in der Literatur in 40-70% vor, wobei deren prognostische Bedeutung bislang noch kontrovers diskutiert wird. In

einigen Studien zeigt sich ein Trend zur schlechteren klinischen Prognose bei Patienten mit *MYCN*- und *DDXI*-Amplifikation (31, 81), wohingegen andere Autoren keinen Zusammenhang zwischen Outcome, Überleben und Koamplifikation von *DDXI* fanden (20, 21, 59). Weber et al. konnten an ihrem Patientenkollektiv eine signifikante Korrelation von *DDXI*-Koamplifikation und besserer Prognose und Patientenüberleben zeigen (88). Kaneko et al. (46) fanden keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensstatistik der Patienten mit unterschiedlichem Amplifikationsstatus der drei Gene auf 2p24 (*MYCN*, *DDXI*, *NAG*). Auch konnten sie keine signifikante Verbindung zwischen Koamplifikationsstatus und Krankheitsstadium oder Alter bei Diagnosestellung ausmachen.

Amler und Schwab diskutierten schon 1989, dass eine niedrigere Kopienzahl bei *MYCN*-amplifizierten Tumoren in Verbindung steht mit einem großen Amplikon und einem geringerem Grad der Rekombination (89). Kaneko et al. zeigten an ihrem Kollektiv (113 untersuchte Tumore, 72 *MYCN*-Amplifikationen), dass Tumoren mit niedrigerem *MYCN*-Amplifikationslevel häufiger Koamplifikationen von *DDXI* und *NAG* aufweisen als solche mit high-level-Amplifikationen von *MYCN*. Sie zogen einen cut-off bei Kopienzahlen  $\geq 40$  *MYCN*-Kopien. Allerdings fanden sich in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit (46). Auch zeigten die Untersuchungen auf Expressionsebene weder für den Expressionsstatus von *DDXI* noch den von *NAG* eine signifikante Korrelation zu Überlebenswahrscheinlichkeit oder Krankheitsstadium bei *MYCN*-amplifizierten Tumoren.

In den hier untersuchten Proben fanden sich keine *MYCN*-Amplifikation mit Kopienzahlen  $\geq 40$  Kopien. Alle *MYCN*-Amplifikationen sind begleitet von Koamplifikation von *DDXI* bzw. *DDXI* und *NAG*, entsprechend der Beobachtungen von Kaneko et al (46).

Die untersuchten Neuroblastomzelllinien mit Amplifikation des Genlokus 2p24, IMR-32 und KCN, zeigen in der Höhe der Amplifikation der einzelnen Gene des Amplikons, d.h. *MYCN*, *NAG* und *DDXI*, keinen signifikanten Unterschied. Die Höhe der Kopienzahl liegt zwischen 20-30 Kopien.

In den Voruntersuchungen mittels RLGS zeigten drei Tumoren einen Zugewinn in der Genregion 2p24. In der Untersuchung der drei gewählten Gene dieses Genlokus mittels qPCR zeigte sich jedoch lediglich in der Tumorprobe 9609P256 eine signifikante Veränderung der Kopienzahlen der entsprechenden Gene. In den anderen beiden Tumorproben konnte mittels qPCR keine Amplifikationen bezüglich dieser drei Gene nachgewiesen werden. Möglicherweise sind eng benachbarte Gene amplifiziert bzw. benachbarte Genregionen verändert, die jedoch nicht die untersuchten Gene betreffen.

In einem Medulloblastom eines 6-jährigen Jungens (Probe 9609P256) zeigten sich in der qPCR alle drei Gene *MYCN*, *DDX1* und *NAG* amplifiziert. Es handelt sich hierbei also um ein relativ großes Amplicon. Die Kopienzahl von *MYCN* liegt jedoch auch hier < 40 Kopien. Sowohl *DDX 1* als auch *NAG* sind in diesem Tumor koamplifiziert. Das koamplifizierte Gen *NAG* liegt in signifikant höherer Kopienzahl vor als *MYCN*.

In den vorliegenden Studien zu Veränderungen auf Chromosom 2p24 ergab sich bislang noch nicht der Hinweis, dass ein relevanter Zusammenhang zwischen Level der Koamplifikation, d.h. Höhe der Kopienzahl, und Einfluss auf das klinische Outcome bestehe. Auch ergaben Untersuchungen des durch die genomische Amplifikation veränderten Expressionsstatus keinen Zusammenhang zu Krankheitsverlauf und Prognose.

### **Genomische Amplifikationen und Koamplifikationen der Genregion 5p15.33**

In den untersuchten Tumoren zeigt die chromosomale Region 5p15.33 ein gehäuftes Auftreten genomischer Amplifikationen. In diesem Bereich liegen zwei Gene von Interesse: *hTERT*, das für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert, sowie *Irx1*, die Matrize für ein Protein der Neurogenese.

Für ersteres konnte bereits in verschiedenen Geweben die spezifische Bedeutung in der Tumorigenese dargestellt werden. In Tumorentitäten wie u.a. Bronchial-, Zervix-, Mammakarzinomen und Neuroblastomen, konnte eine genomische Amplifikation von *hTERT* nachgewiesen werden (51), die zugleich assoziiert war mit einer erhöhten mRNA-/Proteinexpression und einer gesteigerten Telomeraseaktivität (12,13). Über eine *hTERT*- Amplifikation in soliden Tumoren des ZNS liegen hingegen nur wenige

Informationen vor. Fan et al konnten 2003 in einer Serie von 36 embryonalen soliden ZNS-Tumoren in 42% der Fälle mittels komparativer PCR eine relative hTERT-Amplifikation nachweisen (25). Desweiteren konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen erhöhtem Gengehalt und hTERT-mRNA-Level gezeigt werden. In Hinblick auf die Prognose ergab sich eine Assoziation zwischen hoher hTERT-Expression und schlechtem klinischen Outcome, diese Daten erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau (25). Myung et al. stellten 2005 einen Zusammenhang zwischen hTERT mRNA-Expression bzw. Telomeraseaktivität und Nachweis von kolorektalen Karzinomen bei Patienten mit florider Colitis-ulcerosa dar (64).

Die Funktion und pathogenetische Bedeutung des Gens *Irx1* ist beim Menschen noch weitgehend unerforscht. Bislang liegen auch noch keine Beschreibungen über genomische Amplifikationen vor. Bekannt ist zwar seine Bedeutung in der Formation der einzelnen Hirnbereiche, eine mögliche Beteiligung in der Entstehung von Hirntumoren ist jedoch (noch) nicht bekannt. Kürzlich beschrieben Czystowska et al. für *Irx2*, ein Gen der Iroquois-Familie, eine schützende Wirkung vor Tumor-induzierter Apoptose bei CD8+-T-Zellen (17). Funktionsbeschreibungen beim Menschen liegen für das Protein Irx1 jedoch noch nicht vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 37 Proben (davon 6 Tumorzelllinien und 31 ZNS -Tumoren) auf Amplifikationen im Bereich 5p15.33 untersucht. Insgesamt konnten in 13/37 Tumoren erhöhte Genkopien von *hTERT* und/oder *Irx1* gefunden werden. Dies entspricht einer Häufung von ca 35,14%.

Es wurden in 9/37 Proben (24,32%) Amplifikationen von *Irx1* gefunden, 7/37 Proben (19%) zeigten einen Zugewinn von Genkopien von *hTERT*. In 3 der untersuchten 37 Proben zeigten sich Amplifikationen die beide Genloki zugleich betreffen.

In den untersuchten Medulloblastomen/PNET konnten in 2/6 Tumoren Amplifikationen auf 5p15.33 nachgewiesen werden. Einer der beiden Tumoren war bereits in den Voruntersuchungen mittels RLGS untersucht worden und zeigte bereits hier einen Zugewinn in diesem Genbereich. Mittels der spezifischeren Methode der realtime-PCR konnte dieser genetische Zugewinn in Form von signifikanten Amplifikationen der beiden Gene *Irx1* und *hTERT* bestätigt werden. Interessanterweise waren in beiden Tumoren sowohl das Gen *Irx1* als auch *hTERT* betroffen, wie anhand der

Amplifikationsuntersuchungen mittels qPCR gezeigt. Die Höhe der Amplifikation der beiden Gene zeigte einen signifikanten Unterschied. In beiden Tumoren konnte eine signifikant höhere Kopienzahl von *hTERT* als von *Irx1* nachgewiesen werden.

In den übrigen untersuchten cerebralen Tumoren finden sich in 5/25 bzw. 7/25 Fällen signifikante Amplifikationen von *hTERT* bzw. *Irx1*, jedoch nur in einem Tumor einen Zugewinn genetischen Materials, welcher beide Gene betrifft.

Bei allen fünf Tumoren, die Amplifikationen im Bereich *hTERT* zeigten, handelte es sich um Plexuspapillome (WHO I), mehrheitlich waren die Patienten männlich (4/5 Patienten). Sechs der sieben Patienten, deren Tumoren Amplifikationen im Bereich von *Irx1* zeigten, waren ebenfalls männlich. Es handelte sich hierbei um 5 Plexuspapillome, ein Plexus-Carcinom sowie ein Hypophysen-Carcinom. Auffällig ist hierbei die Häufung des männlichen Geschlechtes, wobei zu beachten ist, dass es sich um ein sehr kleines Kollektiv handelt und die Geschlechtsverteilung im Kollektiv nicht ausgeglichen ist, lediglich 12/33 Tumorproben von weiblichen Patienten (36%).

Quantitativ betrachtet liegt in dem untersuchten Kollektiv die Kopienzahl bei Amplifikationen von *Irx1* deutlich höher als bei solchen von *hTERT*. Es fand sich tendenziell eine höhere Anzahl von *Irx1*-Amplifikationen.

Betrachtet man den Tumor (P241, ein Plexuspapillom ersten Grades, WHO I, eines 31-jährigen Mannes), der für beide Gene signifikante Amplifikationen zeigt, so finden sich hier eine deutlich höhere Zahl von Genkopien von *Irx1* als von *hTERT*. *hTERT* zeigt eine dreifache Amplifikation wohingegen *Irx1* 21-fach amplifiziert ist. Kann man aus dieser Tatsache schließen, dass das Gen *Irx1* den eigentlichen Kern der Amplifikation darstellt, die erhöhten Genkopien von *hTERT* lediglich einen Begleiteffekt im Rahmen einer Koamplifikation widerspiegeln?

Diesem scheint die Beobachtung an den untersuchten Medulloblastomen/PNET zu widersprechen. Die gefundenen Amplifikationen im Bereich 5p15.33 betreffen hier sowohl *hTERT* als auch *Irx1*. In allen Fällen zeigt sich in dieser Tumorentität jedoch eine signifikant höhere Anzahl von Kopien des Gens *hTERT*. Allerdings handelt es sich hier auch um WHO-Grad-IV-Tumore, wohingegen das Plexuspapillom (WHO I) ein langsam wachsender Tumor ohne deutlich erhöhte Wachstumsfraktion ist.

Insgesamt stellt sich aus diesen Beobachtungen der genetischen Veränderungen im Genlocus 5p15.33 die Frage, ob es sich um Amplifikationen mit pathogenetischer

Relevanz handelt. Ist lediglich eines der beiden Gene im untersuchten Genbereich der Hauptfokus der Amplifikation und liegt das andere nur aufgrund von Koamplifikationseffekten ebenfalls in erhöhter Kopienzahl vor? Oder hat die erhöhte Kopienzahl beider Gene für sich und/oder in Kombination eine pathogenetische Relevanz in der Tumorentstehung? Spielt die Höhe der Amplifikation (low-level- vs. high-level-Amplifikation) eine entscheidende Rolle oder ist lediglich die Tatsache, dass eine Amplifikation vorliegt ausschlaggebend? Wie sieht es auf der Expressionsebene/ Proteinebene aus: liegt ein erhöhter mRNA-Gehalt, vermehrtes Genprodukt vor, welche Auswirkung hat dieses?

Für genomische Veränderungen, die Chromosom 5p15.33 betreffen (*hTERT* und *Irx1*), liegen Daten zu o.g. Fragen und, ob ein Zusammenhang zwischen Höhe der Kopienzahl einer Amplifikation oder Level der Koamplifikationen und dem klinischen Outcome besteht, für die untersuchten soliden zerebralen Tumoren noch nicht vor

Da die Frage nach der pathogenetischen Relevanz insgesamt nicht allein durch Untersuchungen auf genomischer Ebene zu beantworten ist, sollten sich auch hier Untersuchungen auf Expressions- sowie Proteinebene anschließen. Die Erörterung der Fragen, ob ein erhöhter mRNA-Gehalt und vermehrtes Genprodukt vorliegt, führt möglicherweise auch zur Antwort, welches Gen, *hTERT* oder *Irx1*, eigentlicher Ziel-/Angriffspunkt der Amplifikation ist und welche Auswirkung diese Veränderungen auf die Tumorentstehung haben könnte.

Die Bedeutung der Telomerase im Prozeß der Tumorentstehung ist mittlerweile unumstritten. In Neuroblastomen beispielsweise ist die genomische Amplifikation des Gens *hTERT* bereits vielfach beschrieben und gut erforscht. Insofern liegt die Frage nach einer genomischen Amplifikation des Gens *hTERT* in weiteren soliden zerebralen Tumoren nahe und konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In der Literatur ist bislang noch keine genauere Untersuchung des Amplicons 5p15.33 und das Zusammenspiel der Gene, die auf dem Chromosom in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, beschrieben.

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals eine Amplifikation des Gens *Irx1* auf Chromosom 5p15.33, geographisch benachbart zu *hTERT*, in soliden Hirntumoren in relevanter Zahl nachweisen.

Zwar sind die Untersuchungen in dieser Arbeit lediglich auf die genomische Ebene beschränkt und können somit viele der o.g. Fragen nicht beantworten; dennoch lässt die relativ hohe Zahl der Amplifikationen von *Irx1* in den untersuchten zerebralen Tumoren eine pathogenetische Relevanz im Prozess der Tumorentstehung mutmaßen.

Weiterführende Untersuchungen sind daher notwendig, um die pathogenetische und ggf. auch klinische Relevanz der Ergebnisse tiefergehend zu erörtern.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Allen JC (1985) Childhood brain tumors: current status of clinical trials in newly diagnosed and recurrent disease. *Pediatr Clin North Am.* 32(3):633-51
2. Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE., Cepko CL. (1999). Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irx4*. *Science* 283. 1161-4
3. Bellefroid EJ, Kobbe A, Gruss P, Pieler T, Gurdon JB., and Papalopulu, N. (1998). *Xiro3* encodes a *Xenopus* homolog of the *Drosophila Iroquois* genes and functions in neural specification. *EMBO J.* 17. 191-203
4. Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, Beachy PA (2002) Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science.* 297(5586):1559-61
5. Biegel JA (1999). Cytogenetics and molecular genetics of childhood brain tumors. *Neuro-oncol.* 139-150
6. Biegel JA. (1997 ) Genetics of pediatric central nervous system tumors. *J Pediatr Hematol Oncol.* 19(6):492-501
7. Blackburn EH (2000) Telomere states and cell fates. *Nature* 408: 53-56
8. Bode U, Fleischhack G, (1998). Tumoren des Nervensystems im Kindesalter. *Neuroonkologie*, U. Schlegel, M. Westphal, Georg Thieme Verlag Stuttgart. 342-369
9. Boyd MC, Steinbok P (1987) Choroid plexus tumors: problems in diagnosis and management.. *J Neurosurg.* 66(6):800-5
10. Brodeur GM, Hayes FA, Green AA, Casper JT, Wasson J, Wallach S, Seeger RC. (1987) Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res.* 47(16):4248-53
11. Brodeur GM, Hogarty MD (2002) Gene amplification in human cancers: biological and clinical significance. In: Vogelstein B, Kinzler KW (Hrsg.) *The genetic basis of human cancer.* McGraw-Hill Professional, USA. 2<sup>nd</sup> edition. 1: 115-128
12. Brodeur GM. (1990) Neuroblastoma--clinical applications of molecular parameters. *Brain Pathol.* 1(1):47-54

13. Burger PC, Vogel FS, Green SB. (1985) Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma: Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 56:1106-11
14. Bürglin TR. (1997) Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* 25(21):4173-80
15. Cheng CW, Yan CH, Hui CC, Strähle U, Cheng SH. (2006) The homeobox gene *irx1a* is required for the propagation of the neurogenic waves in the zebrafish retina. *Mech Dev.* 123(3):252-63
16. Cohn SL, London WB, Huang D, Katzenstein HM, Salwen HR, Reinhart T, Madafoglio J, Marshall GM, Norris MD, Haber M. (2000) MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified MYCN. *J Clin Oncol.* 18(21):3604-13
17. Czystowska M, Han J, Szczepanski MJ, Szajnik M, Quadrini K, Brandwein H, Hadden JW, Signorelli K, Whiteside TL (2009) IRX-2, a novel immunotherapeutic, protects human T cells from tumor-induced cell death.. *Cell Death Differ.* 16(5):708-18
18. Dai Z, Weichenhan D, Wu YZ, Hall JL, Rush LJ, Smith LT, Raval A, Yu L, Kroll D, Muehlisch J, Frühwald MC, de Jong P, Catanese J, Davuluri RV, Smiraglia DJ, Plass C. (2002) An AscI boundary library for the studies of genetic and epigenetic alterations in CpG islands. *Genome Res.*12(10):1591-8
19. Dawkins HJ, Robbins PD, Smith KL, Sarna M, Harvey JM, Sterrett GF, Papadimitriou JM. (1993) What's new in breast cancer? Molecular perspectives of cancer development and the role of the oncogene *c-erbB-2* in prognosis and disease. *Pathol Res Pract.* 189(10):1233-52
20. De Preter K, Speleman F, Combaret V, Lunec J, Board J, Pearson A, De Paepe A, Van Roy N, Laureys G, Vandesompele J (2005) No evidence for correlation of DDX1 gene amplification with improved survival probability in patients with MYCN-amplified neuroblastomas. *J Clin Oncol.* 23(13):3167-8; author reply 3168-70
21. De Preter K, Speleman F, Combaret V, Lunec J, Laureys G, Eussen BH, Francotte N, Board J, Pearson AD, De Paepe A, Van Roy N, Vandesompele J. (2002) Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay. *Mod Pathol.* 15(2):159-66
22. De Preter K, Speleman F, Combaret V, Lunec J, Laureys G, Eussen BH, Francotte N, Board J, Pearson AD, De Paepe A, Van Roy N, Vandesompele J. (2002) Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in

- neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay. *Mod Pathol.* 15(2):159-66
23. Ellenbogen RG, Winston KR, Kupsy WJ (1989) Tumors of the choroid plexus in children.. *Neurosurgery.* 25(3):327-35
  24. Ellison D. (2002) Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 28(4):257-82
  25. Fan X, Wang Y, Kratz J, Brat DJ, Robitaille Y, Moghrabi A, Perlman EJ, Dang CV, Burger PC, Eberhart CG (2003) hTERT gene amplification and increased mRNA expression in central nervous system embryonal tumors. *Am J Pathol.* 162(6):1763-9
  26. Feinberg AP(2001). Methylation meets genomics. *Nat Genet* 27 (1): 9-10
  27. Fenichel G M (2005) *Clinical pediatric neurology*.. 5th edition, Elsevier
  28. Frühwald MC, O'Dorisio MS, Rush LJ, Reiter JL, Smiraglia DJ, Wenger G, Costello JF, White PS, Krahe R, Brodeur GM, Plass C. (2000) Gene amplification in PNETs/medulloblastomas: mapping of a novel amplified gene within the MYCN amplicon. *J Med Genet.* 37(7):501-9
  29. Frühwald, M. C. (2001). Medulloblastoma. *Encyclopedic Reference of Cancer Ed.*, Schwab M., Springer New York-Heidelberg. 537-539
  30. Funayama N, Sato Y, Matsumoto K, Ogura T, Takahashi Y. (1999). Coelom formation: binary decision of the lateral plate mesoderm is controlled by the ectoderm. *Development* 126. 4129-38
  31. George RE, Kenyon R, McGuckin AG, Kohl N, Kogner P, Christiansen H, Pearson AD, Lunec J (1997) Analysis of candidate gene co-amplification with MYCN in neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 33(12):2037-42
  32. Giangaspero F, Bigner SH, Giordana MT, Kleihues P, Trojanowski JQ (1997). Medulloblastoma. *Pathology & Genetics, Tumors of the Nervous System*, P. Kleihues, W.K. Cavenee. International Agency for Research on Cancer (IARC). 96-103
  33. Gómez-Skarmeta J, de La Calle-Mustienes E, Modolell J. (2001) The Wnt-activated Xiro1 gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates Bmp4. *Development.* 128(4):551-60
  34. Gómez-Skarmeta JL, Glavic A, del la Calle-Mustienes E, Modolell J, Mayor R (1998). *Xiro*, a *Xenopus* homolog of the *Drosophila Iroquois* complex genes, controls development at the neural plate. *EMBO J.* 17, 181-190

35. Gómez-Skarmeta JL, Modolell J. (2002) Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development. *Curr Opin Genet Dev.* 12(4):403-8
36. Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scot MP (1997) Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277:1109-13
37. Goriely A, Diez del Corral R, and Storey K.G. (1999). *c-Irx2* expression reveals an early subdivision of the neural plate in the chick embryo. *Mech.Dev.* 87, 203-6
38. Grady-Leopardi EF, Schwab M, Ablin AR, Rosenau W. (1986), Detection of N-myc oncogene expression in human neuroblastoma by in situ hybridization and blot analysis: relationship to clinical outcome. *Cancer Res.* 46(6):3196-9
39. Gupta N. (2003) Choroid plexus tumors in children. *Neurosurg Clin N Am.* 14(4):621-31
40. Hashimoto K, Nakagawa Y, Morikawa H, (2001) Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and c-myc protein in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines. *Carcinogenesis* 22: 1965-1970
41. Hashimoto K, Nakagawa Y, Morikawa H, Niki M, Egashira Y, Hirata I, Katsu K, Akao Y. (2001) Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and c-myc protein in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines. *Carcinogenesis.* 22(12):1965-70
42. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Ishii T. (1991) Immunohistochemical analysis of N-myc protein expression in neuroblastoma: correlation with prognosis of patients. *J Pediatr Surg.* 26(7):838-43
43. Jeltsch A. (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem.* 3(4):274-93. Review. Erratum in: *Chembiochem.* 3(5):382
44. Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka P, Visscher DW. (2000) Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol.* 13(1):37-45
45. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 10(4):231-43
46. Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, Isogai E, Nakagawara A, Kaneko M. (2007) Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the

- prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 133(3):185-92
47. Keles GE, Anderson B, Berger MS (1999) The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere. *Surg Neurol.* 52(4):371-9
  48. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 215–229
  49. Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F, Alt FW (1983) Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell.* 35(2 Pt 1):359-67
  50. Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, Troost D, Meeteren NS, Caron HN, Cloos J, Mrsić A, Ylstra B, Grajkowska W, Hartmann W, Pietsch T, Ellison D, Clifford SC, Versteeg R (2008) Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS ONE* 3(8):e3088
  51. Kyo S, Inoue M (2000) Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy? *Oncogene.* 4: 688-697
  52. Lafay-Cousin L, Strother D (2009) Current treatment approaches for infants with malignant central nervous system tumors. *The Oncologist.* 14: 433-444
  53. Lee Y, Miller HL, Jensen P, Hernan R, Connelly M, Wetmore C, Zindy F, Roussel MF, Curran T, Gilbertson RJ, McKinnon PJ. (2003) A molecular fingerprint for medulloblastoma. *Cancer Res.* 63(17):5428-37
  54. Lefkowitz IB, Rorke LB, Packer RJ, Sutton LN, Siegel KR, Katnick RJ. (1987) Atypical teratoid tumor of infancy: definition of an entity. *Ann Neurol* 22: 448–449
  55. Lewis M.T, Ross S, Strickland PA, Snyder CJ, Daniel CW. (1999). Regulated expression patterns of *IRX-2*, an *Iroquois*-class homeobox gene, in the human breast. *Cell Tis. Res.* 296: 549-54
  56. Li H, Lee TH, Avraham H (2002) A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. *J Biol Chem* 277, 23:20965-20973
  57. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114(2):97-109

58. Lusher ME, Lindsey JC, Latif F, Pearson ADJ, Ellison DW, Clifford S (2002). Biallelic Epigenetic Inactivation of the RASSF1A Tumor Suppressor Gene in Medulloblastoma Development. *Cancer Res* 62, 5906-5911
59. M. C. Frühwald, M. S. O'Dorisio, Z. Dai, L. J. Rush, R. Krahe, D. J. Smiraglia, T. Pietsch, S. H. Elsea, C. Plass (2001). Aberant Hypermethylation of the Major Breakpoint Cluster Region in 17p11.2 in Medulloblastomas but not Supratentorial PNETs. *Genes Chromosomes Cancer*. 30: 38-47
60. Manohar CF, Salwen HR, Brodeur GM, Cohn SL (1995) Co-amplification and concomitant high levels of expression of a DEAD box gene with MYCN in human neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 14(3):196-203
61. Meyerson M (2000) Role of telomerase in normal and cancer cells. *Journ of Clin Onc* 18: 2626-2634
62. Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7049-7053
63. Morin GB (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59:521-529
64. Myung SJ, Yang SK, Chang HS, Byeon JS, Kim KJ, Hong SS, Jeong JY, Lee SM, Hong WS, Kim JH, Min YI. (2005) Clinical usefulness of telomerase for the detection of colon cancer in ulcerative colitis patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 20(10):1578-83
65. Nisen PD, Waber PG, Rich MA, Pierce S, Garvin JR Jr, Gilbert F, Lankowsky P. (1988) N-myc oncogene RNA expression in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 80(20):1633-7
66. QuantiTect SYBR Green PCR Handbook. Qiagen 08/2003
67. Rasmussen, R. (2001): Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, and Nakagawara, K, eds. *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications* Springer Press, Heidelberg; ISBN 3-540-66736-9, 21-34
68. Reddy AT (1995) Atypical teratoid/rhabdoid tumors of the central nervous system. *J Neurooncol*. 75(3):309-325
69. Reynolds CP, Biedler JL, Spengler BA, Reynolds DA, Ross RA, Frenkel EP, Smith RG. (1986) Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy *J Natl Cancer Inst*. 76(3):375-87
70. Rice JM (2006) Inducible and transmissible genetic events and pediatric tumors of the nervous system. *J Radiat Res (Tokyo)* 47 Suppl B:B1-B11

71. Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL, Curran T. (2004) Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer Cell*. 6(3):229-40
72. Rorke LB, Packer RJ, Biegel JA (1996) Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood: definition of an entity. *J Neurosurg* 85: 56–65
73. Rorke, L. B., Hart, M. N. (1997). Supratentorial PNET. *Pathology & Genetics, Tumors of the Nervous System*, P. Kleihues, W.K. Cavenee. International Agency for Research on Cancer (IARC). 108-109
74. Schrimpf G, *Gentechnische Methoden*, Spektrum Akademischer Verlag 3. Auflage
75. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grzeschik KH, Naylor SL, Sakaguchi AY, Brodeur G, Trent J. (1984) Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature*. 308(5956):288-91
76. Scott D, Elsdon J, Pearson A, Lunec J. (2003) Genes co-amplified with MYCN in neuroblastoma: silent passengers or co-determinants of phenotype? *Cancer Lett*. 197(1-2):81-6
77. Scott DK, Board JR, Lu X, Pearson AD, Kenyon RM, Lunec J (2003). The neuroblastoma amplified gene, NAG: genomic structure and characterisation of the 7.3 kb transcript predominantly expressed in neuroblastoma. *Gene*. 307:1-11
78. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. (1985) Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*. 313(18):1111-6
79. Shafqat S, Hedley-Whyte ET, Henson JW (1999) Age-dependent rate of anaplastic transformation in low-grade astrocytoma. *Neurology*. 52(4):867-9
80. Slavic I, Ellenbogen R, Jung WH, Vawter GF, Kretschmar C, Grier H, Korf BR. (1990) myc gene amplification and expression in primary human neuroblastoma. *Cancer Res*. 50(5):1459-63
81. Squire JA, Thorner PS, Weitzman S, Maggi JD, Dirks P, Doyle J, Hale M, Godbout R. (1995) Co-amplification of MYCN and a DEAD box gene (DDX1) in primary neuroblastoma. *Oncogene* 10(7):1417-22
82. Tan JT, Korzh V, Gong Z. (1999). Expression of a zebrafish *iroquois* homeobox gene, *Ziro3*, in the midline axial structures and central nervous system. *Mech. Dev*. 87: 165-8

83. Taylor MD, Mainprize TG, Rutka JT. (2000) Molecular insight into medulloblastoma and central nervous system primitive neuroectodermal tumor biology from hereditary syndromes: a review. *Neurosurgery*. 47(4):888-901
84. Taylor RE, Donachie PH, Weston CL, Robinson KJ, Lucraft H, Saran F, Ellison DW, Ironside J, Walker DA, Pizer BL (2009) Impact of radiotherapy parameters on outcome for patients with supratentorial primitive neuro-ectodermal tumours entered into the SIOP/UKCCSG PNET 3 study. *92(1):83-8*
85. Tomita T, McLone DG (1983) Spontaneous seeding of medulloblastoma: results of cerebrospinal fluid cytology and arachnoid biopsy from the cisterna magna.. *Neurosurgery* 12(3):265-7
86. Tomita T, McLone DG (1986) Medulloblastoma in childhood: results of radical resection and low-dose neuraxis radiation therapy.. *J Neurosurg*. 64(2):238-42
87. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Girudice LC, Hoffman AR (1998) Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res*. 18: 4168-4172
88. Weber A, Imisch P, Bergmann E, Christiansen H. (2004) Coamplification of DDX1 correlates with an improved survival probability in children with MYCN-amplified human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 22(13):2681-90
89. Weith A, Martinsson T, Cziepluch C, Brüderlein S, Amler LC, Berthold F, Schwab M. (1989) Neuroblastoma consensus deletion maps to 1p36.1-2. *Genes Chromosomes Cancer*. 1(2):159-66
90. Wolff JE, Sajedi M, Brant R, Coppes MJ, Egeler RM. (2002) Choroid plexus tumours. *Br J Cancer*. 87(10):1086-91.
91. Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson Mo (1999) Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev*. 18: 2388-2399

## 6. Abkürzungen

APC	adenomatöse Polyposis Coli
APP	atypisches Plexuspapillom
AT/RT	atypischer teratoider/rhabdoider Tumor
CGH	comparative genomic hybridization
CPC	Choroidplexuskarzinom
CPP	Choroidplexuspapillom
CT	Computertomographie
Ct	Cycle treshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DDX1	Dead Box Homeoprotein 1
Dmin	double minutes
H <sub>2</sub> O	Wasser
HSR	homogeneously staining regions
hTERT	humane telomerase reverse transkriptase
IRX1	Iroquois Gen 1
LOH	loss of heterozygosity
MB	Medulloblastom
MRT	Magnetresonanztomographie
NAG	Neuroblastoma-amplified Gene
PBL	periphere Blutlymphocyten
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RLGS	restriction landmark genomic scanning
RT-PCR	reverse-Transkriptase-PCR
SHH	sonic hedgehog
WHO	world health organisation
ZNS	zentrales Nervensystem

