

Aus dem Labor für Hirntumorbiologie der Neurochirurgischen Klinik des UKE
der Universität Hamburg
Direktor Prof. Dr. H.-D. Herrmann
PD Dr. M. Westphal

**Das Tumorsuppressorgen p16/MTS1 in Gliomen - ein Vergleich des
Genstatus von Primärtumoren und ihren korrespondierenden
Zelllinien**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Christian Hartmann

aus Hamburg

1998

Angenommen von dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am :

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches der Medizin der Universität
Hamburg**

Sprecher :

Referent :

Korreferent :

**Denen, welchen ihre Herkunft es nicht ermöglichte, sich ihren
Fähigkeiten entsprechend zu entwickeln.**

Inhaltsangabe

Einleitung:	6
THEMENSTELLUNG	6
DAS WISSENSCHAFTLICHE UMFELD	6
Allgemeine Grundlagen	6
Die ersten p16 Beschreibungen	7
Punktmutationen und p16	8
Das familiäre Melanom	9
Methylierung von p16	9
p16 und andere Onkogene	9
p15 und seine Funktion	10
p19 (ARF) und p16	11
Die Cyclinkinaseinhibitoren der INK4 Gruppe	11
FUNKTIONELLE HYPOTHESEN DER ZELLYKLUSREGULATION	12
CDK's und der Zellzyklus	12
Die p16 Signalkaskade	14
ZIELE DIESER ARBEIT	15
Die Diskrepanz: Zelllinie - Primärtumor	15
Methodische Konzepte zur Lösung	17
Der eigene Ansatz	18
Material und Methoden	19
MATERIAL	19
Zellen	19
Geräte	20
Reagentien und Lösungen	21
Kits	22
METHODEN	23
DNA Extraktion	23
DNA Extraktion aus Paraffinschnitten	23
Allgemeine PCR Methodik	24
Spezielle PCR Methodik	24
Sequenzierung von PCR Produkten	25
PCR Coamplifikations Methodik	26
Gel-Darstellung der PCR Produkte	27
Photoquantifizierung von PCR Produkten	28
GenScan Quantifizierung von PCR Produkten	29
Resultate	30
ERGEBNISSE DER ZELLINIEN	30
p16 Exon 1 Status der Zelllinien	30
p16 Exon 2 Status der Zelllinien	31
p16 Exon 3 Status der Zelllinien	32
p15 Exon 2 Status der Zelllinien	34
Zusammenfassung der Ergebnisse an den Zelllinien und pRB	35
p16 und p15 in Korrelation zu p53	37
p16 Status früher Zelllinien	39
OPTIMIERUNG UND KRITISCHE BETRACHTUNG DER PHOTOQUANTIFIZIERUNG	39
Die Optimierungsversuche	39
Agarose als Photoquantifizierungsgel	40
VisiGel als Photoquantifizierungsgel	41
Filmmaterial bei der Photoquantifizierung	42
Die Ungenauigkeit und Schwankungsbreite der Photoquantifizierung	43

Abweichungen der Ratio bei differierenden DNA Konzentrationen.....	44
<i>Experimentelle Photoquantifizierung von Primärmaterial</i>	46
Photoquantifizierung von MTS1_e2 und Gi3a Ex. VIII.....	46
Photoquantifizierung von MTS1_e2 und Gi3a Ex. I.....	49
Photoquantifizierung von MTS1_e1 und Gi3a Ex. I.....	51
Zusammenfassender Vergleich	54
Die Grenze p16-positiv oder p16-negativ an Primärmaterial	54
ERGEBNISSE DER GENSCAN QUANTIFIZIERUNG AN PRIMÄRTUMOREN.....	55
<i>Die Optimierungsversuche</i>	55
PHOTOQUANTITATIVE RESULTATE AN PRIMÄRTUMOREN.....	58
<i>Der p16 Status von Gliomen</i>	58
<i>Der p16 Status von Menigeomen</i>	60
ERGEBNISSE DES PHOTOSCAN AN PRIMÄRTUMOREN DER ZELLINIEN	62
Diskussion	65
DIE KLASSISCHE TUMORTHERAPIE	65
ALTERNATIVEN IN DER TUMORTHERAPIE	66
DER P16 STATUS DER ZELLINIEN IM WISSENSCHAFTLICHEN KONTEXT	68
<i>Der p16 Status der Zelllinien</i>	68
<i>Der p15 Status der Zelllinien in Kontext mit p16</i>	69
KRITIK UND DISKUSSION DER QUANTITATIVEN P16 - PCR.....	71
<i>Die Grenzen der quantitativen PCR Methodik</i>	71
<i>Probleme der Photoquantifizierung</i>	73
<i>Das Schwellenwertproblem</i>	75
<i>Die quantitative PCR in der p16 Literatur</i>	76
DER P16 STATUS VON MENIGEOMEN.....	77
<i>Der wissenschaftliche Kontext</i>	77
<i>Analyse und Interpretation der Resultate</i>	78
DER P16 STATUS VON GLIOMEN.....	79
<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	79
DIE STABILITÄT DES TUMORSUPPRESSORGENES P16 IN ZELLKULTUR.....	80
KONSEQUENZEN	80
Zusammenfassung.....	82
Danksagung.....	83
Lebenslauf.....	84
Anhang	85
DAS PROGRAMM BMPNEU41.EXE.....	85
ERGEBNISBEISPIEL DES PROGRAMMES BMPNEU41.EXE	87
Literaturverzeichnis.....	88

Einleitung:

Themenstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung an Gliomen, ob die häufige von vielen Autoren beschriebene Deletion des Tumorsuppressorgens p16 in Zelllinien ebenfalls auch in den korrespondierenden Primärtumoren vorkommt. Dieses Gen wird, abhängig von den verschiedenen Autoren, auch MTS1, p16^{INK4a}, INK4a oder Cdkn2 genannt. Jedoch wird gegenwärtig wieder Abstand von der Bezeichnung "MTS1" genommen, da dieser Name bereits zuvor für das auf Chromosom 1p22 liegende „Malignant Transformation Suppression-1“ Gen besetzt wurde^{1,2}. Wie weiter unten detaillierter erläutert, so gibt es gegenwärtig auch weiterhin eine deutliche Diskrepanz zwischen den Befunden an Zellkulturen und an In-vivo Neoplasmen bezüglich dieses Genes und der Häufigkeit seiner Defekte. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es so gut wie keine Vergleiche zwischen untersuchten In-vivo und In-vitro Zellen, bei denen letztere direkt von ersteren abstammen. Diese Lücke der p16 Forschung zu schließen soll das Ziel der hier vorgelegten Arbeit darstellen.

Das wissenschaftliche Umfeld

Allgemeine Grundlagen

Schon seit längerem ist es durch zytogenetische Studien bekannt, daß bei vielen Neoplasmen (Zelllinien von Gliomen, Nicht-Kleinzellern der Lunge, Leukämien und Melanomen) Veränderungen innerhalb des kurzen Armes des Chromosomen 9 bestehen. Bei diesem Bereich handelt es sich um die Region 9p21, welche oft invertiert, transloziert oder homo- bzw. heterozygot deletiert ist. Aus dieser Beobachtung wurde dann gefolgert, daß sich in dieser Region des Chromosomen 9 ein Tumorsuppressorgen befinden muß^{3,4,5,6,7,8,9,10}.

Unabhängig von diesen Beobachtungen wurden Anfang der 90iger Jahre Kinasen beschrieben, welche mit Cyclinen interagierend über phosphorylierende Prozesse eine Steuerung des Zellzyklus bewirken. Diese wurden "Cyclin-dependend kinases" bzw. "CDK's" genannt^{11,12,13,14}.

Dabei wurde zwischen '91 und '93 gezeigt, daß u.a. die Kinase Cdk4 in 2 verschiedenen Komplexen vorkommt. Einerseits in einer Verbindung mit einem Multiproteinkomplex Cyclin D, p21 und PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), andererseits zusammen mit einem 16 Kda schweren Protein^{15,16,17,18}. Insbesondere letzterer Komplex fand sich gehäuft bei Neoplasmen, welche ein gestörtes Rb Gen haben¹⁹.

Die ersten p16 Beschreibungen

Serrano, Hannon und Beach²⁰ beschrieben dann Ende '93 einen cDNA Klon, der ein Protein synthetisierte, welches 148 AS lang und 16 Kda schwer ist. Aufgrund des Gewichtes des Produktes nannten sie das Gen "p16". Diese cDNA brachten sie in einem Plasmid in Hefezellen zwecks zusätzlicher Studien ein. Im weiteren gelang es ihnen zu zeigen, daß das resultierende Protein ausschließlich mit der Kinase Cdk4 und mit keinem anderen Protein interagiert. Das 16 Kda schwere Protein bewirkt eine Inhibition der Phosphorylierung von dem Protein Rb ohne allerdings das Tumorsuppressorgen p53 zu beeinflussen.

Kurz danach erschienen zwei Publikationen fast gleichen Inhaltes im Abstand. Beide Arbeitsgruppen gingen von den zytogenetischen Annahme aus, daß wahrscheinlich sich ein Tumorsuppressorgen in der Region 9p21 befinden müsse.

Nabori et al.²¹ begannen mit der Beobachtung, daß v.a. der Abschnitt von 9p21 betroffen ist, der zwischen dem MTAP Gen (Methyl-thio-adenosin Phosphorylase) und dem INK-2 Cluster liegt. Diese beiden Loci liegen auf dem Chromosom 9 und sind ca. 700 Kb voneinander entfernt. Als Arbeitshypothese nahmen die Autoren an, daß zwischen diesen beiden Loci sich das vermutete Tumorsuppressorgen befinden müsse.

Mittels „Chromosomal Walking“, ausgehend vom MTAP Gen, separierten sie dann ca. 15 KB Fragmente in Phagen, um anschließend über eine STS-PCR (Sequence Tagged sites) eine Bestimmung der Häufigkeit des Verlustes der amplifizierten Sequenzen zu erhalten, welche zwischen den beiden Genen liegen. Sie setzten dabei voraus, daß der am häufigsten verloren gegangene Sequenzabschnitt das gesuchte Suppressorgen enthalten wird. Die DNA des betreffenden Phagen aus der „Walking Library“ sequenzierten sie und fanden einen „open reading frame“. Die Sequenz entsprach der cDNA von Serrano, Hannon und Beach.

Diesen Sequenzabschnitt versuchten sie dann mittels der PCR Technik an Zelllinien zu amplifizieren. Es zeigte sich, daß 61% der Melanom Linien, 64% der Leukämie Linien und 87% der Gliom Linien dieses Gen verloren hatten.

Nabori et al. nannten das neue Gen CDK4I, CDK4 - Inhibitor.

Kamb / Gruis et al.²² arbeiteten mit einer gleicher Methodik. Sie fanden jedoch gleich 2 Sequenzen, die zu Serrano/Hannon/Beach paßten: MTS1 und MTS2, "Multiples Tumorsuppressorgen 1 bzw. 2". Das MTS1 Gen konnten sie in 3 Exon aufgliedern, das MTS2 Gen zeigte eine zu 93% identische Sequenz zum Exon II des MTS1 Genes, wobei jedoch die Homologie in Intron II abbricht und somit ein kürzeres Protein resultiert. Das Exon 1 vom MTS1 Gen bestimmten sie mit einer Länge von 126 Bp, Exon 2 mit 307 Bp, Exon 3 mit nur 11 Bp. Des weiteren suchten Kamb / Gruis et al nach einem weiteren MTS3 Gen, welches sie aber nicht finden konnten.

Dann analysierten sie 290 verschiedene Zelllinien und fanden in 46% MTS1 homozygote Deletionen. Jedoch war das MTS2 Gen deutlich häufiger noch nachweisbar. Bei Kamb / Gruis et al. zeigten 25 % aller Leukämie Linien und 82% aller Astrozytom Linien einen MTS1 Verlust. Nur in Zelllinien von Melanomen fanden die Autoren häufiger auch Punktmutationen.

In der nächste für die p16 Forschung wichtige Arbeit wurden erstmalig primäre Neoplasmen auf ihren p16 Status hin untersucht und es wurde dabei nur in 10 - 20% homozygote Deletionen des Genes gefunden²³. In den Neoplasmen mit 9p21 LOH Status, ("Lost of Heterozygosity", d.h., Tumorzellen, welche nur noch ein Allel des betreffenden Genes besitzen, da das korrespondierende Gen deletiert ist) zeigten sich Punktmutationen nur bei 3% aller Primärtumore. Ausschließlich bei Melanomen fanden sich gehäuft solche Mutationen, wie sie bei dem Tumorsuppressorgen p53 üblich sind. Denn entsprechend der Knudson'schen Hypothese²⁴ sollten LOH Neoplasmen im verbliebenen Allel eine Mutation zeigen, um als Tumorsuppressorgen in Frage zu kommen.

Aus diesen Beobachtungen wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die p16 Deletion nur eine Artefakt von Zellkulturen wäre, welcher den betreffenden Zellen einen Wachstumsvorteil ermöglicht. Das angebliche Tumorsuppressorgen p16 habe keinerlei Bedeutung für in-vivo Neoplasmen, ein noch anderes Suppressorgen müsse in der Region 9p21 liegen.

In der Antwort von Kamb auf dieses Studie formulierte selbiger eines der fundamentalen Probleme von p16 Untersuchungen an Primärtumoren²⁵: es wäre nicht berücksichtigt worden, daß primäre Neoplasmen auch immer kontaminierende Normalzellen enthalten und folglich diese in einer PCR immer ein positives Signal liefern würden. Jedoch bestätigte Kamb, daß die Deletion und nicht die Punktmutation der primäre Pathomechanismus bei p16 ist.

Noch 1996 wurde in einer Studie an Melanomen und an Melanom - Zelllinien eine um den Faktor 5 bis 6 erhöhte homozygote Deletionsrate kleiner Fragmente um den CDKN2 Locus herum gesehen. Auch diese Autoren diskutierten die Bedeutung von p16 an Primärtumoren und empfahlen, die an Zelllinien gewonnen Daten sehr kritisch bezüglich der tatsächlichen Bedeutung dieses Tumorsuppressorgenes zu bewerten²⁶.

Punktmutationen und p16

Eine Vielzahl von verschiedenen Arbeitsgruppen beschäftigten sich dann mit der Suche nach Punktmutationen innerhalb des p16 Genes^{27,28,29,30,31}. Dabei wurde zumeist die SSCP Technik oder die direkte Sequenzierung verwendet, es fanden aber in nur 0 - 3% auch Punktmutationen. So kann man alles in allem daraus schließen, daß, wie Kamb erstmalig behauptete, Punktmutationen unbedeutend für die Pathogenese des p16 Tumorsuppressorgen sind. Ausschließlich beim Adenokarzinom des Pankreas wurden Punktmutationen beschrieben⁸⁶.

Das familiäre Melanom

Wie bereits weiter oben angeführt, so fallen jedoch Melanome aus dieser Hypothese heraus, da dort öfters Punktmutationen sich zeigen. So konnte deutlich demonstriert werden, daß beim familiären Melanom häufig Punktmutationen in der Keimbahn der betreffenden Familien vorkamen. Es fanden sich bei 13 von 18 der die Krankheit betreffenden Familien p16 Varianten und nur 15 von 48 Patienten mit p16 Veränderungen hatten kein Melanom entwickelt. Diese 15 Patienten waren dabei auch noch deutlich jünger als die Erkrankten. Aus diesem wurde gefolgert, daß beim familiären Melanom mit großer Wahrscheinlichkeit p16 Punktmutationen in der Keimbahn die Ursache dieser Krankheit seien³².

Diesen Ergebnissen entgegen steht jedoch eine andere Untersuchungen, in welcher bei 38 Familien mit dem Krankheitsbild des familiären Melanoms nur in 2 Fällen eine p16 Punktmutation gesehen wurde. Die entsprechende Schlußfolgerung war es denn auch, daß das in der Region 9p21 vermutete Tumorsuppressorgen MLM nicht p16 und damit dieses nicht die Ursache der Krankheit sein könne, oder wenn doch, daß dann der Defekt außerhalb des eigentlichen Genes liegen müsse³³.

Methylierung von p16

Bei Untersuchungen an Zelllinien, bei welchen weder p16 Deletionen noch Punktmutationen gesehen wurden, fand man als weiteren Pathomechanismus methylierte CpG Islands in der Nähe des Exon I in 10 bis 25% der Fälle. Diese Linien transkribierten keine p16 mRNA mehr. Wenn nun mit 5'-Desoxyazacytidin die Methylierung entfernt wurde, war p16 mRNA bei diesen Zelllinien wieder nachweisbar. Die (Hyper-) Methylierung ist offenbar auch verantwortlich für die Inaktivierung des zweiten weiblichen X-Chromosomen und für die Ausschaltung des Von-Hippel-Lindau Tumorsuppressorgenes^{34,35}. Ein gleicher Pathomechanismus fand sich auch bei dem p15 Gen an Gliomen³⁶. Daraus folgerte sich hypothetisch ein "p16 - spezifischer Imprinter", welcher durch gezielte Methylierung bei der Embryogenese die p16 Aktivität reguliert und welcher offenbar selber im Falle von methylierten CpG Islands bei Neoplasien pathologisch verändert ist³⁷.

p16 und andere Onkogene

Etliche Arbeiten beschäftigten sich mit dem Phänomen der inversen Korrelation zwischen Rb und p16^{38,39,40,41}. Wahrscheinlich ist es für die Onkogenese ausreichend, wenn entweder p16 oder Rb ausfallen, ein zusätzlicher Vorteil entsteht dem Neoplasma wohl nicht, wenn beide verloren gehen. Dieses ist u.a. unter dem Gesichtspunkt zu sehen, daß beide Onkogene sich in einer Signalkaskade befinden (s.u.). Insgesamt ergeben sich so Zahlen von bis zu 86% an Zelllinien, u.a. auch von Glioblastomlinien, bei denen entweder Rb oder p16 defekt waren. D.h., offenbar handelt es sich um eine für die Tumorfehlregulation sehr wichtige Signalkaskade.

Hingegen ist keinerlei Korrelation zwischen p16 und p53 festzustellen, denn nach den gegenwärtig gültigen Modellen gibt es auch keinen Zusammenhang zwischen den Signaltransduktionswegen des p16- und des p53 Systems.

Einen weiteren relevanten Beitrag war der Nachweis, daß auch eine Überexpression der CDK4 Kinase bei Zelllinien möglich ist. Allerdings scheint dieses ein weitaus selteneres Phänomen als die p16- oder Rb-Aberationen zu sein⁴².

Des weiteren konnte gezeigt werden, daß es offenbar eine Verbindung zwischen einer p16 Deletion und einer EGFR Überexpression geben muß. Bei einer Studie an Glioblastomen fand sich dieses Muster in 71 % der Fälle, während eine EGFR Überexpression nur in 29 % der Fälle mit einer p53 Mutation einher ging⁴³. Wie diese Signalkaskade zwischen p16 und EGFR jedoch aussieht, ist gegenwärtig noch völlig offen.

p15 und seine Funktion

Das Polypeptid TGF- β ist ein multifunktionelles Polypeptid, welches u.a. auf Epithelien, Lymphozyten und Endothelien einen negativen Wachstumseffekt ausübt. So kommt es zu einem Arrest von Zellen in der G1 Phase nach TGF- β Exposition⁴⁴. Spätere Arbeiten zeigten, daß TGF- β eine Akkumulation von nicht-phosphoryliertem Rb bewirkt^{45,46}. Das nicht-phosphorylierte Rb nun hemmt die den Schritt G1 nach S im Zellzyklus.

Hannon und Beach⁴⁷, welche bereits als erste die p16 Sequenz publizierten (s.o.), nahmen sich dieses Phänomens an und fanden an den Kinasen CDK4 und CDK6 sowohl das bereits beschriebene Protein p16 als auch 2 weitere Proteine mit 15 bzw. 15,5 Kda Gewicht. Beim Western Blotting zeigten sich schwache Kreuzreaktionen zwischen dem p16-Antiserum und diesen 2 Proteinen. Mittels einer cDNA Phagen Library gelang es aus TGF- β -stimulierten Zellen eine Sequenz zu isolieren, welche sich mit geringer Affinität an die p16 Sequenz anlagerte. Nach Sequenzierung stellte sich heraus, daß das von Hannon und Beach gefundene Gen, welches sie p15^{INK4B} nannten, in den ersten 50 Aminosäuren zu ca. 44% und in den folgenden 81 zu 97% sequenzhomolog zu p16 ist und 25 kBp von diesem entfernt liegt. Danach bricht die p15 - p16 Gemeinsamkeit ab. Dann brachten sie die p15 DNA in Bakterien ein und zeigten, daß das Transcriptions- und Translationsprodukt sich spezifisch an die Kinasen CDK4 und CDK6 anlagerte, nicht aber an CDC2, CDK2 und CDK5. Nach TGF- β Exposition von Zellen fand sich keine Veränderung des p16 Levels, wohl aber ein deutlicher Anstieg von p15.

Aus diesen Befunden folgerten Hannon und Beach, daß offenbar p15 das extrazellulär gesteuerte Gegenstück zum intrazellulär-getriggerten p16 Tumorsuppressorgen darstellt. Folglich würde eine Tumorzelle, welche sowohl p16 als auch p15 verloren hat, gleich 2 wesentliche Steuergene eingebüßt haben.

Ein Vergleich mit dem MTS2 Gen von Kamb / Gruis et al. (s.o.)²² mit dem p15^{INK4B} Gen lieferte Sequenzhomologien auf der carboxy-terminalen Seite der Aminossequenz.

In einer weiteren Studie wurden die beiden Gene p16 und p15 auch im Genom von Mäusen gefunden. Dort liegen die beiden Gene auf dem Chromosom 4 in der Position C3 - C6⁴⁸. Jedoch zeigte sich in normalen Gewebe der Maus im Gegensatz zum Menschen keine p16 Expression, aber eine überall vorhandene p15 Aktivität.

p19 (ARF) und p16

Im Zuge einer detaillierteren Untersuchung des Umfeldes des p16 Genes wurden 2 Promotoren gesehen, welche 2 verschiedene Transkripte ermöglichten⁴⁹. Abhängig von diesen Promotoren entsteht entweder ein E1-alpha oder ein E1-beta genanntes Exon 1. Nach Splicing und Translation resultiert im Falle von der Exon 1 - Variante E1-alpha das bekannte p16 Gen, im Falle von E1-beta jedoch ein als p19 oder ARF bezeichnetes Protein. Beide Gene erwiesen sich als fähig, eine Wachstumshemmung zu induzieren⁵⁰. An Mäusen wurde nach einer gezielten Deletion ein Abbruch der Translation sowohl von p16 als auch von p19 (ARF) beobachtet⁵¹. Jedoch bewirkten gezielt eingebrachte Mutationen im Bereich des p16 Locus zwar eine Aufhebung des Wachstumsarrest, wenn p16 selber betroffen war. Wenn hingegen die Mutationen die p19 Splicevariante betraf, war kein Effekt bezüglich des Wachstums zu sehen⁵².

Die Cyclinkinaseinhibitoren der INK4 Gruppe

Zwei weitere Cyclinkinaseinhibitoren sind p18 und p19 (Op 18). Letzteres ist ein anderes Gen als das oben beschriebene p19 (ARF). Offenbar sind hier 2 verschiedene Gene gleich benannt worden. Dieses ist v.a. deshalb verwirrend, weil beide sich in einigem doch ähnlich sind. So bezeichnet man p16 auch als INK4A, p15 als INK4B, p18 als INK4C und p19 als INK4D. Für dieses p19 erscheinen desweiteren auch Namen wie Onkoprotein 18 (Op18), 19K, Metablastin, Stathmin und Prosolin in der Literatur. Die Bezeichnung INK4 Gruppe wurde gewählt, da alle 4 Gene bzw. ihre Proteine auf ihrer carboxyterminalen Seite Sequenzhomologien in Form von wiederholende Ankyrinmotiven von ca. 32 Bp Länge zeigen und eine hohe Affinität zu CDK4 zeigen^{53,54,55}. p18 (INK4C) und v.a. p19 (INK4D) zeigen jedoch zusätzlich eine im Detail noch unklare Aktivität bei der Steuerung des Zytoskeletts während der Zellteilung⁵⁶.

Aufgrund dieser Ähnlichkeit von p18 und p19 mit dem Tumorsuppressorgen p16 wurden letztere Gene ebenfalls auf ihre Bedeutung in Tumoren hin untersucht. Obwohl es mittels Transfektion an NIH 3T3 Mäusezellen gelang, einen G1 Arrest zu induzieren⁵³, so fand sich bei einer Studie an 100 humanen Zelllinien nur eine einzige p19 Mutation in Form einer singulären Basendeletion und keine p18 Mutation⁵⁷. Weitere Untersuchungen fanden ebenfalls nur sehr selten Defekte an p18 und p19 in Tumoren, so

daß die Bedeutung dieser CDK Inhibitoren für die Pathologie von Neoplasien wohl unbedeutend sein dürfte^{58,59}.

Funktionelle Hypothesen der Zellzyklusregulation

CDK's und der Zellzyklus

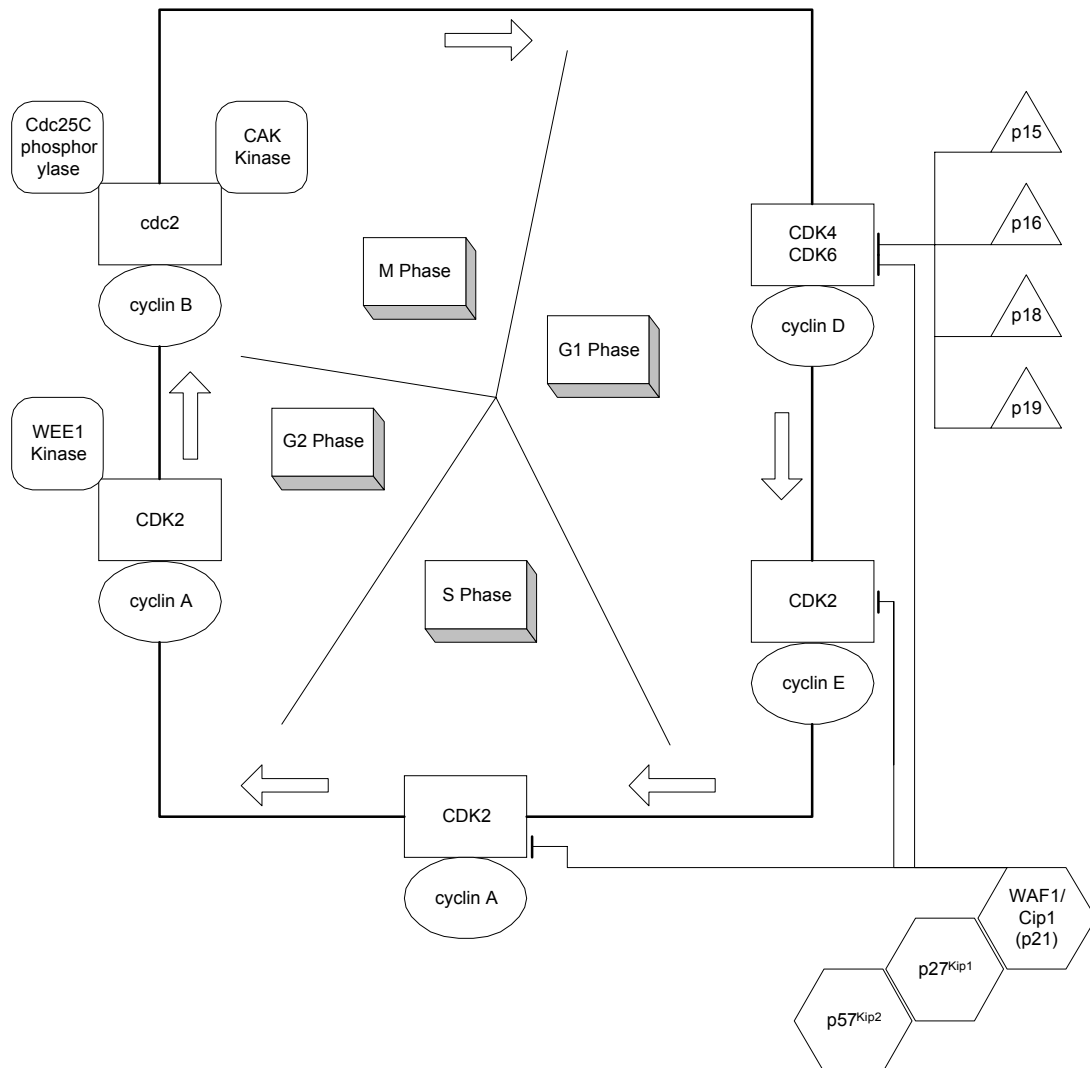


Abb. 1 : Modell der Zellzyklusregulation; genaueres siehe Text.

In diesem Modell⁶⁰ (Abb. 1) sieht man die Wirkung verschiedener Cyclin/CDK Komplexe auf unterschiedliche Phasen des Zellzyklus. Insgesamt sind gegenwärtig 11 Cycline (A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G und H) und 5 CDK's (CDC2, CDK2, CDK4, CDK6 und CDK7) bekannt. Offenbar handelt es sich bei diesen Multiproteinkomplexen um Effektoren, welche das Passieren von verschiedenen Checkpoints forcieren. Dabei kommt wahrscheinlich dem Checkpoint, welcher von dem Cyclin

D/CDK4- bzw. Cyclin D/CDK6- Komplex stimuliert wird, eine der größten Bedeutungen zu, da unmittelbar anschließend die DNA Replikation in der G1 Phase beginnt. Der Cyclin E/CDK2 Komplex initiiert dann die DNA Replikation, der Cyclin A/CDK2 Komplex ist kontinuierlich für die Progression der S Phase und der Cyclin B/CDC2 Komplex für den Eintritt in die Mitose erforderlich.

Auf diese den Zellzyklus forcierenden Cyclin/CDK Komplexe wirken die CDI's, die Cyclin-dependent Inhibitors, hemmend. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann man die CDI's in 2 Gruppen gliedern⁶¹. Spezifisch für den Cyclin D/CDK4- bzw. Cyclin D/CDK6- Komplex sind die Proteine p16 (INK4A), p15 (INK4B), p18 (INK4C) und p19 (INK4D). Dabei stehen sich p15 und p16 deutlich näher als p16 und p18. Wie bereits oben beschrieben, so liegen p15 und p16 auch in unmittelbarer Nähe zueinander in der Region 9p21. Weitere Sequenzhomologien zu diesen Proteinen fanden sich auch bei dem TAN1 Protein, dem menschlichen Gegenstück zum Drosophila Notch Protein⁶², bei den Zellzyklusproteinen CDC10 und SW16 der Hefen, bei dem humanen Erythrozytenprotein Ankyrin und bei dem menschlichen Protein des BCL3 Genes.

Die andere Gruppe von CDI's sind p21 (CIP1, WAF1, CAP20), p27 (Kip1) und p57 (Kip2), welchen eine gleiche homologe amino-terminale Domain haben.

Obwohl jedoch gerade p21, welches auch unter den Namen Cip1, WAF1, CAP20, PIC1 oder SDI1 in der Literatur beschrieben wird, an mehreren Cyclin/CDK Komplexen wirkt^{63,64}, so konnten bis jetzt noch keinerlei Mutationen nachgewiesen werden, außer in einem Fall, wo eine Punktmutation beschrieben wurde⁶⁵. WAF1/Cip1 wird durch p53 induziert⁶⁶, welches wiederum bei DNA Schäden aktiviert wird und die Zelle dann entweder in einen das Wachstum hemmenden Zustand versetzt oder gar in eine Apoptose überführt. Neben der hemmenden Wirkung auf die CDK's wurde WAF1/Cip1 auch als ein durch Alterung induziertes Gen beschrieben⁶⁷. Weitere WAF1/Cip1 stimulierende Faktoren sind offenbar verschiedene Wachstumsfaktoren wie TGF- β ^{68,69}, Phorbol-Esther⁷⁰, Myogenin und MyoD^{71,72}, so daß auch von einer bedeutenden Rolle bei der Zelldifferenzierung auszugehen ist.

Die CDI p27Kip1 ist zu 44% mit der CDI WAF1/Cip1 sequenzhomolog. Auch p27 inhibiert eine Vielzahl von Cyclin/CDK Komplexen, TGF- β oder Kontaktinhibition bewirken einen p27 vermittelten Wachstumsstop⁷³. Hingegen wurde an T-Lymphozyten gezeigt, daß Interleukin-2 einerseits den p27 Level erniedrigt, andererseits aber der WAF1/Cip1 Level ansteigen läßt⁷⁴. Aus diesem Befund leiteten die Autoren die Hypothese ab, daß offenbar p27 der primäre Regulator von ruhenden Zellen sein während WAF1/Cip1 die CDK's während der Zellteilung steuert. Den resultierenden Widerspruch dieser Hypothese mit der WAF1/Cip1 Funktion bei der Zelldifferenzierung an Myozyten (s.o.) begegnen die Autoren mit dem Verweis, daß die CDI's eventuell in den verschiedenen Zelltypen im Sinne einer „lineage specificity“ auch unterschiedliche Funktionen haben.

An der Regulation der Cyclin/CDK Komplexe sind auch Phosphorylasen beteiligt. So ist der Übergang in die Mitose, welcher von dem Cyclin B/CDC2 Komplex gesteuert wird, nur dann möglich, wenn es zu einer Dephosphorylierung der CDC2 durch die CDC25C^{75,76} und CAK⁷⁷ Phosphatasen kommt. In

vielen Tumor Zelllinien ist offenbar die Hemmung durch eine Phosphorylierung der CDC2 aufgehoben^{78,79}.

Die p16 Signalkaskade

Nachdem von unterschiedlichen Autoren verschiedene Modelle bezüglich der p16 Signalkaskade zur Diskussion gestellt worden sind, ergibt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt folgende Vorstellung:

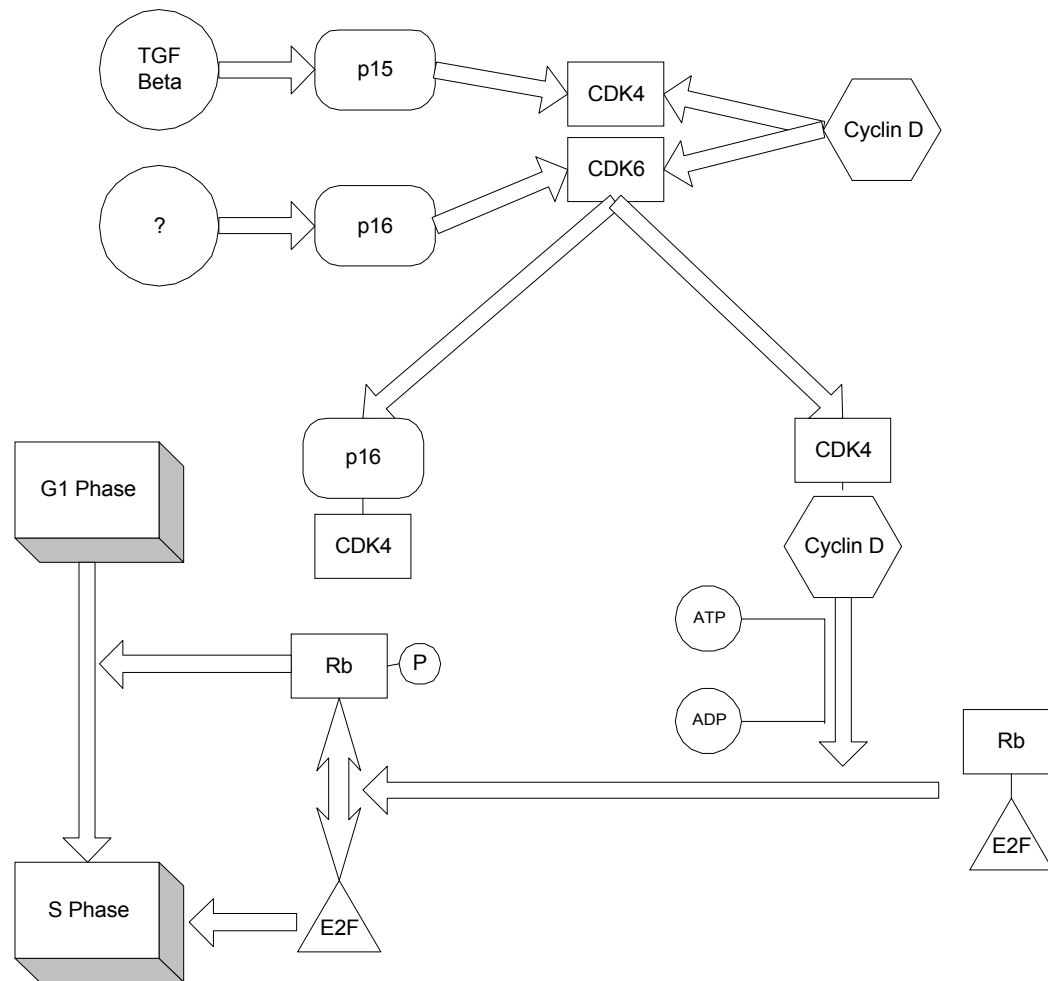


Abb. 2 : Modell der p16 Signalkaskade.

Am Beginn der Signalkaskade steht die Konkurrenz von den Proteinen p15 bzw. p16 um die Kinasen CDK4 und CDK6 mit dem Cyclin D. Wenn die Proteine p15 bzw. p16 vorhanden sind, dann bilden sie einen Komplex mit den CDK's 4 und 6, so daß andererseits dann die CDK's keinen Komplex mit dem Protein Cyclin D bilden können. Erst wenn die supprimierenden Proteine p15 und p16 nicht vorhanden sind, entsteht ein CDK/Cyclin Komplex, der dann unter ATP Verbrauch das Rb Protein phosphoryliert. Letzteres dissoziiert von dem Faktor E2F ab, mit welchem es zuvor einen Komplex gebildet hat, und stimuliert so den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus. E2F selber hat eine Wirkung auf die DNA Replikation im Sinne eines Transcriptionsfaktors in der S-Phase.

Nasmyth und Hunt⁸⁰ formulierten die Hypothese von "Dams and Sluises", welche besagt, daß es in ruhenden Zellen eine höhere p16- als CDK4/CDK6 Konzentration gäbe. Sämtliche Kinasen seien abgebunden und damit inaktiv. Jedoch steige im Laufe der Zeit die CDK4/CDK6 Konzentration über die des p16, der "Damm läuft über", und die CDK's könne sich mit dem Cyclin D verbinden und damit eine Mitose initiieren. Nach Abschluß der Mitose würden dann die CDK's und eventuell auch die Cycline proteolytisch zerlegt werden.

Ziele dieser Arbeit

Die Diskrepanz: Zelllinie - Primärtumor

Wie bereits weiter oben angedeutet, so ergaben verschiedene Studien an einerseits Zelllinien und andererseits an Primärtumoren eine zumeist deutliche Diskrepanz in der p16 Deletionsrate. Während an Linien homozygote Deletionsraten von bis zu 80 % gefunden wurden (s.o.), so ergab sich bei durch verschiedene Techniken untersuchtem Primärmaterial folgende Verteilung:

<i>Autor</i>	<i>Primärtumor</i>	<i>Zahl der Fälle mit Deletionen</i>	<i>Zahl der Fälle insg.</i>	<i>Zahl der Fälle mit Deletionen in %</i>	<i>Screening - Methode</i>
<i>Moulton⁸¹</i>	<i>GBM</i>	<i>9</i>	<i>27</i>	<i>33</i>	<i>PCR</i>
<i>Giani⁸²</i>	<i>Gliome</i>	<i>19</i>	<i>32</i>	<i>60</i>	<i>Quantitative PCR</i>
<i>Walker⁸³</i>	<i>Astrozytome</i>	<i>40</i>	<i>78</i>	<i>51</i>	<i>Quantitative PCR</i>
<i>Kratzke⁸⁴</i>	<i>Mesotheliome</i>	<i>12</i>	<i>12</i>	<i>100</i>	<i>Immunfärbung</i>
<i>Cairns²³</i>	<i>Verschiedene</i>	<i>8 - 16</i>	<i>75</i>	<i>10 - 20</i>	<i>Quantitative PCR</i>
<i>Kamb 1⁸⁵</i>	<i>Verschiedene</i>	<i>16</i>	<i>86</i>	<i>19</i>	<i>Microsatellite Markers</i>
<i>Kamb 2</i>	<i>Verschiedene</i>	<i>53</i>	<i>86</i>	<i>62</i>	<i>Direkte PCR</i>

<i>Caldas⁸⁶</i>	<i>Pankreas CA</i>	<i>10</i>	<i>27</i>	<i>37</i>	
<i>Herbert⁸⁷</i>	<i>T-Lymphozytome</i>	<i>20</i>	<i>24</i>	<i>83</i>	
<i>Schmidt⁸⁸</i>	<i>GBM</i>	<i>19</i>	<i>46</i>	<i>41</i>	
<i>Brenner⁸⁹</i>	<i>Mamma CA</i>	<i>14</i>	<i>24</i>	<i>58</i>	<i>Microsatellite Markers</i>
<i>Serra¹⁶⁹</i>	<i>Blastenkrise bei CML</i>	<i>3</i>	<i>17</i>	<i>18</i>	<i>Quantitative PCR</i>
<i>Cheng⁹⁰</i>	<i>Mesotheliom</i>	<i>5</i>	<i>23</i>	<i>22</i>	<i>Southern, Northern, PCR, SSCP</i>
<i>Ueki⁴¹</i>	<i>GBM</i>	<i>24</i>	<i>42</i>	<i>57</i>	<i>Quantitative PCR, SSCP</i>
<i>Ueki⁹¹</i>	<i>Astrozytome</i>	<i>15</i>	<i>30</i>	<i>50</i>	<i>Microsatellite Markers, PCR, SSCP</i>

Tabelle 1 : p16 Deletionsraten von Primärtumoren; CML: chronisch myeloische Leukämie.

Wie in der Tabelle zu sehen ist, so ergibt sich in den verschiedenen Untersuchungen eine Spannweite der Deletionsrate an Primärtumoren von 10% bis zu 100%. Bei z.B. Glioblastomen werden Werte von 33% und 57%, bei nicht weiter klassifizierten Gliomen Werte von 60% beschrieben. Bei Mesotheliomen ist die Schwankung noch extremer, sie liegt zwischen 22% und 100%.

Die wohl wahrscheinlichste Erklärung für diese widersprüchlichen Zahlen sind die unterschiedlichen Methoden der Untersuchung. So besteht einerseits das Problem von den Primärtumor kontaminierenden Normalzellen wie z.B. Endothelien, Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten. Diese Zellen lassen zumindestens theoretisch jede Methodik positiv ausfallen, welche auf einer gewöhnlichen PCR Amplifikation beruht, da sie immer ein intaktes p16 besitzen. Andererseits scheint die oft beschriebene 9p21 Deletion nur einen kleinen Abschnitt des Chromosomen zu umfassen, und zwar den Bereich des Tumorsuppressorgenes p16. So konnte gezeigt werden⁸⁵, daß bei Untersuchungen mit Microsatellite Markern, welche p16 flankierende Bereiche amplifizieren, nur 16 von 86 Tumore sich als p16 deletiert erwiesen. Wenn hingegen das p16 Gen direkt amplifiziert wird, dann zeigten sich hingegen 53 dieser 86 Neoplasmen als MTS1-verlustig. Dieser Befund ist insbesondere deshalb von Interesse, weil viele frühe Arbeiten mit Microsatellite Markern zur Identifikation eines LOH Status arbeiteten, um dann mittels einer SSCP nach Punktmutationen bei Tumoren zu suchen (s.o.).

Methodische Konzepte zur Lösung

Einerseits läßt sich diese Diskrepanz zwischen hoher Deletionsrate an Zelllinien und Primärtumoren aber auch mit dem Argument begründen, als daß es sich bei p16 nicht um das bei 9p21 vermutete Tumorsuppressorgen handelt, sondern, daß es dort noch ein anderes Gen geben muß. Andererseits jedoch nimmt p16 eine sehr bedeutende Rolle in der Inhibition des Zellzyklus ein, so daß von diesem Standpunkt aus betrachtet das Gen wahrscheinlich das gesuchte ist.

Um also zu beweisen, daß es sich bei p16 doch um das gesuchte Tumorsuppressorgen handelt, müssen anderen Methodiken angewandt werden, welche zuverlässig die Untersuchung von Primärtumoren ermöglichen. Als solche bieten sich die mindestens die folgenden 4 an:

1. p16 Transfektion - funktioneller Nachweis
2. p16 Nachweis mit Antikörpern
3. FISH Screening
4. Verbesserte PCR Methoden

Als funktioneller Beweis bietet sich die Transfektion von p16 deletierten Zellen mit eben diesem Gen an. Wenn diese Zellen nach erfolgreicher Transfektion geringer ausgeprägte Tumoreigenschaften haben, dann wäre dieses ein deutliches Zeichen dafür, daß p16 bei der Tumorigenese von Relevanz ist.

Okamoto⁹² machte Ende '94 zuerst ein solches Experiment. Er transfizierte verschiedene Zelllinien und nahm die Koloniausbreitungsfähigkeit als Maßstab der Malignität. Er konnte dann eine deutliche Wachstumsinhibition zeigen.

Arap et al.⁹³ transfizierte erstmalig Gliom Linien mit p16 cDNA und fand ebenfalls ein deutlich reduziertes Wachstum als Folge dessen.

p16 spezifische Antikörper bieten die Möglichkeit, an Schnitten von Primärtumoren eindeutig p16 exprimierende von nicht-exprimierenden Arealen zu differenzieren und diese histopathologisch zu beurteilen. Z.Zt. gibt es 2 verschiedene p16 Antikörper, den der Arbeitsgruppe von Serrano/Hannon/Beach²⁰, welchen sie verschiedenen andere Gruppen zur Verfügung gestellt hatten, und den kommerziellen Antikörper der Firma PharMingen. Einige Arbeitsgruppen haben diesen bisher verwendet, jedoch soll dieser Antikörper laut Firmenspezifikation nicht zur Linien- oder Gewebsfärbung geeignet sein. Kratzke et al.⁸⁴ konnte aber dennoch mit diesem Antikörper sowohl Monolayer als auch in Paraffin eingebettet Gewebsschnitte erfolgreich färben.

Beim FISH Screening („Fluorescence in Situ Hybridisation“) werden mit fluoreszierenden Substanzen gelabelte cDNA Probes auf Zellen gegeben. Die Probes lagern sich an die entsprechenden komplementären

tären genomischen DNA Abschnitte an und ermöglichen somit den mikroskopischen Nachweis u.a. des Vorhandenseins beider Allele eines Genes. Im Gegensatz zur Immunhistochemie bietet diese Methode zusätzlich Aussagen bezüglich des LOH Status an. Aufgrund der geringen Punktmutationsrate bei p16 ist das Interesse an der Ermittlung des LOH Status jedoch gesunken, so daß diese technisch schwierige Methode bezüglich p16 unbedeutend geworden ist^{92,94}.

Ebenfalls über verbesserte PCR Methoden sind Aussagen bezüglich des qualitativen p16 Status in Primärtumoren möglich. Wenn man z.B. eine PCR entwickelt, welche in einem Ansatz sowohl ein Gen, welches essentiell lebensnotwendig für jede Zelle und damit auch in jeder vorhanden ist, als auch einen p16 Abschnitt amplifiziert, so sollte das Verhältnis beider resultierenden DNA Produkte eine Aussage bezüglich des prozentualen Anteils an p16 positiven Zellen ermöglichen. Eine entsprechende oder ähnliche Methodik wurde unterdessen von mehreren Autoren bezüglich der p16 Fragestellung beschrieben^{23,82,83,95}.

Der eigene Ansatz

Die wohl einfachste Lösung zur Klärung der Diskrepanz der p16 Deletionsrate zwischen Zelllinien und Primärtumoren wäre der Vergleich beider miteinander, wenn beide miteinander korrespondieren würden. Da dieses einfache Konzept jedoch bis jetzt kaum umgesetzt wurde, liegt v.a. an dem allgemeinen Problem, daß es nur noch von wenigen Zelllinien hoher Passagezahl auch noch Primärmaterial gibt.

Eben dieses Problem hatte auch Izumota⁹⁵, der als erster Zelllinien mit ihren korrespondierenden Primärtumoren verglich und dabei zu dem Ergebnis kam, daß in allen Fällen der p16 Status vom Primärtumor zur Linie konstant blieb. Ihm standen allerdings nur 2 Zelllinien von Gliomen zur Verfügung, welche 50 bzw. 60 Passagen gelaufen sind. Bei 12 weiteren Linien konnte er nur 3 bis 5 Passagen vorweisen. Aber wenn die p16 Deletion tatsächlich ein Artefakt von Zellkulturen darstellt, dann resultiert daraus die Frage, ob dergleichen bereits schon zu frühen Passagen eintritt.

Des weiteren ist an dieser Arbeit die Methodik fragwürdig, welche er anwendete, um an den Primärtumoren den p16 Status zu bestimmen. So hat er ebenfalls 2 Primerpaare pro PCR-Ansatz verwendet und dann eine DNA Verdünnungsreihe mittels dieser Primer gewonnen. Bei p16 deletierten Zelllinien bestimmte er dann die DNA-Konzentration, bei welcher der Kontrollprimer noch eine Bande macht, der p16 Primer hingegen keine Bande mehr liefert. Daraus folgerte er die Hypothese, daß bei dieser Konzentration an DNA die kontaminierenden Normalzellen nicht mehr ausreichen, um sich zu zeigen.

Wenn der Primärtumor hingegen p16 positiv wäre, dann würde man, so sein Konzept, eine Bande sehen. Diesen einmalig gewonnen DNA Verdünnungsfaktor wendete er dann auf alle Versuchsansätze an, indem er voraus setzte, daß in allen Primärtumoren tatsächlich eine konstante Menge an nicht transformierten Normalzellen vorhanden ist. Aber gerade dieses ist eher fraglich, wie eigene Ergebnisse zeigen (s.u.).

Außerdem dürfte Izumoto Erstbeschreiber des Phänomens sein, daß bei vielen seiner Tumore Exon 1, 2 oder 3 alleine deletiert sind. Dieses steht im krassen Gegensatz zu u.a. eigenen (s.u.) und auch vielen fremden Ergebnissen anderer Untersucher, die eindeutig zeigen, daß entweder alle oder gar kein Exon bei p16 verloren geht. So steht die Frage im Raum, ob seine PCR's wirklich verläßlich funktionierten.

Diese Arbeit nun will diesen Ansatz aufgreifen und unter verbesserten Bedingungen nachvollziehen. Als Grundlage dienen die 31 Zelllinien des Labors der Hirntumorbiologie der neurochirurgischen Klinik des UKE. Bei den Linien, bei welchen eine p16 Deletion vorliegt, soll dann der p16 Status des korrespondierenden Primärtumor mittels einer quantitativen PCR ermittelt werden um so Aussagen bezüglich der Stabilität des p16 Status zu erlangen.

Material und Methoden

Material

Zellen

Die untersuchten Zelllinien entstammen der Abteilung für Neurochirurgie des Universitätskrankenhauses Eppendorf. Ihre Etablierung und Vermehrung wurde bereits beschrieben⁹⁶.

Zelllinie	Geschlecht	Alter	Histologie
NCE-G22	F	56	GBM
NCE-G28	M	66	GBM
NCE-G44	M	64	GBM
NCE-G55	F	65	GBM
NCE-G59	M	66	GBM
NCE-G60			GBM
NCE-G61	M	58	GBM
NCE-G62	M	4	GBM
NCE-G63	F	52	GBM
NCE-G84	M	47	GBM
NCE-G96	F	9	GBM
NCE-G111	F	47	GBM
NCE-G112	F	51	GBM
NCE-G118	M	54	GBM
NCE-G120	F	59	GBM
NCE-G121	M	53	GBM Rezidiv
NCE-G122	M	50	GBM

NCE-G123	M	68	GBM
NCE-G124	M	58	GBM
NCE-G130	M	51	GBM
NCE-G140	M	59	GBM
NCE-G141	M	54	GBM
NCE-G142	M	58	GBM
NCE-G167		50	GBM
NCE-G168		70	GBM
NCE-G169		70	GBM
NCE-G195		55	GBM
NCE-G197		71	GBM
NCE-G260		50	GBM
NCE-G270		52	GBM
NCE-G350		52	GBM

Tabelle 2 : Übersicht über die verwendeten Zelllinien aus der Neurochirurgischen Klinik des UKE.

Fomalinfixierte Paraffinschnitte der zu diesen Zelllinien korrespondierenden Primärtumoren entstammen der Abteilung für Neuropathologie (Dir.: Prof. Dr. Dr. Dr. D. Stavrou) des Universitätskrankenhauses Eppendorf.

Bei den primären 47 Gliomen handelt es sich um Operationsmaterial der neurochirurgischen Klinik des UKE. Nach histopathologischer Diagnose der Abteilung für Neuropathologie (Dir.: Prof. Dr. Dr. Dr. D. Stavrou) des Universitätskrankenhauses Eppendorf handelt es sich um 15 Glioblastome, 4 Astrozytome, 19 Oligodendrogliome, 6 Mischgliome und um 1 Gangliogliom. Von 2 Gliomen lag zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Histologie vor. Diese Gliome waren nach WHO Klassifizierung 4 Grad I-, 14 Grad II-, 9 Grad III- und 16 Grad IV Gliome. 4 Gliome waren nicht klassifiziert worden.

Gleicher Herkunft und Klassifizierung waren 1 Hämangiozytom, 3 Meningosarkome und 36 Meningeome. Letztere gliederten sich in 16 Grad I-, 15 Grad II- und 5 Grad III Meningeomen. Diese Tumore wurden außerhalb der eigentlichen Fragestellung dieser Studie analysiert.

Geräte

- ABI Prism 310 Genetic Analyser Version 2.0.2, Perkin Elmer
- ABI Prism 377 Genetic Analyser Vers. 2.1.1, Perkin Elmer
- Allegro Rotator
- Biometra Personal Cycler PCR Maschine
- Biometra TGGE Machine
- Biometra Thermoblock II

- Biometra UNO II PCR Maschine
- CONSORT Microcomputer Electrophoresis Power Supply
- Dialysefilter
- Electrophoresis Power Supply EPS 500/400, Farmacia Fine Chemicals
- Eppendorf Centrifuge 5412
- Eppendorf Centrifuge 5413
- Eppendorf Centrifuge 5415c
- Eppendorf Thermostat 5320
- Kodak Polaroid 665 Film
- Kodak Polaroid 667 Film
- Microtek MRS 600 E3 Scanner
- Mupid 2 Gelelektrophoresekammer, Cosmo Bio
- Mustek GS-400(L) Scanner
- Perkin Elmer Cetus 480 DNA Thermal Cycler PCR Maschine
- Perkin Elmer Cetus 9600 DNA Thermal Cycler PCR Maschine
- Polaroid Kamera
- PYE UNICAM PU 8600 UV/UCS Spectrophotometer
- TGGE System
- UV Tisch, Vilkor Lourmat

Reagentien und Lösungen

- 100 Bp Ladder
- Acrylamid, Bio RAD
- Agarose Eurogentek
- AmpliTaq DNA Polymerase, Perkin Elmer Cetus
- AmpliTaqGOLD DNA Polymerase, Perkin Elmer Cetus
- APS, Ammonium Persulfat
- Chloroform, Aldrich
- DMSO, Sigma
- DNA molecular weight marker VI, Boehringer Manheim
- DNA molecular weight marker VIII, Boehringer Manheim
- dNTP's, Bio Ventures
- EDTA, Ethylendiamintetraacetat, Merck
- Ethanol, Merck
- Ethidiumbromid, Merck
- Fomamid
- Glykogen

- H₂O, 18 Mega-Ω, Sigma
- Isoamyl-Alkohol, Sigma
- Isopropanol, Merck
- Loading DYE
- MgCl², Perkin Elmer Cetus
- Natrium Acetat
- PBS, Phosphat-Buffered Saline, Sigma
- PCR Buffer, 50% Glycerol, 100mM KCl, 20mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 0,5% Tween, 0,5% Nonidet P40, Perkin Elmer Cetus
- PCR Wachs, Chill-out liquid wax, MJ Research
- Phenol, Sigma
- Proteinase K, Sigma
- SDS, Sodium Dodecyl Sulfat, Gibco
- SYBR green I nucleic acid gel stain, FMC Bio Products
- TAE, Tris-Acetat-EDTA, Sigma
- TBE, Tris-Borate-EDTA, Sigma
- TE, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, Sigma
- Temed, Tetramethylethylenediamine, Sigma
- Tris-HCl pH 8,0
- Trypsin, Gibco BRL
- VisiGel, Stratagene

Kits

- ABI PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer
- DNA Isolation Kit, Puregene
- QIAamp Blood Kit, Qiagen
- QIAamp Tissue Kit, Qiagen
- QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen
- QIAquick-spin PCR Purification Kit, Qiagen
- TRI Reagent™ RNA/DNA/Protein Isolation Reagent, Molecular Research Center

Methoden

DNA Extraktion

Es wurden 2 verschiedene Extraktionsmethoden zur Gewinnung von DNA verwendet. V.a. wurden die QUIamp DNA Extractions Kits verwendet, da sie eine deutlich kürzere Bearbeitungszeit im Gegensatz zur klassischen Phenolmethode ermöglichen.

Die dicht bewachsenen Zellschalen wurden nach Absaugung mit 1.5 ml Trypsin kurz gespült, dann für 10 min mit 1.5 ml Trypsin zwecks Zellyse versetzt. Anschließend wurde die Suspension bei 2000 Umdrehungen/min zentrifugiert, der Überstand entfernt und mit 200 µl PBS, 200 µl AL-Buffer und 25 µl Proteinkinase K bei 70 °C für 10 min inkubiert. Danach wurde 210 µl 100% Ethanol hinzu gegeben und bei 8000 Umdrehungen/min für 1 min die Flüssigkeit durch einen dem Kit beiliegenden Filter entfernt. Bei gleicher Umdrehungszahl und Zeit wurde daraufhin 2 x hintereinander 500 µl AW-Buffer hindurchgefiltriert. Nach einer Trocken-zentrifugation wurde dann die DNA mit 200 µl H₂O ausgewaschen und bei 260 nm Wellenlänge anschließend im Spectrophotometer die Konzentration bestimmt.

Die klassische DNA Phenolextraktionstechnik lieferte bei erheblich längerer Bearbeitungszeit etwas bessere DNA Konzentrationen als Ergebnis. Entsprechend fand sie v.a. Verwendung bei nur geringen Zellmengen.

Auch hier wurden die dicht bewachsene Zellschalen nach Absaugung mit 1.5 ml Trypsin kurz gespült, dann für 10 min mit 1.5 ml Trypsin versetzt. Anschließend wurde die Suspension bei 500g zentrifugiert, der Überstand entfernt und mit 1 – 1.5 ml ice-cold PBS bei erneut 500g für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden jeweils 300 µl Digestions Buffer, 300 µl Pellet Buffer, 30 µl 10% SDS und 6 µl Proteinkinase K mit den Zellen für 12 bis 18 h inkubiert. Anschließend kamen 300 µl des Gemisches 25:24:1 Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alkohol hinzu, nach 10 sec Vortexing und 15 sec Zentrifugierung wurde die obere Phase entnommen und erneut diesem Reinigungsschritt unterzogen. Daraufhin wurden 1/10 des bisherigen Volumens an 3 M NaAcetat pH 5.2 und das 2 – 2.5 x Volumen an ice-cold 100% Ethanol hinzu gegeben und bei –20 °C für 30 min inkubiert und dann für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde im Anschluß daran mit 1 ml 70% Ethanol bei 4 °C für 5 min zentrifugiert, woraufhin der Überstand entfernt und die DNA getrocknet wurde. Nach Applikation von 100 µl H₂O wurde anschließend bei 260 nm Wellenlänge im Spectrophotometer die DNA Konzentration bestimmt.

DNA Extraktion aus Paraffinschnitten

Ca. 3 bis 4 Gewebsschnitte wurden mittels eines sterilen Skalpell vom Objektträger abgekratzt, so daß sich max. 25 mg Material in einer Eppendorftube befand. Dazu gab man 1200 µL Xylol, nach Vortexing, Zentrifugierung und Überstandentfernung dann 1200 µL 100% Ethanol. Danach dann Vortexing,

Zentrifugierung und Überstandentfernung und Wiederholung dieses Auswaschungsschrittes. Ethanolreste wurden dann bei 37 °C für 15 min verdampft, anschließend gab man 180 µL ATL Buffer und 20 µL Proteinkinase K dazu und inkubierte das Gemisch für 24 bis 48 h bei 55 °C. Daraufhin erwärmte man die Flüssigkeit auf 70 °C, nachdem man 200 µL AL Buffer drauf gegeben hatte. Danach wurde 210 µl 100% Ethanol hinzu gegeben und bei 8000 Umdrehungen/min für 1 min die Flüssigkeit durch einen dem Kit beiliegenden Filter entfernt. Bei gleicher Umdrehungszahl und Zeit wurde daraufhin 2 x hintereinander 500 µl AW-Buffer hindurchgefiltert. Nach einer Trockenzentrifugation wurde dann die DNA mit 70 °C warmen 400 µl Tris pH 9.0 ausgewaschen und bei 260 nm Wellenlänge anschließend im Spectrophotometer die Konzentration bestimmt.

Allgemeine PCR Methodik

Für einen 100 µl PCR Ansatz wurden je 10 µl 10x PCR Buffer II, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 2.5 U AmliTaq DNA Polymerase, 0.2 – 1.0 µM Sense Primer, 0.2 – 1.0 µM AntiSense Primer und ca. 1 µg DNA Template zusammen gemischt. Mit H₂O wurde dann das Endvolumen auf 100 µl gebracht.

Zur Maximierung der Primeraffinität besteht die Möglichkeit der Erhöhung der MgCl₂ Konzentration. Der übliche Bereich liegt zwischen 1.0 und 4.0 mM MgCl₂. Im Zuge der hier beschriebenen PCR's wurde nur kurzzeitig experimentell mit der MgCl₂ variiert, da die im 10x PCR Buffer II sich befindende MgCl₂ Konzentration von 1.0 mM sich als ausreichend erwiesen hatte.

Aufgrund des hohen CG Anteiles des p16- und des p16 Genes erwies es sich jedoch als notwendig, zu jedem PCR Ansatz 5% DMSO beizufügen.

Spezielle PCR Methodik

Zur Amplifikation des p16 Exon I wurden die von Washimi et al.⁹⁷ beschriebenen Primer verwendet. Es handelte sich um den Sense Primer 5'-GAAGAAAGAGGAGGGGCTG-3' und um den Antisense Primer 5'-GCGCTACCTGATTCCAATTC-3', welche ein 340 Bp langes Produkt entstehen lassen. Die PCR Konditionen waren: 94 °C 2 min; 35 Cyclen: 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min; dann 72 °C 10 min und 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus der PCR Maschine. Das Produkt wurde MTS1_e1 genannt.

Das Exon II des p16 Genes wurde ebenfalls mittels Primer von Washimi et al.⁹⁷ nachgewiesen. Es handelte sich um den Sense Primer 5'-TGGCTCTGACCATTCTGT-3' und um den Antisense Primer 5'-AGCTTTGGAAGCTCTCAG-3', aus welchen ein 384 Bp langes Produkt resultiert. Die PCR Kondi-

tionen waren: 94 °C 2 min; 35 Cyclen: 94 °C 30 sec, 57 °C 30 sec, 72 °C 30 sec; dann 72 °C 10 min und 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus der PCR Maschine. Das Produkt wurde MTS1_e2 genannt.

Exon III von p16, auch MTS1_e3 genannt, ließ sich mittels des Sense Primers 5'-TTTTCTTTCTGCCCTCTGCA-3' und des Antisense Primers 5'-GACCTTCGGTGSCTGATGAT-3' von Raffael et al.²⁷ amplifizieren, welche ebenfalls bei Sonoda et al.⁹⁸ Verwendung fanden. Um erfolgreich ein 93 Bp großes Produkt zu bekommen, waren die PCR Bedingungen wie folgt: 94 °C 2 min; 35 Cyclen: 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min; dann 72 °C 10 min und 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus der PCR Maschine.

Bei dem Sense Primer 5'-TGGCTCTGACCACTCTGC-3' und dem Antisense Primer 5'-AGCGAATTCGGGTGGGAAATTGGGTAAGAA-3' handelt es sich um Oligonucleotide, welche ein 356 Bp großes Produkt des Exon II des p15 Genes amplifizieren und die Bezeichnung MTS2_e2 bekam. Die von Washimi et al.⁹⁹ beschriebenen Primer benötigen folgende Konditionen: 94 °C 2 min; 30 Cyclen: 94 °C 30 sec, 55 °C 30 sec, 72 °C 30 sec; dann 72 °C 10 min und 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus der PCR Maschine.

Um für die Coamplifikation einen zu p16 Exon I und II passenden Partner zu bekommen fiel die Wahl auf das G-Protein Gi3a. Das Exon I dieses Genes ließ sich mit dem Sense Primers 5'-GCCACCGCCCAGCAATAGAC-3' und des Antisense Primers 5'-GCCCCGACCAGACCCCGTTCAG-3' zu einem 292 Bp langen Strang vervielfältigen. Die PCR Konditionen waren: 94 °C 2 min; 35 Cyclen: 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min; dann 72 °C 10 min und 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus der PCR Maschine.

Das Exon VIII des Gi3a Genes wurde mittels des Sense Primers 5'-TGGGTCTCCGTTTTAGGTTC-3' und des Antisense Primers 5'-GGTCTCAACTCCCACTG-3' zu einem 351 Bp langen Produkt amplifiziert. Die PCR Konditionen waren: 94 °C 2 min; 35 Cyclen: 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min; dann 72 °C 10 min und 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus der PCR Maschine.

Sequenzierung von PCR Produkten

In einem ersten Schritt mußten die PCR Produkte gereinigt werden. Hierzu wurde das QIAquick-spin PCR Purification Kit verwendet. Auf 100 µl PCR Produktvolumen wurde 0.5 ml PB Buffer gegeben und mittels einer Tischzentrifuge durch einen dem Kit beiliegenden Filter gedrückt. Anschließend wurden 0.75 ml PE Buffer für 60 sec durch den Filter zentrifugiert und letzterer Schritt ohne einen Buffer noch einmal wiederholt. An die gereinigte DNA der PCR gelangte man dann letztendlich durch eine 60 sec dauernde maximal mögliche Zentrifugation mit 50 µl H₂O, welches zuvor auf den Filter gegeben wurde.

In dem zweiten Schritt erfolgte dann die eigentliche Sequenzierung mittels des ABI PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kits. 8 µl Terminator Ready Reaction Mix wurden zu 11 µl gereinigter DNA und zu 1 µl 10 µM Sense Primer gegeben und dann mit 25 Cyclen zu 96 °C 30 sec, 50 °C 15 sec und 60 °C 4 min amplifiziert. Anschließend wurden 2.0 µl 3 M NaAcetat pH 4.6 und 50 µl 95% Ethanol dem Ansatz zugeführt und dieser für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Applikation von 1 µl Glykogen wurde der Ansatz bei maximaler Beschleunigung zentrifugiert, der Überstand entfernt und durch 75% Ethanol ersetzt. Daraufhin erfolgte eine erneute Zentrifugation, eine erneute Entfernung des Überstandes und eine Lufttrocknung unter einem Abzug.

Die Reaktionsprodukte wurden dann dem Servicelabor des zellbiochemischen Institutes des UKE übergeben, wo sie mittels eines ABI Prism 377 Genetic Analyser Vers. 2.1.1 ausgewertet wurden.

PCR Coamplifikations Methodik

Zur Coamplifikation von MTS1_e2 mit Gi3a Exon VIII war es erforderlich, 10 µl 10 µM MTS1_e2 Sense Primer, 10 µl 10 µM MTS1_e2 Antisense Primer, 5 µl 10 µM Gi3a Exon VIII Sense Primer und 5 µl 10 µM Gi3a Exon VIII Antisense Primer in einen 100 µl PCR Ansatz zu bringen. Die bestmöglichen Konditionen waren dabei: 94 °C 2 min; 35 Cyclen: 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min; dann 72 °C 10 min und 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus der PCR Maschine.

Bei der kombinierten PCR von MTS1_e2 mit Gi3a Exon I erwies es sich als optimal, in einen 100 µl Ansatz, 5 µl 10 µM MTS1_e2 Sense Primer, 5 µl 10 µM MTS1_e2 Antisense Primer, 0.375 µl 10 µM Gi3a Exon I Sense Primer und 0.375 µl 10 µM Gi3a Exon I Antisense Primer zu geben und bei diesen Bedingungen durch zu führen: 94 °C 2 min; 30 Cyclen: 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min; dann 72 °C 10 min und 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus der PCR Maschine.

Zwecks Coamplifikation MTS1_e1 mit Gi3a Exon 1 führte man in einen 100 µl Ansatz 4.5 µl 10 µM MTS1_e1 Sense Primer, 4.5 µl 10 µM MTS1_e1 Antisense Primer, 0.45 µl 10 µM Gi3a Exon I Sense Primer und 0.45 µl 10 µM Gi3a Exon I Antisense Primer zusammen und verwendete diese Bedingungen: 94 °C 2 min; 30 Cyclen: 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min; dann 72 °C 10 min und 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus der PCR Maschine. Neben dieser PCR Variante (I) war es aufgrund eines Wechsels des Herstellers für Primer erforderlich, eine höhere Gi3a_Ex.1 Konzentration einzubringen. Bei gleichen Konditionen wurde in dieser Variante (II) jedoch pro 100 µl Ansatz, 0.8 µl 10 µM Gi3a Exon I Sense Primer und 0.8 µl 10 µM Gi3a Exon I Antisense Primer eingebracht.

Da es an DNA, welche aus Paraffinschnitten gewonnen wurde, nicht möglich war, Fragmente über eine Länge von ca. 150 Bp zu amplifizieren, war es erforderlich, die Primer anzupassen. Dabei konnte man MTS1_e3 weiterverwenden, da dieser Primer ein 93 Bp langes Amplifikat bildet. Jedoch mußte ein

neuer Antisenseprimer für den Gi3a Exon I Abschnitt konstruiert werden: die Primer 5'-GCCACCGCCCAGCAATAGAC-3' und 5'-GCTCAACGTGCAGCCCATGG-3' lieferten ein nur 114 Bp langes Produkt von Gi3a Exon I. 0.375 µl bei einer Konzentration von 10 µM von diesen Primern und 2.5 µl von 10 µM MTS1_e3 ließen eine Coamplifikation unter Verwendung der DNA Polymerase TaqGOLD bei folgenden Bedingungen zu: 94 °C 16 min; 40 Cyclen: 94 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min; dann 72 °C 10 min und 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus der PCR Maschine.

Gel-Darstellung der PCR Produkte

Die übliche Darstellungsmethode für PCR Produkte war das gewöhnliche Agarose Gel. Zur Anfertigung des Geles wurden 2.4 g Agarosepulver auf 120 ml 0.5 x TBE gegeben, dieses rührend erhitzt, in die Gußformen überführt und dort zum Abkühlen gebracht.

Dann wurde ein Gemisch aus 1.3 µl Loading DYE und 9 µl DNA-PCR-Produkt zusammengebracht und in die Taschen des Geles überführt. Als Gewichtsstandard wurde zumeist der Marker VI, seltener der Marker VIII oder der 100 Bp Ladder verwendet. Nachdem die Bromphenolfront die Anode nach ca. 30 min Laufzeit in einer 0.5 x TBE enthaltenden Gelelektrophoresekammer bei 100 V erreicht hatte, wurde das Gel für 30 min in 50 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, und dann für 30 min in H₂O entfärbt. Das Gel wurde daraufhin mittels einer Polaroid Kamera und einem Kodak Polaroid 665- oder eines Kodak Polaroid 667 Film unter UV-Licht photographiert.

Als Alternative zum Ethidiumbromid fand zeitweilig auch der Farbstoff SYBR green I nucleic acid gel stain Verwendung, der jedoch nach 30 min Färbezeit keinerlei Entfärbung mehr erforderte. Er wurde angesetzt, indem man 5 µl SYBR green I nucleic acid gel stain Stammlösung auf 50 µl 0.5 x TBE gab.

Insbesondere für die Photoquantifizierung erwies sich VisiGel besser als konventionelles Agarose Gel (s.u.). Es wurden 6 ml VisiGel Konzentrat in 100 ml 0.5 x TAE Buffer verdünnt, rührend erhitzt, in die Gußformen überführt und zum Abkühlen gebracht. Das weitere Procedere entsprach dem von konventionellen Agarose Gel, außer, daß in der Gelelektrophoresekammer 0.5 x TAE enthalten waren und daß nur Ethidiumbromid zur Färbung verwendet wurde.

Da beide Methoden zur Darstellung von DNA Fragmenten kleiner als 100 Bp bzw. bei Bandenabständen kleiner 10 – 20 Bp ungeeignet waren, wurde in diesen Fällen ein Acrylamidgel verwendet. Zwischen 2 durch einen Gummiplatzhalter getrennten Glasplatten wurde ein 10% Acrylamid Gel gegossen, welches aus 15 ml 30% Bis Acrylamid, 4.5 ml 0.5 x TBE, 25.5 ml Aqua dest., 200 µl APS und aus 30 µl Temed bestand. Nach 45 min Polymerisierungszeit wurde das Gel dann in die TGGE Maschine gelegt, in die Anoden- und Kathodenkammer je 1 l 0.5 x TBE gegossen und eine elektromechanische Kommunikation mittels Wattetücher zwischen Gel und Kammer erreicht. Daraufhin wurde ein Gemisch aus 0.8 µl Loading DYE und 5 µl DNA-PCR-Produkt zusammengebracht, in die Taschen des Geles überführt, Gewichtsstandard VIII beigegeben und bei 500 V für ca. 3 h laufen gelassen. Nach

einer Färbezeit von 30 min in 5 µl SYBR green I nucleic acid gel stain Stammlösung auf 50 µl 0.5 x TBE wurde das Gel spiegelverkehrt auf den UV-Tisch gelegt und mit einem Kodak Polaroid 665-Film fotografiert.

Photoquantifizierung von PCR Produkten

Um Aussagen bezüglich des Anteils von p16 positiven Zellen in einem Primärtumor machen zu können, wurde die Photoquantifizierung entwickelt. Zwecks dessen war es erforderlich, in einem PCR-Ansatz zwei Primerpaaren aus einerseits p16-Oligos und andererseits aus Oligos von einem lebensnotwendigen Gen zu coamplifizieren und dann diese 2 Produkte zu Quantifizieren. Aus diesen Daten konnte man dann letztendlich eine Ratio berechnen und so Aussagen zum prozentualen Anteil des p16 Status in dem Primärtumor machen.

Das Ethidiumbromid- oder auch SYBR I gefärbte Gel wurde in der Optimierungsphase bei Blende 16 und 42 cm Gel-Linsen-Abstand bei unterschiedlichen Belichtungszeiten, welche zwischen 5 und 40 sec variiert wurden, fotografiert. An Gelen wurden Agarose und VisiGel versucht, an Filmen Kodak Polaroid 665- und Kodak Polaroid 667-Filme durchprobiert und von ersterem sowohl Positive als auch Negative verwertet.

Anschließend wurde das Photo mittels eines Mustek GS-400(L)- oder eines Microtek MRS 600 E3 Scanner bei 8bit Farbtiefe und 800dpi Auflösung als Greyscale digitalisiert. Das resultierende, ca. 3 Mb große Bild, wurde dann mittels des Photobearbeitungsprogrammes Corel Photo Paint 6.0 in einzelne , nur noch die ausgeschnittene Banden enthaltende Windows-bmp Files überführt. Das Bild wurde nicht in irgendeiner Weise mittels des Programmes zuvor moduliert, es wurde konsequent nur das native Scannergebniss weiter bearbeitet.

Nachdem so eine Vielzahl ca. 25 Kb großer Files entstanden war, welche jeweils nur noch eine Bande und deren unmittelbar angrenzenden Hintergrund enthielten, wurden diese durch das in Turbo Basic Version 1.0 selbstentwickelte und im Anhang in reduzierter Form dargestellte Programm BMPNEU.EXE ausgewertet. Dieses Programm erforderte die Banden-enthaltenden Files als Namen mit fortlaufender Nummer und verlangte in einer früheren Version nach einem Leerbild, welches als allgemeiner Hintergrund zur weiteren Berechnung verwendet wurde. Dann laß das Programm Pixel für Pixel die Bildinformationen, addierte jeden einzelnen Wert auf die Variabel „alles“ und berechnete den Bildhintergrund. Für diese Hintergrundberechnung wurden 3 Algorithmen verwendet:

1. Bei der Leerbild Methode wurde ein Bildfile ohne Bandeninformation als Durchschnittswert für den Hintergrund verwendet. Angepaßt an die spezifische Größe der einzelnen Bilder wurde von der Variabel „alles“ der Banden-enthaltenden Bildfiles die Variabel „alles“ des Leerbild-enthaltenden Bildfiles subtrahiert. Der resultierende Wert entspricht dann der auf dem Gel sich befindenden Bandenintensität.

2. Als weitere Methode wurde die gesamte unterer Zeile eines Banden-enthaltenden Bildfiles als spezifischer Hintergrundwert verwendet. Der addierte Wert der unteren Zeile wurde mit der Gesamtzahl aller Zeilen multipliziert und dann von der Variable „alles“ subtrahiert.
3. Der dritte Algorithmus verwendet die linke Spalte eines jeden Bildfiles als Basis der Hintergrundberechnung: der Durchschnittswert dieser Spalte wurde mit der Zahl aller Pixel multipliziert, das resultierende Ergebnis von der Variable „alles“ abgezogen.

Die Ergebnisse des Algorithmus „1“ finden sich in der Spalte „Real Value“, die von „2“ in der Spalte „Direct Value“ und die von „3“ in der Spalte „Direct Value Left“ der Ergebnistabelle des Programmes wieder. Als Beispiel siehe die Tabelle im Anhang.

GenScan Quantifizierung von PCR Produkten

Als sehr viel genauere Alternative zur Photoquantifizierung bot sich die GenScan Quantifizierung an, bei der entweder die Primer mit fluoreszierenden Substanzen oder die verwendeten Nucleotide mit selbigen Stoffen gelabelt wurden. In dieser Arbeit wurden nur FAM-markierte Primer verwendet und als Gewichtsmarker GenScan-350 oder GenScan-500 benutzt, welche mit TAMRA (N,N,N',N'- tetramethyl-6-carboxyrhodamin) oder ROX (6-carboxy-X-rhodamin) gelabelt wurden.

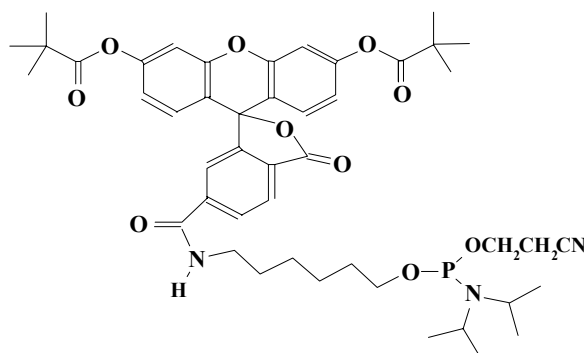


Abb. 3 : Der Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM, 6-Carboxyfluorescein, welcher am 5'- Ende des Primers gebunden wird; die Substanz ist wie auch HEX und TET ein modifiziertes Fluorescein Analogon und hat seine maximale Absorptionswellenlänge bei 495 nm und seine maximale Emissionswellenlänge bei 521 nm.

Aufgrund des DMSO war es erforderlich, zuerst je 2 µl PCR Produkt für 1 h auf einen Dialysefilter zu bringen, welcher auf 400 ml 5 mM Tris-HCl pH 8.0 oder auch auf Aqua dest. schwamm. Anschließend wurden 2 µl von dem Dialysat mit 12 µl frisch angesetztem Formamid und 0.5 µl Gewichtsmarker TAMRA oder ROX zusammengebracht und für 2 min bei 94 °C denaturiert. Die Quantifizierung wurde dann mit einem ABI Prism 310 Genetic Analyser durchgeführt.

Resultate

Ergebnisse der Zelllinien

p16 Exon 1 Status der Zelllinien

Um den p16 Exon 1 Status der Zelllinien des Labor für Hirntumorbiologie zu ermitteln, wurden alle 31 Linien mittels der MTS1_e1 Primer untersucht. Zuvor wurde die PCR Produkte aus MTS1_e1 Reaktionen an lymphozytärer DNA sequenziert. Bezüglich der p16 Exon 1-PCR Resultate an Zelllinien des Labore für Hirntumorbiologie ergab sich folgendes Muster:

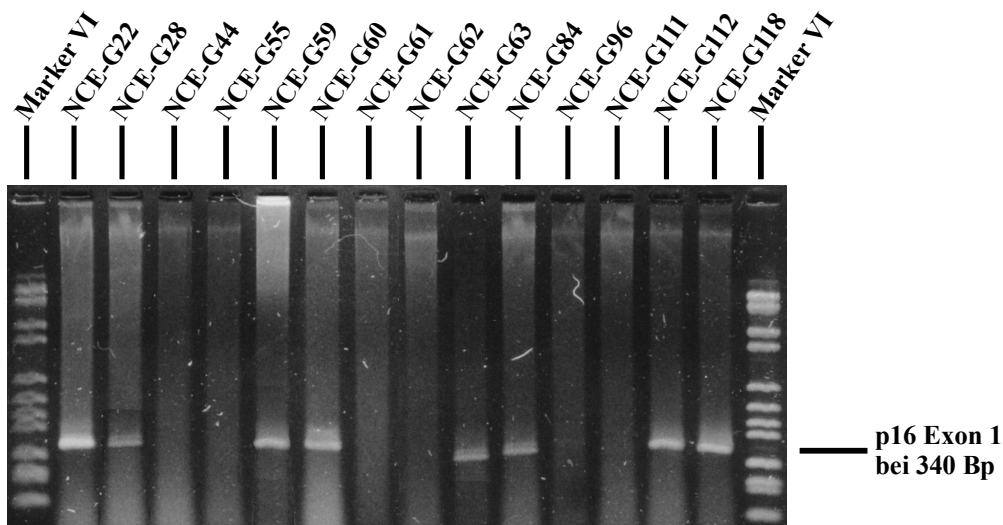


Abb. 4: MTS1_e1 Primer an den Zelllinien 22 bis 118.

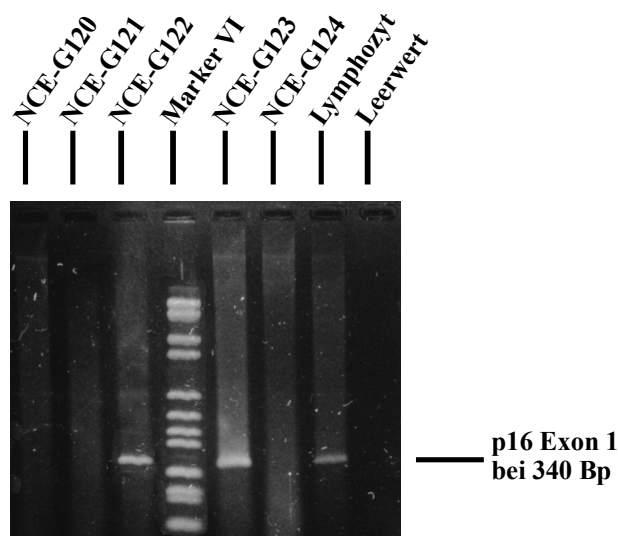


Abb. 5 : MTS1_e1 Primer an den Zelllinien 120 – 124 und an lymphozytärer DNA und H₂O / Leerwert als Positiv- und Negativkontrolle.

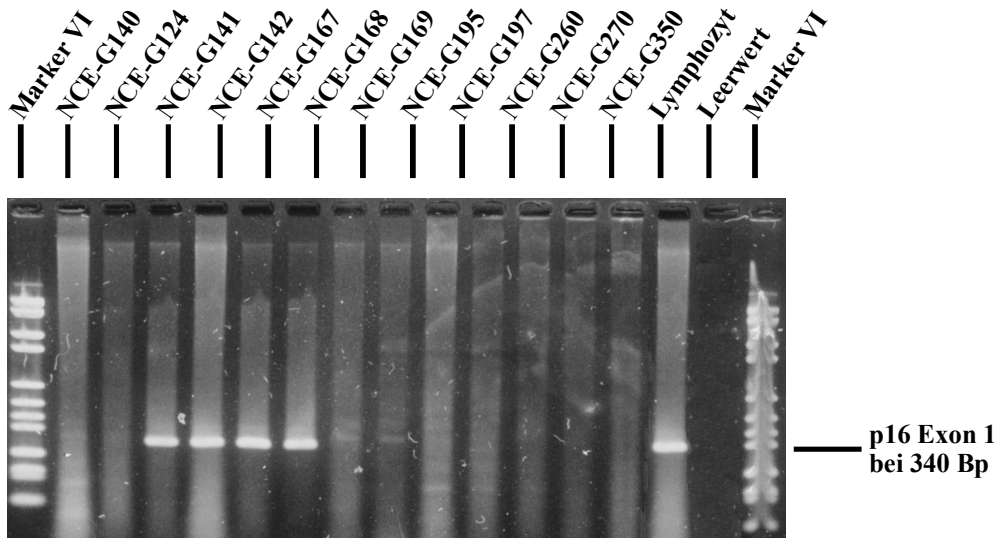


Abb. 6 : MTS1_e1 Primer an den Zelllinien 140 bis 350 und einer lymphozytärer DNA als Positiv- und H₂O / Leerwert als Negativkontrolle.

p16 Exon 2 Status der Zelllinien

Mittels der MTS1_e2 Primer gelang es, nach vorausgegangener Sequenzierung, folgendes Verteilungsmuster an den Zelllinien bezüglich des p16 Exon 2 Status zu ermitteln:

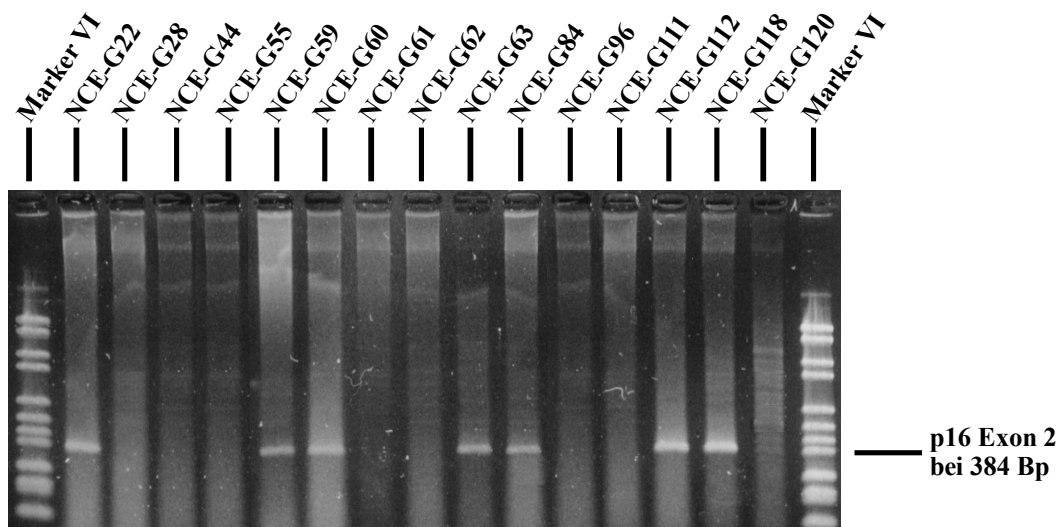


Abb. 7: MTS1_e2 Primer an den Zelllinien 22 bis 120.

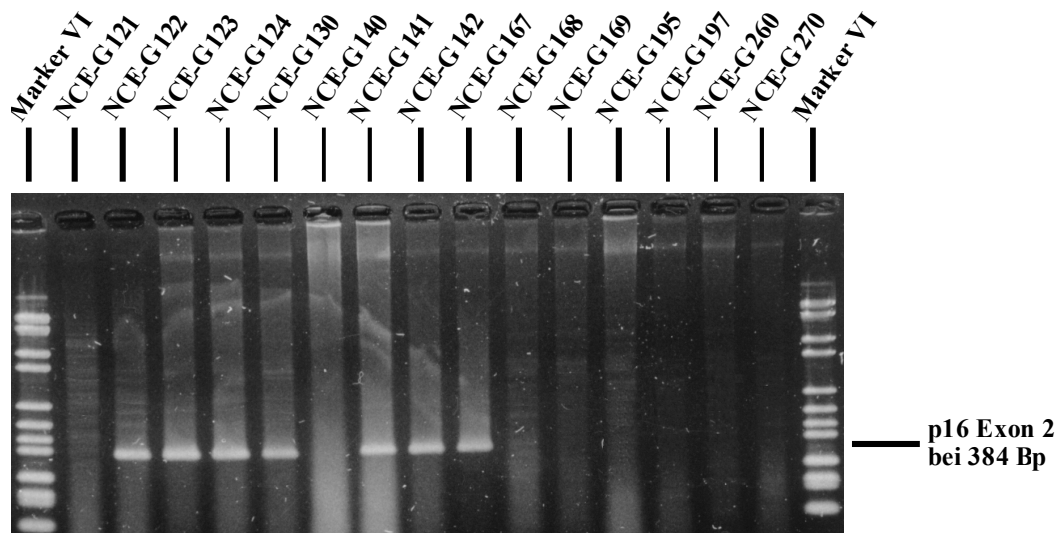


Abb. 8 : MTS1_e2 Primer an den Zelllinien 121 bis 270.

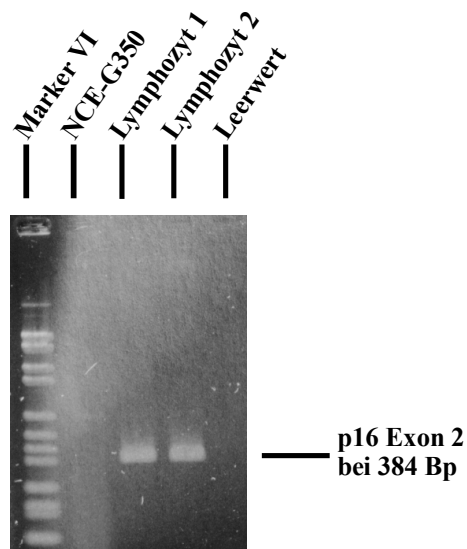


Abb. 9 : MTS1_e2 Primer an der Zelllinien 350 und zwei lymphozytären DNA's als Positiv- und H₂O / Leerwert als Negativkontrolle.

p16 Exon 3 Status der Zelllinien

Mittels der MTS1_e3 Primer gelang es folgendes Verteilungsmuster an den Zelllinien bezüglich des p16 Exon 2 Status zu ermitteln. Die PCR Produkte wurden exemplarisch sequenziert und dann wegen ihrer geringen Größe von nur 93 Bp auf VisiGel dargestellt und unter Zuhilfenahme des 100 Bp DNA Ladder als Gewichtsmarker orientierend bewertet.

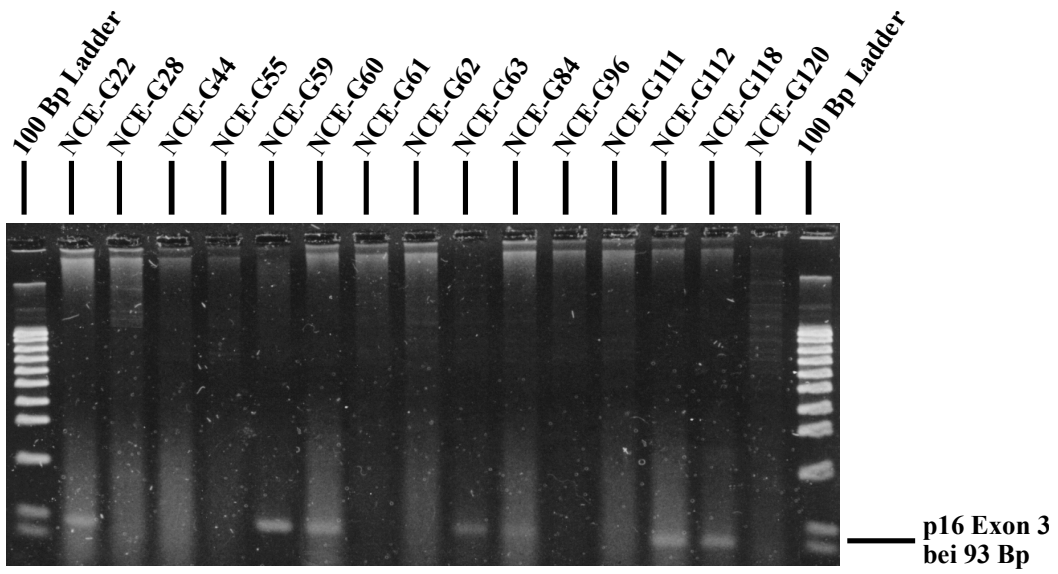


Abb. 10 : MTS1_e3 Primer an den Zelllinien 22 bis 120.

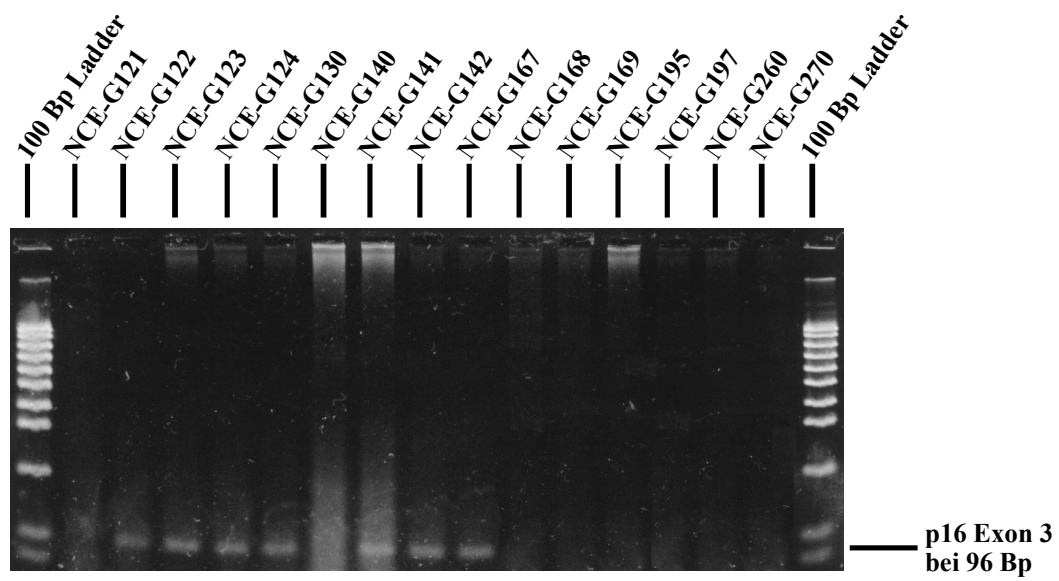


Abb. 11 : MTS1_e3 Primer an den Zelllinien 121 bis 270.

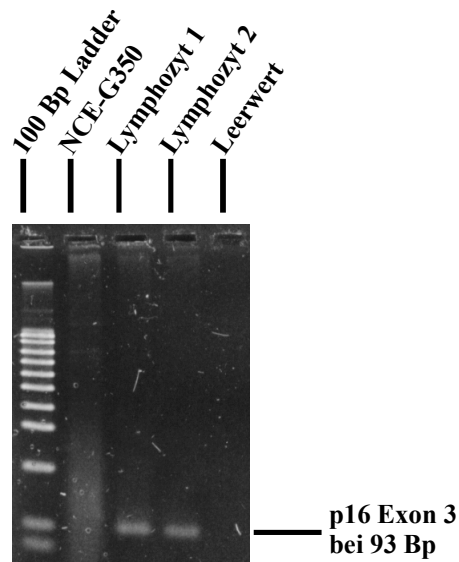


Abb. 12 : MTS1_e3 Primer an der Zelllinien 350 und zwei lymphozytären DNA's als Positiv- und H₂O / Leerwert als Negativkontrolle.

p15 Exon 2 Status der Zelllinien

Bei der Bestimmung des p15- bzw. des MTS2 Status mittels der Primer MTS2_e2 ergaben sich diese Ergebnisse. Eine exemplarische Sequenzierung an lymphozytärer DNA erbrachte den Beweis, das richtige Gen amplifiziert wurde.

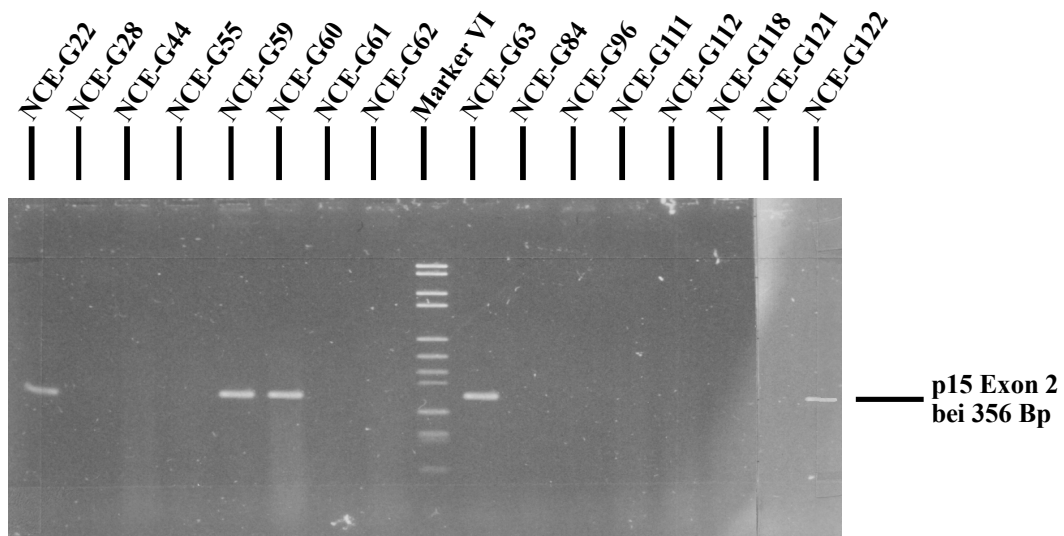


Abb. 13 : MTS2_e2 Primer an der Zelllinien 22 bis 122 ohne die Linie 120.

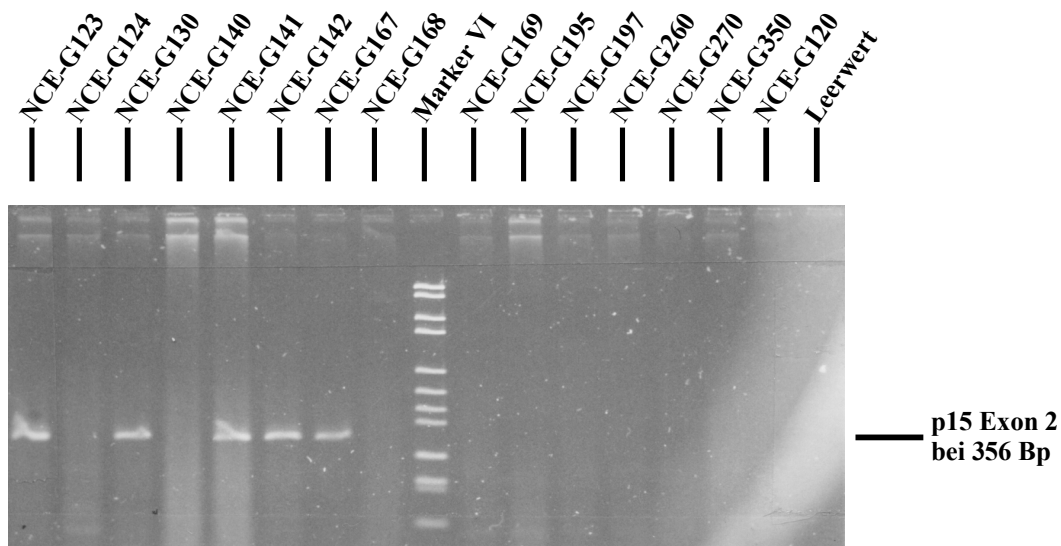


Abb. 14 : MTS2_e2 Primer an der Zelllinien 123 bis 350, zusätzlich Linie 120 und H₂O / Leerwert als Negativkontrolle.

Zusammenfassung der Ergebnisse an den Zelllinien und pRB

Von 31 untersuchten Zelllinien des Labor für Hirntumorbiologie zeigten sich insgesamt bei 19 Linien, d.h. in 61% der Fälle, Deletionen des p16 bzw. des MTS1 Genes. Das Exon 1 war in 17 Fällen, d.h. zu 55%, das Exon 2 in 18 Fällen, d.h. zu 58%, und das Exon 3 in wieder 17 der 31 Fälle, d.h. zu 55%, verloren gegangen. 28 der 31 Zelllinien, d.h. 90% der Fälle, zeigten sich in ihrem p16 Status homogen, entweder alle 3 Exons waren vorhanden oder deletiert. Bei den 3 anderen Linien, die sich nicht dergleichen verhielten, handelte es sich um die Zelllinie NCE-G28, bei welcher nur Exon 1, um die Linie NCE-G84, bei der Exon 1 und 3 und um die Linie NCE-G124, bei der nur Exon 2 und 3 nachweisbar waren.

Bei dem p15 bzw. MTS2 Status ergab sich als Resultat, daß 21 der 31 Zelllinien, d.h. 68%, des Genes verlustig gegangen waren. Der p15 Status entsprach in 29 der 31 Linien dem p16 Status, d.h., in 94% der Fälle sind beide Gene sich in ihrem Deletionsmuster gleich, nur die Zelllinien NCE-G112 und NCE-G118 hatten ein deletiertes Exon 2 des p15 Genes bei intaktem p16 Gen.

Zell Linien	Passage	p15 Ex 2	p16 Ex 1	p16 Ex 2	p16 Ex 3	pRB ^{100, 101}
NCE-G22	p188	+	+	+	+	v / -
NCE-G28	p202	-	+	-	-	+
NCE-G44	p293	-	-	-	-	
NCE-G55	p76	-	-	-	-	
NCE-G59	p70	+	+	+	+	+
NCE-G60	p301	+	+	+	+	
NCE-G61	p71	-	-	-	-	

NCE-G62	p56	-	-	-	-					
NCE-G63	p63	+	+	+	+	+				
NCE-G84	p107	-	+	-	+					
NCE-G96	p342	-	-	-	-	+				
NCE-G111	p69	-	-	-	-					
NCE-G112	p50	-	+	+	+	v / -				
NCE-G118	p72	-	+	+	+	v / -				
NCE-G120	p56	-	-	-	-					
NCE-G121	p70	-	-	-	-	+				
NCE-G122	p116	+	+	+	+	v / -				
NCE-G123	p48	+	+	+	+	+				
NCE-G124	p52	-	-	+	+					
NCE-G130	p73	+	+	+	+	-				
NCE-G140	p95	-	-	-	-	+				
NCE-G141	?	+	+	+	+	v / -				
NCE-G142	p89	+	+	+	+	-				
NCE-G167	p23	+	+	+	+					
NCE-G168	p70	-	-	-	-					
NCE-G168	p44	-	-	-	-					
NCE-G195	p32	-	-	-	-					
NCE-G197	p31	-	-	-	-					
NCE-G260	p55	-	-	-	-					
NCE-G270	p25	-	-	-	-					
NCE-G350	p53	-	-	-	-					
Anzahl der Deletionen absolut/prozent	21	68%	17	55%	18	58%	17	55%	7	50%
Anzahl der Nachweises absolut/prozent	10	32%	14	44%	13	42%	14	45%	7	50%
Anzahl der untersuchten Zelllinien	31		31		31		31		14	

p15 und p16 Analyse mittels PCR

+ : betreffendes Exon nachweisbar

- : betreffendes Exon nicht nachweisbar, .d.h. homozygot deletiert

pRB Analyse mittels Westernblot

- : nicht-detektierbare Expression

v / - : verminderte Expression

+ : normale Expression

Tabelle 3 : Zusammenfassung des p16 Status an Zelllinien des Labors für Hirntumorbiologie korreliert mit dem pRB Status nach Markus Lücke et al.¹⁰⁰ und Wolfgang Hamel et al.¹⁰¹.

Korrelierte man die Ergebnisse des p16 Status mit den Resultaten von Markus Lücke et al.¹⁰⁰ und Wolfgang Hamel et al.¹⁰¹ bezüglich des Rb Status und wertet sowohl die komplette Nicht-Nachweisbarkeit als auch eine Minderung der Rb Expression als Defekt dieses Tumorsuppressorgenes,

so sieht man, daß bei den 14 von ihnen untersuchten Zelllinien in 11 Fällen, d.h. 79%, entweder ein p16- oder ein Rb-Defekt vorliegt. Jedoch gibt es keinen einzigen Fall, bei dem sowohl das p16 Gen als auch das Rb Protein defekt war, die Linien NCE-G59, NCE-G63 und NCE-G123 hatten sowohl ein intaktes p16 Gen als auch unverändertes Rb Protein. Von den 11 Zelllinien, die entweder ein p16- oder ein Rb-Defekt hatten, zeigten 7 ein intaktes p16 Gen bei verändertem Rb Protein und nur 4 Linien die umgekehrte Variante, d.h., ein p16 Defekt bei normalen Rb Protein Status

Die Linien NCE-G59, NCE-G63 und NCE-G123 stimmten ebenfalls in ihrem p15- und Rb-Status miteinander überein, auch das p15 Gen war bei ihnen voll vorhanden, wenn man davon ausging, daß der Status von Exon 2 von p15 mit dem Status des ganzen Genes übereinstimmte.

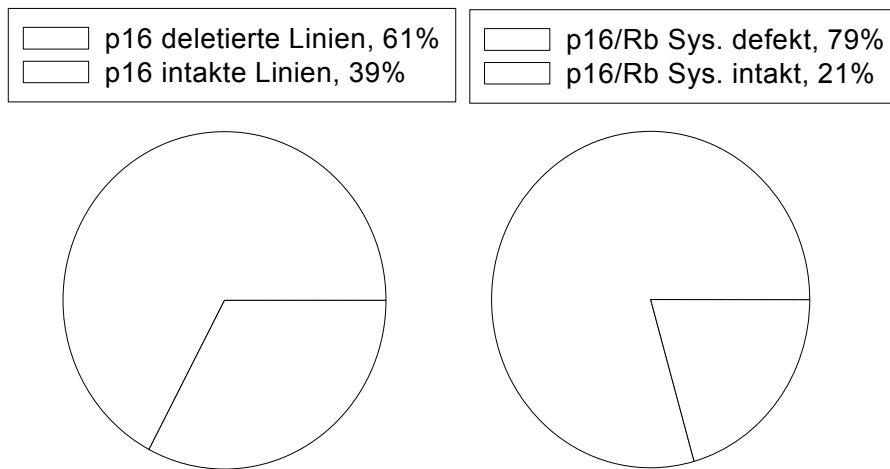


Abb. 15 : Graphische Darstellung des Verhältnisses von p16 deletierten zu intakten Zelllinien bzw. von den Linien, die ein defektes p16/Rb System hatten.

p16 und p15 in Korrelation zu p53

Bezüglich der Korrelation zwischen dem p16/Rb System und dem p53 Genstatus nach Analyse der Exons 5, 6, 7 und 8 ergibt sich bei verschiedenen Passagen der Zelllinien folgendes Muster

Zell Linien	Passage / p53	p53 Status	Passage / p16	p16 Status	p16/Rb Status
NCE-G22	22 p221	-	p188	+	-
NCE-G28	28 p21	-	p202	-	-
NCE-G44	44 p269	+	p293	-	
NCE-G55	55 p49	+	p76	-	
NCE-G59	59 p238	-	p70	+	+
NCE-G60	60 p262	+	p301	+	

NCE-G61	61 p54, p284	-	p71	-				
NCE-G62	62 p284	+	p56	-				
NCE-G63	63 p195	+	p63	+			+	
NCE-G84	84 p63	+	p107	-				
NCE-G96	96 p69	+	p342	-			-	
NCE-G111	111 p70	+	p69	-				
NCE-G112	112 p219	+	p50	+			-	
NCE-G118	118p 13,186	-	p72	+			-	
NCE-G120	120 p269	+	p56	-				
NCE-G121	121 p154	+	p70	-			-	
NCE-G122	122 p174	+	p116	+			-	
NCE-G123	123 p170	-	p48	+			+	
NCE-G124	124 p16	-	p52	-			-	
NCE-G130	130 p45	+	p73	+			-	
NCE-G140	140 p140	-	p95	-			-	
NCE-G141	141 p32	-	?	+			-	
NCE-G142	142 p28	+	p89	+			-	
NCE-G167	167 p26	+	p23	+				
NCE-G168	168 p32	+	p70	-				
NCE-G168	169 p26	+	p44	-				
NCE-G195	195 p18	+	p32	-				
NCE-G197	197 p26	+	p31	-				
NCE-G260	260 p45	+	p55	-				
NCE-G270	270 p28	+	p25	-				
NCE-G350	350 p28	+	p53	-				
Linien mit pathologischem Status absolut/prozent		9	29%		19	61%	11	79%
Linien mit Normalstatus absolut/prozent		22	71%		11	39%	3	21%
Anzahl der untersuchten Zelllinien		31			31		14	

+ : Linien mit Normalstatus
- : Linien mit pathologischem Status

Tabelle 4 : Korrelation des p53- mit dem p16- bzw. dem p16/Rb Status an Zelllinien des Labors für Hirntumorbiologie; dabei wurden die Linien zu verschiedenen Passagezyklen auf p16 und p53 untersucht.

Wie bereits oben aufgeführt, so waren 61% der Zelllinien p16 Deletiert, 79% der 14 untersuchten Linien hatten einen Defekt im p16/Rb System. Hingegen fanden sich nur 9 der 31 Linien, d.h. 29%, mit Veränderungen in den Exons 5, 6, 7 und 8 des p53 Genes. Ein defektes p53 Gen bei intaktem p16 hatten 5 Linien, d.h. 16%, ein intaktes p53 bei defektem p16 zeigten 15 Linien, d.h. 48%, beide Gene wa-

ren in 7 Fällen, d.h. 23%, intakt und beide Gene in 4 Fällen, d.h. 13%, defekt. Vergleich man den p53- mit dem Status des gesamten p16/Rb Systems, wovon nur Aussagen zu 14 Zelllinien möglich waren, so sah man, daß ein defektes p53 Gen bei intaktem p16 2 Linien hatten, d.h. 14%, ein intaktes p53 bei defektem p16 6 Linien zeigten, d.h. 43%, daß beide Gene in 1 Fall, d.h. 7%, intakt waren und beide Gene in 5 Fällen, d.h. 36%, defekt waren. Die häufigste Variante war damit das intakte p53 Gen bei defektem p16- bzw. p16/Rb System.

p16 Status früher Zelllinien

In den möglichen Fällen, wo von den p16 negativen etablierten Zelllinien frühe Passagen in Form eingefrorene Proben vorhanden waren, wurden diese aufgetaut und erneut zwecks Vermehrung kultiviert. Der p16 Status dieser frühen Passagen ist in Tabelle 5 dargestellt.

Frühe Zellinie	Passage	p16 Status	Passage der etablierten Linie	p16 Status der etablierten Linie
NCE-G28	p3	-	p202	-
NCE-G55	p8	-	p76	-
NCE-G62	p3	-	p56	-
NCE-G62	p6	-	p56	-
NCE-G111	p16	-	p69	-
NCE-G169	p7	-	p44	-
NCE-G197	p28	-	p31	-
NCE-G270	p10	-	p25	-
NCE-G350	p23	-	p53	-

Tabelle 5 : Vergleich von Zelllinien aus frühen Passagen mit den etablierten Linien bezüglich des p16 Status.

Von 8 untersuchten Zelllinien früher Passagen verhielten sich alle identisch zu dem p16 Status ihrer korrespondierenden etablierten Linien. Bei der Linie NCE-G62 bestand zusätzlich die Möglichkeit, ihren Status zu dem Zeitpunkt p3 und p6 zu betrachten, wobei auch in diesem Fall es zu keiner Veränderung kam. Die Spannweite zwischen Linien früher Passagen lag zwischen 3 (NCE-G197) und 199 Passagen (NCE-G28), die früheste untersuchte Passagezahl war p3, schon zu diesem Zeitpunkt waren offenbar keine nicht-transformierten Zellen mehr in der Kultur.

Optimierung und kritische Betrachtung der Photoquantifizierung

Die Optimierungsversuche

Um Koamplifikationen zweier Primerpaare auszuwerten, wurden 2 verschiedene Techniken angewendet: GenScan und die Photoquantifizierung. Bei letzterer galt es im Vorfeld einerseits, sie zu etablieren und andererseits dann zu zeigen, daß sie in einem groben Bereich tatsächlich DNA in unterschiedlichen Konzentrationen linear messen kann. Das dahinter stehende Prinzip war es, die auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennte DNA zu photographieren, darauf hin das Bild einzuscannen und es mittels des Programmes BMPNEU.EXE auszuwerten. Als verfälschende Momente in diesem Verfahren ist das Gel an sich, die photographische Ablichtung und der Prozeß des Digitalisierens zu überprüfen.

Bei der Optimierung des Scanvorganges waren die Grenzen eng gesetzt, da nur 2 verschiedene Geräte zu Verfügung standen. Eine signifikante Differenz zwischen beiden konnte jedoch nicht gezeigt werden. Um auch die weiterverarbeitende Software beim Digitalisieren möglichst vergleichbar zu halten, wurden auf Funktionen wie Kontrast und Helligkeit verzichtet, daß eingescannte Bild wurde nativ weiterverarbeitet.

Agarose als Photoquantifizierungsgel

An Gelen wurden normale Agarose- und kommerzielle VisiGele durchgetestet. Bei Verwendung von normalen Agarosegelen ergaben sich folgende Ergebnisse, wenn man Marker VI in Volumen von 8 bis auf 1 µL gelelektrophoretisch auftrennte.

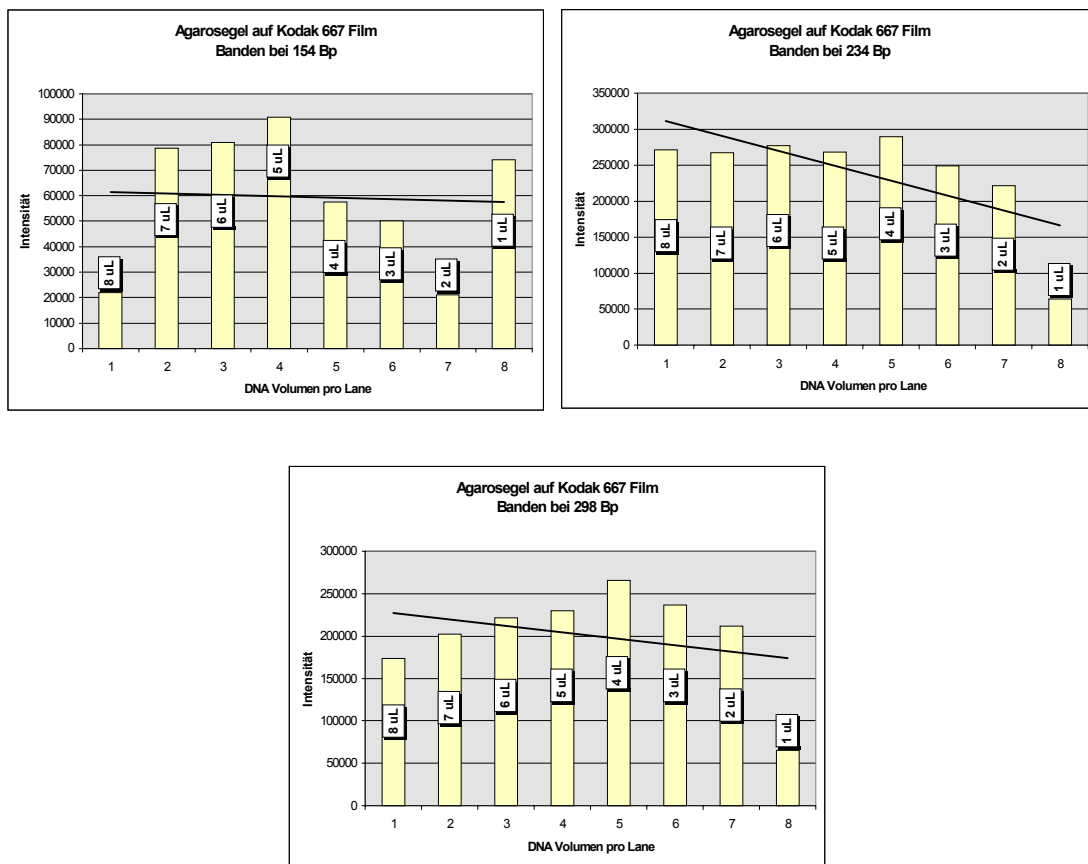


Abb. 16 : Graphische Darstellung einer DNA Verdünnungsreihe mittels Marker VI auf Agarosegel, gefärbt mit SYBR green I, photographiert auf Kodak 667 Film bei 10 sec Belichtung.

Wie zu sehen ist, so war eine eindeutige Tendenz im Sinne eines linearen Abfalles der Bandenintensität nicht vorhanden. Agarose war somit für eine Photoquantifizierung nicht geeignet. Offenbar färbte SYBR green I DNA auf Agarose dermaßen intensiv an, als daß Nuancierungen der Konzentration verwischt wurden. Eine stärkere Reduktion der Belichtungszeit hätte sich eventuell als Lösung angeboten, jedoch wäre dann die Empfindlichkeit für geringe DNA Konzentrationen in einem zu großen Maße abgefallen. Als weiteres, v.a. bei Agarose zu beobachtendes Phänomen, fand sich, daß die randständigen Banden eines Geles zumeist eine schwächere Intensität als Banden hatten, die in der Mitte des Gels sich befanden.

VisiGel als Photoquantifizierungsgel

Hingegen ergaben sich bei Verwendung von VisiGelen folgende Ergebnisse, wenn man Marker VI in Volumen von 8 bis auf 1 µL gelelektrophoretisch auftrennte.

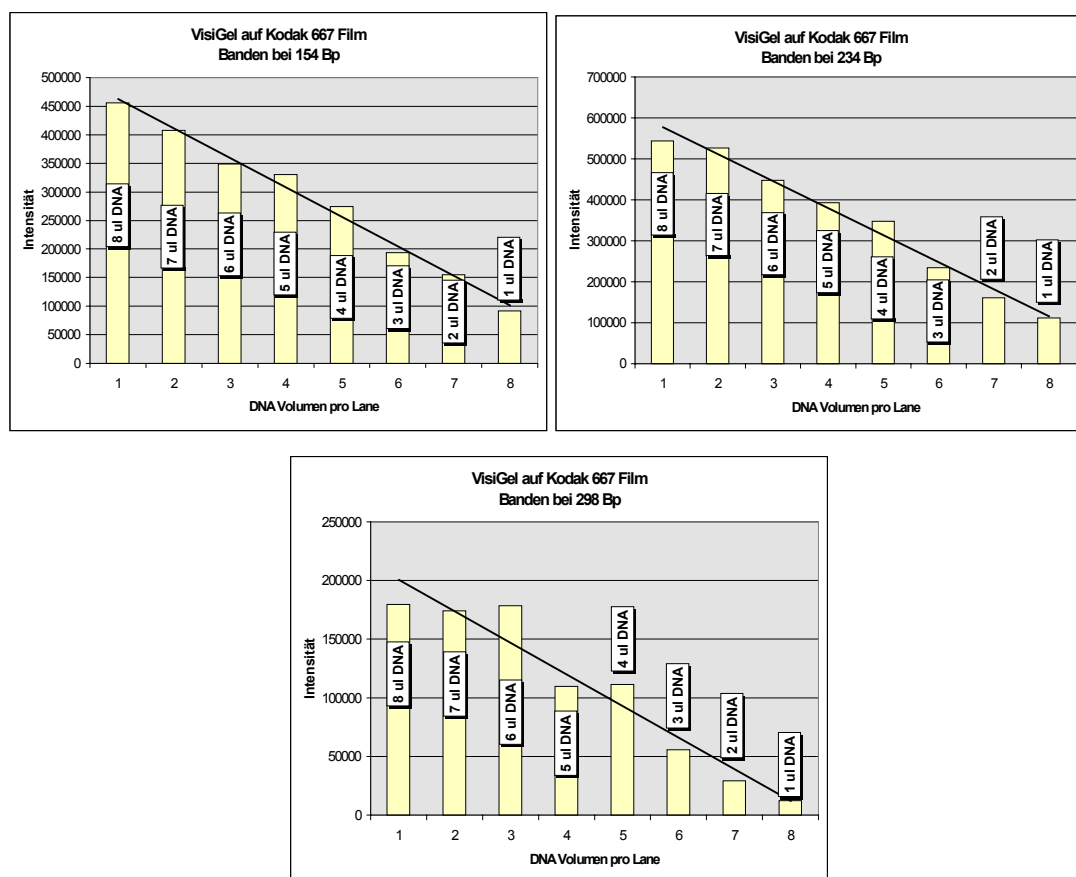
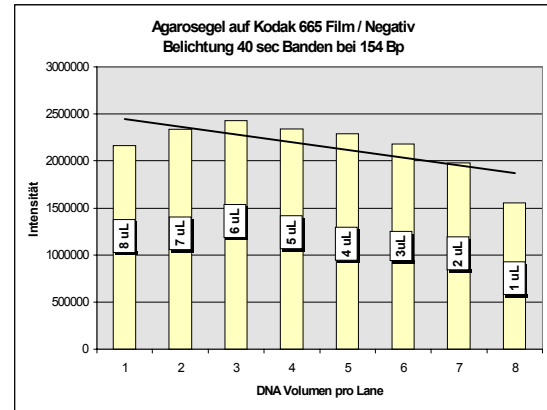
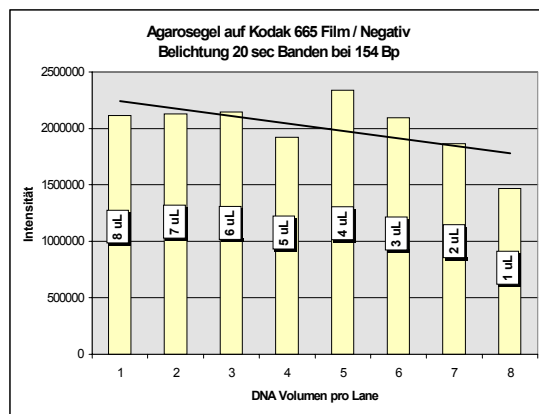
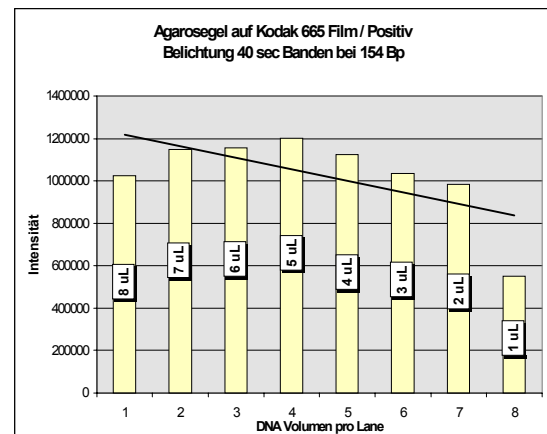
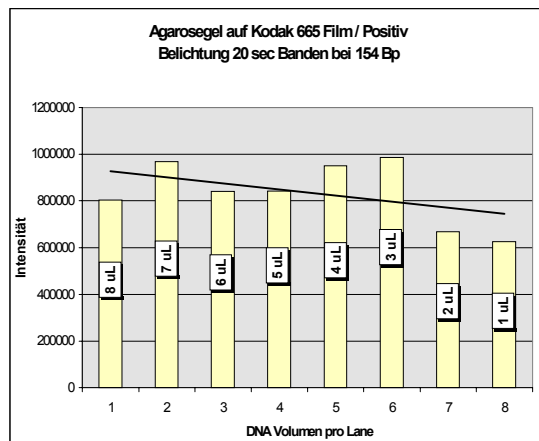


Abb. 17 : Graphische Darstellung einer DNA Verdünnungsreihe mittels Marker VI auf VisiGel, gefärbt mit Ethidiumbromid, photographiert auf Kodak 667 Film bei 10 sec Belichtung.

Man sieht eine eindeutige Linearität im Intensitätsabfall der Banden, der sich passend zur Reduktion der DNA Volumina verhielt. Damit gelang es zu zeigen, daß VisiGel konventioneller Agarose überlegen ist, wenngleich die Anfertigung aufwendiger war. Ebenfalls ist in diesen Abbildungen zu erkennen, daß sich eine Linearität besser im Bereich kleiner DNA Fragmente, hier 154 Bp, ergab, als bei größeren Fragmenten, hier 298 Bp. Dieses Phänomen erklärte sich jedoch nicht durch die Schwere der Fragmente, sondern durch den Effekt, daß Banden an Schärfe verloren und flächiger werden, je näher sie sich an der Anode befanden. Diese Beobachtung ließ sich auch dahingehend nutzen, als daß eine leichte Unschärfe beim Photographieren ebenfalls eine Verbesserung der Quantifizierung zur Folge hatte.

Filmmaterial bei der Photoquantifizierung

Bezüglich des Filmmaterials wurden Kodak 665 und 667 Polaroidfilme ausgetestet, um den für eine Photoquantifizierung bestmöglichen Film zu finden. Der im Gegensatz zum 667 Film sehr viel aufwendiger zu bearbeitende 665 Film bietet zusätzlich die Möglichkeit, je ein Positiv und ein Negativ zu entwickeln, so daß auch dieses durchgetestet wurde. Desweiteren wurden verschiedene Belichtungszeiten des 665 Filmes untersucht. Die Abb. 18 zeigt die Ergebnisse von 5 photographischen Varianten, angewendet auf ein Gel:



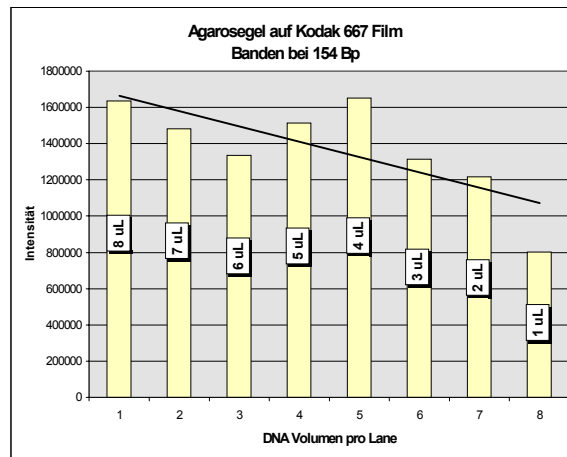


Abb. 18 : Graphische Darstellung einer DNA Verdünnungsreihe mittels Marker VI auf Agarosegel, gefärbt mit SYBR green I, photographiert auf Kodak 665 Film bei 20 sec und 40 sec Belichtung, je als Positiv und Negativ, dazu als Vergleich ein Kodak 667 Film mit 10 sec Belichtung.

Das Ergebnis dieser Optimierungsphase machte deutlich, daß der 665 Film keinerlei Vorteil gegenüber dem einfacher zu handhabenden 667 Film lieferte. Weder bezüglich der Möglichkeit von Positiven und Negativen, noch bezüglich unterschiedlicher Belichtungszeiten zeigten sich signifikante Differenzen. Im Gegenteil, sogar die Trendkurve beim 665 Film war weniger steil als beim 667 Film, so daß die Differenzierung von variierenden DNA Konzentrationen bei ersterem deutlich schwerer war.

Als Konsequenz aus diesen Optimierungsversuchen ergab es sich, daß VisiGel, photographiert auf Kodak 667 Film die bestmöglichen Ergebnisse lieferte. Entsprechend wurden diese Bedingungen dann bei den weiteren Versuchen verwendet.

Die Ungenauigkeit und Schwankungsbreite der Photoquantifizierung

Da es eine Schwankungsbreite bei der Amplifikation und anschließenden Gel Darstellung mit Photoquantifizierung in der Intensität der Banden im Zuge mehrerer gleichartiger PCR's gab, war es erforderlich, dieses genauer zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden lymphozytäre DNA eines Spenders mit dem Primerpaar MTS_e1 : Gi3a_Ex.1 (II) amplifiziert und miteinander verglichen. Die Resultate sind in Abb. 19 dargestellt. Die 23 untersuchten Fälle zeigten einen Maximalwert von 1.273 und einen Minimalwert von 0.615 bei einer Spannweite von 0.658. Der Mittelwert lag dabei bei 0.965, die Varianz bei 0.096156 und die Standardabweichung bei ± 0.310091 . Aus dieser Analyse der Güte von Photoquantifizierung ließ sich folgern, daß die Reproduzierbarkeit relativ groß und die Abweichungen vom Durchschnitt sich in erträglichen Grenzen hielt.

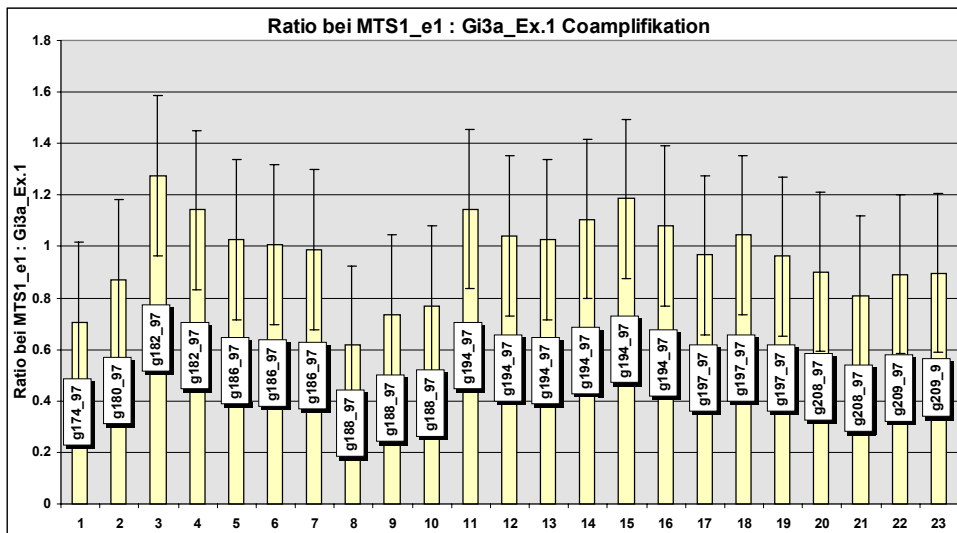


Abb. 19 : Darstellung von 23 Rationes aus 9 verschiedenen Versuchen, bei denen eine MTS1_e1 : Gi3a_Ex.1 Coamplifikation und Photoquantifizierung mittels immer der gleichen Ω - Lymphozyten DNA durchgeführt wurde.

Abweichungen der Ratio bei differierenden DNA Konzentrationen

Eine weitere wichtige Frage bezüglich der Güte der quantitativen PCR und auch der Photoquantifizierung bestand in der Analyse des Problems, ob und wenn dann auch wieweit die Ratio bei differierenden DNA Konzentrationen konstant bleibt. Aus diesem Grund wurden mehrfach die gleichen DNA's bei identischen PCR Konditionen und nur verschiedenen Konzentrationen amplifiziert (Abb. 20). Diese Frage wurde an 8 verschiedenen DNA's getestet. In 5 von diesen 8 Fällen zeigten sich ein eindeutiger Anstieg in der Ratio bei zunehmender DNA Konzentration (Abb. 20 als Beispiel von 2 dieser DNA's). In den anderen 3 Fällen fiel die Ratio ab. Bei 2 von diesen 3 DNA's lag die Ursache des Abfalles jedoch in einzelnen starken Ausreißern, so daß man auch diese 2 Fälle zu der Gruppe der Ansteiger zählen konnte. Aus diesen Resultaten konnte wurde nun gefolgert, daß offenbar die Ratio nicht konstant bleibt, wenn man unterschiedliche Konzentrationen der gleichen DNA amplifiziert. Offenbar gibt es komplexe Wechselwirkungen zwischen den Affinitäten der beiden Primerpaare, der eingebrachten DNA Menge und der daraus resultierenden Menge an Amplifikaten bei einer konstanten Zykluszahl. In wieweit der Anstieg der Ratio einer linearen oder einer anderen Funktion entspricht, konnte in diesem Rahmen nicht gezeigt werden.

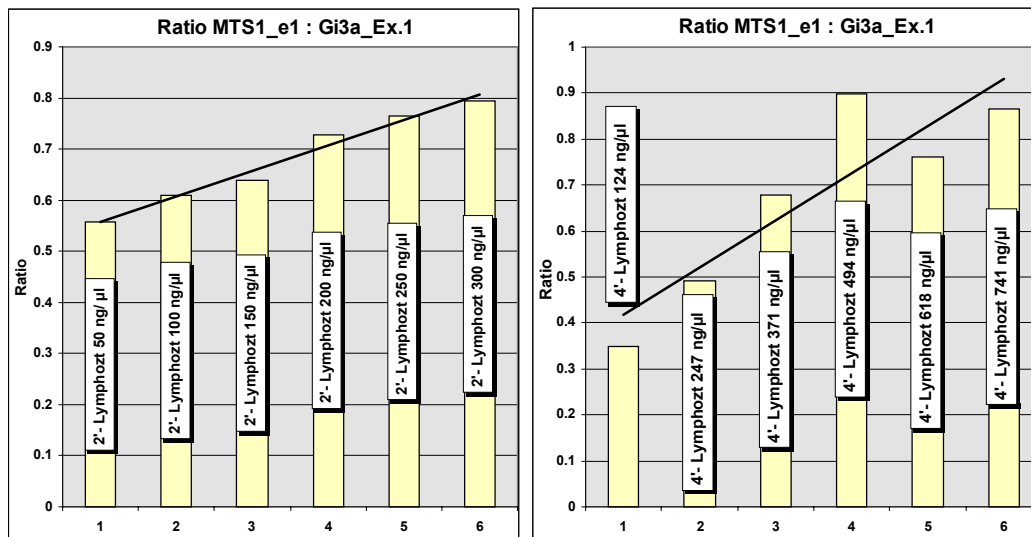


Abb. 20 : MTS1_e1 : Gi3a_Ex.1 (II) Coamplifikation jeweils der gleichen DNA bei 6 verschiedenen Konzentrationen; die Ratio steigt bei zunehmender DNA Konzentration an.

Aus diesem folgerte die Frage, ob es möglich wäre, unabhängig von der eingebrachten DNA, einen Zusammenhang zwischen DNA Konzentration und Ratio zu finden. Wäre dieses der Fall, dann könnte man bei Kenntnis dieses Anstiegsfaktor jede DNA auf eine Standardkonzentration hochrechnen, um dann diese DNA mit jeder anderen vergleichen zu können. Zwecks dessen war es erforderlich, Konzentration gegen Ratio von möglichst vielen verschiedenen normalen DNA's in einem Graphen gegeneinander aufzutragen (Abb. 21).

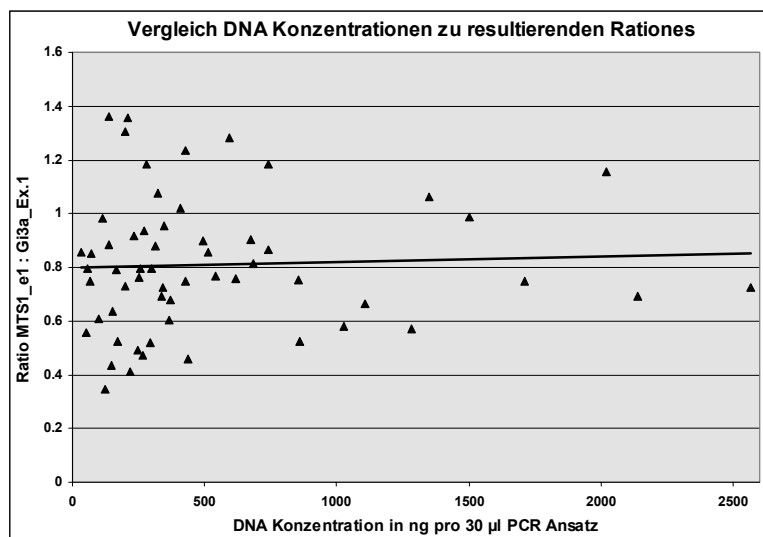


Abb. 21 : Darstellung der Ergebnisse der Coamplifikation MTS1_e1 : Gi3a_Ex.1 (II); auf der X-Achse sind die eingebrachten DNA Konzentrationen, auf der Y-Achse die resultierenden Rationen aufgetragen; dabei wurden 22 verschiedene DNA's bei insg. 58 unterschiedlichen Konzentrationen analysiert; die Trendlinie aller Ergebnisse zeigt einen schwach ansteigenden Verlauf, keinesfalls jedoch einen Anstieg von der Größe der in Abb. 20 dargestellten Trendlinien.

Das Resultat dieser Analyse war jedoch, daß keinerlei Korrelation zwischen DNA Konzentration und Ratio bezüglich verschiedener DNA's zu finden war, die Trendkurve beschrieb nur einen minimalen Anstieg. Offenbar gab es neben der DNA Konzentration noch andere für die Amplifikation relevante Faktoren wie z.B. die Reinheit der extrahierten DNA. Eine weitere Untersuchung der bedingenden Faktoren war an dieser Stelle jedoch nicht möglich.

Aus diesen Ergebnissen, d.h. Anstieg der Ratio bei zunehmender DNA Konzentration in Einzelfällen, aber keine Wiederholung dieses Phänomens an verschiedenen DNA's, wurde dann geschlossen, daß bezüglich des Vergleiches unterschiedlicher DNA's von einer Konstanz der Rationes auszugehen wäre. Durch diesen Beweis wurde es dann möglich, verschiedene Primärtumore unabhängig von der Qualität der aus ihnen extrahierten DNA gesichert miteinander zu vergleichen. Dennoch wurde versucht, die DNA Konzentration in allen quantitativen PCR's weitgehendst bei ca. 40 ng/ μ l PCR Volumen zu halten.

Experimentelle Photoquantifizierung von Primärmaterial

Um zeigen zu können, daß eine PCR Coamplifikation bei verschiedenen Primerpaaren aber gleicher DNA reproduzierbare Ergebnisse lieferte, wurde dann DNA aus 10 Primärtumoren untersucht. Dabei war es für jedes Primerpaar erforderlich, die idealen Konzentrationsverhältnisse beider Oligopaare zu ermitteln, dann eine Eichreihe zu gewinnen, an der man anschließend den prozentualen Anteil von p16 positiven Zellen an der Gesamtmenge ablesen konnte.

Photoquantifizierung von MTS1_e2 und Gi3a Ex. VIII

In einem erstem Versuch wurde dieses Prinzip mittels einer Coamplifikation von MTS1_e2 und Gi3a Ex. VIII durchgeführt. Dabei wurden DNA von zwei Quellen verwendet, von einerseits p16 deletierten und andererseits p16 amplifizierenden Zellen. Diese zwei verschiedenen DNA wurden in differierenden Konzentrationen vermischt und darauf hin coamplifiziert, um nach Darstellung als Ergebnis ein Gel zu erhalten, auf dem die Bandenintensität von dem p16 Exon, hier Exon 2, proportional zur zunehmenden p16 positiven DNA ansteigt, während die Bandenintensität des Housekeeping Genes, hier Gi3a Ex. VIII, abfällt. Das Resultat ist in Abbildung 22 dargestellt.

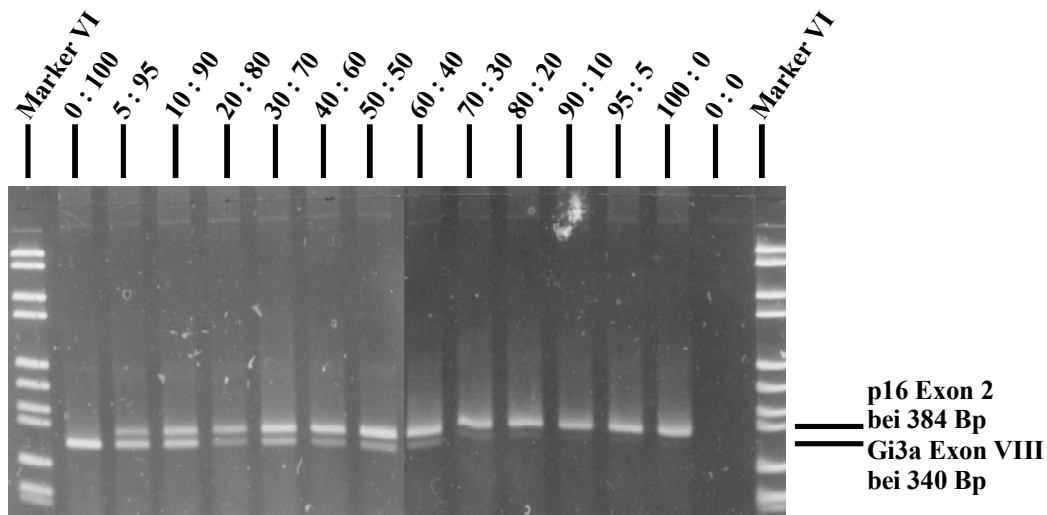


Abb. 22 : Coamplifikation von MTS1_e1 (p16 Ex.2) und Gi3a Ex. VIII bei unterschiedlichen Konzentrationen von p16 positiver und p16 negativer DNA.

Nach Photoquantifizierung konnte man dann die Intensität von den MTS1_e2 Banden durch die von Gi3a Ex. VIII dividieren, um einen Quotienten zu erhalten, welcher unabhängig von der Hintergrundaktivität, d.h. von der lokalen Leuchtkraft, ist. Die Quotienten bzw. die Ratio stiegen bezüglich ihres Wertes proportional zur Zunahme der p16 positiven DNA an, wie man in Abbildung 23 sehen kann.

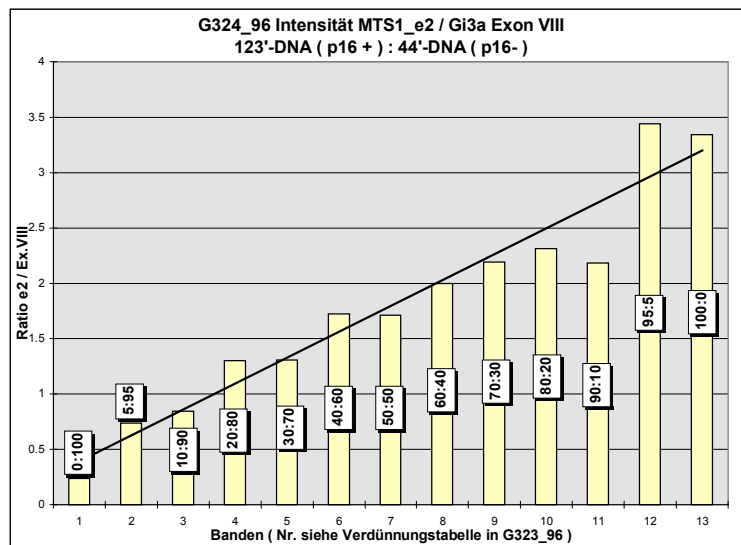


Abb. 23 : Darstellung der Ratio der Bandenintensität bei Coamplifikation von MTS1_e2 (p16 Ex.2) und Gi3a Ex. VIII bei unterschiedlichen Konzentrationen von p16 positiver und p16 negativer DNA.

Wenn man nun bei identischen PCR Konditionen eine Coamplifikation von Primärmaterial vornahm, so stand die Intensität der MTS1_e2- und der Gi3a Ex. VIII Banden und deren Ratio in einem direktem Verhältnis zu dem Anteil an p16 positiven Zellen in dem Tumor. Angewendet auf 10 unterschiedliche Gliome ergab sich folgendes Bild, dargestellt in Abbildung 24.

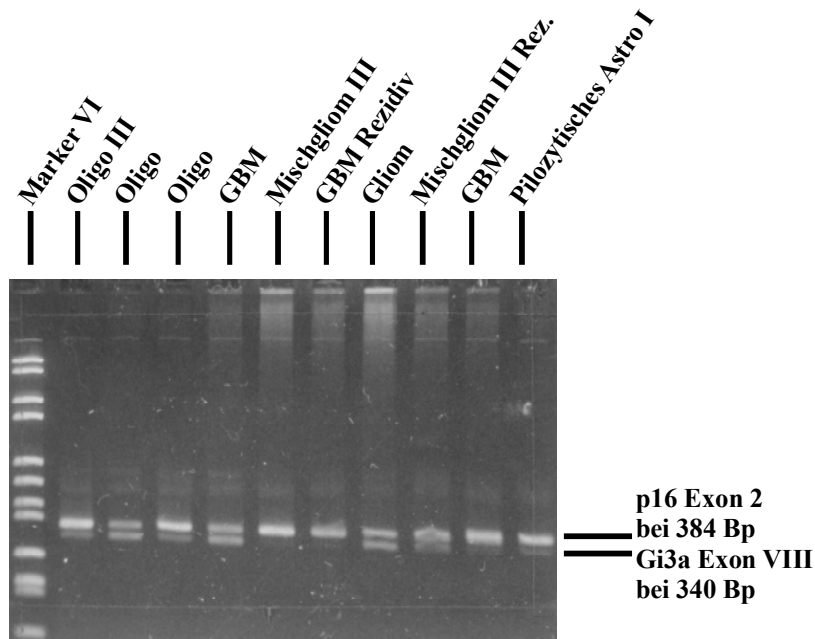


Abb. 24 : Darstellung einer MTS1_e2 : Gi3a Ex. VIII Coamplifikation an 10 verschiedenen Primärtumoren.

Photoquantifizierte man anschließend die Banden und dividierte die Werte wie oben beschrieben durcheinander, so konnte man diesen Quotienten in Relation zur Eichkurve aus Abbildung 23 stellen und damit das Verhältnis an p16 positiven Zellen in jedem Primärtumor ermitteln. Das graphische Ergebnis dessen ist in Abbildung 25 dargestellt.

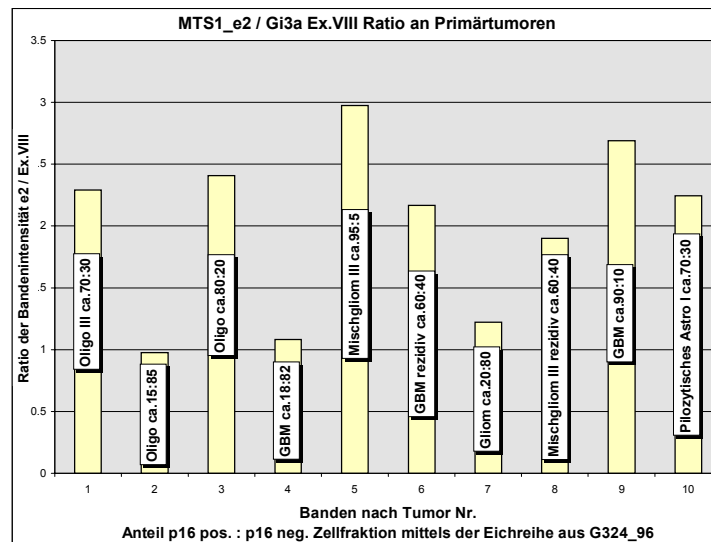


Abb. 25 : Darstellung der Ratio von 10 verschiedenen Primärtumoren bei einer MTS1_e2 : Gi3a Ex. VIII Coamplifikation unter Korrelation mit der Eichreihe aus Abbildung 23.

Photoquantifizierung von MTS1_e2 und Gi3a Ex. I

Bei der Erstellung einer Eichreihe unter Verwendung der Primer MTS1_e2 und Gi3a_Ex I zwecks Coamplifikation ergab sich das in Abb. 26 dargestellte Bild. Hier zeigte sich der theoretisch auch zu erwartende Effekt, daß die Intensität der Banden des Housekeeping Genes konstant blieben, während die p16 Exon 2 Banden abhängig von der Zunahme der p16 DNA Konzentration anstiegen.

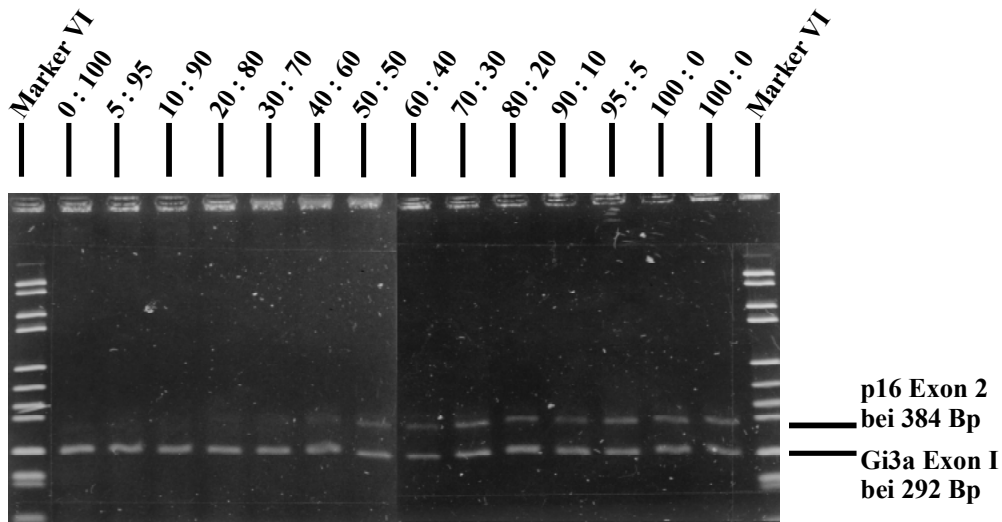


Abb. 26 : Coamplifikation von MTS1_e2 (p16 Ex.2) und Gi3a Ex. I bei unterschiedlichen Konzentrationen von p16 positiver und p16 negativer DNA.

Nach Photoquantifizierung dieses Geles und Division der p16 Exon 2- durch die Gi3a Ex.I Banden ergab sich der in Abb. 27 dargestellte Graph.

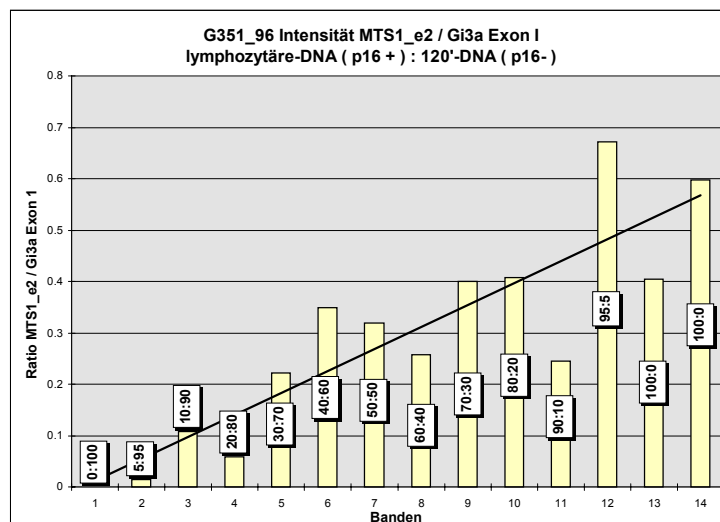


Abb. 27 : Darstellung der Rationes der Bandenintensität bei Coamplifikation von MTS1_e2 (p16 Ex.2) und Gi3a Ex. I bei unterschiedlichen Konzentrationen von p16 positiver und p16 negativer DNA.

Bei der Coamplifikation von DNA aus den 10 oben bereits genannten Primärtumoren, welche im weiteren als Standard-DNA zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Photoscannings Verwendung fand, sah man als Ergebnis das in Abb. 28 gezeigte Bild bei Benutzung des Primerpaar MTS1_e2 und Gi3a Ex.I.

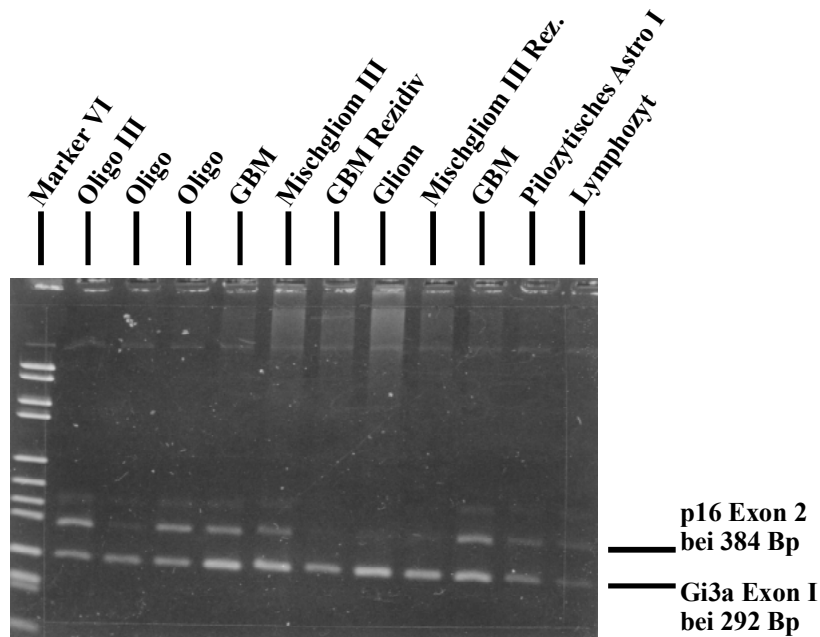


Abb. 28 : Darstellung einer MTS1_e2 : Gi3a Ex. I Coamplifikation an den oben genannten 10 verschiedenen Primärtumoren.

Nach Quantifizierung der Bandenintensität und unter Heranziehung der zuvor gewonnen Eichreihe konnte man Aussagen bezüglich des Anteils von p16 positiven Zellen bei Verwendung des Primerpaar MTS1_e2 und Gi3a Ex.I. an diesen Primärtumoren machen. Die Resultate der Quantifizierung zeigt Abb. 29.

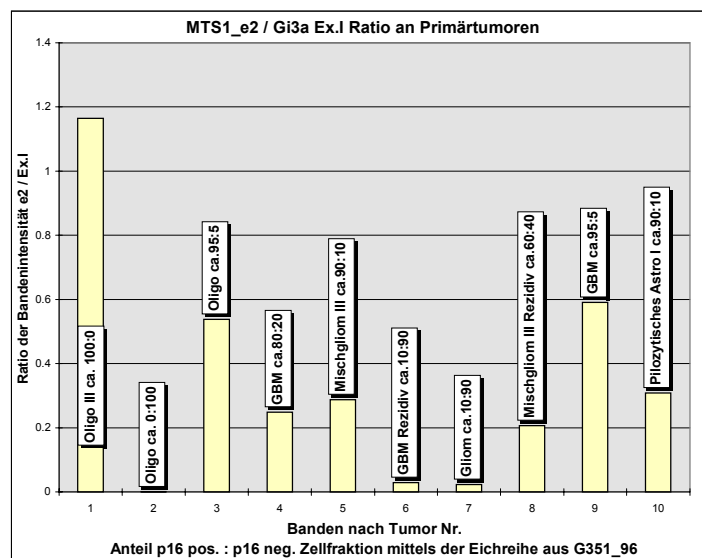


Abb. 29 : Darstellung der Ratio von 10 verschiedenen Primärtumoren bei einer MTS1_e2 : Gi3a Ex. I Coamplifikation unter Korrelation mit der Eichreihe aus Abbildung 27.

Als Ausreißer war hier das in Lane 1 bzw. als Säule 1 dargestellte Oligodendrogliom WHO Grad III zu betrachten, denn die MTS1_e2 Bandenintensität war dermaßen heller als die der Gi3a Ex.I Bande, daß der Quotient weit über dem Eichreihenwert für 100% positive p16 Zellen lag.

Photoquantifizierung von MTS1_e1 und Gi3a Ex. I

Des weiteren wurde auch das Primerpaar MTS1_e1 und Gi3a Ex.I auf einer p16 DNA Verdünnungsreihe coamplifiziert, um eine Eichreihe zu gewinnen. Allerdings war die Verwendung zweier verschiedener MTS1_e1 : Gi3a_Ex.1 Konzentrationsverhältnisse unumgänglich (s.u.). Zur weiteren Unterscheidung beider MTS1_e1 : Gi3a_Ex.1 Coamplifikationsvarianten wurden diese als I und als II gekennzeichnet. Das aus Variante I diesem Experiment resultierende Bild ist in Abb. 30 dargestellt.

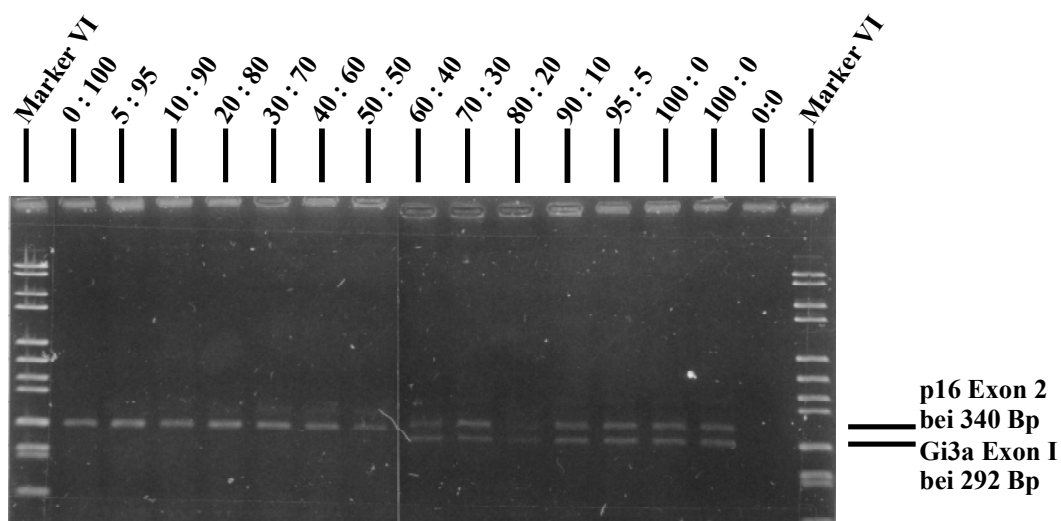


Abb. 30 : Coamplifikation von MTS1_e1 (p16 Ex.1) und Gi3a Ex. 1 bei unterschiedlichen Konzentrationen von p16 positiver und p16 negativer DNA.

Nachdem man dieses Bild eingescannt und anschließend quantifiziert hatte, ergab sich folgende, in Abb. 31 dargestellter Graph als Eichreihe des Primerpaar MTS1_e1 und Gi3a Ex.1 (I).

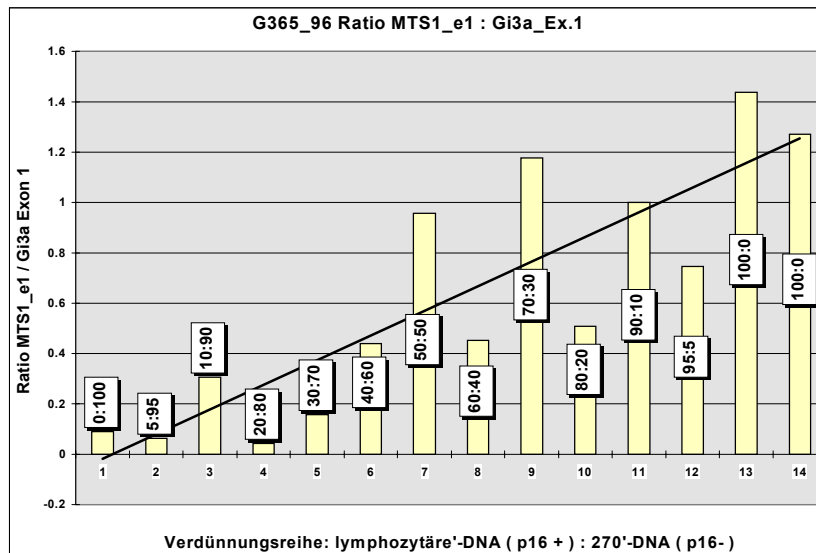


Abb. 31 : Darstellung der Ratio der Bandenintensität bei Coamplifikation von MTS1_e1 (p16 Ex.1) und Gi3a Ex. I (I) bei unterschiedlichen Konzentrationen von p16 positiver und p16 negativer DNA.

Da während der laufenden Versuchsreihen die Verwendung neuer Gi3a_Ex.1 Primer eines anderen Herstellers erforderlich wurde, diese Primer trotz gleicher Konzentrationen jedoch ein schwächeres Amplifikationsmuster zeigten, war die Anpassung der Konzentrationen mit der Erstellung einer neuen Eichreihe unumgänglich. Deren Gel soll hier nicht dargestellt werden, die Resultate dieser Eichreihe sind in Abb. 32 zu sehen

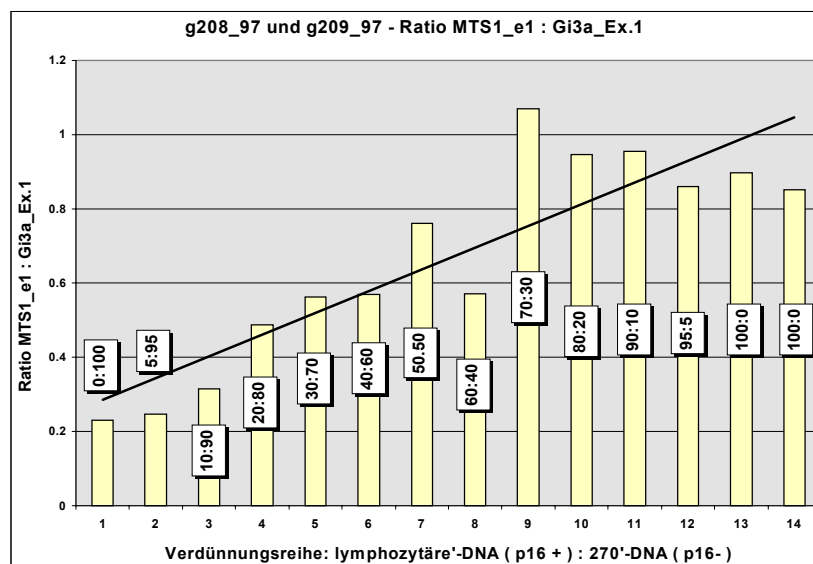


Abb. 32 : Darstellung der Ratio aus den Bandenintensitäten bei Coamplifikation MTS1_e1 : Gi3a_Ex. 1 (II) bei unterschiedlichen Konzentrationen von p16 positiver und p16 negativer DNA.

Um dann wieder eine Aussage bezüglich des p16 Status in den 10 Primärtumoren machen zu können, welche als Standard-DNA zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Verfahrens der Photoquantifi-

zierung verwendet wurden, war eine MTS1_e1: Gi3a Ex.1 (I) Coamplifikations PCR mit ihnen durchgeführt worden. Das auf Gel dargestellte Produkt zeigt Abb. 33.

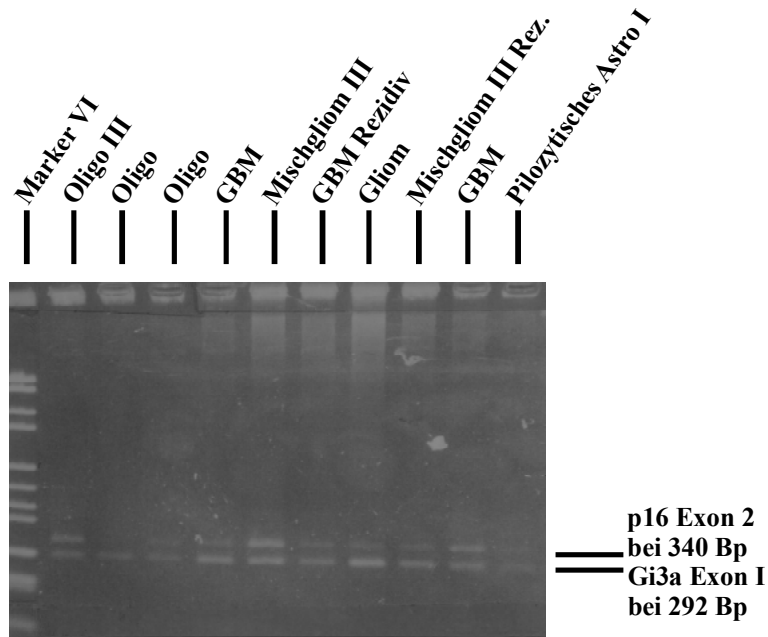


Abb. 33 : Darstellung einer MTS1_e1 : Gi3a Ex. 1 (I) Coamplifikation an den oben genannten 10 verschiedenen Primärtumoren.

Nach Quantifizierung und Anwendung der Eichreihe ergab sich für die 10 Tumore bei Verwendung des Primerpaares MTS1_e1 und Gi3a_Ex.1 (I) der in Abb. 34 dargelegte Graph, welcher den p16 Status in dieser Primerkombination zeigt.

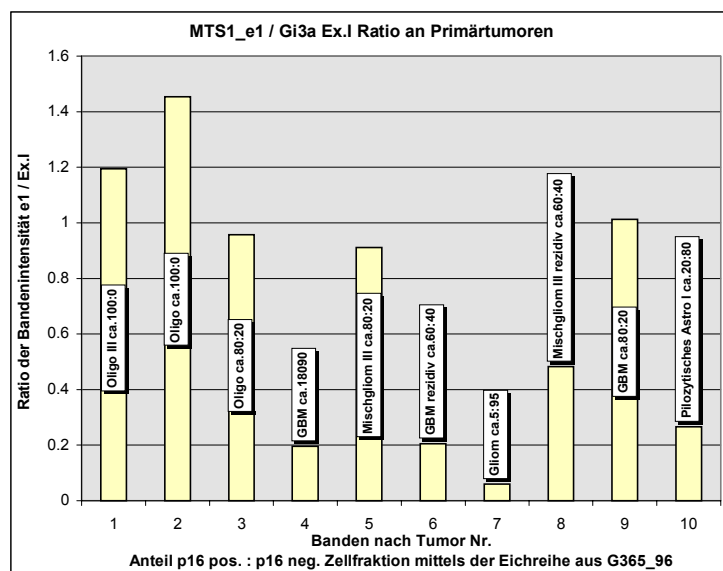


Abb. 34 : Darstellung der Ratio von 10 verschiedenen Primärtumoren bei einer MTS1_e2 : Gi3a Ex. I (I) Coamplifikation unter Korrelation mit der Eichreihe aus Abbildung 32.

Zusammenfassender Vergleich

Wenn man die Ergebnisse der 3 Primerpaare, d.h., MTS1_e2 mit Gi3a Ex. VIII, MTS1_e2 mit Gi3a Ex.1 und MTS1_e1 mit Gi3a_Ex. 1 (I), welche auf die gleiche Primärtumor DNA angewendet wurde, graphisch zusammenfaßt, so erhält man das in Abb. 35 dargestellte Ergebnis als Resultat

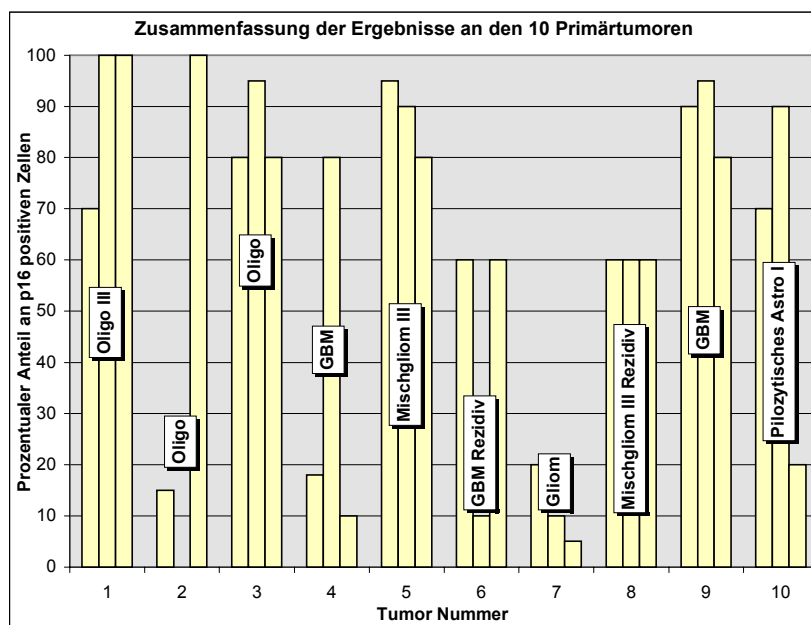


Abb. 35 : Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils von p16 positiven Zellen an 10 verschiedenen Primärtumoren bei jeweils einer MTS1_e2 : Gi3a Ex. VIII - , einer MTS1_e2 : Gi3a Ex. I und einer MTS1_e1 : Gi3a_Ex.1 (I) Coamplifikation.

Wie man anhand der Abb. 35 erkennt, so fanden sich bei einer Schwankungsbreite von +/- 30% in 5 von 10 Fällen bei allen 3 Primerpaaren identische Ergebnisse. In den anderen 5 Fällen lagen 2 der 3 Primerpaare jeweils bei gleichen Resultaten, nur ein Primerpaar schoß aus der Reihe. Um ausschließlich Aussagen bezüglich der Frage zu machen, ob dieser Tumor p16 negative Zellen besitzt, war es nicht erforderlich, exakte prozentuale Verhältnisse zu vergleichen, sondern nur grobe Tendenzen als Anhalt zu nehmen. Bei einer Grenze von 60% p16 positiven Zellen als Schwellenwert, um folgern zu können, ob der Primärtumor MTS1 deletiert ist oder ob nicht, und unter Mittelung der Resultate der 3 Primerpaare bekam man als Ergebnis, daß 5 der 10 Gliome einen p16 Defekt hatten.

Die Grenze p16-positiv oder p16-negativ an Primärmaterial

Um einen Grenzwert zu erhalten, an welchen man Primärtumore scheiden kann, ob sie p16 deletiert oder ob sie ein intaktes p16 Gen haben, wurden verschiedene DNA's mit dem Primerpaar MTS_e1 : Gi3a_Ex.1 (II) amplifiziert und miteinander verglichen. Die dafür notwendigen 100% p16 positiven DNA's entstammten 14 verschiedenen Lymphozyten. (siehe Abb. 36)

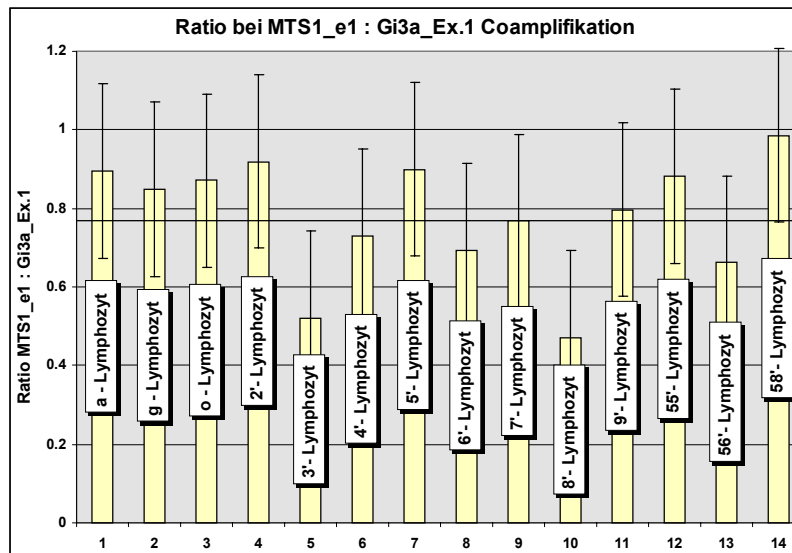


Abb. 36 : Amplifikation von 14 verschiedenen p16 positiven DNA's mittels des Primerpaares MTS1_e1 : Gi3a_Ex.1; die durchgezogene Linie bei der Ratio von 0.78 entspricht dem Mittelwert aller Rationen.

Die 14 untersuchten Fälle zeigen einen Maximalwert von 0.986 und einen Minimalwert von 0.472 bei einer Spannweite von 0.514. Der Mittelwert liegt dabei bei 0.782, die Varianz bei 0.049 und die Standardabweichung bei 0.221. Wenn man den kleinsten Wert für 100% p16 positive DNA als Grenzwert annahm, dann würde nach diesem Konzept dieser bei einer Ratio von 0.472 in der korrespondierenden Eichreihe (Abb. 32) bei 30% liegen.

Ergebnisse der GenScan Quantifizierung an Primärtumoren

Die Optimierungsversuche

Um zu zeigen, daß sowohl die Photo- als auch die GenScanquantifizierung vergleichbare Resultate unter identischen Voraussetzungen lieferte, wurde die Produkte einer MTS1_e2 : Gi3a Exon I Co-amplifikations - PCR bei differierenden Konzentrationen p16 positiver und negativer DNA zwecks Erstellung einer Eichreihe sowohl mittels einer Photo- als auch durch eine GenScanquantifizierung ausgewertet. Ein Teil der Resultate des GenScans sind in Abbildung 37, die Ergebnisse des Vergleiches sind in Abb. 38 dargestellt.

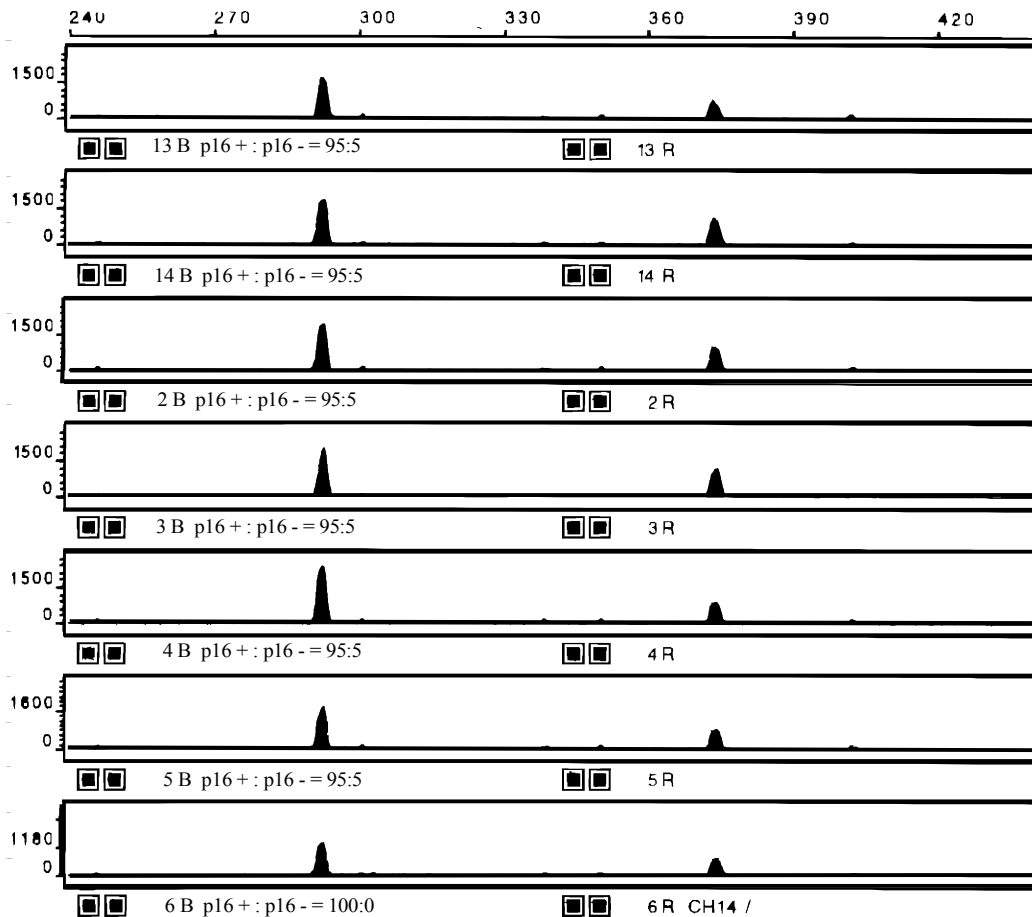


Abb. 37 : Darstellung der GenScan Ergebnisse von einem Teil der Verdünnungsreihe; der linke Peak entspricht der Signalintensität der Produkte des MTS1_e2 Primerpaares bei 384 Bp, der rechte der des Gi3a Exon I Paares bei 292 Bp.

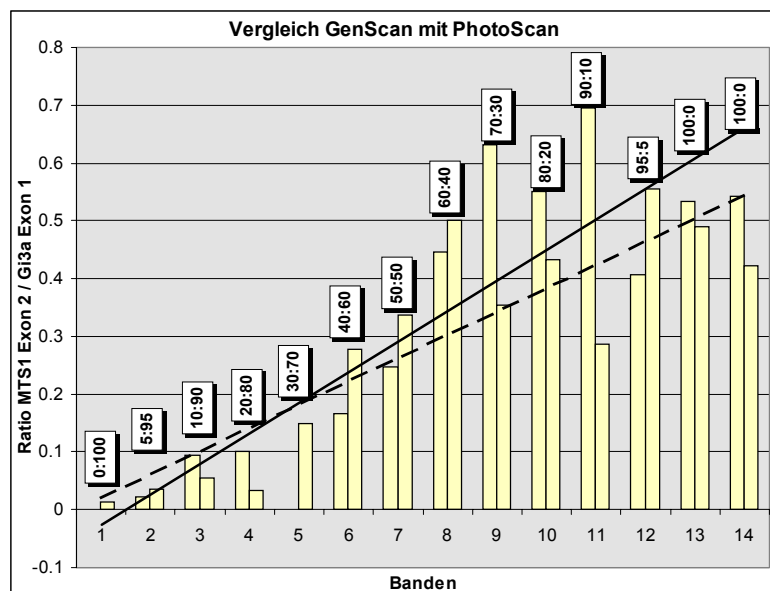


Abb. 38 : Nebeneinanderstellung der Resultate einer Photoquantifizierung (li. Säulen, durchgezogene Trendlinie) und einer GenScanquantifizierung (re. Säulen, gestrichelte Trendlinie) basierend auf einer Eichreihe aus p16 positiver und p16 negativer DNA.

Die Ergebnisse beider Verfahren lagen bei den in Abb. 38 dargestellten Versuchen nahe beieinander. Um diese Resultate zu reproduzieren, wurde anschließend eine MTS1_e2 : Gi3a Exon I Coamplifikations-PCR von den oben bereits erwähnten Standard-Primärtumoren ausgeführt und dann mit beiden Quantifizierungsmethoden ausgewertet (siehe Abb. 40). Ein Teil der GenScan Ergebnisse zeigt Abbildung 39.

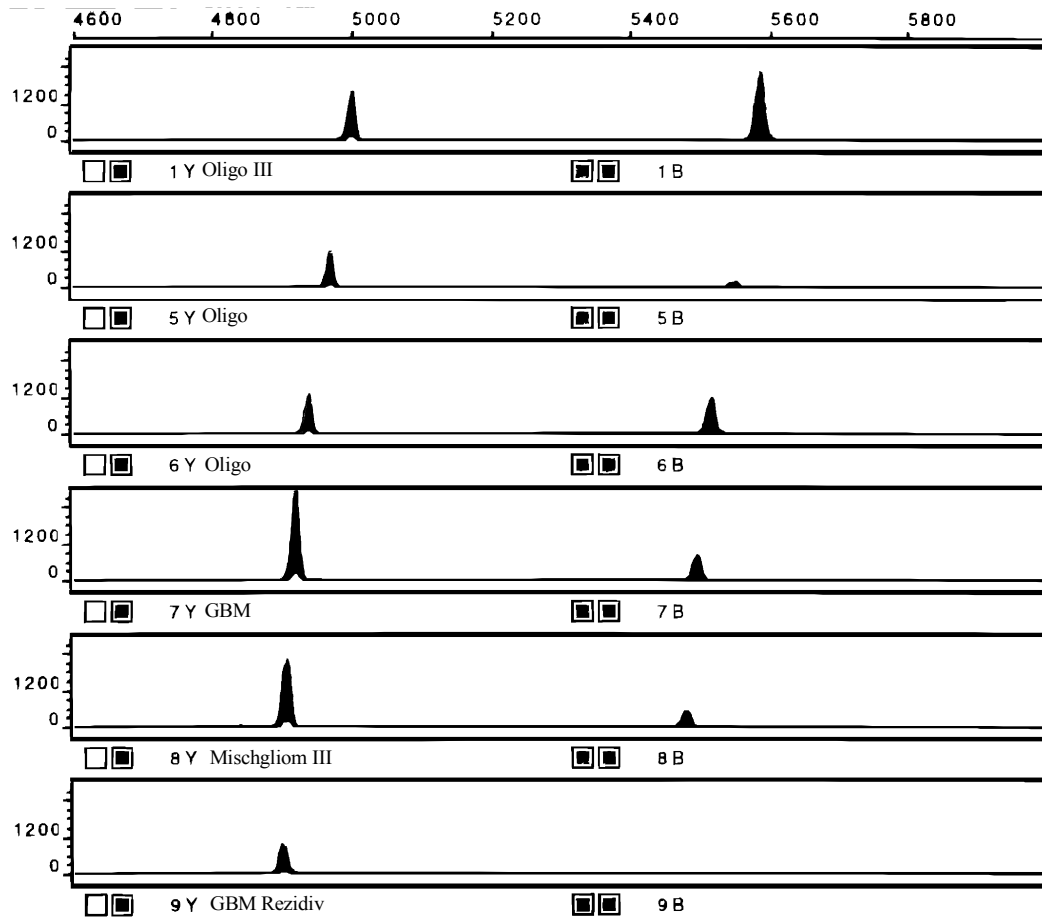


Abb. 39 : Darstellung der GenScan Ergebnisse von einem Teil der Primärtumore; der linke Peak entspricht der Signalintensität der Produkte des MTS1_e2 Primerpaares bei 384 Bp, der rechte der des Gi3a Exon I Paares bei 292 Bp.

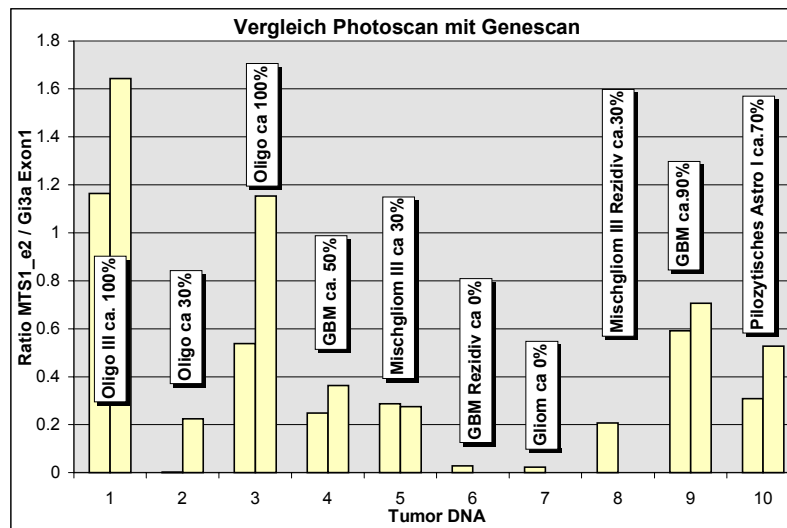


Abb. 40 : Nebeneinanderstellung der Resultate einer Photoquantifizierung (li. Säulen) und einer GenScanquantifizierung (re. Säulen) basierend auf einer MTS1_e2 : Gi3a Exon I PCR mittels der 10 Standard-Primärtumore.

Auch der Reproduktionsversuch zeigte, daß beide Verfahren vergleichbare Resultate erbrachten. In nur zwei von 10 Fällen (Oligodendrogliom III Säulengruppe 1 und Oligodendrogliom Säulengruppe 3) kam es zu Abweichungen von mehr als 1/3. Aus diesen Ergebnissen konnte gefolgert werden, daß beide Methoden nebeneinander bestehen konnten, wengleich die Fehlerhaftigkeit der Photoquantifizierung eine größere war.

Photoquantitative Resultate an Primärtumoren

Der p16 Status von Gliomen

Neben den bereits oben dargestellten Ergebnissen bezüglich des p16 Status von primären Gliomen ergab sich aus den Untersuchungen von insg. 47 dieser Tumore die in Tabelle 6 dargestellten Resultate. Von den 47 Gliomen waren 4 WHO Grad I, 14 Grad II, 9 Grad III und 16 Grad IV. In 4 Fällen lag keine Einteilung vor.

Bei der in dieser Tabelle angegebenen Differenzierung in p16 positive und negative Gliome wurden die zwei in der Diskussion erläuterten Methoden zur Findung eines Schwellenwertes angewandt. Die ersten 10 Fälle wurden zu einem Zeitpunkt untersucht, als noch der Schwellenwert bestimmt wurde, indem von dem 100% Wert der Eichreihe die Standardabweichung subtrahiert wurde. Dabei lag dieser differenzierende Schwellenwert bei 60%. Im späteren Verlauf der Studie wurde dann die zweite Methodik etabliert. Leider standen zu diesem Zeitpunkt nur noch Primer einer anderen Herstellungsfirma zur Verfügung, welche andere Affinitätsmuster aufwiesen und somit nicht auf die ersten 10 Ergebnisse anwendbar waren.

Nr.	Diagnose	Grad	Sex	Alter	PCR	Ratio	p16 Anteil in %	p16 Status
1	Oligodendrogliom	III	F	30	♣♦♥♠	*	85	+
2	Oligodendrogliom	III	M	65	♣♦♥♠	*	10	-
3	Oligodendrogliom	III	M	78	♣♦♥♠	*	85	+
4	Glioblastom	IV	M	30	♣♦♥♠	*	15	-
5	Mischgliom	III	M	12	♣♦♥♠	*	85	+
6	Glioblastom	IV Rezidiv	M	51	♣♦♥♠	*	50	-
7	Glioblastom	Rezidiv von 2	M	65	♣♦♥♠	*	15	-
8	Mischgliom	III Rezidiv	M	58	♣♦♥♠	*	60	-
9	Glioblastom	IV	F	46	♣♦♥♠	*	85	+
10	Astrozytom	I pilozytisch	M	48	♣♦♥♠	*	80	+
54	Oligodendrogliom	III Rezidiv	F	30	♥(II)	0,514	35	+
55	Oligodendrogliom	III	F	70	♥(II)	0,400	10	-
56	Oligodendrogliom	I	M	61	♥(II)	0,264	0	-
57	Oligodendrogliom	II Rezidiv	M	35	♥(II)	0,552	35	+
66	Mischgliom	II	M	33	♥(II)	0,434	10	-
67	Glioblastom	IV	F	10	♥(II)	0,479	30	-
70	Astrozytom	I pilozytisch	M	4	♥(II)	0,421	10	-
74	Glioblastom	IV	M	37	♥(II)	0,430	10	+
76	Oligodendrogliom	III	F	40	♥(II)	0,469	30	-
100	Oligodendrogliom	III	M	50	♥(II)	0,141	0	-
104	Oligodendrogliom	II	F	53	♥(II)	0,246	0	-
105	Glioblastom	IV Rezidiv	M	37	♥(II)	0,425	10	-
106	Glioblastom	IV Rezidiv	F	53	♥(II)	0,371	5	-
109	Mischgliom	II	F	75	♥(II)	0,659	50	+
110	Oligodendrogliom	II	M	42	♥(II)	0,441	10	-
119	Astrozytom	II Rezidiv	M	21	♥(II)	0,335	5	-
120	Oligodendrogliom	II Rezidiv	F	27	♥(II)	0,718	70	+
121	Oligodendrogliom	II	F	53	♥(II)	0,589	40	+
126	Oligodendrogliom	II	F	56	♥(II)	0,609	45	+
130	Glioblastom	IV	M	37	♥(II)	0,622	50	+
131	Astrozytom	Rezidiv	M	55	♥(II)	0,659	55	+
136	Glioblastom	IV	M	49	♥(II)	0,452	15	-
G6	Gangliogliom	I	M	10	♥(II)	0,722	65	+
G7	Oligodendrogliom	IV	M	45	♥(II)	0,156	0	-
g8	Glioblastom	IV	M	62	♥(II)	0,839	80	+
g14	Oligodendrogliom	II	M	36	♥(II)	0,617	50	+
g15	Glioblastom	IV Rezidiv	M	59	♥(II)	0,304	5	-
g18	Oligodendrogliom	II	F	39	♥(II)	0,493	35	+

g21	Oligodendrogliom	II	F	12	♥(II)	0,838	90	+
g22	Oligodendrogliom	II	F	59	♥(II)	0,541	35	+
g23	Glioblastom	IV Rezidiv	M	58	♥(II)	0,276	0	-
g27	Glioblastom	IV Rezidiv	M	58	♥(II)	0,406	10	-
g29	Mischgliom	II	F	54	♥(II)	0,624	50	+
g33	Mischgliom	II	F	49	♥(II)	0,708	65	+
g34	Glioblastom	IV	M	35	♥(II)	0,451	30	-
g35	Astrozytom	I	F	53	♥(II)	0,934	100	+
g37	Astrozytom	II	F	42	♥(II)	0,734	70	+

Tabelle 6 : Untersuchte Primärtumore von Gliomen; die Nr. 1 bis 10 wurden bereits detailliert oben besprochen; in der Spalte "PCR" bedeuten die Abkürzungen ♣ - Primerpaar MTS1_e2 : Gi3a Exon VIII; ♦ - Primerpaar MTS1_e2 : Gi3a Exon I; ♥ - Primerpaar MTS1_e1 : Gi3a Exon I; ♥(II) - Primerpaar MTS1_e1 : Gi3a Exon I in der Amplifikationsvariante II; ♠ - GenScan-quantifizierung von dem Primerpaar MTS1_e2 : Gi3a Exon I; in der Spalte „Ratio“ bedeutet die Abkürzung * - verschiedene Werte pro Tumor, da 4 verschiedene Primerpaare angewendet wurden und aus diesen Mittelwerte gebildet wurden; Einteilung p16 +/- siehe Text.

Der p16 Status von Meningeomen

Ebenso wurde der p16 Status an 36 Meningeomen, an 3 Meningosarkomen und an einem Hämangiozytom untersucht. Die Resultate dieser Analysen finden sich in Tabelle 7 dargestellt.

Nr.	Diagnose	Grad	Sex	Alter	Ratio	p16 Anteil in %	p16 Status
2	Meningeom	I	M	50	0,65	55	+
6	Meningeom	II	M	40	0,59	40	+
9	Meningosarkom	IV, Rezidiv	W	28	1,00	100	+
12	Fibril. Meningeom	I	W	59	0,81	80	+
14	Meningeom	II	W	60	0,47	30	-
16	Meningeom	II	W	75	0,44	20	-
17	Malignes Meningeom	III	W	70	0,511	35	+
20	Angio. Meningeom	II	W	62	0,64	55	+
22	Meningeom	I	W	25	0,54	35	+
25	Meningeom	III	M	93	0,55	35	+
26	Meningeom	II	W	61	0,75	75	+
30	Meningeom	I	W	78	0,97	100	+
32	Meningeom	III	M	28	0,55	35	+
52	Meningeom	I	W	51	0,04	0	-
54-1	Meningeom	I	W	22	1,16	100	+
54-2	Fibröses Meningeom	II	M	47	1,03	100	+

57	Meningeom	I	W	27	1,09	100	+
75	Meningeom	I	W	78	0,90	100	+
78	Meningeom	I	W	31	1,05	100	+
82	Meningeom	II	M	54	0,85	90	+
95	Meningeom	III	W	36	0,83	85	+
97	Meningeom	I	W	71	0,00	0	-
160	Hämangioperizytom	III	M	33	0,94	100	+
s1	Meningeom	II	F	52	0,50	35	+
s2	Meningeom	II	F	60	0,85	90	+
s3	Meningeom	II	M	64	0,78	80	+
s4	Meningeom	III	F	94	0,52	35	+
s6	Meningeom	I	M	47	0,50	35	+
s8	Meningeom	II	F	58	0,32	5	-
s9	Meningeom	II	F	71	0,62	55	+
s10	Meningeom	II	F	37	0,72	65	+
s11	Meningeom	I	F	71	0,74	70	+
s14	Meningeom	I	M	56	0,57	40	+
s15	Meningeom	I	F	57	0,58	40	+
s16	Meningeom	II	F	53	0,41	30	-
s17	Meningeom	II	F	33	0,83	85	+
s23	Meningeom	I	F	22	0,54	35	+
s24	Meningeom	I	F	3	0,50	30	+
g2	Meningosarkom	IV	F	29	0,912	100	+
g19	Meningosarkom	IV	F	59	0,632	50	+

Tabelle 7 : Der p16 Status von 36 Meningeomen, 3 Meningosarkomen und 1 Hämangioperizytom; Zur Analyse wurde das Primerpaar MTS1_e1 : Gi3a Exon I (II) verwendet, es galt die Eichreihe aus Abb. 32, der Schwellenwert p16 + / p16 – lag bei 0,47, d.h. bei 30%.

Von den untersuchten 36 Meningeomen erwiesen sich bei einem Schwellenwert von 0,47 6 als p16 deletiert (17%), die restlichen 28 (83%) stellten sich in ihrem p16 Status als normal heraus. Von den 6 p16 deletierten Meningeomen wurden 4 als Grad II und 2 als Grad I histopathologisch klassifiziert. Alle 5 Grad III Meningeome zeigten einen p16 positiven Befund, ebenso die 3 Meningosarkome Grad IV und das Hämangioperizytom Grad III.

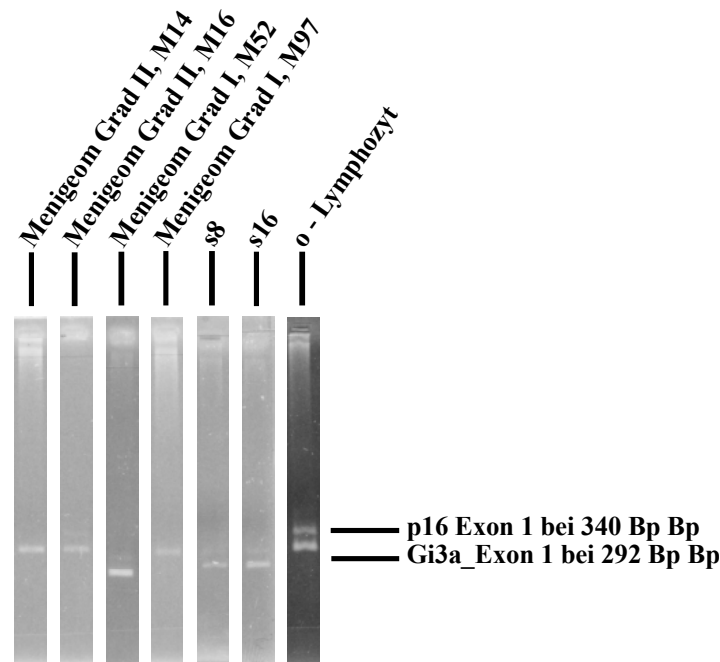


Abb. 41 : Die 6 Menigeome, welche einen negativen p16 Status aufwiesen; man sieht jeweils eine intensive Gi3a_Ex.1 Bande und eventuell eine sehr schwache MTS1_e1 Bande; als Vergleich die nicht transformierte DNA des Ω - Lymphozyten mit beiden Bande; die beiden Banden liegen in den 7 dargestellten Lanes nicht nebeneinander, da es sich um verschiedene Gele handelte, aus welchen diese Abbildung zusammen gesetzt wurde.

Ergebnisse des Photoscans an Primärtumoren der Zelllinien

Zur Gewinnung von DNA aus den Primärtumoren der etablierten Zelllinien war es erforderlich, Paraffinschnitte aus der Abteilung für Neuropathologie des UKE heranzuziehen, da die zu diesem Zeitpunkt noch vorhandenen Mengen an eingefrorenen Primärmaterial für diese Untersuchungen nicht mehr ausreichend waren.

Da die DNA Qualität massiv unter der Einbettung in Paraffin und unter der Lagerung bei Raumtemperatur von teils über 10 Jahre gelitten hatte, gelang es bei der oben beschriebenen DNA Extraktionsmethode aus Paraffinschnitten nur, ca. 100 bis 150 Bp lange DNA Fragmente zu erhalten. So war es erforderlich, einen neuen Primer für den internen Standard zu konstruieren, welcher innerhalb der Größe dieser Fragmente lag. Dieser neue Primer konnte das G-Protein Gi3a Exon I amplifizieren und seine Produktlänge betrug 114 Bp. Zur Amplifikation von p16 wurde der Primer für p16 Exon III herangezogen, welcher ein 93 Bp langes Produkt lieferte.

Entsprechend der bereits oben beschriebenen Methodik wurde zunächst als erstes erneut eine Eichreihe ermittelt, indem p16 positive und p16 negative DNA in unterschiedlichen Konzentrationen vermischt und dann mit den neuen Primerpaaren amplifiziert wurde. Das Resultat ist in Abb. 42, die graphische Auswertung in Abb. 43 dargestellt.

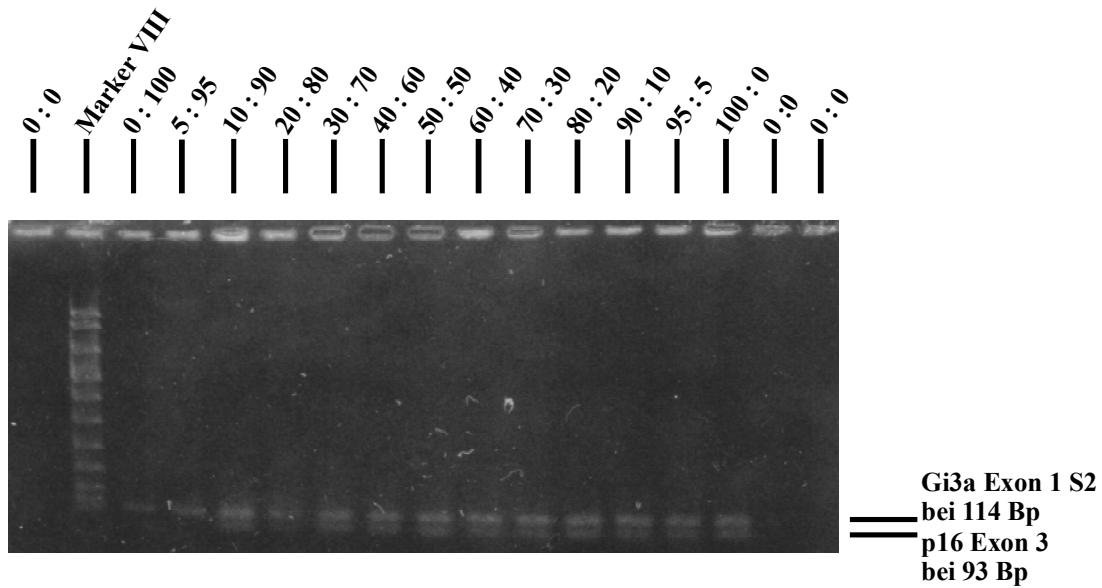


Abb. 42 : Resultat der Gi3a Exon I S2 : MTS1_e3 Coamplifikation zur Gewinnung einer Eichreihe unter Verwendung einer zunehmenden Konzentration p16 positiver und einer abnehmenden Konzentration an p16 negativer DNA.

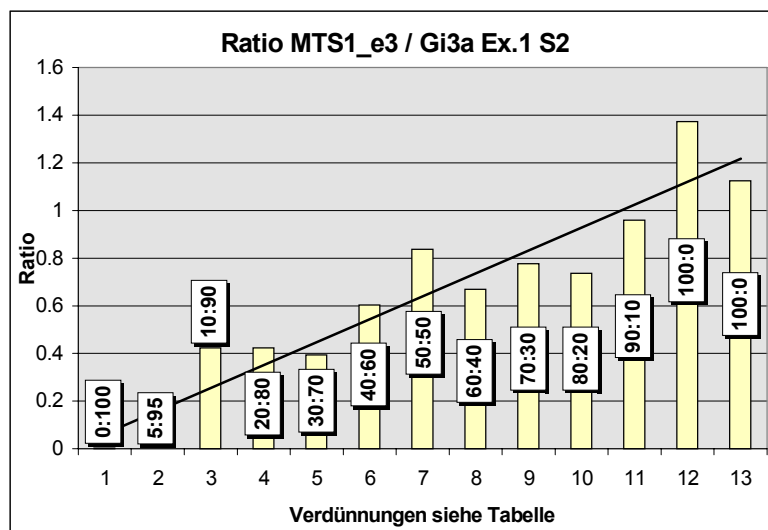


Abb. 43 : Graphische Darstellung der Ratio aus den Bandenintensitäten des Primers MTS1_e3 und Gi3a Exon I S2 unter Verwendung einer zunehmenden Konzentration p16 positiver und einer abnehmende Konzentration p16 negativer DNA.

Nach Verwendung gleicher PCR Bedingungen an den DNA's der aus Paraffinschnitten gewonnenen Primärtumoren ergab sich folgendes Bild eines Geles (Abb. 44).

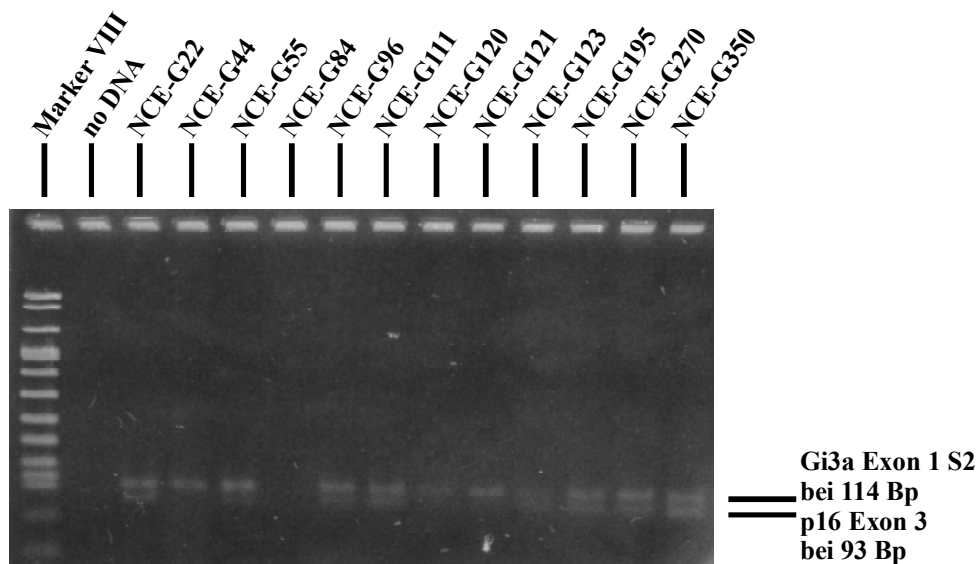


Abb. 44 : Resultat der Gi3a Exon I S2 : MTS1_e3 Coamplifikation an Primärtumoren aus Parafinschnitten.

Unter Heranziehung der in Abb. 42 dargestellten Eichreihe konnte man dann nach Errechnung der Ratio der Bandenintensitäten Aussagen bezüglich des p16 Status von Primärtumoren von 11 Zelllinien machen (Abb. 45).

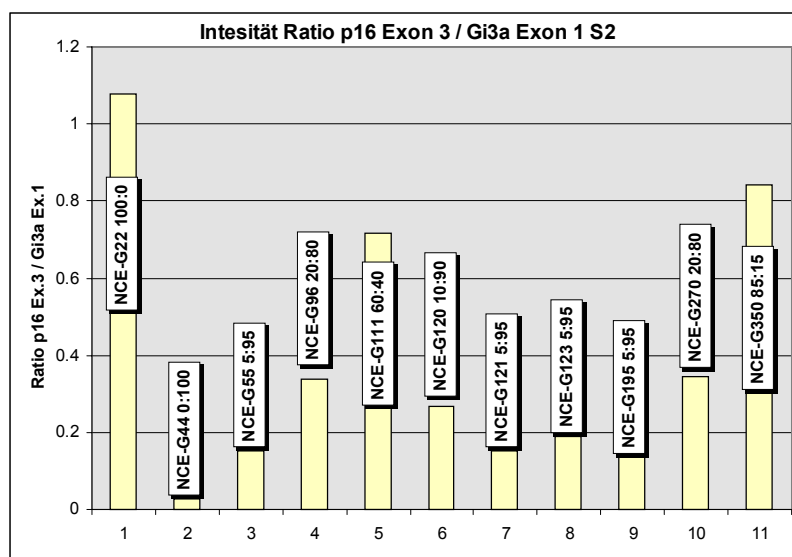


Abb. 45 : Ratio aus den Bandenintensitäten von 11 Primärtumoren, aus den Zelllinien gewonnen wurden.

Wenn man die Grenze zwischen p16 positiven und p16 negativen Tumoren bei einem Anteil von 60% p16 positiven Zellen setzte, dann erhielt man als Resultat, daß 2 der 11 untersuchten Linien (18%) ihren Status innerhalb der Zellkultur geändert hatten (siehe Tabelle 8). Es handelte sich dabei um die Linie NCE-G111, welche seit 1988, d.h. seit 9 Jahren, und um die Linie NCE-G350, die seit 1994, d.h. seit 3 Jahren, etabliert war. Da bei beiden Linien auch der p16 Status früher Passagen bekannt war (

siehe Tabelle 5), kann man folgern, daß die genetische Alteration bereits zu einem frühen Zeitpunkt eingetreten sein muß, da sowohl die Zelllinie NCE-G111 in Passage 16 als auch die Linie NCE-G350 in Passage 23 p16 negativ waren, In-Vivo jedoch noch einen p16 positiven Status hatten. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie NCE-G22, welche sowohl In-Vivo als auch als Linie p16 positiv blieb.

Zelllinie	p16 Status in den Zelllinien	p16 Status in den korrespondierenden Primärtumoren
NCE-G22	⊕	⊕
NCE-G44	-	-
NCE-G55	-	-
NCE-G96	-	-
NCE-G111	-	⊕
NCE-G120	-	-
NCE-G121	-	-
NCE-G123	-	-
NCE-G195	-	-
NCE-G270	-	-
NCE-G350	-	⊕

Tabelle 8 : Vergleich des p16 Status der 11 untersuchten Zelllinien mit ihren korrespondierenden Primärtumoren. Wenn man als Grenze 60% p16 positive Zellen annimmt, dann haben sich 2 von 11 Linien in ihrem Status verändert.

Diskussion

Die klassische Tumorthherapie

Die Therapie von Neoplasmen beruht gegenwärtig auf 3 Säulen: aus operativer Resektion, Chemotherapie und Bestrahlung. Trotz deutlicher Verbesserungen der Operationstechniken, der Kombination verschiedener Zytostatika miteinander und der Optimierung von Bestrahlungsprotokollen ist jedoch keine signifikante Verbesserung der Therapieergebnisse mittels dieser "klassischen Trinität" mehr zu erwarten. Dabei ist bei Glioblastomen eine ausreichend radikale chirurgische Tumorentfernung nicht möglich, die Lebenserwartung beträgt ohne Therapie wenige Wochen¹⁰² und nach völliger makroskopischer Extirpation 6 bis 16 Monate^{103,104}, wenn der Tumor dabei in einem günstigen Operationsgebiet liegt. Ohne solche Voraussetzung beträgt die mediane Überlebenszeit bei rein operativer Therapie sogar nur 4 bis 6 Monate¹⁰². Nach Entstehung des Rezidivs beträgt dann trotz intensiver Therapie die mittlere Lebenserwartung nur noch 35 Wochen.¹⁰⁵

Mittels Bestrahlung, welche 2 bis 4 Wochen postoperativ begonnen werden sollte, kann die mediane Überlebenszeit auf 8 bis 10 Monate gesteigert werden. Die Gesamtdosis der Radiatio liegt zwischen 50 und 60 Gy, die Einzeldosen bei 1.8 bis 2 Gy/d mit 5 Fraktionen pro Woche. Intensivere Dosen verursachen deutliche Steigerungen des Risikos radiogener Schäden des normalen Hirngewebes. Stereotaktische Bestrahlungen bieten die Möglichkeit, kleine Tumervolumina in kurzer Zeit einer hohen Dosis auszusetzen. Diese Voraussetzung kleiner Volumina ist jedoch bei Gliomen sehr selten gegeben^{106,107,108,109}.

Ein großes Problem der Chemotherapie in der Neuroonkologie ist die Liquorgängigkeit der Zytostatika. Obwohl innerhalb von Gliomen die Blut-Hirn-Schranke gestört ist, so ist selbige doch in den wichtigen peripheren Proliferationsbereichen des Tumors noch weitgehend intakt. Diese schränkt die Verwendung von Zytostatika massiv ein. Bei der Monotherapie mit dem Nitroseharnstoff BCNU konnten objektive Remissionsraten von bis zu 30 % erreicht werden, bei Kombination mit Operation und Radiatio konnte die mediane Überlebenszeit um 8 Wochen ausgedehnt werden¹¹⁰. Allerdings profitieren von einer adjuvanten Chemotherapie v.a. jüngere Patienten und Patienten mit einem hohen Karnofskiindex^{111,112,113,114,115}. Da BCNU jedoch eine erhebliche pulmonale Toxizität besitzt, empfiehlt es sich, andere Nitroseharnstoffderivate wie ACNU oder CCNU zu verwenden¹¹⁶. Teilweise konnten die Therapieergebnisse durch eine Polychemotherapie verbessert werden¹¹⁷.

Die Versuche, mittels chemischer Substrate eine osmotische Öffnung der Blut-Hirn-Schranke zu bewirken oder Zytostatika intraarteriell zu applizieren, erreichten zwar eine höhere Toxizität, jedoch keinerlei Verbesserung der Prognose^{118,119}.

Alternativen in der Tumortherapie

Aufgrund dieser frustranen Therapieoptionen leitet sich die Notwendigkeit ab, alternative Therapiekonzepte zu erarbeiten. Dabei erweist es sich als unumgänglich, die Mechanismen zu verstehen, die bei der Fehlregulation von neoplastischen Zellen involviert sind. Einen wesentlichen Schritt nach vorne stellte die Entdeckung von retroviralen Onkogenen dar¹²⁰. Wenngleich auch der retrovirale Aspekt sich als relativ unbedeutend erwiesen hatte, so gelangte man jedoch zur Erkenntnis, daß es bestimmte Protoonkogene im Genom gibt, welche aufgrund ihrer das Zellwachstum modulierenden Funktion für die Tumorbilogie von essentieller Bedeutung sind. Diese Gene wiederum ließen sich gliedern in Onkogene, welche das Zellwachstum stimulieren und die zumeist Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren kodieren (z.B. EGFR, EGF, TGF- α , PDGF, PDGFR), und in Tumorsuppressorgene, die eine inhibierende Wirkung haben (z.B. p53, p16). Darauf aufbauend wurden Interaktionen zwischen diesen einzelnen Systemen gefunden, so konnte u.a. gezeigt werden, daß das Wild-type p53 Protein mit den Promotoren verschiedener anderer Gene wie Bax, MDM2, EGFR, Thrombospondin oder Fas interagieren^{121,122}. Des weiteren fand die genetische Steuerung der Apoptose ein zunehmendes Interesse, insbesondere unter dem Aspekt, daß sich die 2 bisher bekannten Apoptose-Systeme Fas/FasL und Bax/Bcl-2 gegenseitig regulieren¹²³ und daß die Expression dieser beiden Systeme nur unter Anwesenheit von Wild-type p53 Protein möglich ist^{124,125,126}. Weiter konnte gezeigt werden, daß eine Apoptose unter p53

Überexpression allein nicht erfolgte, sondern daß dieser Effekt nur unter gleichzeitiger Überexpression von p53 und p16 möglich war¹²⁷.

Als weitere Therapiekonzepte boten sich initial adjuvante Immuntherapien¹²⁸, die Applikation monoklonaler Antikörper¹²⁹ oder auch die Modulation autokriner Wachstumsmechanismen¹³⁰ an. Jedoch konnte bisher keines dieser Therapieverfahren eine deutliche Verbesserung erreichen. Weitere therapeutische Möglichkeiten bestehen in der Transfektion genetischen Materials. So gäbe es die Variante, Gene zu transfizieren, welche Immunreaktionen verstärken, welche als Antisense-Gen überexprimierte Onkogene hemmen oder welche einen zytotoxischen Effekt vermitteln. Letzteres wird bereits u.a. auch an Gliomen versucht, indem durch Transfektion das Herpes Simplex Virus Thymidin-Kinase Gen (HSV-tk) in Tumorzellen eingebracht wurde und dieses dort nach Ganciclovirapplikation einen zytotoxischen Metaboliten transkribierte^{131,132,133}.

Ein anderer therapeutischer Ansatz liegt in dem Versuch, fehlende Steuergene in die Tumorzellen zurück zu bringen und somit diese Zellen im Sinne einer Apoptose wieder kontrollierbar zu machen. Als Vektoren wurden bisher in einer Vielzahl von Ansätzen u.a. Retro- und Adenoviren versucht, um intakte p53- bzw. p16 Gene in Zelllinien einzubringen^{134,135,127,136,137,138,139}. Die ersten klinischen Versuche in Form von retroviraler Transfektion von Wild-type p53 in Glioblastome sind ebenfalls, wenngleich auch noch nicht sonderlich erfolgreich, abgeschlossen¹⁴⁰. Als ein effektiverer p53 Transfektionsvektor fand sich das replikationsunfähige rekombinante Adenovirus rAd-p53¹⁴¹.

Die Verwendung von kleinen Molekülen, welche hochspezifisch eine Signalkaskade modulieren, könnte die zu erwartenden Schwierigkeiten immunogener Art umgehen, welche bei der Anwendung von Antikörpern und Viren entstehen. Im Gegensatz zu Antikörpern wirken diese Substanzen intrazellulär. In der Erprobung sind dabei Tyrosinkinase-Inhibitoren von PDGF- und EGF-Rezeptoren^{142,143,144}. Als weiteres Ziel kommen Proteine in Frage, welche in der Signalkaskade hinter die Rezeptoren geschaltet sind. So lassen sich die ras - Onkogene durch einen Inhibitor der Farnesyltransferase hemmen^{145,146,147}. Der Effekt der Farnesyltransferaseinhibitoren beruht offenbar aber nicht nur auf der Modulation der ras - Onkogene, wie Studien an nicht-ras mutierten Zellen zeigten. Offenbar kann man mittels dieser Substanzen bis zu 20 verschiedene Proteine beeinflussen¹⁴⁸. Im Gegensatz zu Onkogenen, welche zumeist mutationsbedingt hyperaktiv sind, zeichnen sich defekte Suppressorgene durch einen Verlust ihrer selbst aus. Da es nun leichter ist, ein überaktives Protein zu beeinflussen, als ein nicht mehr vorhandenes zu ersetzen, bieten sich für Suppressorgene eher die oben beschriebenen Therapiekonzepte an. Da jedoch Suppressorgene wie p53 und mehr noch p16 in sehr vielen Tumoren deutlich öfter mutiert sind als Onkogene, gibt es auch ein nicht zu vernachlässigendes an kleinmolekularen Wirkstoffen. Dabei ist das gegenwärtig wohl am ergiebigsten erscheinende Ziel die Inhibition der CDK4, um so ein fehlendes p16 Gen zu ersetzen¹⁴⁹. Allerdings gibt es z.Zt. nur Flavopiridol, einen nichtspezifischen CDK Inhibitor^{150,151}.

Diese Arbeit soll nun zeigen, daß Störungen in dem p16/Rb System nicht nur ein Artefakt von Zellkulturen sind, sondern bereits in Primärtumoren von Relevanz sind. Denn wenn dieses der Fall ist, und man weiterhin berücksichtigt, daß Störungen in dieser Signalkaskade offensichtlich häufiger zu beobachten sind, als Defekte im p53 System, dann sollte auch das p16 Gen und seine abhängigen Regulatoren von sehr großer Bedeutung bezüglich einer noch zu entwickelnden Getherapie sein.

Der p16 Status der Zelllinien im wissenschaftlichen Kontext

Der p16 Status der Zelllinien

Im Zuge der Untersuchung von 31 Zelllinien aus dem Labor für Hirntumorbiologie des UKE, welche aus Glioblastomen gewonnen wurden, fanden sich in 61% der Fälle, d.h. bei 19 Linien, Deletionen des p16 Genes. Das Exon 1 war in 18 Fällen, d.h. zu 55%, das Exon 2 in 18 Fällen, d.h. zu 58%, und das Exon 3 in wieder 17 der 31 Fälle, d.h. zu 55%, verloren gegangen. 28 der 31 Zelllinien, d.h. 90% der Fälle, zeigten sich in ihrem p16 Status homogen, entweder alle 3 Exons waren vorhanden oder deletiert. Bei den 3 anderen Linien, die sich nicht dergleichen verhielten, handelte es sich um die Zelllinie NCE-G28, bei welcher nur Exon 1, um die Linie NCE-G84, bei der Exon 1 und 3 und um die Linie NCE-G124, bei der nur Exon 2 und 3 nachweisbar waren. Dieses Resultat von 61% p16 deletierten Zelllinien liegt niedriger als alle fremden Ergebnissen (siehe Tabelle 9). Wenn man jedoch berücksichtigt, daß 6 von den 10 Untersuchungen nur ein n = 5 bis 8 vorwies und gerade diese Arbeiten Deletionsraten von bis zu 100% zeigten, die anderen 4 Untersuchungen hingegen Fallzahlen von 16 bis 35 vorwies und dabei nur noch p16 Defekte im Bereich von 67 bis 75 % erreichten, dann erscheinen die eigenen Resultate doch plausibel. Aussagen bezüglich der Passagezahl der verwendeten Zelllinien lieferten keine der Arbeiten, welche sich mit p16 Defekten an Gliomlinien auseinandersetzen. Da die hier vorliegende Arbeit jedoch zeigt, daß in 2 von 11 Fällen (18%) sich der p16 Status vom Primärtumor zur Zelllinie doch artifiziell ändert, es aber nicht bekannt ist, wie alt die von den anderen Autoren verwendeten Linien waren, dürfte eine Schwankungsbreite von ca. 18% bezüglich der durchschnittlichen p16 Deletionsrate an Gliomlinien zu berücksichtigen sein.

Autor	Zahl der Deletionen	Zahl der Deletionen in %	Zahl der Linien insg.	Screening Methode
Hama ¹⁵²	4	80	5	Southern Blot
Srivenugopal ¹⁵³	5	71	7	Southern Blot
Izumoto ⁹⁵	6	100	6	PCR

He ¹⁵⁴	12	67	18	PCR
He ⁴²	24	75	32	PCR
Nabori ²¹	7	88	8	STS-PCR
Kamb ²²	25	71	35	STS-PCR
Arap ⁹³	12	75	16	Southern Blot und Western Blot
Aagaard ¹⁵⁵	2	100	2	RT-PCR
Gomi ¹⁵⁶	7	88	8	Southern Blot

Tabelle 9 : Resultate verschiedener Untersuchungen bezüglich des p16 Status von Gliom Zelllinien; die Deletionsrate bzw. die Nicht-Expressionsrate schwankt zwischen 67 und 100%; wenn man die Ergebnisse zusammenfaßt, dann haben von insg. 137 Gliom Linien 104 Fälle (76%) Defekte im p16 Gen.

Die Beobachtung, daß zumeist im Falle einer p16 Deletion alle Exons des Genes betroffen sind, deckt sich mit anderen Untersuchungen. Eine größere Rate an nicht-Übereinstimmungen dieses Deletionsmusters fanden sich nur in einer Arbeit⁹⁵. Zwar wiesen Analysen mittels Microsatellite Markern in einem Bereich von bis zu 200 kBp um den p16 Locus herum darauf hin, daß die für viele Neoplasmen typische Deletion auf Chromosom 9p21 zwar nur einen relativ kleinen Bereich umfassen, diese aber dennoch zumeist das gesamte p16 Gen betreffen^{85,91}. Mittels dieses Phänomens läßt es sich auch erklären, daß initiale Beobachtungen eine sehr geringe Deletionsrate an Primärtumoren aufwiesen: der Bereich der Microsatellite Markern war wohl zu groß gewählt, so daß die relativ kleine p16 Deletion oft heraus fiel. Dieses Argument wurde v.a. durch eine Studie bekräftigt, welche sehr differenziert Deletionsmuster von Microsatellite Markern in einer Vielzahl von Abständen zum p16 Locus erbrachte und welche zeigte, daß die Marker, die in unmittelbare Nähe zum MTS1 Gen liegen, deutlich öfter nicht mehr nachweisbar waren als die weiter entfernten⁸⁹.

Der p15 Status der Zelllinien in Kontext mit p16

Bei dem p15 bzw. MTS2 Status ergab sich als Resultat, daß 21 der 31 Zelllinien, d.h. 68%, des Genes verlustig gegangen waren. Der p15 Status entsprach in 29 der 31 Linien dem p16 Status, d.h., in 94% der Fälle waren beide Gene sich in ihrem Deletionsmuster gleich, nur die Zelllinien NCE-G112 und NCE-G118 hatten ein deletiertes Exon 2 des p15 Genes bei intaktem p16 Gen (siehe Tabelle 3). Die-

ses steht im Widerspruch zu bisherigen Kenntnissen, bei welchen die p15 Deletionsrate geringer als die von p16 ist. So ergaben verschiedene initiale Studien an 6 Zelllinien eine p16 - p15 Codeletion, an 4 anderen Linien war hingegen p16 nicht mehr nachweisbar, während p15 noch vorhanden war^{42,157,92,158}. In der Literatur ergibt sich abgesehen von diesen Autoren das in Tabelle 10 dargestellte Verteilungsmuster. Da es nur sehr wenige Arbeiten zum Thema "p15 und Gliome" gibt, wurden in Tabelle 10 alle vorhandenen Ergebnisse an humanen Zelllinien unterschiedlichem Ursprunges aufgeführt.

Autor	Primärtumor	p15 Verlust	p15 Verlust in %	p15 und p16 Verlust	p15 und p16 Verlust in %	Linien insg.
Zariwala ¹⁵⁹	Verschiedene	16	22			73
Yoshida ¹⁶⁰	BT-CA	4	100	3	75	4
Okamoto ¹⁶¹	NSCLC	7	50	7	50	14
	SCLC	0	0	0	0	8
Washimi ⁹⁷	NSCLC	6	30	6	30	20
	SCLC	0	0	0	0	20
Nakagawa ¹⁶²	NSCLC	17	24	17	24	71
Srivenugopal KS ¹⁶³	Gliome	5	71	5	71	7
Robinson WA ¹⁶⁴	Melanom	8	35	6	26	23
Tanaka ¹⁶⁵	ESC-CA	16	53	16	53	30
Kaino ¹⁶⁶	Leberzell-CA	0	0	0	0	5
Izumoto ⁹⁵	Gliome	5	83	5	83	6

Tabelle 10 : Resultate verschiedener Autoren an Zelllinien unterschiedlicher Herkunft; die Säule "p15 und p16 Verlust" bezieht sich auf die Gesamtzahl der untersuchten Linien; BT-CA: "biliary tract carcinoma", NSCLC: "non-small cell lung cancer", SCLC: "small cell lung cancer", ESC-CA: "esophageal squamous-cell-carcinoma".

Wie in Tabelle 10 zu sehen ist, so gibt es bisher keine größeren Arbeiten bezüglich der p15 - p16 Codeletion an Gliomen. Bei den zusammengefaßt 10 untersuchten Zelllinien aus Gliomen fand sich als Resultat, daß immer p15 Deletionen mit p16 Verlusten einher gingen und daß die Deletionsrate wie bereits oben beschrieben zwischen 71 und 83 % lag. Bei den anderen analysierten Zelllinien aus unterschiedlichen Primärtumoren schwankte die Codeletionsrate zwischen 0 und 83 %, d.h. man kann keine

Aussagen bezüglich Tumor-übergreifender Mechanismen machen. Jedoch zeigt es sich beim Vergleich von p15 Deletion zu p15 - p16 Codeletion, daß zumeist p15 gemeinsam mit p16 verlustig geht. Nur in einem Fall¹⁵⁹ waren 100 % aller Linien p15 negativ während der p16 Status bei nur 75 % lag.

Nach Kenntnis dieser Studien und der eigenen Resultate muß man nun davon ausgehen, daß die p15 Deletionsrate der von p16 nicht nachsteht, und daß beide Tumorsuppressorgene fast immer zugleich deletieren. Damit dürfte auch die Hypothese widerlegt sein, daß es einen Hot-Spot für chromosomale Brüche zwischen dem p15 und dem p16 Gen geben müßte¹⁵⁹.

Kritik und Diskussion der quantitativen p16 - PCR

Die Grenzen der quantitativen PCR Methodik

Die quantitative Messung von PCR Produkten ist theoretisch sehr gut möglich, da sich die Konzentration der Amplifikate exponentiell mit der Zyklenzahl verhält. So sollte sich die Menge an Produkten bei jedem Zyklus verdoppeln. Jedoch konnte gezeigt werden, daß diese exponentielle Zunahme ab einer gewissen Zahl an Runden ein Plateau erreicht und dann nur noch linear anwächst: bei 12 bis 400 Anfangskopien beginnt die Plateauphase bei 30 Zyklen, bei 200 bis 3200 Kopien bei 25 Zyklen und bei 3200 bis 51200 Kopien bei 20 Zyklen¹⁶⁷ (siehe Abb. 46).

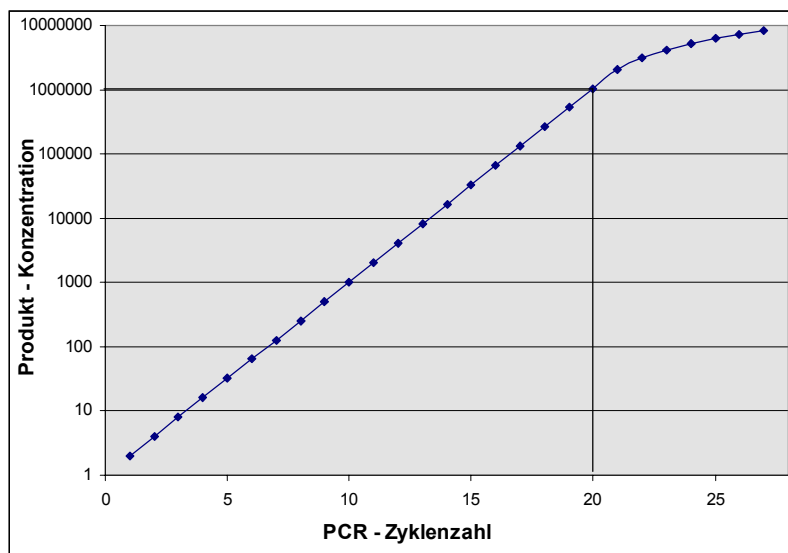


Abb. 46 : Darstellung der exponentiellen Zunahme der PCR Produkte bei einer Zahl an Anfangskopien von 3200 bis 51200; ab 20 Zyklen erfolgt die Zunahme der Produktkonzentration nur noch linear.

Wie bereits in dem Kapitel "Material und Methoden" dargelegt, so wurde initial eine Eichreihe aus einerseits p16 positiver und andererseits p16 negativer DNA bei bekannter und weitgehend gleicher Konzentration selbiger ermittelt. Jedoch war es nicht mit ausreichender Exaktheit möglich, die Zahl der

Anfangskopien zu bestimmen. Für einige häufige Fragestellungen der Virologie gab es kommerzielle Standards bekannter Kopienzahl, um einerseits eine Eichreihe zu ermitteln, andererseits um die maximale Zyklenzahl zu bestimmen, innerhalb derer noch eine exponentielle Amplifikation erfolgt. Dergleichen stand für die p16 Amplifikation nicht zur Verfügung. Da jedoch auch keine ausreichend sensiblen Detektionstechniken vorhanden waren (s.u.), um PCR Produktkonzentrationen bei nur 20 Zyklen zu messen, war die Kenntnis der Zahl der Ausgangskopien ohnehin müßig. Als einzige Normierung wurde nur versucht, eine DNA Konzentration von ca. 75 ng/µl PCR Volumen zu schaffen.

Da eine PCR die Tendenz hat, sehr stark von geringen Veränderungen der äußeren Bedingungen beeinflusst zu werden, ist es erforderlich, bei einer quantitativen PCR diese weitgehend konstant zu halten. Aus diesem Grund wurde grundsätzlich auf die Möglichkeit verzichtet, bei gleicher Ausgangs-DNA internen Standard und die p16 Sequenz in getrennten Tubes zu amplifizieren. Ebenso machte sich als Problem bemerkbar, daß die Resultate bei gleichen Konzentrationen von Substraten und bei identischen PCR Programmen die verwendeten 4 PCR Maschinen differierende Produktmengen lieferten. Deshalb wurde zumeist nur auf die Biometra PCR Maschinen bei quantitativen Fragen zurückgegriffen. Auch die Verwendung neusynthetisierter Primer gleicher Sequenz aber verschiedener Hersteller erforderten oft eine Neuerstellung der Eichreihe.

Von einer sehr viel größeren Tragweite erwies sich das Phänomen, daß die Ratio nicht konstant blieb, wenn man die selbe DNA bei gleichen PCR Konditionen mit nur differierenden Konzentrationen amplifizierte. Es zeigte sich dabei, daß die Ratio mit der steigenden DNA Konzentration zunahm (Abb. 20). Offensichtlich gab es komplexe Wechselwirkungen zwischen den Affinitäten der beiden Primerpaare, der eingebrachten DNA Menge und der daraus resultierenden Menge an Produkten bei einer konstanten Zykluszahl, welche eine relative Zunahme der MTS1_e1 Amplifikate gegenüber den Gi3a_Ex.1 Produkten bei ansteigender DNA Konzentration bedingten. Ob dieses Phänomen auf der zu hohen PCR Zykluszahl beruhte, ließ sich nicht klären, da zum photoquantitativen Nachweis 20 Zyklen zu gering waren.

Aus dieser Korrelation zwischen DNA Konzentration und Ratio bei Verwendung einer DNA folgte die Frage, ob es möglich wäre, dieses Phänomen auf eine Vielzahl von DNA's zu übertragen, um eine Gesetzmäßigkeit in Form eines Anstiegsfaktors beschreiben zu können. Wäre dieses der Fall, dann könnte man bei Kenntnis dieses Anstiegsfaktor jede DNA auf eine Standardkonzentration hochrechnen, um dann diese DNA mit jeder anderen vergleichen zu können. Das dergleichen jedoch nicht möglich war, zeigte Abb. 21. Die Resultate von 22 DNA's bei verschiedenen Konzentrationen, lieferten insg. 58 Einzelergebnisse, welche nur eine sehr schwache Anstiegstendenz boten. Wahrscheinlich liegt die Ursache dieser Resultate in dem differierenden Anteil an Verunreinigungen und an den Schwächen eine photometrischen DNA Konzentrationsbestimmung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Aus diesen Ergebnissen wurde dann gefolgert, daß bezüglich des Vergleiches unterschiedlicher DNA's insg. von einer Konstanz der Rationes auszugehen wäre. Die Zunahme der Ratio stellte sich somit nur als ein Phänomen dar, welches in Einzelfällen von Relevanz war. Durch diesen Beweis wurde es dann

möglich, verschiedene Primärtumore unabhängig von der Qualität der aus ihnen extrahierten DNA unter Kenntnis der Schwankungsbreite des Verfahrens gesichert miteinander zu vergleichen.

Probleme der Photoquantifizierung

Zur Ermittlung der Konzentrationen der PCR Produkte werden üblicherweise radio-gelabelte Primer verwendet. Als Substanzen kommt ^{32}P oder auch $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$'s in Betracht. Nach der Gelelektrophorese kann man dann die Konzentration densitometrisch, szintillatorisch oder über Radioimaging bestimmen¹⁶⁸. Als Alternative zu den radioaktiven Substanzen wurden andere Methoden etabliert, so z.B. die Verwendung chemoluminiszierender oder, wie auch in dieser Arbeit, fluoreszierender Markierungen.

Da keine der oben erwähnten Methodiken regelmäßig zur Verfügung standen, war es erforderlich, eine Meßmethode zu schaffen, welche mit einfachen Mitteln dennoch grobe Aussagen bezüglich der Konzentration der PCR Produkte ermöglichte. Als solche bot sich eine Photoquantifizierung an. Diese Methode der Photoquantifizierung beruhte darauf, die auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennte DNA zu photographieren, das Bild einzuscannen und es mittels des Programmes BMPNEU.EXE auszuwerten. Die notwendigen Optimierungsversuche bezüglich Gelelektrophorese und Photographierung wurden bereits in dem Kapitel "Material und Methoden" vorgestellt, hier soll im folgenden nun die Probleme und die unterschiedlichen Lösungen der Software diskutiert werden.

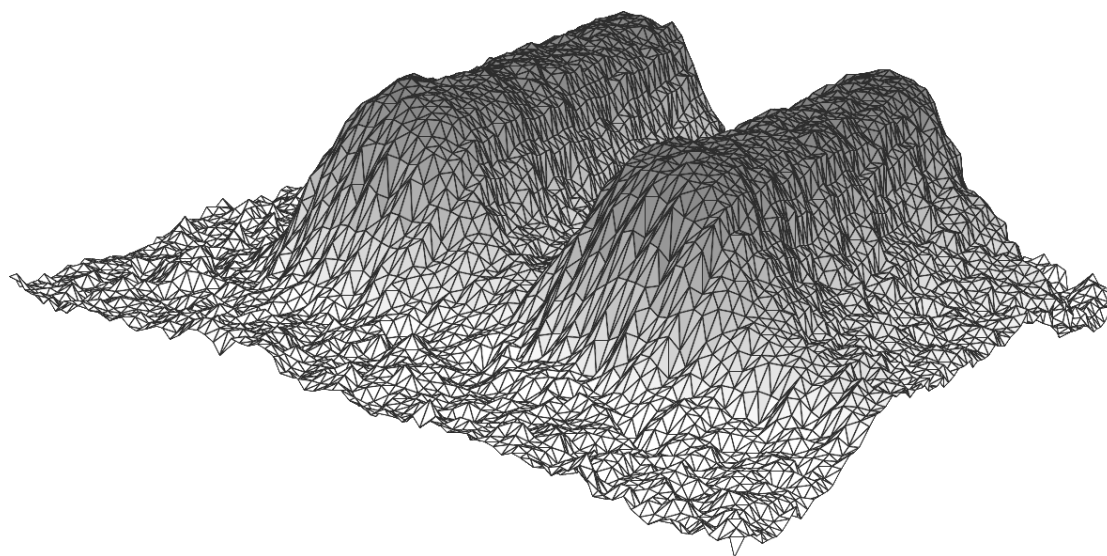


Abb. 47 : Darstellung von 2 Banden, eine MTS1_e1 Bande bei 384 Bp und eine Gi3a_Ex.1 Bande bei 292 Bp, nachdem sie bei 400 dpi eingescannt und mittels einer modifizierten Version des Programmes BMPNEU.EXE analysiert wurden; als X - und Y - Koordinaten wurden die entsprechenden Koordinaten des Bildes, als Z - Wert die Intensität des jeweiligen Pixels verwendet; wie zu erkennen ist, so liegt das Tal zwischen beiden Banden nicht auf dem Groundlevel, sondern etwas höher: hierbei handelt es sich um den DNA Schweif der leichteren Bande.

Der letzte Abschnitt der Photoquantifizierung begann mit dem Einscannen der gesamten Photographie des Gels. Aus diesem sich nun in dem Rechner befindenden Bild, welches zumeist eine Auflösung

von 800 dpi und eine Größe von ca. 6 Mb bei einer stets vorhandenen Farbtiefe von 8 Bit in Form von Grayscales hatte, wurden die Banden als Einzeldateien separiert. Anschließend wurde das selbst entwickelte Programm BMPNEU.EXE ausgeführt, um die Bandenintensität zu berechnen.

Das Prinzip dieses Programmes beruhte auf der Tatsache, daß pro Pixel eine Farbtiefe von 8 Bit, also 256 mögliche Graustufen vorhanden waren und ein hellerer Bildpunkt sich durch einen höheren Wert von einem dunkleren unterschied. Addierte man nun sämtliche Pixel einer Bande, so resultierte als Summe die Intensität selbiger. So zumindestens das Konzept. Da jedoch durch Faktoren wie eine unterschiedliche Geldicke und eine ungleichmäßige Beleuchtung die Helligkeit des Geles nicht überall gleich war, war es auf diese Weise nicht möglich, die Banden eines Geles miteinander zu vergleichen. Als Lösung bot es sich, den spezifischen Hintergrund jeder Bande zu berechnen, um dann von diesem Hintergrund die eigentliche Bande zu subtrahieren. So sollte als Resultat alle Banden miteinander vergleichbar werden, da ihre jeweils spezifische Hintergrundintensität entfernt wurde.

Um nun die Hintergrundintensität zu ermitteln, war es erforderlich, einen Bereich neben der eigentlichen Bande heraus zu nehmen, zu postulieren, daß dieses Areal der spezifischen Hintergrundleuchtkraft entspricht, die Intensität dieses Areals auf die gesamte Datei hochzurechnen um dann diesen Wert von der Gesamtintensität zu subtrahieren.

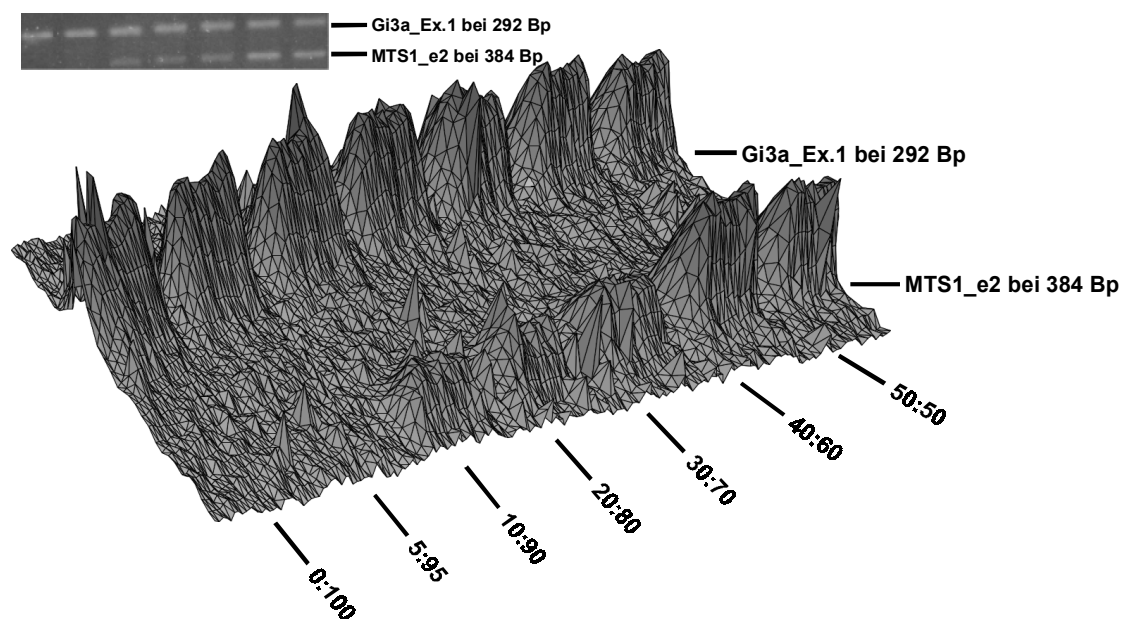


Abb. 48 : Dreidimensionale Oberflächenanalyse eines kleinen Teils einer Eichreihe von p16 positiver und p16 negativer DNA mittels der Primer MTS1_e2 und Gi3a_Ex.I; zur besseren Darstellung wurde das Bild zuvor in der horizontalen Achse gespiegelt; man sieht eine Konstanz der Gi3a_Ex.1 Banden während die MTS1_e2 Banden bei einem größer werdenden Anteil an p16 positiver DNA an Intensität zunehmen; weitere Details zu dieser Grafik siehe Abb. 47.

Ein großes Problem stellte die Beantwortung der Frage, welches Areal neben der Bande nehmen verwendet werden sollte. Programmtechnisch am einfachsten war es, die unterste Zeile für die Hintergrundinformation zu verwenden. Der Gesamtwert dieser untersten Zeile wurde mit der Zahl aller Zei-

len der jeweiligen Datei multipliziert und man erhielt als Resultat den Hintergrund einer einzelnen Bande. Wenn jedoch 2 Banden einer Lane dicht beieinander lagen, dann befand sich die schwerere Bande noch im Schweif der leichteren (Abb. 47 und Abb. 48). Folglich wurde gerade die Zeile heller, welche zur Berechnung des Hintergrundes der schwereren Bande verwendet wurde. Und damit wurde ein hellerer Hintergrund errechnet, die relative Bandenintensität verlor an Wert. Folglich war dieses Areal nicht geeignet, das Programm BMPNEU.EXE mußte dem angepaßt werden. Als alternatives Areal bot es sich an, die linke Spalte der jeweiligen Datei einer Bande zur Hintergrundberechnung heranzuziehen. Programmtechnisch war dieses jedoch in der Realisation erheblich komplexer, so daß für eine Übergangslösung erstmalig nur der linke untere Pixel der Datei verwendet wurde. Da jedoch auch der nicht-Banden tragende Teil eines Geles von Pixel zu Pixel einer gewissen Schwankung der Intensität unterlag, konnte von Bande zu Bande der linke untere Punkt heller oder auch dunkler ausfallen. Eine Variante zur Umgehung dieses Problems bestand nun in einer verlustbehafteten JPG Kompression und Dekompression der Datei, in zuge derer eine gewisse Nivellierung aller Pixelintensitäten ähnlichen Levels erfolgte. Die definitive Lösung jedoch lag in der Heranziehung der gesamten linken Spalte einer Datei, was dann auch in die Endversion des Programmes BMPNEU.EXE aufgenommen wurde.

Das Schwellenwertproblem

Das erstrangige Problem bei der Untersuchung von Primärtumoren bezüglich ihres p16 Status ist, wie bereits in der Einleitung dargelegt, die Kontamination des Primärtumores mit normalen, nicht maligne transformierten Zellen. Dabei handelt es sich einerseits um Zellen wie Lymphozyten, Endothelien oder Glia, welche sich innerhalb des eigentlichen Tumores befinden, als auch um Mitanschnitte normalen, an den Tumor angrenzendes Gewebes. Eine Beantwortung der Frage, wie groß der Anteil an diesen beiden kontaminierenden Fraktionen ist, ist morphologisch wohl nur sehr unbefriedigend lösbar. Da hier nur in sehr wenigen Fällen Paraffinschnitte zur Verfügung standen, war dieser Ansatz ohnehin nicht realisierbar.

Um dennoch zu einer Aussage gelangen zu können, ob ein Primärtumor p16 deletiert oder ob er bezüglich dieses Genes noch intakt war, erforderte deshalb im Rahmen der quantitativen PCR die Festlegung einer Grenze, eines Schwellenwertes, mittels einer anderen Methodik. Durch Division der zwei Banden, der p16-Bande und der Bande des internen Standards, erhielt man eine Ratio, welche auf dieser Ebene den p16 Status beschrieb. Da eine Zahl keine eindeutige Aussage in Form eines Wertes vom Typ „ja/nein“ lieferte, war ein Verfahren erforderlich, welche eine solche Trennung ermöglichte.

Der erste Versuch zur Lösung dieses Schwellenwertproblems ging von der Schaffung einer Eichreihe aus, indem zu einer abnehmenden Konzentration an p16 negativer DNA eine größer werdende Menge p16 positive DNA gegeben wurde. Wenn man nun von der Ratio ausging, welche sich aus den Bandenintensitäten bei 100% p16 positiver DNA errechnete und von diesem Wert die typische Abweichung des Meßverfahrens subtrahierte, dann sollte man folglich die Ratio haben, ab der sich in einem Primärtumor p16 deletierte Zellen befinden mußten. Die typische Abweichung ließ sich klären, indem man

immer die gleiche nicht-transformierte DNA zu identischen Konditionen möglichst häufig amplifizierte und von den gewonnenen Rationes die Standardabweichung errechnete (siehe Abb. 19). Diese betrug bei den durch eine MTS1_e1 : Gi3a_Ex.1 (II) Coamplifikation untersuchten 23 Fällen ± 0.310091 . Angewendet auf die entsprechende Eichkurve (Abb. 32) lag nach dieser Bestimmungsform der Schwellenwert bei ca. 60%. Dieser erste Versuch einen Schwellenwertbestimmung wurde jedoch durch eine Vielzahl von Resultaten in Frage gestellt, bei welchen lymphozytäre DNA's unterschiedlicher Konzentration amplifiziert wurden und deren Ratio weit unter diesen 60% lagen (Abb. 36).

Der zweite Versuch einer Schwellenwertbestimmung beruhte auf Untersuchungen von 14 verschiedenen lymphozytären DNA's mittels einer MTS1_e1 : Gi3a_Ex.1 (II) Coamplifikation (Abb. 36). Bei DNA Konzentrationen von 91 ng/ μ l bis 1711 ng/ μ l lag die Schwankungsbreite der Ratio zwischen 0,478 und 0,986, also nach der entsprechenden Eichreihe (Abb. 32) zwischen ca. 30% und 100%. Wenngleich der Großteil, nämlich 8 dieser 14 Lymphozyten, Rationes $> 0,8$ ($> 80\%$) und 11 von ihnen Rationes $> 0,7$ ($> 70\%$) boten, so lag doch ein Lymphozyt bei einer Ratio von 0,66 (50%), einer bei 0,52 (35%) und der niedrigste bei 0,47 (30%). Nach dieser Methodik läge dann der Schwellenwert bei dem Primerpaar MTS1_e1 : Gi3a_Ex.1 (II) bei 0,47, also bei ca. 30% p16 positive DNA nach der Eichreihe. Rationes unterhalb dieses Wertes wurden deshalb dann als ein p16 negativer Status des Primärtumores gewertet.

Die quantitative PCR in der p16 Literatur

Eine quantitative oder auch Multiplex- PCR wurde bezüglich des Problems von kontaminierenden Normalzellen in Primärtumoren auch von fünf anderen Arbeitsgruppen bei der Suche nach p16 Deletionen angewendet. In der ersten Arbeit wurde als interner Standard entweder das β -Globin - oder das β -Aktin Gen verwendet. Nach 28 Amplifikationszyklen wurden die PCR Produkte auf 2% Agarosegel aufgetragen und dann nach UV-Photographierung densitometrisch quantifiziert. Wie diese Densitometrie erfolgte, wurde von den Autoren nicht erläutert. Wenn die p16 Bandenintensität kleiner als 10% des erwarteten Signals betrug, wurde der Primärtumor als homozygot deletiert angesehen. Diese Grenze von 10% als Schwellenwert wurde gewählt, weil nur CML Blut verwendet wurde, welches einen Blastenanteil $> 90\%$ hatte¹⁶⁹.

Die zweite Arbeit, welche eine quantitative PCR verwendete, um Aussagen bezüglich des p16 Status an Primärmaterial zu machen, verwendete 9q STS als internen Standard bei einer "touch down" PCR mit 19 Zyklen. Um einen Schwellenwert zur Unterscheidung p16 positiv : p16 negativ zu erhalten, wurde einerseits eine Verdünnungsreihe nur aus normaler DNA geschaffen und dann der Punkt als Grenze gesetzt, bei welchem zwar der interne Standard noch zu sehen war, die p16 Bande jedoch verschwunden war. Diese Grenze lag bei 30%. Andererseits wurden 30 normale DNA's herangezogen, um die Variationsbreite des Primerpaares zu ermitteln. Eine Beschreibung der eigentlichen Quantifizierung wurde nicht veröffentlicht⁴¹.

Die Autoren der dritten Arbeit amplifizierten p16 und ihren internen Standard in Form des CPTI Genes in getrennten Ansätzen mit 35 Zyklen und trugen dann beide Produkte in eine Lane eines 2% Agarosegels auf. Eine densitometrische Bestimmung der zwei Bandenintensitäten wurden dann mittels der kommerziellen "Bio-Profil" Software von Vilber-Lourmat, welche offenbar funktionell dem Programm BMPNEU.EXE glich, durchgeführt und eine Ratio aus beiden Werten errechnet. Um einen Schwellenwert bemühten sich die Autoren nicht weiter, sie beschränkten sich auf prozentuale Angaben bezüglich des p16 Anteils der analysierten Primärtumore³¹.

Die vierte Arbeit verwendete den 9q Marker D9S196 als internen Standard ihrer 35 Zyklen umfassenden "touch down" PCR. Die Produkte wurden auf 1% Agarose dargestellt, photographiert, mittels eines Laser Densimeters quantifiziert und zwecks Bildung einer Ratio durcheinander dividiert. Es wurde eine Verdünnungsreihe aus normaler mit p16 deletierter DNA geschaffen und als Schwellenwert ein p16 Anteil von 20% mit dem Verweis auf eine frühere Arbeit gesetzt⁸³.

Die fünfte Arbeit verweist nur auf die Tatsache, daß sie eine Multiplex- PCR verwendet hatten. Eine detailliertere Angabe zur Methodik blieben die Autoren schuldig²³.

Zusammengefaßt ergibt sich aus diesen Arbeiten ein ähnliches Bild, welches in vielem auch die Probleme der hier vorgestellten eigenen Arbeit widerspiegelt. Zumeist wurden 1 bis 2% Agarosegele verwendet, 3 Arbeiten benutzten 28 bis 35 PCR Zyklen, womit sie deutlichen im linearen Amplifikationsbereich einer PCR lagen, und die Schwellenwertproblematik wurde gelöst, indem sie ignoriert, definiert, durch eine Eichreihe oder durch eine Analyse von Normalgewebe angegangen wurde. Damit war es keinem der Autoren möglich, eine methodisch bessere Lösung zu finden, als die der hier vorgestellten eigenen Arbeit. Eine qualitative Differenz findet sich nur in den teils besseren Geräten, welche den anderen Autoren zur Verfügung standen.

Der p16 Status von Menigeomen

Der wissenschaftliche Kontext

Menigeome sind intracranielle Tumore, welche von der Arachnoidea ausgehen. Sie zeigen eine Inzidenz von 6 auf 100.000 Personen, kommen zumeist bei älteren Menschen vor und treten mit einer Verteilung männlich : weiblich in einem Verhältnis 1:3 bis 1:2 auf. Nach WHO werden sie in Grad I, Grad II (atypische) und Grad III (anaplastisch – maligne) eingeteilt. Man findet eine starke Häufung von Menigeomen bei der Neurofibromatose Typ 2.

Zytogenetisch findet man zumeist eine Deletion der Bande q12 auf Chromosom 22^{170,171}. Dort befindet sich das NF2 Gen, welches in ca. 60% aller sporadischen Menigeome mutiert und damit der typische Defekt dieser Neoplasie ist¹⁷². Als weitere chromosomale Loci werden 1p, 9q, 10q, 14q und 17p bei Grad II und III Menigeomen beschrieben¹⁷³. Als weitere potentiell relevante Gene werden β -Adaptin

und MN1 genannt^{174,175}, Mutationen des p53 Genes wurden nur sehr selten in Grad II und III Meningeomen gesehen¹⁷⁶.

Bezüglich Mutationen im p16 Tumorsuppressorgen gibt es gegenwärtig nur 3 Veröffentlichungen. 2 dieser 3 Studien fanden mittels SSCP, Southern Blot und quantitative PCR keine p16 Defekte^{177,178}, in einer Arbeit wurde durch quantitative PCR 1 Deletion in 26 untersuchten Meningeomen gefunden¹⁷⁹. In diesem einen Fall handelte es sich um ein menigoendotheliales Meningeom ohne atypische und anaplastische Eigenschaften (Grad I).

Analyse und Interpretation der Resultate

Aufgrund dieser noch bescheidenen Daten bezüglich des p16 Status von Meningeomen und weil die quantitative PCR etabliert war, wurde im Zuge dieser Arbeit eine solche Untersuchung durchgeführt. Es standen 36 Meningeome der histopathologischen Graduierung I bis III, 3 Meningosarkome und 1 Hämangiozytom zur Analyse zur Verfügung. Von diesen 36 Meningeomen stellten 6 sich als p16 deletiert (17%) dar, die restlichen 28 (83%) erwiesen sich in ihrem p16 Status als normal. Von den 6 p16 deletierten Meningeomen wurden 4 als Grad II und 2 als Grad I histopathologisch klassifiziert. Da 16 Grad I Meningeome untersucht wurden, lag bei diesen die Deletionsrate bei 13 %, bei 15 analysierten Grad II Meningeomen betrug der Anteil an p16 defekten damit 27% (Abb. 49). Alle 5 Grad III Meningeome zeigten einen positiven p16 Befund, ebenso die 3 Meningosarkome Grad IV und das Hämangiozytom Grad III. Auch das eine untersuchte Craniopharyngeom erwies sich als unauffällig in seinem p16 Status.

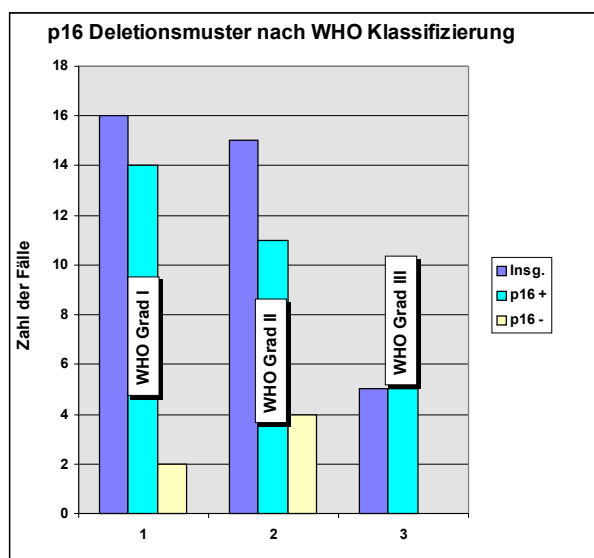


Abb. 49 : Darstellung der Korrelation zwischen p16 Status und WHO Einteilung der untersuchten Meningeomen; wie zu sehen ist, so fand man bei den Grad I Meningeomen deutlich seltener Deletionen des Tumorsuppressorgene p16 als bei den Grad II Meningeomen; bei den Grad III Meningeomen waren alle untersuchten Fälle p16 positiv.

Diese Daten nun deuten darauf hin, daß eine p16 Deletion in Meningeomen doch ein gar nicht so seltenes Ereignis darstellt. Diese Resultate stehen in einem bedingten Widerspruch zu einer Vielzahl von

Beobachtungen, bei denen p16 Mutationen eher bei malignen als bei benignen Neoplasien gefunden wurden. Tendenziell war dieses Phänomen auch hier zu sehen, da die Deletionsrate bei Grad II Meningeomen eine doppelt so große wie bei Grad I Meningeomen war. Hingegen fanden sich keine der erwarteten Veränderungen an den 5 Grad III Meningeomen. Eventuell war jedoch auch die Zahl der untersuchten Fälle hierbei einfach zu gering. Diese eigenen Resultate, welche aufgrund der bisher größten Untersuchung von Meningeomen auf p16 Mutationen gewonnen wurden (hier 36 Fälle gegen bisher maximal 26) fordern als Konsequenz eine weitere Analyse des hier erstmalig beschriebenen Phänomens. Vielleicht gehört auch das Tumorsuppressorgen p16 in die postulierte Gruppe von weniger oft veränderten Genen bei Meningeomen. Ein n = 3 bei den Meningosarkomen war jedoch wohl zu gering, um aus der Tatsache, daß alle Fälle einen normalen MTS1 Befund aufwiesen, zu folgern, daß diese genetische Veränderung für diesen Tumor ohne Bedeutung ist.

Der p16 Status von Gliomen

Diskussion der Ergebnisse

Bei den insgesamt 47 analysierten Gliomen konnte in 24 Fällen (51%) ein intaktes p16 Gen nachgewiesen werden. In 23 Fällen (49%) war dieses Tumorsuppressorgen jedoch deletiert. Von den 4 WHO Grad I Gliomen zeigten zwei einen p16 positiven, zwei einen p16 negativen Status (50% vs. 50%). Bei den 14 Grad II Gliomen lag das Verhältnis bei 10 positiven zu 4 negativen Fällen (71% vs. 29%), bei den 9 Grad III Tumoren bei 4 positiven zu 5 negativen Fällen (43% vs. 57%) und bei den 16 Grad IV Neoplasien bei 4 positiven zu 12 negativen Fällen (25% vs. 75%). Alle 4 nicht nach WHO Graduierung eingeteilten Gliome (1 Astrozytom, 1 Oligodendrogliom und 2 histopathologisch überhaupt nicht klassifizierte Tumore) boten ein einheitliches Bild: alle 5 wiesen keine p16 Deletion auf (Abb. 50). Zusammengefaßt stellt sich eine eindeutige Korrelation zwischen p16 Deletionsrate und dem Malignitätsgrad dar.

Diese Ergebnisse decken sich zumeist mit denen der Literatur: wie in Tabelle 1 abgebildet, so schwanken die Deletionsraten an primären Gliomen zwischen 33% und 60% mit einem Mittel von 49,1% bei zusammengefaßt 255 untersuchten Fällen. In diesen Studien wurden Gliome im allgemeinen, Astrozytome und Glioblastome untersucht. Dabei zeigte sich in diesen Studien keine Tendenz bezüglich eines Anstieges der Deletionsrate von niedrig- zu höhergradigen Gliomen. Dergleichen ist jedoch zu erwarten, da neben einem Verlust der Chromosomen 12 q und 13q von niedrig- zu höhergradigen Gliomen auch eine erhöhte Deletionsrate von 9p oft beschrieben wurde^{180,181}. In dieser Arbeit nun gelang unseres Wissens nach der erste eindeutige Beweis, daß es nicht nur eine Korrelation zwischen dem Malignitätsgrad und der Chromosom 9p Deletionsrate, sondern auch zwischen dem Malignitätsgrad und dem p16 Status gibt. Dieser Befund spricht als weiteres wichtiges Indiz für die These, daß es sich bei dem auf Chromosom 9p erwarteten Tumorsuppressorgen um p16 handeln muß.

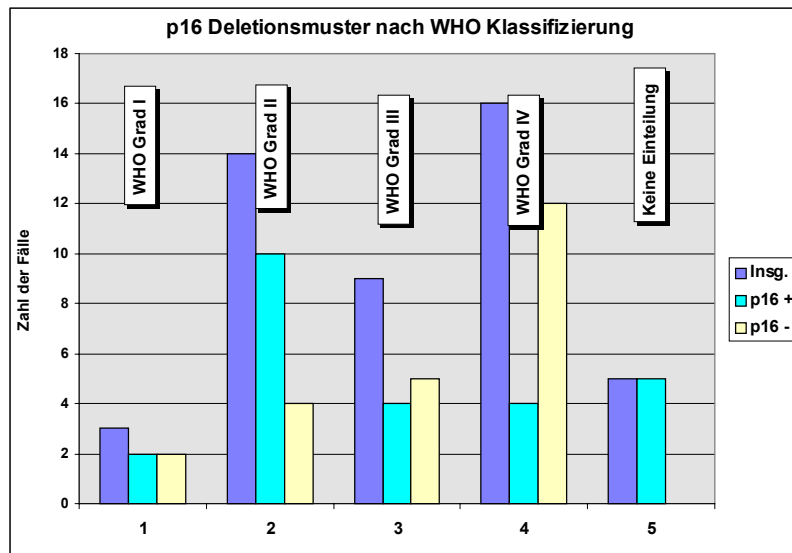


Abb. 50 : Darstellung der Korrelation zwischen p16 Status und WHO Einteilung nach Malignität; wie zu sehen ist, so fand man bei den höhergradigen Gliomen deutlich häufiger Deletionen des Tumorsuppressorgene p16 als bei den niedriggradigen Tumoren.

Die Stabilität des Tumorsuppressorgenes p16 in Zellkultur

Wenn man die Grenze zwischen p16 positiven und p16 negativen Tumoren bei einem Anteil von 60% p16 positiven Zellen entsprechend der Standardabweichung als Meßwert für die Ungenauigkeit der Methodik ansetzte, dann erhielt man als Resultat, daß 2 der 11 untersuchten Linien (18%) ihren Status innerhalb der Zellkultur geändert hatten (siehe Tabelle 8). Sowohl diese beiden Fälle als auch die Positivkontrolle entwickelten eine MTS1_e3 : Gi3a_Ex.1 Ratio, welche in der minimalsten Variante immer noch fast doppelt so groß wie der höchste Wert der als p16 negativ gewerteten Tumore war. Somit konnte man diese 3 Tumore eindeutig von den anderen 8 differenzieren. Da bei beiden Linien auch der p16 Status früher Passagen bekannt war (siehe Tabelle 5), konnte man folgern, daß die genetische Alteration bereits zu einem frühen Zeitpunkt eingetreten sein mußte, da beide Zelllinien in Passage 16 bzw. 23 p16 negativ waren, als Primärtumor jedoch noch einen p16 positiven Status hatten. Als Positivkontrolle diente eine Zelllinie, welche sowohl als Primärtumor als auch als Linie p16 positiv blieb. Damit gelang unseres Wissens nach erstmalig der Beweis, daß es sehr wohl zu Veränderungen des p16 Status vom Primärtumor hin zur Zellkultur kommen kann, bzw. das ein schon vorbestehender p16 mutierter Klon besser auf die Selektionskriterien der Zellkultur reagieren kann als die anderen Zellen des Primärtumores.

Konsequenzen

In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß die Deletionsrate des Tumorsuppressorgenes p16 bei Gliomen in 47 untersuchten Primärtumoren bei 49 % lag. Ein p16 Verlust fand sich jedoch in 61 % der 31 untersuchten Zelllinien, welche aus Gliomen gewonnen wurden. Ergo fand sich eine Differenz von 11%. Von 10 der 19 p16 negativ Linien gelang es DNA aus ihrem Primärtumor zu extrahieren und auf

den p16 Status hin zu analysieren. Hierbei zeigte sich in 2 Fällen, d.h. in 18%, eine Veränderung: der Primärtumor stellte sich als p16 positiv, die resultierende Zelllinie jedoch als p16 negativ dar. Aus diesen Resultaten wurde dann die Schlußfolgerung gezogen, daß es einen Zusammenhang zwischen den 12% und den 18% geben muß, daß es bei Gliomen tatsächlich eine Veränderung des p16 Status in der Zellkultur gab und das deshalb sämtliche zumindestens an Zelllinien von Gliomen gewonnen Erkenntnisse bezüglich des Tumorsuppressorgenes p16 oder MTS1 kritisch betrachtet werden müssen.

Dennoch handelt es sich bei dem Tumorsuppressorgene p16 um eines der wichtigsten Gene in der Molekularpathologie von Gliomen und einer Vielzahl anderer maligner Neoplasien. Zentrale Beweise hierfür sind die oft reproduzierten Deletionsraten an primären Gliomen von ca. 50%, die Korrelation zwischen der Lokalisation dieses Genes, seiner Funktion und dem in dieser Lokalisation erwarteten Tumorsuppressorgen, der Veränderung der malignen Zelleigenschaften nach Transfektion p16 deletierter Zellen hin zu weniger bösartigen Eigenschaften und eine Vielzahl anderer Fakten. Auch diese Arbeit möchte die Bedeutung des Genes für etwaige Gentherapien unterstreichen, wenngleich es sich als Konsequenz aus dieser Studie ergibt, daß die initiale Euphorie bei Entdeckung des Genes wohl doch etwas zu hoch angesetzt war.

Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war die Beantwortung der Frage, in welchem Maße der Status des Tumorsuppressorgenes p16 oder MTS1 von einem Primärtumor hin zu der aus diesem gewonnenen Zelllinien konstant bleibt. Diese Fragestellung resultierte aus der Beobachtung, daß die p16 Deletionsrate in Primärtumoren eine deutlich geringere als in Zelllinien war.

Dazu wurde in einer ersten Phase der p16 und p15 Status aller im Labor für Hirntumorbiologie etablierten Zelllinien bestimmt. In einer zweiten Phase wurde eine Methodik in Form einer quantitativen PCR entwickelt, um Aussagen bezüglich des immer mit normalen Zellen kontaminierten Primärtumores machen zu können. Daran anschließend wurde diese Methodik nicht nur auf die Primärtumore angewendet, welche die Quelle der Zelllinien waren, sondern auf eine Vielzahl von Gliomen und Meningeomen.

Es zeigte sich, daß von den 31 untersuchten Zelllinien in 19 Linien, d.h. 61%, eine homozygote Deletion mindestens eines der 3 Exons vorlag. 28 der 31 Zelllinien, d.h. 90%, zeigten sich in ihrem p16 Status homogen, entweder alle 3 Exons waren vorhanden oder deletiert. Bei dem p15 Status ergab sich, daß 21 der 31 Zelllinien, d.h. 68%, des Genes verlustig gegangen waren. Der p15 Status entsprach in 29 der 31 Linien dem p16 Status, d.h., in 94% der Fälle waren beide Gene sich in ihrem Deletionsmuster gleich. Korreliert man die Ergebnisse des p16 Status mit den Resultaten mit dem Rb Status, so sah man, daß bei den 14 von auf Rb hin untersuchten Zelllinien in 11 Fällen, d.h. 79%, entweder ein p16- oder ein Rb-Defekt vorlag. Es gab keinen einzigen Fall, bei dem sowohl das p16 Gen als auch das Rb Protein defekt war. Diese Ergebnisse glichen damit den Beobachtungen, daß fast immer nur das eine oder andere Tumorsuppressorgen einen Defekt zeigt und das die Rate von Mutationen in dem einen oder dem anderen Gen zusammengenommen sehr hoch ist.

Eine DNA Extraktion aus Primärtumoren von 10 der p16 deletierten Zelllinien gelang durch Verwendung von Paraffinschnitten. Nach Analyse mittels der quantitativen PCR fand sich als Resultat, daß 2 der 10 Linien tatsächlich eine p16 Deletion erst in der Zellkultur erfahren hatten, da ihr Primärtumor noch über mindestens ein intaktes p16 Gen verfügte. Frühe Passagen dieser 2 Linien zeigten ebenfalls die p16 Mutation, so daß gefolgert werden konnte, daß das schädigende Ereignis in einer sehr frühen Phase der Kultivierung eingetreten sein mußte. Diese in der Literatur noch nicht beschriebene Beobachtung zwingt zur kritischen Betrachtung von Resultaten der p16 Forschung, welche anhand von Zelllinien gewonnen wurden.

Bei der quantitativen PCR - Analyse von 47 Gliomen fand sich eine p16 Deletionsrate in 49%. Diese Rate zeigte eine deutliche Korrelation zur Malignität und stellte damit unseres Wissens nach die Erstbeschreibung eines solchen Zusammenhanges dar. In 18% der 36 untersuchten Meningeome fand sich ebenfalls eine p16 Deletion. Auch dieses wurde in solch einem Maße noch nicht berichtet.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle PD Dr. M. Westphal, Leiter des Labors für Hirntumorbiologie, und Prof. Dr. H.-D. Herrmann, Direktor der neurochirurgischen Klinik des UKE, für die Überlassung des Thematik und für die Bereitstellung der Räumlichkeiten in sehr großem Maße danken. Ohne ihre vorangehende Arbeiten wäre die Verwirklichung meiner Thematik nicht möglich gewesen.

Weiterhin schulde ich Hildegard Meissner, Svenja Zapf, Dorothea Zirkel, Kim Platzek, Bianca Heinrich und Britta Laube großen Dank. Sie lehrten mich nicht nur die grundlegenden Techniken dieser Arbeit, sondern ebenfalls Geduld, Ausdauer und Mut zu entwickeln.

Ebenso dürfen hier die Namen Dr. A. Giese und Frau Dr. K. Lamszus nicht fehlen. Von ihnen erhielt ich eine Vielzahl wichtiger Anregungen und Ideen. Dr. Laas aus dem neuropathologischen Institut des UKE möchte ich für die freundliche Überlassung etlicher Paraffinschnitte danken.

Meinen Mitdoktoranden verdanke ich vor allem das Wissen, daß ich nicht alleine an mitunter frustrierenden Fragen gearbeitet habe. N.-O. Schmidt danke ich vor allem für die gemeinsamen langen Nächte im Labor. Ohne die Arbeit von M. Lücke bezüglich des Tumorsuppressorgenes Rb würde mir ein wesentlicher Teil meiner Studie fehlen. Seine Resultate lieferten einen entscheidenden Beweis für die Richtigkeit meiner Ergebnisse.

In A. Steiner fand ich einen Menschen, welcher mir innerhalb der mehrjährigen Arbeit an dieser Thematik oft Grund war, trotz aller Widrigkeiten, immer wieder gerne an den Ort meines Schaffens zurück zu kehren. *Amor mi mosse, che mi fa parlare, Inferno, II, 72*

Auch meiner Mutter und meinem Vater bin ich zu einer großen Danksagung verpflichtet. Sie ermöglichten mir nicht allein durch ihre finanzielle Unterstützung, welche sie selber nicht in geringem Maße belastete, die Durchführung dieser Arbeit. Ebenso Dank an Ingrid.

我要獻給 **Lan Kluwe** 博士我最大的感謝，她給了我很多寶貴的知識以及指點了我在迷津裡的出路。我非常榮幸能夠讓我稱她為我的恩師。

Lebenslauf

04.12.68:

Geboren im AK-Harburg als uneheliches Kind des Arbeiters Peter Hahn und der Sekretärin Gisela Hartmann

ca. ersten 3 Lebensjahre:

überwiegende Zeit aufgewachsen bei Onkel und Tante; anschließend bei der Mutter, werktags über im Kindergarten

08.06.88:

Abitur Alexander-von-Humboldt Gymnasium, Hamburg

03.10.88 - 31.05.90:

Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Landkreis Harburg, im Rettungsdienst; dabei Ausbildung zum Rettungshelfer

WS 90/91 und SS 91:

Gasthörer der Philosophie, Literatur-, Kunst-, und Musikwissenschaft der Universität Hamburg.

21.10.91:

Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg

04.10.93:

Physikum bestanden

Dezember 93:

Beginn der Doktorarbeit im Labor für Hirntumorbiologie der neurochirurgischen Klinik des UKE unter PD Dr. Westphal bezüglich der Entwicklung des Tumorsuppressorgenes p16/MTS1 vom bioptischen Material hin zu Zelllinien hoher Passagezyklen.

16.09.94:

1. Staatsexamen bestanden

11.04.97:

2. Staatsexamen bestanden

28.01.97:

Beginn des Praktischen Jahres

Chirurgie : AK Harburg

Innere Medizin: AK Harburg

Neurochirurgie: UKE

Anhang

Das Programm BMPNEU41.EXE

```
1. dim feld$(1000)
2. dim array(120,13)

3. start:

4. alles = 0
5. pixel = 0
6. max = 0
7. min = 255
8. tabu$ = chr$(9)
9. backgrd = 0
10. Znull = 0
11. yvalue = 0

12. schrift$ = "Datei" + tabu$ + "Pixel" + tabu$ + "Intensitaet" + tabu$ + "X:Y-Achse" + tabu$ + "X:Y-Achse/dpi"
13. schrift$ = schrift$ + tabu$ + "Max:Min." + tabu$ + "Mittel" + tabu$ + "Backgrd_U" + tabu$ + "Backgrd_L"
14. schrift$ = schrift$ + tabu$ + "Unten" + tabu$ + "Links"

15. abfrage:
16. cls
17. print:print:print
18. print"BMP Quantifizierer Version 4.0 by Christian Hartmann"
19. print"Labor für Hirntumorbiologie / UKE"
20. print: print: print
21. Input"Name der dateien: ";datei$
22. input"Anfang: ";begin
23. input"Ende: ";ende
24. if (((ende - begin) / 2) * 2) = (int((ende - begin) / 2) * 2) then goto weiter
25. input"Division zweier Banden? (j/n)";divb$
26. if divb$ = "n" then goto weiter
27. input"Bande 1/2(1) oder 2/1(2): ";Numm$
28. if Numm$ = "1" then schrift$ = schrift$ + tabu$ + "U_B 1/2" + tabu$ + "L_B 1/2": goto weiter
29. if Numm$ = "2" then schrift$ = schrift$ + tabu$ + "U_B 2/1" + tabu$ + "L_B 2/1": goto weiter
30. if Numm$ >< "1" or Numm$ >< "2" then goto abfrage
31. weiter:
32. print:print:print
33. print"-----Beginn der Auswertung-----"
34. print

35. print: print"Initialisierung...": print
36. for i = 1 to 13
37. for k = i to 13
38. array(i,k) = 0
39. next k
40. next i

41. einlesen:

42. for i = begin to ende
43. g$ = right$(str$(i), len(str$(i))-1)
44. print>Loading now: ";datei$; G$: chr$(46); "bmp";
45. open "binary",#1,datei$ + g$ + ".bmp"
46. counter = 0
47. yvalue = 1
48. loop1:
49. if eof(1) >< 0 then goto auswertung
50. get$ #1,1,c$
51. counter = counter + 1

52. if counter = 19 and asc(c$) > 0 then xachse = asc(c$)
53. if counter = 20 and asc(c$) > 0 then xachse = xachse + ( asc(c$) * 256 )
54. if counter = 21 and asc(c$) > 0 then xachse = xachse + ( asc(c$) * 65536 )
55. if counter = 22 and asc(c$) > 0 then xachse = xachse + ( asc(c$) * 16777216 )
56. if counter = 22 then gosub ZnullR
```

```

57. if counter = 23 and asc(c$) > 0 then yachse = asc(c$)
58. if counter = 24 and asc(c$) > 0 then yachse = yachse + ( asc(c$) * 256 )
59. if counter = 25 and asc(c$) > 0 then yachse = yachse + ( asc(c$) * 65536 )
60. if counter = 26 and asc(c$) > 0 then yachse = yachse + ( asc(c$) * 16777216 )
61. if counter = 26 then print xachse;"":yachse;

62. if counter = 39 and asc(c$) > 0 then xdpi = asc(c$)
63. if counter = 40 and asc(c$) > 0 then xdpi = xdpi + ( asc(c$) * 256 )
64. if counter = 41 and asc(c$) > 0 then xdpi = xdpi + ( asc(c$) * 65536 )
65. if counter = 42 and asc(c$) > 0 then xdpi = xdpi + ( asc(c$) * 16777216 )

66. if counter = 43 and asc(c$) > 0 then ydpi = asc(c$)
67. if counter = 44 and asc(c$) > 0 then ydpi = ydpi + ( asc(c$) * 256 )
68. if counter = 45 and asc(c$) > 0 then ydpi = ydpi + ( asc(c$) * 65536 )
69. if counter = 46 and asc(c$) > 0 then ydpi = ydpi + ( asc(c$) * 16777216 )

70. if counter < 1079 then goto loop1
71. if counter > 1079 and counter < ( 1079 + xachse ) then backgrd = backgrd + asc(c$)
72. if counter = 1079 then wert = asc(c$)
73. if counter = (1079 + ( yvalue * Zvor )) then wert = wert + asc(c$): yvalue = yvalue + 1

74. if asc(c$) = 0 then goto loop1
75. alles = alles + asc(c$)
76. pixel = pixel + 1
77. if asc(c$) < min then min = asc(c$)
78. if asc(c$) > max then max = asc(c$)
79. goto loop1

80. ZnullR:
81. Znull = xachse
82. runter :
83. Znull = Znull - 4
84. if Znull = -4 then Znull = 0: Zvor = Xachse + Znull: return
85. if Znull < 0 then Znull = Znull * -1: Zvor = Xachse + Znull: return
86. goto runter

87. auswertung:
88. close #1
89. print" - Berechnung"
90. array(i,1) = pixel
91. array(i,2) = alles
92. array(i,3) = xachse
93. array(i,4) = yachse
94. array(i,5) = int(xdpi / 39.37 )
95. array(i,6) = int(ydpi / 39.37 )
96. array(i,7) = max
97. array(i,8) = min
98. array(i,9) = int(alles / pixel)
99. array(i,10) = int( backgrd / xachse )
100. array(i,11) = int( wert / ( yvalue + 1 ))
101. array(i,12) = alles - int( pixel * ( backgrd / xachse ))
102. array(i,13) = alles - int( pixel * ( wert / ( yvalue + 1 )))

103. if array(i,12) < int(alles / pixel ) then array(i,12) = int(alles / pixel )
104. if array(i,13) < int(alles / pixel ) then array(i,13) = int(alles / pixel )

105. pixel = 0
106. alles = 0
107. mittel = 0
108. max = 0
109. min = 255
110. xachse = 0
111. yachse = 0
112. backgrd = 0

113. next i

114. berechnen:
115. for i = begin to ende
116. feld$(i) = datei$ + right$(str$(i), len(str$(i))-1) + ".bmp"
117. feld$(i) = feld$(i) + tabu$ + str$(array(i,1)) + tabu$ + str$(array(i,2)) + tabu$ + str$(array(i,3)) + " : " + str$(array(i,4)) +
tabu$ + str$(array(i,5)) + " : " + str$(array(i,6))
118. feld$(i) = feld$(i) + tabu$ + str$(array(i,7)) + " : " + str$(array(i,8)) + tabu$ + str$(array(i,9)) + tabu$ + str$(array(i,10)) +
tabu$ + str$(array(i,11)) + tabu$ + str$(array(i,12))

```

```

119. feld$(i) = feld$(i) + tabu$ + str$(array(i,13))
120. next i
121. if Numm$ = "1" then goto Vari1
122. if Numm$ = "2" then goto Vari2
123. if Numm$ >< "1" or Numm$ >< "2" then goto abspeichern
124. Vari1:
125. for i = begin to ende - 1 step 2
126. feld$(i) = feld$(i) + tabu$ + str$(array(i,12) / array(i+1,12))
127. feld$(i) = feld$(i) + tabu$ + str$(array(i,13) / array(i+1,13))
128. next i
129. goto abspeichern
130. Vari2:
131. for i = begin + 1 to ende step 2
132. feld$(i) = feld$(i) + tabu$ + str$(array(i,12) / array(i-1,12))
133. feld$(i) = feld$(i) + tabu$ + str$(array(i,13) / array(i-1,13))
134. next i

135. abspeichern:
136. open "output",#1,datei$+".txt"
137. print #1,schrift$
138. for i = begin to ende+1
139. print #1,feld$(i)
140. next i
141. close #1
142. print"READY"

143. print
144. input"Once again (Y/N)? ";c$
145. if c$ = "y" then goto start
146. end

```

Ergebnisbeispiel des Programmes BMPNEU41.EXE

Datei	Pixel	Intensität	X:Y-Achse	X:Y-Achse/dpi	Max:Min.	Mittel	Backgrd_U	Backgrd_L	Unten	Links
g371_1.bmp	7605	654422	169 : 45	800: 800	99 : 76	86	86	82	86	29490
g371_2.bmp	9328	831142	176 : 53	800: 800	102 : 79	89	87	84	17963	44654
g371_3.bmp	9384	856522	184 : 51	800: 800	158 : 79	91	91	86	2017	49318
g371_4.bmp	11880	1142946	198 : 60	800: 800	137 : 80	96	90	86	64086	118150
g371_5.bmp	10304	992828	184 : 56	800: 800	137 : 85	96	95	91	6389	55164
g371_6.bmp	9639	951354	189 : 51	800: 800	192 : 85	98	95	93	32946	48625
g371_7.bmp	10976	1010164	196 : 56	800: 800	105 : 80	92	92	92	92	372
g371_8.bmp	16478	1666284	214 : 77	800: 800	141 : 85	101	99	95	30419	100241
g371_9.bmp	10725	984598	195 : 55	800: 800	147 : 79	91	91	91	91	3453
g371_10.bmp	13391	1592571	206 : 65	800: 800	171 : 83	118	97	93	288314	347208
g371_11.bmp	8976	807370	187 : 48	800: 800	104 : 79	89	91	87	89	22245
g371_12.bmp	14065	1735799	198 : 71	800: 800	218 : 5	123	94	91	405663	450805
g371_13.bmp	9016	805129	184 : 49	800: 800	112 : 78	89	89	86	89	27590
g371_14.bmp	12672	1416138	192 : 66	800: 800	166 : 83	111	93	91	232494	253341
g371_15.bmp	10659	1060632	187 : 57	800: 800	130 : 82	99	92	87	77781	124111
g371_16.bmp	11460	1133900	191 : 60	800: 800	124 : 79	98	90	89	93500	108137
g371_17.bmp	10638	1265740	197 : 54	800: 800	165 : 83	118	99	91	210958	289366
g371_18.bmp	12524	1373806	202 : 62	800: 800	153 : 81	109	95	89	176276	247839

Literaturverzeichnis

- ¹ Stoler, A. et al., (1985), "Identification of a single chromosome in the normal human genome essential for suppression of hamster cell transformation", *Proc Nat Acad Sci*, 82, 570-574
- ² Zabel, B. et al. (1985), "Chromosomal locations of the human and mouse genes for precursors of epidermal growth factor and the beta subunit of nerve growth factor", *Proc Nat Acad Sci*, 82, 469-473
- ³ Olopade O. et al., (1992), "Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas", *Cancer Research* 52, 2523
- ⁴ Lukeis et al., (1990), "Cytogenetics of non-small cell lung cancer: analysis of consistent non-random abnormalities", *Genes Chromosomes Cancer* 2, 116 - 124
- ⁵ Diaz M. et al., (1988), "Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 5259 - 5263
- ⁶ Middleton G. et al., (1991), "Alpha interferon gene deletions in adults, children and infants with acute lymphoblastic leukemia", *Leukemia*, 5, 680 - 682
- ⁷ Fountain J. et al., (1992), "Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 10557
- ⁸ Olopade O. et al., (1993), "Homozygous loss of the interferon genes defines the critical region on 9p that is deleted in lung cancers", *Cancer Research*, 53, 2410
- ⁹ Diaz M., et al. (1990), "Deletions of interferon genes in acute lymphoblastic leukemia", *N. Engl. J. Med.*, 322, 77 - 82
- ¹⁰ Merlo A. et al., (1994), "Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer", *Cancer Research* , 54, 640 - 642
- ¹¹ Solomon M., (1993), *J. Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 180 - 186
- ¹² Nigg E. et al., (1993), *J. Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 187 - 193
- ¹³ Motukura T. et al., (1993), *Biochim. Biophys. Acta*, 1155, 63 - 78
- ¹⁴ Sherr C. et al., (1993), "Mammalian G1 cyclins", *Cell*, 73, 1059 - 1065
- ¹⁵ Matsushime H. et al., (1991), "Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle", *Cell*, 65, 701 - 713
- ¹⁶ Matsushime H. et al., (1992), "Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins", *Cell*, 71, 323 - 334
- ¹⁷ Xiong Y., Beach D., (1992), "D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA", *Cell*, 71, 505 - 514
- ¹⁸ Zhang H., Beach D. et al., (1993), "Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes", *Molec. Biol. Cell*, 4, 897 - 906
- ¹⁹ Xiong Y., Beach D., (1993), "Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation", *Genes Dev.* 7, 1572 - 1583
- ²⁰ Serrano M., Hannon G. and Beach D., (1993), "A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D / CDK4", *Nature* Vol 366, S. 704 - 707
- ²¹ Nabori T. et al., (1994), "Deletion of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers", *Nature*, 368, 753 - 756
- ²² Kamb A., Gruis N. et al., (1994), "A Cell Cycle Regulator Potentially Involved in Genesis of Many Tumor Types", *Science*, 264, 436 - 440
- ²³ Cairns P. et al., (1994), "Rates of p16/MTS1 Mutations in Primary Tumors with 9p Loss", *Science*, 265, 415 - 416
- ²⁴ Knudson A., (1971), "Mutation and Cancer: statistical study of Retinoblastoma", *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 820 - 823
- ²⁵ Kamb A. et al., (1994), *Science*, 265, 416-417
- ²⁶ Dracopoli N. et al., (1996), "CDKN2 mutations in melanoma", *Cancer Surv*, 26, 115-132
- ²⁷ Raffael C. et al., (1995), "The MTS1/CDKI2 Gene in human CNS PNET's", *Neurosurgery*, 36, No.5, 971 - 975
- ²⁸ Ueki K. et al., (1994), "MTS1/CDKN2 gene mutations are rare in primary human astrocytomas with allelic loss of chromosome 9p", *Human Molecular Genetics*, 3, No. 10, 1841 - 1845
- ²⁹ Jen J. et al., (1994), "Deletion of p16 and p15 in Brain Tumors", *Cancer Research* 54, 6353 - 6358
- ³⁰ Cheng J. et al., (1994), "p16 Alterations and Deletion Mapping of 9p21-p22 in Mesothelioma", *Cancer Research*, 54, 5547 - 5551

-
- ³¹ Giani C. et al., (1994), "Mutation Rate of the CDKN2 Gene in Malignant Gliomas", *Cancer Research* 54, 6338 - 6339
- ³² Hussusian C. et al., (1994), "Germline p16 mutations in familial melanoma", *Nature Genetics*, 8, 15 - 21
- ³³ Kamb A., Shattuck-Eidens D., et al, (1994), "Analysis of the p16 as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus", *Nature Genetics*, 8, 22 - 26
- ³⁴ Merlo A. et al, (1995), "5'-CpG Islands is associated with transcriptional silencing of p16 in human cancers", *Nature Med*, 1, 686 - 692
- ³⁵ Little M et al., (1995), "Methylation an p16: Suppressing the suppressor", *Nature Med*, 1, 633 - 634
- ³⁶ Herman JG. et al., (1996), "Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15", *Cancer research*, 56, 722 - 727
- ³⁷ Little, M. et al., (1995), "Methylation and p16: suppressing the suppressor", *Nature Med*, 1, 633-634
- ³⁸ Otterson G., (1994), "Absence of p16 is restricted to the subset of lung cancer lines that retain wild-type Rb", *Oncogene*, 9, 3375 - 3378
- ³⁹ Shapiro G. et al., (1995), "Reciprocal Rb inactivation and p16 expression in primary lung cancers and cell lines", *Cancer research*, 55, 505 - 509
- ⁴⁰ Tam S. et al., (1994), "Differential expression and cell cycle regulation of p16", *Cancer research*, 54, 5816 - 5820
- ⁴¹ Ueki K. et al., (1996), "p16 or Rb Alterations Occur in the Majority of BGM's and are inversely correlated", *Cancer research*, 56, 150 - 153
- ⁴² He J. et al., (1994), "CDK4 Amplification is an alternative Mechanism to p16 Gene Homozygous Deletion in Glioma Cell Lines", *Cancer research*, 54, 5804 - 5807
- ⁴³ Hayashi Y. et al., (1997), "Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme", *Brain Pathol*, 7(3), 871 - 875
- ⁴⁴ Massague J., (1990), "The transforming growth factor-beta family", *Rev. Cell Biol.*, 6, 597 - 641
- ⁴⁵ Laiho M., (1990), "Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation", *Cell*, 62, 175 - 185
- ⁴⁶ Pietenpol J., (1990), "TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains", *Cell*, 61, 777 - 785
- ⁴⁷ Hannon G., Beach D., (1994), "p15 is a potential effector of TGF- β - induced cell cycle arrest", *Nature*, 371, 257 - 261
- ⁴⁸ Quelle D. et al., (1995), "Cloning and characterization of murine p16(INK4a) and p15(INK4b) genes", *Oncogene*, 11, 635-645
- ⁴⁹ Stone, S. et al., (1995), "Complex structure and regulation of the p16(MTS1) locus", *Cancer Res* 55, 2988-2994
- ⁵⁰ Quelle, D. et al., (1995), "Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest", *Cell*, 83, 993-1000
- ⁵¹ Serrano, M. et al., (1996), "Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality", *Cell*, 85, 27-37
- ⁵² Quelle, D. et al., (1997), "Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16(INK4a) but not by the alternative reading frame protein p19(ARF)", *Proc Nat Acad Sci*, 94, 669-673
- ⁵³ Hirai H et al., (1995), "Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6", *Mol Cell Biol*, 15(5), 2672 - 2681
- ⁵⁴ Larsson N et al., (1997), "Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis", *Mol Cell Biol*, 17(9), 5530 - 5539
- ⁵⁵ Chan FK et al., (1995), "Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4", *Mol Cell Biol*, 15(5), 2682 - 2688
- ⁵⁶ Melander Gradin H et al., (1997), "Regulation of microtubule dynamics by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IV/Gr-dependent phosphorylation of oncoprotein 18", *Mol Cell Biol*, 17(6), 3459 - 3467
- ⁵⁷ Gemma A et al., (1996), "Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes p15INK4b/MTS2, p16INK4/MTS1, p18 and p19 in human cancer cell lines", *Int J Cancer*, 68(5), 605 - 611
- ⁵⁸ Park DJ et al., (1997), "Molecular analysis of the INK4 family of genes in prostate carcinomas", *J Urol*, 157(5), 1995 - 1999
- ⁵⁹ Williams ME et al., (1997), "Analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitors p18 and p19 in mantle-cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia", *Ann Oncol*, 8 Suppl 2, 71 - 73
-

-
- ⁶⁰ Biggs J., et al., (1995), "Inhibitors of cyclin-dependent kinase and cancer", *J. Mol. Med.*, 73, 509 - 514
- ⁶¹ Shiohara M et al., (1996), „Alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor p19 (INK4D) is rare in hematopoietic malignancies“, *Leukemia*, 10(12), 1897 - 1900
- ⁶² Ellison LW. Et al., (1991), "TAN1, the human homolog of the Drosophila Notch Protein, is broken by chromosomal translocations in T-Lymphomas", *Cell*, 66, 649 - 661
- ⁶³ Harper JW., (1993), "The p21 CDK-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases", *Cell*, 75, 805 - 816
- ⁶⁴ Xiong Y. et al., (1993), "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases", *Nature*, 366, 701 - 704
- ⁶⁵ Chedid M., et al., (1994), "A single nucleotide substitution at codon 31 defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene WAF1/Cip1", *Oncogene*, 9, 3021 - 3024
- ⁶⁶ El-Deiry WS., (1993), "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression", *Cell*, 75, 817 - 825
- ⁶⁷ Noda A. et al., (1994), "Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen", *Exp. Cell Res.*, 211, 90 - 98
- ⁶⁸ Steinmann RA. et al., (1994), "Induction of p21 during differentiation", *Oncogene*, 9, 3389 - 3396
- ⁶⁹ Elbendary A. et al., (1994), "Transforming growth factor 1 can induce WAF1/Cip1 expression independent of the p53 pathway in ovarian cancer cells", *Cell Growth Diff.*, 5, 1301 - 1307
- ⁷⁰ Michielli P. et al., (1994), "Induction of WAF1/Cip1 by a p53-independent pathway", *Cancer research*, 54, 3391 - 3395
- ⁷¹ Halevy O. et al., (1995), "Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD", *Science*, 267, 1018 - 1021
- ⁷² Parker SB. et al., (1995), "p53-independent expression of p21 in muscle and other terminally differentiating cells", *Science*, 267, 1024 - 1027
- ⁷³ Polyak K. et al., (1994), "Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals", *Cell*, 78, 59 - 66
- ⁷⁴ Nourse J. et al., (1994), "Interleukin-2 mediated elimination of the p27 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin", *Nature*, 372, 570 - 573
- ⁷⁵ Parker L. et al., (1992), "Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosin kinase", *Science*, 257, 1955 - 1957
- ⁷⁶ McGowen C. et al., (1993), "Human WEE1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr 15", *EMBO*, 12, 75 - 85
- ⁷⁷ Solomon M. et al., (1993), "CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical to or closely related to p40M015", *EMBO*, 12, 3133 - 3142
- ⁷⁸ O'Conner P., et al., (1992), "Relationships between cdc2 kinase, DNA cross-linking, and cell cycle perturbation induced by nitrogen mustard", *Cell Growth Diff.*, 3, 43 - 52
- ⁷⁹ O'Conner et al., (1993), "G2 delay induced by nitrogen mustard in human cells affects cyclin A/cdk2 and cyclinB1/cdc2 kinase complex differently", *J. Biol. Chem.*, 268, 8298 - 8308
- ⁸⁰ Nasmyth K., Hunt T., (1993), "Dams and Sluices", *Nature*, 366, 634 - 635
- ⁸¹ Moulton T., (1995), "MTS1 Lesions in primary GBM's", *American Journal of Path.*, 146, 613 - 619
- ⁸² Giani C., (1994), "Mutations Rate of the CDKN2 Gene in Malignant Gliomas", *Cancer research*, 54, 6338 - 6339
- ⁸³ Walker D., "Homozygous Deletions of the MTS1 Gene in the Progression of Human Astrocytomas", *Cancer research*, 55, 20 - 23
- ⁸⁴ Kratzke R., (1995), "Immunohistochemical Analysis of the p16 CDKI in Malignant Mesothelioma", *Journal of the National Cancer Institute*, 87, 1870 - 1875
- ⁸⁵ Kamb A., (1994), „Response to ²³“, *Science*, 265, 417 - 418
- ⁸⁶ Caldas C., (1994), „Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 gene in pancreatic adenocarcinoma“, *Nature Genetics*, 8, 27 - 32
- ⁸⁷ Herbert J., (1994), „Candidate tumor-suppressor genes MTS1 and MTS2 display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia’s“, *Blood*, 84, 4038 - 4044
- ⁸⁸ Schmidt E., (1994), „CDKN2 gene deletions or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas“, *Cancer research*, 54, 6321 - 6324
- ⁸⁹ Brenner A., (1995), „Chromosome 9p Allelic Loss and p16 in Breast Cancer and Evidence of p16 Inactivation in Immortal Breast Epithelial Cells“, *Cancer research*, 55, 2892 - 2895
- ⁹⁰ Cheng J., (1994), „p16 Alterations and Deletion Mapping of 9p21 – 9p22 in Malignant Mesothelioma“, *Cancer research*, 54, 5547 - 5551
-

-
- ⁹¹ Ueki K., (1994), „MTS1 gene mutations are rare in primary human astrocytomas with allelic loss of chromosome 9p“, *Hum Mol Gen*, 3, 1841 - 1845
- ⁹² Okamoto A., (1994), „Mutations and altered expression of p16 in human cancer“, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 11045 - 11049
- ⁹³ Arap W., (1995), „Replacement of the p16 Gene suppresses human Glioma cell growth“, *Cancer research*, 55, 1351 - 1354
- ⁹⁴ Schroder M., (1995), „CDKN2 gene deletion is not found in chronic lymphoid leukemia's of B- and T-cell origin but is frequent in acute lymphoblastic leukemia“, *Br J Haematol*, 91, 865 - 870
- ⁹⁵ Izumoto S., (1995), „Homozygous deletion of p16 and p15 genes in glioma cells and primary glioma tissues“, *Cancer Letters*, 97, 241 - 247
- ⁹⁶ Westphal M., (1990), „Culture of brain tumors on an extracellular matrix derived from bovine corneal endothelial cells and cultured human glioma cells“, In: *Methods in Molecular Biology (5): Animal Cell Culture*, Pollard JW, Walker JM (eds), Human press, Clifton, New Jersey, pp113 - 131
- ⁹⁷ Washimi O., (1995), „In Vivo Occurrence of p16 and p15 Alterations Preferentially in Non-Small Cell Lung Cancers“, *Cancer research*, 55, 514 - 517
- ⁹⁸ Sonoda Y., (1995), „Homozygous deletion of the MTS1 and MTS2 genes and amplification of the CDK4 gene in glioma“, *Oncogene*, 11 (10), 2146 - 2149
- ⁹⁹ Washimi O., (1995), „In Vivo Occurrence of p16 and p15 Alterations Preferentially in Non-Small Cell Lung Cancers“, *Cancer research*, 55, 514 - 517
- ¹⁰⁰ Lücke M., (1994), „Expression of retinoblastoma gene in human intracranial neoplasms“, *International Journal of Oncology*, 4, 885 - 890
- ¹⁰¹ Hamel W., (1993), „Loss in Expression of the retinoblastoma gene is associated with advanced disease“, *J Neuro-Oncol*, 16, 159 - 165
- ¹⁰² Müller B., Bamberg M., Krauseneck P., (1995), "Maligne Gehirntumore", In: Seeber S., Schütte J., "Therapiekonzepte Onkologie", 2.Auflage, Springer Verlag
- ¹⁰³ Westphal M, Herrmann H.-D., (1992), "Tumore", *Lehrbuch der Neurologie*, Hrsg.: Klaus Kunze, Georg Thieme Verlag, 479 - 499
- ¹⁰⁴ Deen DF., Chiarodo A., (1993), "Brain tumor working group report on the 9th conference on brain tumor research and therapy", *J Neuro-Oncol*, 16, 243 - 272
- ¹⁰⁵ Ammirati M., (1987), "Reoperation in the treatment of recurrent intracranial gliomas", *Neurosurgery*, 21, 607 - 614
- ¹⁰⁶ Bamberg M., Hess CF., (1992), "Radiation therapy of malignant gliomas", *Onkologie*, 15, 178 - 189
- ¹⁰⁷ Munding F., (1987), "Stereotactic biopsy and technique implantation (instillation) of radionuclids", In: Jellinger K, "Therapy of malignant brain tumors", Springer, 134 - 194
- ¹⁰⁸ Sauer R., (1987), "Radiation therapy of brain tumors", In: Jellinger K, "Therapy of malignant brain tumors", Springer, 195 - 276
- ¹⁰⁹ EORTC Brain Tumor Group, (1983), "Misonidazole in radiotherapy of supratentorial malignant gliomas in adult patients: A randomized double blind study", *Eur J Cancer Clin Oncol*, 19, 39 - 42
- ¹¹⁰ Green SB., Byar DP. et al., (1983), "Comparison of carmustin, procarbazine, and high dose methylprednisolone as additions to surgery and radiotherapy for the treatment of malignant glioma", *Cancer treat rep*, 67, 123 - 132
- ¹¹¹ Bamberg M. et al, (1986), "Preliminary experimental results with the nitrosourea derivate ACNU in the treatment of malignant gliomas", *Radiotherapy and Oncology*
- ¹¹² Schlegel U. et al., (1994), "Neue Entwicklungen in der Chemotherapie von Hirntumoren", *Akt Neurol*, 21, 39 - 46
- ¹¹³ Shapiro WR. et al., Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant gliomas", *J Neurosurg*, 71, 1 - 9
- ¹¹⁴ Takakuro K. et al., (1986), "Effect of ACNU and radiotherapy on malignant glioma", *J Neurosurg*, 64, 53 - 57
- ¹¹⁵ Trojanowski T. et al., (1988), "Postoperative radiotherapy and radiotherapy combined with CCNU chemotherapy for treatment of brain tumors", *J Neurosurg*, 6, 285 - 291
- ¹¹⁶ Müller B. et al., (1994), "Lung fibrosis - avoided with ACNU instead of BCNU", *J Neurooncol*, 21,1, 72
- ¹¹⁷ Krauseneck P. et al., (1991), "Postoperative Strahlen- und Chemotherapie mit BCNU und BCNU + VM26 bei malignen supratentoriellen Gliomen des Erwachsenenalters", *Abschlußbericht*
- ¹¹⁸ Shapiro WR. et al., (1987), "Reevaluating the efficacy of intra-arterial BCNU", *J Neurosurg*, 66, 313 - 315
-

-
- ¹¹⁹ Müller B., Bamberg M., Krauseneck P, (1993), "Maligne Gehirntumore", In: Seeber S., Schütte J., "Therapiekonzepte Onkologie", 1.Auflage, Springer Verlag
- ¹²⁰ Bishp JM., (1991), "Molecular themes in oncogenesis", *Cell*, 64, 235 - 248
- ¹²¹ Dameron KM et al., (1994), "Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of thrombospondin 1", *Science*, 265, 1582 - 1584
- ¹²² Harper JW. et al., (1996), "p53 - Integrating the complexity", *J pathol*, 180, 1 - 5
- ¹²³ Yoshino T. et al., (1994), "Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes", *Blood*, 83, 1856 - 1861
- ¹²⁴ Owen Schaub LB. et al., (1995), "Wild-typ human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression", *Mol cell biol*, 15, 3032 - 3040
- ¹²⁵ Thomas A. et al., (1996), "Drug induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/Bax proteins in drug resistance", *Oncogene*, 12 1055 - 1062
- ¹²⁶ Yin C. et al., (1997), "Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo", *Nature*, 385, 637 - 640
- ¹²⁷ Sandig V. et al., (1997), "Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death", *Nat Med*, 3(3), 313-319
- ¹²⁸ Merchant RE., "Treatment of recurrent malignant glioma by repeated intracerebral injections of human recombinant IL-2 alone or in combination with systemic IF- α . Results of a phase 1 clinical trial", *J Neuro Science*, 127, 125 - 133
- ¹²⁹ Wilkstrand CJ, (1992), "Monoclonal antibodies to malignant human glioblastomas", *Mol Chem Neuropathol*, 17, 137 - 146
- ¹³⁰ Westphal M., Hameln W., (1994), "Epidermal growth factor receptor expression in human malignant glioma: In vitro and in vivo effects of application of monoclonal antibodies to the epidermal growth factor receptor", *Rec results in cancer res*, 135, 171- 184
- ¹³¹ Culver KW. et al., (1993), "Gene therapy for the treatment of malignant brain tumors with in vivo transduction with the HSV-tk gene/ganciclovir system", *Hum gene therapy*, 5, 343 - 377
- ¹³² Moolten DW. et al., (1986), "Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase gene: paradigm for a prospective cancer control strategy", *Cancer Research*, 46, 5276 - 5281
- ¹³³ Oldfield EH. et al., (1993), "A clinical protocol: gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir", *Hum gene therapy*, 4, 39 - 69
- ¹³⁴ Badie B. et al., (1995), "Adenovirus-mediated p53 gene delivery inhibits 9L glioma growth in rats", *Neurol Res*, 17(3), 209 - 216
- ¹³⁵ Asai A. et al., (1994), "Negative effects of wild-type p53 and s-Myc on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implication of the tumor suppressor genes for gene therapy", *J Neurooncol*, 19(3), 259 - 268
- ¹³⁶ Schrupp DS., (1996), "Inhibition of esophageal cancer proliferation by adenovirally mediated delivery of p16INK4", *Cancer Gene Ther*, 3(6), 357 - 364
- ¹³⁷ Quesnel B. et al., (1996), "Transfer of p16INK4/CDKN2 gene in leukemia cell lines inhibits cell proliferation", *Br J Haematol*, 95(2), 291 - 298
- ¹³⁸ Fueyo J. et al., (1996), "Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer induces growth arrest and modifies the transformed phenotype of glioma cells", *Oncogene*, 12(1), 103 - 110
- ¹³⁹ Jin X. et al., (1995), "Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16INK4 gene mediated by an adenovirus vector", *Cancer Res*, 55(15), 3250 - 3253
- ¹⁴⁰ Bischoff JR. et al., (1996), "An adenovirus mutant that replicates selectively in p53 deficient human tumor cells", *Science*, 274, 373 - 376
- ¹⁴¹ Wills KN. et al., (1994), "Development and characterization of a recombinant adenovirus encoding human p53 for gene therapy of cancer", *Hum Gene Therapy*, 5, 1079 - 1088
- ¹⁴² Powis G, (1991), "Growth factor and oncogene signaling pathways as targets for rational anticancer drug development", *Clin Biochem*, 24(5), 385 - 397
- ¹⁴³ Faaland CA, (1991), "Rapid uptake of tyrphostin into A431 human epidermoid cells is followed by delayed inhibition of epidermal growth factor (EGF)-stimulated EGF receptor tyrosine kinase activity", *Mol Cell Biol*, 11(5), 2697 - 2703
- ¹⁴⁴ Singh J, (1997), "Structure-based design of a potent, selective, and irreversible inhibitor of the catalytic domain of the erbB receptor subfamily of protein tyrosine kinases", *J Med Chem*, 40(7), 1130 - 1135
-

-
- ¹⁴⁵ Hara M et al., (1993), " Identification of Ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening", Proc Natl Acad Sci U S A, 15;90(6), 2281 - 2285
- ¹⁴⁶ Kohl NE et al., (1994), " Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice", Proc Natl Acad Sci U S A, 91(19), 9141 - 9145
- ¹⁴⁷ Gibbs JB et al., (1996), " Farnesyltransferase inhibitors and anti-Ras therapy", Breast Cancer Res Treat, 38(1), 75 - 83
- ¹⁴⁸ Karlson J, (1996), "Inhibition of tumor cell growth by monoterpenes in vitro: evidence of a Ras-independent mechanism of action", Anticancer Drugs, 7(4), 422 - 429
- ¹⁴⁹ Barinaga M., (1997), "From Bench Top to Bedside", Science, 278, 1036 - 1039
- ¹⁵⁰ Bible KC et al., (1996), " Flavopiridol: a cytotoxic flavone that induces cell death in noncycling A549 human lung carcinoma cells", Cancer Res, 56(21), 4856 - 4861
- ¹⁵¹ De Azevedo WF et al., (1996), " Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase", Proc Natl Acad Sci U S A, 93(7), 2735 - 2740
- ¹⁵² Hama S. et al., (1997), " Transformation of human glioma cell lines with the p16 gene inhibits cell proliferation", Anticancer Res, 17(3C), 1933 - 1938
- ¹⁵³ Srivenugopal KS. et al., (1996), " Deletions and rearrangements inactivate the p16INK4 gene in human glioma cells", Oncogene, 12(9), 2029 - 2034
- ¹⁵⁴ He J. et al., (1995), " Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines", Cancer Res, 55(21), 4833 - 4836
- ¹⁵⁵ Aagaard L. et al., (1995), "Aberrations of p16 and Rb tumor suppressor genes occur in distinct subsets of human cancer cell lines", Int J Cancer, 61, 115 - 120
- ¹⁵⁶ Gomi A. et al., (1995), " Frequent loss of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in human gliomas", Jpn J Cancer Res, 86(4), 342 - 346
- ¹⁵⁷ Zhang S. et al., (1994), "Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck", Cancer research, 54, 5050 - 5053
- ¹⁵⁸ Xu L. et al., (1994), "Mutational analysis of CDKN2 (MTS1/p16ink4) in human breast carcinomas", Cancer research, 54, 5262 - 5264
- ¹⁵⁹ Zariwala M. et al., (1996), "Mutational analysis of the p16 family cyclin-dependent kinase inhibitors p15 and p18 in tumor-derived cell lines and primary tumors", Oncogene, 12, 451 - 455
- ¹⁶⁰ Yoshida S. et al. (1995), " Mutations of p16Ink4/CDKN2 and p15Ink4B/MTS2 genes in biliary tract cancers", Cancer Research, 55, 2756 - 2760
- ¹⁶¹ Okamoto A. et al., (1995), "Mutations in the p16, p15 and p18 genes in primary and metastatic lung cancer", Cancer Research, 55, 1448 - 1451
- ¹⁶² Nakagawa K. et al., (1995), "Mechanism of inactivation of CDKN2 and MTS2 in non-small cell lung cancer and association with advanced stage", Oncogene, 2;11(9), 1843 - 1851
- ¹⁶³ Srivenugopal KS. et al., (1996), "Deletions and rearrangements inactivate the p16INK4 gene in human glioma cells", Oncogene, 12(9), 2029 - 2034
- ¹⁶⁴ Robinson WA. et al., (1996), "Expression of the tumor suppressor genes p15 and p16 in malignant melanoma", Melanoma Res, 6(4), 285 - 289
- ¹⁶⁵ Tanaka H. et al., (1997), "Multiple types of aberrations in the p16 (INK4a) and the p15(INK4b) genes in 30 esophageal squamous-cell-carcinoma cell line", Int J Cancer, 70(4), 437 - 442
- ¹⁶⁶ Kaino M. et al., (1997), "Alterations in the tumor suppressor genes p53, RB, p16/MTS1, and p15/MTS2 in human pancreatic cancer and hepatoma cell lines", J Gastroenterol, 32, 40 - 46
- ¹⁶⁷ Kellogg DE. et al., (1990), "Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction", Anal. Biochem., 189(2), 202-208
- ¹⁶⁸ Newton CR., (1994), "PCR", Oxford : Spektrum Akad. Verlag, 175 - 179
- ¹⁶⁹ Serra A. et al., (1995), "Involvement of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in the pathogenesis of lymphoid blast crisis of CML", Br J Haematology, 91, 625 - 629
- ¹⁷⁰ Zang KD et al., (1982), „Cytological and cytogenetical studies on human menigeomas“, Cancer Genet Cytogenet, 6, 249 - 274
- ¹⁷¹ Dumanski JP et al, (1987), „Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the ocogenesis of menigeoma“, Proc Natl Acad USA, 84, 9275 - 9279
- ¹⁷² Lekanne Deprez RH et al., (1994), „Frequent NF2 gene transcription mutations in sporadic menigeomas“, Am J Hum Genet, 54, 1022 - 1029
- ¹⁷³ Lindblom A et al., (1994), „Chromosomal deletions in anaplastic menigeomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression“, Int J Cancer, 56, 354 - 357
-

-
- ¹⁷⁴ Peyrard M et al., (1994), „Characterization of a new member of the human β -Adaptin gene family from 22q12, a candidate menigeoma gene“, *Hum Mol Genet*, 3, 1393 - 1399
- ¹⁷⁵ Lekanne Deprez RH et al., (1995), „Cloning and characterization of MN1“, *Oncogene*, 10, 1521 - 1528
- ¹⁷⁶ Wang JL et al., (1995), „Detection of TP53 gene mutations in human menigeoma“, *Int J Cancer*, 64, 223 - 228
- ¹⁷⁷ Barker FG et al., (1997), „P16 deletion and mutation analysis in human brain tumors“, *J Neurooncol*, 31, 17 - 23
- ¹⁷⁸ Sato K et al., (1996), „Infrequent alterations of the p15, p16, CDK4 and cyclin D1 genes in non-astrocytic human brain tumors“, *Int J Cancer*, 66, 305 - 308
- ¹⁷⁹ Ono Y et al., (1996), „Homozygous deletions of the CDKN2/p16 gene in dural hemangiopericytomas“, *Acta Neuropathol (Berl)*, 91, 221 - 225
- ¹⁸⁰ v.Deimling A et al., (1995), „Molecular pathways in the formation of gliomas“, *Glia*, 15, 328 - 338
- ¹⁸¹ Furnari FB et al., (1996), „Molecular biology of malignant degeneration of astrocytoma“, *Pediatr Neurosurg*, 24, 41 - 49