

Institut für Humangenetik
Fachbereich 2.6 Theoretische Medizin
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Prof. Dr. med. Klaus D. Zang)

**Wirkt das Gen der gewebeunspezifischen Alkalischen
Phosphatase (ALPL) auf Chromosom 1p als
Tumorsuppressorgen?
Mutations- und Methylierungsanalyse in Meningeomen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2005

vorgelegt von: Katja Vater
geb. am: 24.01.1979 in Landstuhl

Meinen Eltern

Abkürzungen

Aqua dest.	destilliertes Wasser
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
cDNA	aus RNA kopierte Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxynukleinsäure
EcoRI	Restriktionsendonuklease aus Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
fmol	Femtomol
h	Stunde
HindIII	Restriktionsendonuklease aus Haemophilus influenzae
H ₂ O	Wasser
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galaktosidase
kb	Kilobase
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
LB-Medium	Luria-Botani-Medium
mA	MilliAmpere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol/l	Millimol pro liter
mol/l	Mol pro liter
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄	Ammonium
NH ₄ CL	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	kurzer Chromosomenarm
P	Phosphat

PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
q	langer Chromosomenarm
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
sec	Sekunde
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris-HCl	Tris-Salzsäure
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
-x	fach
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galaktosidase
10x	10-fach
β -ME	Beta-Mercaptoethanol
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	1
	Summary	3
II.	Einleitung	5
1.	Epidemiologie und Einteilung der Meningeome	5
2.	Chromosomenkonstitution der Meningeome	6
3.	Alkalische Phosphatase (ALPL)	9
4.	Alkalische Phosphatase (ALPL) in Meningeomzellen	10
5.	DNA-Methylierung	11
6.	Aufgabenstellung dieser Arbeit	13
III.	Material und Methoden	14
1.	Material	14
1.1	Meningeome	14
1.2	Genomische DNA	15
1.3	Apparaturen	15
1.4	Chemikalien	16
1.5	Lösungen	17
1.6	Primer	18
2.	Methoden	19
2.1	Isolierung von genomischer DNA aus Meningeomzellkulturen	19
2.2	Isolierung von genomischer DNA aus Blut	19
2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA durch Spektralphotometrie	20
2.4	Bisulfitbehandlung	20
2.4.1	Prinzip	20
2.4.2	Methode 1	22
2.4.3	Methode 2	22
2.5	Isolierung von RNA aus Meningeomzellkulturen	24
2.6	Gewinnung von cDNA (RT-Reaktion)	24
2.6.1	RT-Reaktion mit SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	25

2.6.2	RT-Reaktion mit Sensiscript	26
2.6.3	RT-Reaktion mit Omniscript	27
2.7	PCR, RT-PCR	27
2.7.1	Prinzip	27
2.7.2	PCR – Protokolle	29
	A) HotStarTaq®DNA-Polymerase	29
	B) Taq-DNA-Polymerase	30
2.8	Gelelektrophorese	31
2.8.1	Prinzip und Verfahren	31
2.8.2	Gelherstellung	32
2.9	DNA-Isolierung aus präparativem Agarosegel	32
2.10	Klonieren	32
2.10.1	Prinzip	32
2.10.2	Vorbereitung der PCR-Produkte zur Ligation	36
2.10.3	Klonierung mit pSTBlue-1	37
2.10.4	Klonierung mit pCR4-TOPO	37
2.10.5	Kontroll-PCR der Klone	37
2.11	Plasmidisolierung	38
2.11.1	Plasmid Mini Kit Qiagen	38
2.11.2	GFX™Micro Plasmid Prep Kit Pharmacia	38
2.11.3	Kontroll-PCR	39
2.12	Sequenzierung	39
2.12.1	Prinzip	39
2.12.2	Sequenzierung mit SequiTherm EXCEL™II	40
IV.	Ergebnisse	43
1.	Das Alkalische Phosphatase-Gen und -Transkript	43
1.1	Das Transkript der Alkalischen Phosphatase	43
1.2	Optimierung der Versuchsbedingungen	45
1.3	Gewinnung des ALPL-Transkripts	46
1.4	Variationen im ALPL-Transkript	51
2.	Promotoraktivität in Meningeomen	53

3.	DNA-Methylierung des Promotors	56
3.1	Promotor der normalen Kontroll-DNA (pST-Blue1)	59
3.2	Promotor der Tumor-DNA (pST-Blue1)	60
3.3	Promotor der normalen Kontroll-DNA (pCR4-TOPO)	65
V.	Diskussion	69
VI.	Literaturverzeichnis	76
VII.	Publikationen/Dank	92
VIII.	Lebenslauf	94

I. Zusammenfassung

Das Meningeom, ein Tumor der Hirnhäute, ist neuroektodermalen Ursprungs, üblicherweise gutartig und - bezogen auf die Masse seines Matrixgewebes - der häufigste Tumor beim Menschen. Nur eine Minderheit der Fälle zeigt eine Progression zu einem intermediären oder anaplastischen Tumor (WHO-Grad II und III). Man findet bei WHO-Grad I Tumoren zytogenetisch entweder eine Monosomie 22 oder einen diploiden Karyotyp. Strukturelle Aberrationen sind selten, ausser dem Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1, der als entscheidender Schritt für Meningeomprogression gilt.

Mikroskopisch erkennbare Deletionen von Chromosom 1p und Verlust der Expression der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase (liver/bone/kidney type ALPL), lokalisiert auf Chromosom 1p36.1-34, im Tumorgewebe sind stark assoziiert mit der Progression von Meningeomen. Dies lässt darauf schließen, dass die Alkalische Phosphatase eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation in normalen Meningen und niedriggradigen Meningeomen ausübt.

Bei Meningeomen mit Deletion des kurzen Arms eines Chromosoms 1 bleibt der kurze Arm des homologen Chromosoms 1 noch erhalten. Mit immunologischen und histochemischen Methoden ist aber weder ein Enzymprotein noch eine Enzymaktivität mehr nachweisbar.

In dieser Arbeit wurden verschiedene mögliche Mechanismen für die somatische Inaktivierung der Alkalischen Phosphatase analysiert.

Als eine Möglichkeit der Enzyminaktivierung kommen Mutationen im verbleibenden ALPL-Gen in Frage. Bei der Analyse dreier Meningeome, eines WHO-Grad-I-Tumors mit normalem Chromosomensatz und zweier WHO-Grad-II-Tumore mit Verlusten des kurzen Arms, bzw. eines kompletten Chromosoms 1, zeigten die Sequenzierungen von ALPL jedoch keine Mutationen. Wir konnten bei diesen Meningeomen ausschließen, dass Mutationen die Inaktivierung der ALPL bedingen.

Eine andere mögliche Ursache, die zur Inaktivierung der ALPL führen könnte, ist eine epigenetische Veränderung im Sinne der DNA-Methylierung.

Das ALPL-Gen besitzt zwei hintereinander liegende unterschiedliche Promotoren, die Leber-Form (liver-type) und die Knochen-Form (bone-type), die in gewebespezifischer Weise aktiv sind. In den analysierten Meningeomen war der ALPL-Gen-Promotor der Knochen-Form aktiv. CpG-reiche Promotoren können durch DNA-Methylierung reguliert werden.

Durch genomische Bisulfitbehandlung und Sequenzierung der Promotorsequenzen von fünf Meningeomen, fanden wir im meningeomspezifischen ALPL-Gen-Promotor (Knochen-Form) eine erhöhte DNA-Methylierung. Ob die gefundene Methylierung des Promotors der

Meningeom-DNA für dessen Inaktivierung und den Enzymverlust ausreicht, musste durch in vivo-Experimente an Meningeomzellkulturen mit einem Demethylierungsagens wie 5-Azacytidin geklärt werden.

Diese Experimente konnten erst nach Abschluss dieser Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt werden. Sie haben in der Tat ergeben, dass in den Zellkulturen eine Reaktivierung des Enzyms erfolgt ist.

Da die gefundene Methylierung für die Genstilllegung offenbar ausreicht, ist ein Zweischnitt-Prozess für die somatische Inaktivierung der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase anzunehmen: zum einen mikroskopisch erkennbare Deletion eines Allels und zum anderen eine Promotor-Methylierung des verbleibenden Allels.

I. Summary

„Does the gene of the tissue non-specific alkaline phosphatase (ALPL) on chromosome 1p work as a tumor suppressor gene?

Mutation and methylation analysis in meningiomas“

The meningioma, a tumor of the brain coverings, is of neuroectodermal origin, usually benign and - related to the mass of matrix tissue - the most frequent tumor in humans. Only a minority of cases show progression to an intermediate type or anaplastic tumor (WHO grade II and III). Cytogenetically WHO grade I tumors show either uniform monosomy 22 or a diploid karyotype. Structural aberrations are infrequent, except for the loss of the short arm of chromosome 1, which appears to be the decisive step for progression.

Microscopic deletions of chromosome 1p and loss of expression of tissue non-specific alkaline phosphatase (liver/bone/kidney type ALPL), located on 1p36.1-34, in the tumor tissue are strongly associated with progression of meningiomas, indicating a growth-suppressing function of ALPL in normal meninges and low-grade meningiomas.

With loss of the short arm of one chromosome 1 there is still one complete chromosome 1 left. However, with immunological and histological methods, neither the enzyme protein nor enzyme activity is detectable.

In this study, we investigated different possible mechanisms for the somatic inactivation of the alkaline phosphatase.

One possibility is inactivation by mutation of the remaining ALPL gene. Three meningiomas, one WHO grade I tumor with a normal karyotype and two WHO grade II tumors with loss of the short arm respectively a complete chromosome 1, were analyzed. However, no mutations could be detected by sequencing. With our study, we can exclude in these cases that mutations cause enzyme inactivation of ALPL.

A second possibility is down-regulation of ALPL transcription by DNA methylation. The ALPL gene has two promoters (liver-type and bone-type) located one behind the other which are active in a tissue-specific manner. In all analyzed meningiomas only the bone-type ALPL gene promoter was active. CpG-rich promoters can be regulated by DNA methylation.

By high-resolution bisulfite genomic sequencing of the promoter sequences of five meningiomas, we found elevated levels of methylation in the meningioma-specific bone-type ALPL gene promoter. Because DNA methylation does not necessarily mean gene silencing an in vivo experiment of meningioma cell cultures with the demethylating agent 5-azacytidine had to elucidate this question.

These experiments could not be made by our study group until after the completion of this thesis. In fact the experiments result in the reactivation of the enzyme in the cell cultures.

Since the methylation is obviously sufficient for gene inactivation, we conclude that the tissue non-specific alkaline phosphatase gene can be somatically silenced in a two-step process: through microscopic deletion of one allele plus promoter methylation of the second allele.

II. Einleitung**1. Epidemiologie und Einteilung der Meningeome**

Meningeome gehören zu den häufigsten Neoplasien des Zentralnervensystems im Erwachsenenalter. Sie entstehen aus der Arachnoidalschicht der Meningen und machen mehr als 20% der menschlichen intrakraniellen und intraspinalen Tumoren aus (KUJAS, 1993). Die Manifestation erfolgt meist im höheren Erwachsenenalter mit einem Häufigkeitsgipfel in der sechsten Lebensdekade, wobei Frauen rund doppelt so häufig betroffen sind. Mit steigender Malignität der Tumoren erkranken beide Geschlechter etwa gleich häufig (KEPES, 1982; ZANG, 1982; ANTINHEIMO et al., 2000; LOUIS et al., 2000; ZANG, 2001). Multiple Meningeome sind fast immer assoziiert mit Neurofibromatose 2, einem autosomal-dominant vererbten Tumorsyndrom. Sie treten bei bis zu 50% der Patienten mit Neurofibromatose 2 auf (EVANS et al., 1992), oft in Kombination mit vestibulären Schwannomen und Ependymomen.

Die Mehrheit der Meningeome, etwa 90%, ist benigne (WHO-Grad I) und wird unterteilt in meningoendotheliomatöse, transitionale, fibroblastische, psammomatöse, angiomatöse, mikrozystische, sekretorische, chordoide, metaplastische, lymphoplasmazytoide und klarzellige Meningeome (KLEIHUES et al., 1993). Ein Teil der Meningeome zeigt aggressiveres biologisches Verhalten und Progression zum atypischen bzw. intermediären Typ (WHO-Grad II) oder zum anaplastischen Typ (WHO-Grad III). Charakteristika des Meningeoms vom intermediären Typ, das etwa 5-7% aller Meningeome darstellt, sind häufige Mitosen, erhöhte Zelldichte, kleine Zellen mit hoher Kern-Plasma-Relation und/oder prominentem Nukleolus, strukturarmes Wachstumsmuster und Nekrosen. Das anaplastische Meningeom (1-2% der Meningeome) weist offensichtliche Malignitätszeichen auf, die weit über die Abnormalitäten atypischer Meningeome hinausgehen (KLEIHUES et al., 1993), einschließlich maligner Zytologie, hohem mitotischem Index und auffälliger Nekrosen (NIEDERMAYER et al., 1997; SANSON und CORNU, 2000). Meningeome des WHO-Grades II und III können Knochen, Muskeln, Dura, venöse Sinus und das Gehirn infiltrieren (KLEIHUES et al., 1993; McCUTCHEON, 1996). Das intermediäre Meningeom zeigt eine Tendenz zum lokalen Tumorrezidiv, das anaplastische weist ein großes Risiko für Lokalrezidive und intrazerebrale Metastasen auf (MAIER et al., 1992; LANTOS et al., 1996). Eine schlechte Prognose ist häufig bei bestimmten Subtypen, die mit aggressivem Verhalten assoziiert sind. Dazu zählen klarzellige (ZORLUDEMIR et al., 1995), papilläre (LUDWIN et al., 1975; PASQUIER et al.,

1986), atypische und anaplastische Meningeome (KALLIO et al., 1992; MAHMOOD et al., 1993; NISHIZAKI et al., 1994).

2. Chromosomenkonstitution der Meningeome

Wie viele Neoplasien, weisen Meningeome in ihrem Chromosomensatz spezifische strukturelle und numerische Aberrationen auf.

In ausgedehnten zytogenetischen Studien an Meningeomen zeigt sich der vollständige oder partielle Verlust eines G-Chromosoms (ZANG und SINGER, 1967; MARK, 1970; SINGER und ZANG, 1970; ZANKL und ZANG, 1971), das als Chromosom 22 identifiziert wurde (ZANKL und ZANG, 1972). Typisch für benigne Meningeome ist ein normaler Chromosomensatz oder die Monosomie 22 als einzige Chromosomenaberration (ZANG, 1982; KUJAS, 1993). Studien an Meningeomen mit Hinblick auf heterozygoten Allelverlust (LOH) identifizierten eine Region auf dem langen Arm von Chromosom 22, die in 60-70% der Tumore deletiert ist (DUMANSKI et al., 1987; DUMANSKI et al., 1990; REMPEL et al., 1993; RUTTLEDGE et al., 1994). Es wurden inaktivierende Mutationen des NF2-Tumorsuppressorgens (ROULEAU et al., 1993), lokalisiert auf 22q12, in der Mehrzahl der Fälle mit distalem heterozygotem Allelverlust von 22q gefunden (RUTTLEDGE et al., 1994; WELLENREUTHER et al., 1995). Eine homozygote Mutation und/oder Verlust des NF2-Gens wurden in Meningeomen aller Malignitätsgrade gefunden, allerdings nur in rund einem Drittel der Grad I-Tumoren. Die Inaktivierung zumindest eines Allels dieses Gens und somit auch die partielle Inaktivierung des NF2-Genproduktes Merlin (Schwannomin) scheinen in der Pathogenese der Meningeome ein frühes genetisches Ereignis zu repräsentieren (RUTTLEDGE et al., 1994; WELLENREUTHER et al., 1995). Abwesende oder stark reduzierte Immunreaktivität für Merlin wurde in der Mehrheit der Meningeome gefunden (HITOTSUMATSU et al., 1997; HUYNH et al., 1997; EVANS et al., 2001). Merlin gehört zur 4.1 Familie von strukturellen Proteinen, die das Zytoskelett mit den Proteinen der zytoplasmatischen Membran verbinden (GUSELLA et al., 1999). Der Mechanismus, durch den Merlin Tumorsuppressoraktivität ausübt, ist noch wenig geklärt. Die Unterbrechung einer Signalkaskade, die zur zytoskelettalen Reorganisation führt, wird als kritisch bei der Tumorbildung gewertet. Überexpression von Merlin in sowohl NF2-negativen als auch NF2-positiven menschlichen Meningeomzellen hemmte signifikant ihre Proliferation in vitro. Dies gibt weiteren Beweis dafür, dass Merlin eine Rolle als negativer Regulator beim Tumorwachstum inne hat (IKEDA et al., 1999).

Neben dem typischen Verlust eines Chromosoms 22 treten bei der Progression weitere unterschiedliche Chromosomenverluste, selten (außer 1p-) strukturelle Chromosomenveränderungen, extrem selten Zugewinne auf. Häufig kommen kompletter oder teilweiser Verlust von Chromosom 14 (SIMON et al., 1995; MENON et al., 1997) oder Verlust von Chromosom 18, 19 oder dem Y-Chromosom vor (MALTBY et al., 1988; WEBER et al., 1997). Simon et al. (1995) und Weber et al. (1997) beschreiben außerdem aufgrund von vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) den heterozygoten Allelverlust von 1p, 9q, 10q und 14q, der selten in benignen Meningeomen, jedoch häufig in atypischen und noch öfter in anaplastischen Meningeomen in Erscheinung tritt.

In einer Studie von Lopez-Gines et al. (2004) wurden 14 Meningeome unter zytogenetischen Aspekten und durch FISH-Analyse untersucht. Unter den Tumoren waren sechs benigne, vier atypische und vier maligne Meningeome. Alle Meningeome weisen Verluste in verschiedenen Regionen des Chromosoms 1p auf, mit Bruchstellen bei 1p11, 1p13, 1p21, 1p32 und 1p21. Acht Meningeome zeigten auch Verluste von Chromosom 14. Fünf von sechs Fällen mit Deletion von 1p und normalem Chromosom 14 waren WHO-Grad I, bei zwei davon trat ein Rezidiv auf. Alle außer einem von acht Fällen mit gleichzeitiger 1p-Deletion und Veränderungen des Chromosoms 14 waren WHO-Grad II (3 Fälle) und WHO-Grad III (4 Fälle). Alle WHO-Grad III-Tumore traten rezidivierend auf. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das gleichzeitige Bestehen einer 1p-Deletion und Verluste eines Chromosoms 14 stark mit dem hohen histologischen Grad der Tumore assoziiert sind und eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression spielen (LOPEZ-GINES et al., 2004).

In aggressiven Meningeomen sind zusätzlich strukturelle Veränderungen an den Chromosomen 3 und 6 nachgewiesen worden (PERRY et al., 1996).

Henn et al. (2003) stellen in ihrer Studie 15 Meningeome aus einer konsekutiven Serie von 400 zytogenetisch charakterisierten Meningeomen vor mit Veränderungen an Chromosom 7. Zwölf dieser Tumore (80%) wiesen partielle oder komplette Monosomie 7p auf mit deletierter Region bei 7p12-pter und unbalancierter Translokation mit anderen Chromosomen. Balancierte Translokationen von Chromosom 7 waren eher selten. In 11 von 15 Meningeomen war die Zentromerregion des Chromosom 7 in die Rearrangements involviert. Man geht davon aus, dass die zentromer-nahe Region teilweise zu strukturellen Rearrangements neigt, meist resultierend in der Monosomie 7p. Da 7 von 11 Meningeomen mit Monosomie 7p zum WHO-Grad II oder –III gehören, die üblicherweise weniger als 20% aller Meningeome darstellen, scheint der partielle Verlust von 7p an der Tumorprogression der Meningeome beteiligt zu sein (HENN et al., 2003).

Zytogenetisch korrelieren die intermediären und anaplastischen Meningeome mit distalem Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p-) (BELLO et al., 1994; KOLLES et al., 1995) oder strukturellem Rearrangement von Chromosom 1p (PERRY et al., 1996). Der Verlust des Chromosoms 1p ist assoziiert mit erhöhtem in vivo Glucose-Metabolismus und mit erhöhter Rezidivrate von Meningeomen (HENN et al., 1995). Die Rezidivrate bei Meningeomen ohne 1p-Verlust beträgt 4,3%, in Meningeomen mit 1p-Verlust 30% (KETTER et al., 2001). Mehrere Studien zeigen bei den in der Zellkultur als intermediär und anaplastisch klassifizierten Meningeomen den progressionsassoziierten Verlust von genetischem Material auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 oder ein komplettes Fehlen eines Chromosoms 1 (BELLO et al., 1994; HENN et al., 1995; BOSTRÖM et al., 1997; NIEDERMAYER et al., 1997; NIEDERMAYER et al., 1998; ZANG, 2001). In FISH-Studien an Meningeomgewebe zeigt sich die Monosomie 1p in 70% der atypischen Meningeome und bei praktisch allen anaplastischen Meningeomen (MÜLLER et al., 1999).

Ketter et al. (2001) fanden, dass die zytogenetische Klassifikation der Meningeome, auch in Verbindung mit dem histologischen WHO-Grad, einen signifikanten Beitrag zur Vorhersage der Tumorrezidivität liefert. Somit ist sie ein wertvolles Kriterium für das neurochirurgische postoperative Nachsorgeschema. Die höchste Rezidivrate von 30% zeigte sich in der Tumorgruppe mit Deletion des Chromosoms 1p, dem Lokalisationsort der ALPL. In der Studie von McCarthy et al. (1998) ergab die Rezidivrate 32,4% bei 771 Patienten mit malignen Meningeomen vom WHO-Grad III. Dementsprechend stellt die Deletion des kurzen Armes von Chromosom 1 einen unabhängigen prognostischen Faktor dar, der signifikant mit erhöhtem Rezidivrisiko korreliert. Am wichtigsten für die Behandlung von Meningeomen ist der Versuch, den Tumor komplett zu resektieren, um ein Rezidiv zu vermeiden oder zumindest ein verlängertes rezidivfreies Intervall zu erzielen (ADGEBITE et al., 1983; CHAN et al., 1984; BOROVICH et al., 1986; BEKS et al., 1988; MAHMOOD et al., 1994). Verschiedene Nachsorgeprotokolle wurden versucht, um Meningeomrezidive früher zu erkennen und mehr Information über ihr Wachstum zu erhalten. Hochrisikopatienten sollten einer engeren postoperativen Überwachung unterzogen werden, wobei auch Glukose-PET Studien zum Einsatz kommen sollten, um die biologische Aktivität von frühzeitigem rezidivierendem Tumorwachstum feststellen zu können. Eine differenzierte Klassifikation der Meningeome ist somit ein wichtiger Aspekt, um Meningeome mit erhöhter Rezidivneigung zu identifizieren und dementsprechend ein dem jeweiligen Patienten angepasstes Nachsorgeschema durchführen zu können (KETTER et al., 2001).

Außer dem Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p-) wurde bei jungen Patienten ein gleichzeitiger Zugewinn eines kompletten Chromosoms 1 in den gleichen Zellen gefunden. Dieser Befund und die Infiltrationstendenz führten zur hypothetischen Annahme, dass aggressives biologisches Verhalten von Meningeomen entweder mit relativem Verlust von 1p oder mit relativem Zugewinn von 1q verbunden ist. FISH-Analysen zeigten, dass eine hohe Anzahl an Trisomie-1q-Zellen mit wachsender Malignität zu korrelieren scheinen (MÜLLER et al., 1999).

3. Alkalische Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase ist ein glykosiliertes membrangebundenes Enzym, das ein breites Spektrum an Monophosphatestern bei alkalischem pH-Optimum hydrolysiert (McCOMB et al., 1979). Im menschlichen Organismus sind vier Isoenzyme charakterisiert. Es gibt das liver/bone/kidney type-, das intestinal type-, das placental type- und das placental-like type Isoenzym. Das liver/bone/kidney type Isoenzym (ALPL) wird in Leber, Knochen und Niere und den meisten anderen Geweben exprimiert. Die intestinal (ALPI), placental (ALPP-1) und placental-like (Testes/Thymus) (ALPP-2) type Isoenzyme haben ihre bestimmte Verteilung in den Geweben, nach denen sie benannt sind (STIGBRAND et al., 1984).

Das kodierende Gen für die ALPL ist auf Chromosom 1 (1p34-p36.1) lokalisiert (SMITH et al., 1988), während sich die Gene für die ALPI, ALPP-1 und ALPP-2 alle auf Chromosom 2 (2q34-q37) befinden (GRIFFIN et al., 1987; MARTIN et al., 1987). Alle ALP-Gene des Menschen scheinen aus einem gemeinsamen ursprünglichen Gen hervorgegangen zu sein, wobei sich das ALPL-Gen evolutionär weiter von den drei anderen Genen entfernt hat. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz ihrer Proteine beträgt zwischen der ALPP-1 und ALPP-2 98%, zwischen ALPI und ALPP-1 bzw. ALPP-2 87%; die ALPL-Polypeptidsequenz stimmt nur zu etwa 50-60% mit der Aminosäuresequenz der Proteine der anderen ALPs überein (HARRIS, 1989). Auch im Hinblick auf die Promotorregion unterscheiden sich die ALPL-Gene. In den Promotorregionen am 5'-Ende der Gene sind für die ALPI, ALPP-1 und ALPP-2-Gene drei signifikant homologe Domänen gefunden worden. In der Promotorregion des ALPL-Gen besteht dazu kein Äquivalent (WEISS et al., 1988).

Das ALPL-Gen besitzt zwei verschiedene Promotoren. Strukturelle und funktionelle Analysen zeigen, dass das Gen aus zwei verschiedenen „leader exons“ (Exon 1B = bone, Knochen und Exon 1L = liver, Leber) und 11 kodierenden Exons besteht. Diesen beiden ersten Exons ist jeweils ein Promotor vorgeschaltet. Die Exons 2 bis 12 sind kodierende Exons und führen nach Translation zum Protein des ALPL-Gens. Die translatierten Proteine

unterscheiden sich nicht, da sich das Start-Codon ATG im Exon 2 befindet. Lediglich in der mRNA ist das erste Exon verschieden. Das Transkript des ALPL-Gens enthält entweder Exon 1B und somit den bone type der ALPL oder Exon 1L und damit den liver type der ALPL. Dieser Unterschied ist durch alternatives Splicing bedingt (MATSUURA et al., 1990).

Die Promotorregion am 5'-Ende des ALPL-Gens ist sehr GC-reich und enthält eine hohe Anzahl an CpG-Dinukleotiden (WEISS et al., 1988). Solche CpG-reichen Regionen, auch „CpG islands“ genannt, spielen in der Regulation der Genexpression eine Rolle (BIRD, 1986).

Die angeborene Hypophosphatasie ist eine Stoffwechselstörung, bei der eine verminderte Aktivität der ALPL aufgrund heterozygoter oder homozygoter Mutationen im ALPL-Gen besteht. Charakteristika sind eine gestörte Mineralisation des Skeletts mit Thoraxdeformitäten und frühem Zahnverlust und vermehrter Ausscheidung von Phosphoethanolamin im Harn (RASMUSSEN, 1983; WHYTE, 1994). Je nach Art der Mutation und deren Auswirkung auf das mutierte Allel gibt es stark variierende klinische Ausprägungen von der letalen infantilen Form bis zur milderen Form im Erwachsenenalter mit Rachitissymptomen (WHYTE et al., 1979; WHYTE et al., 1982; EASTMAN und BIXLER, 1983; EBERIC et al., 1984).

4. Alkalische Phosphatase (ALPL) in Meningeomzellen

Die Meningen weisen eine starke zelluläre Aktivität der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase auf (LANDOW et al., 1942), deren Strukturgen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p36.1-p34) lokalisiert ist. Histochemisch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Alkalischen Phosphatase beim Meningeom vom intermediären und anaplastischen Typ entweder komplett oder in großen Teilen eines Tumors verloren ist (NIEDERMAYER et al., 1997). Zytogenetische Befunde zeigen, dass der Verlust der Alkalischen Phosphatase-Aktivität innerhalb der Tumorzellen sehr hoch zum Verlust des kurzen Arms des Chromosoms 1 korreliert ist (NIEDERMAYER et al., 1997). Die Deletion von 1p und der Verlust der Expression der Alkalischen Phosphatase zeigen die Progression von Meningeomen (MÜLLER et al., 1999; KETTER et al., 2001; ZANG, 2001). Die starke Korrelation zwischen Aktivitätsverlust der ALPL und Monosomie 1p in Meningeomzellen weist darauf hin, dass die Alkalische Phosphatase als Tumorsuppressorgen wirkt (LINDBLOM et al., 1994; BOSTRÖM et al., 1997; NIEDERMAYER et al., 1997; ISHINO et al., 1998; LAMSZUS et al., 1999).

Es besteht die Möglichkeit eines „two-hit“-Mechanismus für die somatische Inaktivierung beider Allele der ALPL (KNUDSON, 1971). Hierbei kann es sein, dass ein Allel deletiert ist

durch Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und das verbleibende ALPL-Allel kann durch Mutation oder durch genomisches Imprinting inaktiviert sein.

5. DNA-Methylierung

Genomisches Imprinting ist eine epigenetische Form der Genregulation und führt dazu, dass Gene entweder vom väterlichen oder mütterlichen Chromosom bevorzugt exprimiert werden. Bisher schätzt man, dass es etwa 100 imprimierte Gene im Genom gibt, die ausschließlich oder überwiegend von entweder dem väterlichen oder dem mütterlichen Allel exprimiert werden (REIK und WALTER, 2001). Veränderungen in der korrekten Expression von solchen Genen resultieren in Entwicklungsstörungen. Darüber hinaus sind sie mit verschiedenen Erkrankungen und dem Auftreten unterschiedlicher Neoplasien vergesellschaftet (HORSTHEMKE et al., 1997; TYCKO, 1997; CONSTANCIA et al., 1998).

Aberrantes Imprinting wurde bei Patienten mit dem Angelman-Syndrom (AS) und dem Prader-Willi-Syndrom (PWS) festgestellt. Das Angelman- und das Prader-Willi-Syndrom sind Erkrankungen, die durch den Verlust der Funktion eines monoallelisch exprimierten väterlichen (beim PWS) oder mütterlichen (beim AS) Gens auf 15q11-13 verursacht werden (HORSTHEMKE et al., 1997).

DNA-Methylierung ist eine Schlüsselkomponente der Imprinting-Mechanismen und spielt eine essentielle Rolle sowohl in der normalen Embryogenese und Entwicklung, als auch in der Verminderung der Expression von Tumorsuppressorgenen während der Tumorigenese (AHUJA und ISSA, 2000). Beim Kolon-Karzinom wird die Methylierung des Promotors des Tumorsuppressorgens p16 auf Chromosom 9p sehr früh sogar in präneoplastischen Polypen gefunden (TOYOTA et al., 1999a). Das Gleiche gilt für das benachbarte p15-Gen bei einigen Leukämien. Diese Veränderung am p15-Gen wird in großen Studien im Knochenmark von Patienten mit Akuter myeloischer Leukämie (AML) bei 85% der erwachsenen und 65% der kindlichen Patienten gezeigt (HERMAN et al., 1996b; HERMAN et al., 1997). Eine wichtige Rolle spielt die CpG-Hypermethylierung auch bei der Inaktivierung des E-Cadherin-Gens bei Blasenkrebs (BORNMAN et al., 2001; RIBEIRO-FILHO et al., 2002). Die 5'-CpG-Promotor-Methylierung zeigt sich bei transkriptioneller Verminderung der E-Cadherin-Genexpression weiterhin bei Karzinomen der Brustdrüse (DROUFAKOU et al., 2001), Lunge (ZOCHBAUER-MULLER et al., 2001b), Magen (MACHADO et al., 2001), Kolon/Rektum (WHEELER et al., 2001) und Oesophagus (SI et al., 2001).

Imprimierte, d.h. nur monoallelisch aktive Tumorsuppressorgene und Protoonkogene sind sehr anfällig dafür, den Prozess der Tumorigenese zu induzieren, da nur ein Allel inaktiviert werden muss (RECILLAS-TARGA, 2002).

Es gibt drei Veränderungen, die eine Imbalance im Prozess der DNA-Methylierung bedingen und Charakteristika für Tumorprogression sind: (1) Verlust der Methylierung von normalerweise methylierten Regionen, (2) erhöhte Aktivität der DNA-Methyltransferase und (3) eine erhöhte Anzahl von Regionen mit hypermethylierter DNA (BAYLIN et al., 1991; JONES, 1996).

Das Ziel für DNA-Methylierung sind Cytosine der CpG-Dinukleotide, die im Genom im Vergleich zu anderen Dinukleotiden unterrepräsentiert sind. Es gibt jedoch GC-reiche Sequenzen, die eine höhere Anzahl an CG-Dinukleotiden enthalten. Solche sogenannten „CpG islands“ befinden sich mehrheitlich in der Promotorregion von Genen (PLASS und SOLOWAY, 2002). Hypermethylierung von unmethylierten „CpG islands“ der Promotorregion resultiert in einer Inaktivierung der Tumorsuppressorgene (BAYLIN et al., 1998; TOYOTA und ISSA, 2000; REIK und WALTER, 2001; BAYLIN, 2002).

Myöhänen et al. (1998) zeigten, dass der Verlust der Tumorsuppressorfunktion durch eine Kombination einer inaktivierenden Mutation in einem Allel und aberranter Methylierung eines nichtmutierten Promotors im anderen Allel auftreten kann. In ihrer Studie richteten sie das Interesse auf die Zelllinie HCT116 eines Kolonkarzinoms. Sie enthält ein Allel des Tumorsuppressorgens p16^{ink4A} mit einer inaktivierenden Mutation und ein Wildtyp-Allel. Der Promotor des Wildtyp-Allels, aber nicht das mutierte Allel, ist hypermethyliert und nur das mutierte Allel wird exprimiert (MYÖHÄNEN et al., 1998).

Nach homozygotem Knockout des Methyltransferase-Gens Dnmt 1 bei der Maus kommt es zur Reexpression von verschiedenen imprimierten Genen, die vorher ruhiggestellt waren. Dies gilt als ein Beweis dafür, dass DNA-Methylierung eine Rolle bei einer Genexpressionverminderung spielt. Ein anderer Beweis ist die Reexpression solcher stillgelegten Gene durch experimentelle Demethylierung mit Methyltransferase-Inhibitor-Substanzen wie 5`- Deoxyazacytidin (AHUJA und ISSA, 2000).

In mehreren Studien wurde nach inaktivierender Methylierung in Verbindung mit heterozygotem Allelverlust („Loss of heterozygosity“, LOH) bzw. Mutation gesucht (JONES und LAIRD, 1999). Die Frequenz, mit der die Promotor-Methylierung zur Inaktivierung von Genen beiträgt, reicht von 9% des RB1-Gens in **R**etinoblastomen (OHTANI-FUJITA et al., 1997) über 33% des VHL-Gens bei der **V**on-**H**ippel-**L**indau-Erkrankung (PROWSE et al.,

1997) bis zu 84% des MLH1-Gens (**MutL Homolog1-Gen**) in kolorektalen Tumoren (HERMAN et al., 1998).

Verschiedene regulatorische Gene, die in enger Nachbarschaft zum ALPL-Gen auf Chromosom 1 liegen, sind bekannt für monoallelische Expression: p73, ein Mitglied der p53-Familie, lokalisiert auf 1p36.33 (KAGHAD et al., 1997) und NOEY2 (**ARHI, ras homolog gene family, member I**), ein mögliches Tumorsuppressorgen des Ovarial- und Mammakarzinoms mit lokaler Homologie zu RAS (**rat sarcoma**) und RAP (**ras-related protein**) (YU et al., 1999), lokalisiert auf 1p31.

6. Aufgabenstellung dieser Arbeit

Der Verlust des kurzen Arms eines Chromosoms 1 bei in Progression befindlichen Meningeomen (WHO-Grad II und III) bedeutet, dass mikroskopisch noch ein intaktes Chromosom 1 in der Zelle vorhanden ist. Immunologisch und histochemisch ist aber weder eine Enzymaktivität noch das Enzym selbst nachweisbar (NIEDERMAYER et al., 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit werden im Hinblick auf einen möglichen „two-hit“-Mechanismus (KNUDSON, 1971) Ursachen für die Inaktivierung des zweiten Allels untersucht.

Eine Möglichkeit für den Aktivitätsverlust der ALPL in Meningeomen könnten submikroskopische Mutationen oder Deletionen sein, die zu einem defekten ALPL-Transkript führen.

Neben Deletion oder Mutation ist ein Verlust der ALPL-Expression auch durch genomisches Imprinting möglich, wobei als wahrscheinlichster Mechanismus die DNA-Methylierung des Promotors des ALPL-Gens in Frage kommt.

Da das ALPL-Gen zwei alternative Promotoren besitzt, musste zuerst eruiert werden, welches der aktive Promotor ist.

Folgende Fragestellungen waren in dieser Arbeit zu klären:

1. Gibt es Mutationen im ALPL-Transkript, die in einer Veränderung des translatierten Proteins resultieren und die Enzymaktivität beeinträchtigen?
2. Welcher Promotor des ALPL-Gens ist der aktive in den Meningeomzellen und welcher mRNA-Typ wird exprimiert?
3. Liegt eine DNA-Methylierung des Promotorbereichs der ALPL vor, die die Inaktivierung des ALPL-Allels erklären könnte?

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Meningeome

Biopsiematerial der operativ entfernten Meningeome wurde von der Neurochirurgischen Universitätsklinik in Homburg als Tumorstückchen zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. Aus einem Teil des Materials wurde die DNA präpariert. Vom übrigen Material wurden nach mechanischer Zerkleinerung Zellkulturen angezüchtet. An Mitosen der angezüchteten Zellkulturen wurden Chromosomenanalysen durchgeführt (Tab. 1). Auch aus Teilen der Zellkulturen wurde DNA und RNA präpariert.

Gewebe	Alter der Patienten bei Operation	Geschlecht	Karyotyp	Histologie	WHO-Grad
T 5502	63 Jahre	w	46, XX	sekretorisch	I
T 5416	47 Jahre	w	45, XX, -1, -7, +der(1)t(1;7)(p11;q11), del(7)(q11), -22	intermediär	II
T 5327	51 Jahre	w	40, X, -X, -1, -10, -13, -14, -22	intermediär	II
T 4768	52 Jahre	w	44-45, XX, del(1)(p12), t(1,20)(q21;q13), -22, -21,	intermediär	II
T 4633	60 Jahre	w	41, XX, del(1)(p22), -14, -15, -18, -21, -22	anaplastisch	III
T 4557	51 Jahre	w	40-42, XX, 1p-	anaplastisch	III

Tab. 1 : Daten zum verwendeten genetischen Material

Als Untersuchungsmaterial dienen Meningeome mit unterschiedlicher Histologie und unterschiedlichen WHO-Graden (I-III). Wichtiges Kriterium bei der Auswahl der Meningeome stellte der Verlust des kurzen Arms eines Chromosoms 1 dar. Ein Meningeom mit normalem Karyotyp (T 5502), d.h. ohne 1p-Verlust, wurde zum Vergleich herangezogen. Die Chromosomenanalyse war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Diese Befunde wurden mir zur Verfügung gestellt.

1.2 Genomische DNA

Genomische DNA wurde aus Blut von gesunden Spendern isoliert und analysiert, um einen Vergleich bei der Analyse der Tumor-DNA zur Verfügung zu haben.

1.3 Apparaturen

Brutschränke:

- Ehret Typ BK 8, Nr.10 637, W. Ehret GmbH, Emmendingen
- Ehret Typ BK 3064, Nr.17 412, W. Ehret GmbH, Emmendingen

Elektrophorese-Spannungs-/Stromquellen:

- E 831 Consort, AGS GmbH, Heidelberg
- Electrophoresis Power Supply EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco CA, USA

PCR-Geräte:

- Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg
- PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA
- PTC-200™ Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA

Schüttler:

- Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg

UV/Visible-Spektralphotometer:

- Ultrospec 3000, Pharmacia, Biotech Ltd. Cambridge, United Kingdom

Zentrifugen:

- Hypspin 16 K mit Standardrotor (r = 70 mm), Anachem, Luton LU2 OE B
- Z 233 MK mit Rotor 220,59V07 (r = 760 mm), Hermle, Wehingen, temperierbar
- Universal 16 mit Rotor 1381 (r = 145 mm), Hettich, Tuttlingen

1.4 Chemikalien

Agarosen:

- Agarose NEEO Ultra-Qualität Rotiagose®ROTH, Karlsruhe
- Biozym small DNA low melt agarose, Hess. Oldendorf

Auftragspuffer:

- 5x DNA Blue Run, AGS GmbH, Heidelberg

Chemikalien zur DNA-Isolierung aus Agarosegelen:

- GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA

Chemikalien zur DNA-Reinigung:

- Wizard®DNA Clean-Up System, Promega, Madison, WI, USA

Chemikalien zur Klonierung:

- Acceptor™Vector Kit, Novagen, Madison, WI, USA
- TOPO TA Cloning®Kit for Sequencing, Invitrogen, Karlsruhe
- E.coli K1, Invitrogen, Karlsruhe
- NovaBlueSingles™Competent Cells, Novagen, Madison, WI, USA
- pCR4-TOPO, Invitrogen, Karlsruhe
- pST-Blue1, Novagen, Madison, WI, USA

Chemikalien zur Plasmidisolierung:

- GFX™Micro Plasmid Prep Kit, Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA
- Plasmid Mini Kit, Qiagen, Hilden

Chemikalien zur RNA-Isolierung:

- RNeasy Minikit, Qiagen, Hilden

Chemikalien zur RT-PCR:

- Omniscript™ RT Kit, Qiagen, Hilden
- Sensiscript™ RT Kit, Qiagen, Hilden
- SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase, Gibco, Eggenstein

Chemikalien zur Sequenzierung:

- SequiThermEXCEL™II, Biozym, Hess. Oldendorf

Enzyme:

- HotStarTaq™DNA-Polymerase (5 U/μl), Qiagen, Hilden
- Restriktionsendonuklease EcoRI (10 U/μl), Gibco BRL, Eggenstein
- Restriktionsendonuklease HindIII (12 U/μl), Boehringer Mannheim
- Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl), Pharmacia, Freiburg

Enzyminduktor:

- IPTG (100mM), Roth, Karlsruhe

Farbstoff:

- Ethidiumbromid (10 mg/ml), Pharmacia, Freiburg

Medien:

- Bacto-Agar, Becton Dickinson, Heidelberg
- DMEM, Bio Whittaker, Verviers, Belgien
- LB-Medium, Sigma, Deisenhofen

Standards:

- Molekulargewichtsstandard VIII (0,25 μg/μl), Roche, Mannheim
- 1 kb DNA Ladder (1,0 μg/μl), Gibco, Eggenstein

1.5 Lösungen

- Erythrozyten-Lysis-Puffer:

155 mmol/l NH₄Cl (Merck)

10 mmol/l KHCO₃ (Merck)

0,1mmol/l EDTA (Sigma)

- SE-Puffer:

75 mmol/l NaCl (Sodiumchloride) (Riedel-de-Häen)

25 mmol/l EDTA (Sigma)

pH 8,0

- TBE-Puffer (10x):

1 mol/l	Tris	(Roth)
0,83 mol/l	Borsäure	(Roth)
10 mmol/l	EDTA	(Sigma)

- TE-Puffer:

10 mmol/l	Tris	(Roth)
1 mmol/l	EDTA	(Sigma)

pH 8,0

1.6 Primer

Die Primer (siehe Kap. 2.7, Seite 30 und Kap. 2.12, Seite 41) wurden nach Vorgabe von folgenden Firmen synthetisiert:

- Thermo Hybaid GmbH, Interactiva Division, Ulm:
Primer: MetPromI, MetPromK, TNAP 24428, TNAP 24429, TNAP 90054
- MWG-Biotech AG, Ebersberg:
Primer: Alp2mRNA3`, Alp2mRNA5`, Alp4mRNA3`, Alp4mRNA5`, T7 Promotor Primer, SP6 Promotor Primer
- Invitrogen, Karlsruhe:
Die Primer M13 Forward (-20) und M13 Reverse wurden mit dem TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing mitgeliefert.

2. Methoden

2.1 Züchtung von Meningeomzellkulturen und Isolierung von genomischer DNA

Die Zellzüchtung erfolgt bei 37°C in einem 5% CO₂-begasteten Brutschrank in befeuchteter Luft. Die Zellen wachsen in 75 cm²-Kulturflaschen. Als Kulturmedium dient Dulbecco's minimal essential medium (DMEM), komplettiert mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), Penicillin (10 000 U/ml) und Streptomycin (10 000 µg/ml). Kulturmediumwechsel erfolgt 2x wöchentlich. Nachdem ein geschlossener Monolayer entstanden ist, werden die Zellen mit Trypsin-EDTA (1x), (Gibco) abgelöst. Nach Abtrypsinieren wird 8 min bei 25 x g (Hettich-Zentrifuge) zentrifugiert und die Zellen werden 2x mit PBS-Puffer gewaschen. Durch Zentrifugieren (8 min bei 25 x g, Hettich-Zentrifuge) werden die Zellen pelletiert. Das Zellpellet resuspendiert man in 4,5 ml SE-Puffer und gibt 0,5 ml 10%ige SDS-Lösung hinzu. Mit einer Spatelspitze Proteinase K wird der Ansatz über Nacht bei 55°C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgt die Aufreinigung der DNA.

2 ml gesättigte 6 mol/l NaCl-Lösung werden dem Ansatz zugegeben und die Lösung wird gemischt. Nach Zugabe von 7 ml Chloroform wird der Ansatz auf einem Überkopfschüttler vermischt (1h) und danach abzentrifugiert (340 x g, 10 min, Hermle-Zentrifuge). Die obere wässrige Phase wird in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Erneut werden 7 ml Chloroform hinzupipettiert und die Lösung wird 20 min gemischt. Das Röhrchen wird zentrifugiert (340 x g, 10 min, Hermle-Zentrifuge) und die obere Phase in ein Reaktionsgefäß überführt. Zum Fällen der DNA gibt man das 2,5 fache Volumen eiskalten Isopropanols hinzu. Das DNA-Isopropanol-Gemisch wird auf mehrere Röhrchen verteilt und abzentrifugiert (14 800 x g, 80 min, Hermle-Zentrifuge). Der Überstand wird verworfen. Pro Röhrchen werden jeweils 200 µl 70% Ethanol zupipettiert. Nach dem Zentrifugieren (14 800 x g, 20 min, Hermle-Zentrifuge) wird der Überstand verworfen und das Pellet lässt man bei Raumtemperatur trocknen. In Aqua dest. löst man das DNA-Pellet und bewahrt es anschließend bei 4°C auf.

2.2 Isolierung genomischer DNA aus Blut

10 ml EDTA-Blut werden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 30 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer vermischt, um die Erythrozytenmembran aufzulösen, und 20-30 min auf Eis gekühlt. Das entstandene Lysat wird abzentrifugiert (340 x g, 10 min, Hermle-Zentrifuge) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 4,5 ml SE-Puffer und 0,5 ml 10%iger SDS-Lösung resuspendiert, eine Spatelspitze Proteinase K hinzugegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert.

Die Aufreinigung der DNA erfolgt, wie es in Kapitel 2.1 beschrieben ist.

2.3 Konzentrationsbestimmung der DNA durch Spektralphotometrie

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration misst man in einem UV/Vis-Spektralphotometer die Absorption, die auch als optische Dichte (OD) bezeichnet wird. In einer 100 µl Quarzküvette wird 1 µl der DNA-Lösung, die in 99 µl Aqua dest. verdünnt wird, gegen steriles Aqua dest. als Referenz zur Messung eingesetzt. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNA, gemessen. Dabei entspricht eine OD gemessen in der 100 µl-Küvette unter Berücksichtigung der 1:100-Verdünnung der DNA-Lösung 5 µg DNA/µl der unverdünnten DNA-Lösung.

Bei einer DNA-Isolierung kann man die Verunreinigung der DNA durch Proteine durch zusätzliches Messen der OD bei 280 nm ermitteln. Der Quotient aus der OD bei 260 nm und 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA-Präparation. Bei einem Wert von 1,8-2,0 liegt eine sehr reine DNA-Lösung vor. Niedrigere Werte sind ein Indiz für die Anwesenheit von Proteinen. Werte über 2,0 können ein Hinweis auf die Anwesenheit von RNA sein oder zeigen an, dass die DNA denaturiert ist.

2.4 Bisulfitbehandlung

2.4.1 Prinzip

Die Bisulfitbehandlung ist ein Verfahren zur gezielten Basenumwandlung innerhalb eines DNA-Moleküls. Die Reaktion besteht in der Desaminierung von freien Cytosin-Resten durch Behandlung mit Natriumbisulfit zu Uracil-Resten, während methylierte Cytosin-Reste als Cytosinbasen bestehen bleiben und nicht umgewandelt werden. Ein neu entstandenes Uracil wird in einer folgenden PCR durch Thymidin ersetzt. Dies entspricht im komplementären Strang einem Adenin. Somit kommt es zu einem Austausch eines CG-Basenpaares gegen ein TA-Basenpaar (vgl. Abb.1). Die Bisulfitbehandlung von DNA wird genutzt, um das Methylierungsmuster von Genen zu analysieren. Es wird eine Analyse von CpG's und eine detaillierte Information über Methylierungsmuster von Genen und Regionen ermöglicht. Die Produkte der PCR-amplifizierten bisulfitbehandelten DNA können sequenziert werden. Somit erhält man Information über das Methylierungsmuster individueller Chromosomenabschnitte.

Chemie der Bisulfitbehandlung (HAJKOVA et al., 2002):

- I Reversible Sulfonierung von Cytosin zu Cytosin-6-sulfonat bei niedrigem pH-Wert und niedriger Temperatur.
- II Irreversible hydrolytische Desaminierung von Cytosin-6-sulfonat zu Uracil-6-sulfonat. Für diese Reaktionen sind höhere Konzentrationen an Natriumbisulfit günstig. Das pH-Optimum liegt zwischen 5 und 6.
- III Reversible Desulfonierung von Uracil-6-sulfonat zu Uracil bei hohem pH-Wert.

Schematisches Diagramm der Bisulfitkonversion einer DNA-Sequenz

(5') a --GAGT**CAC**-----**CG**----***CG**-----**GCTTCAG**
 (3') b --**CTCAGTG**-----**GC**---- **GC***-----**CGAAGTC**

↓
Denaturierung

(5') a --GAGT**CAC**-----**CG**----***CG**-----**GCTTCAG**
 (3') b --**CTCAGTG**-----**GC**----**GC***-----**CGAAGTC**

Bisulfitbehandlung:
 I Sulfonierung
 II Desaminierung
 III Desulfonierung

↓

(5') a --GAGT**UAU**-----**UG**----***CG**-----**GUTTUAG**
 (3') b --**UTUAGTG**-----**GU**----**GC***-----**UGAAGTU**

Abb. 1: Schematisches Diagramm der Bisulfitkonversion***C** = Methyliertes Cytosin

2.4.2 Methode 1

Zur Herstellung der Bisulfitlösung werden 8,1 g Natriumbisulfit (Sigma) in 15 ml entgastem H₂O gelöst und 1 ml 40 mmol/l Hydrochinonlösung hinzugegeben. Mit 10 mol/l NaOH stellt man den pH-Wert auf 5,0 ein. 6 mol/l Ammoniumacetatlösung wird mit Eisessig auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und sterilfiltriert.

4 µg der zu behandelnden DNA werden in 70 µl TE-Puffer gelöst und für 15 min bei 37°C und nach Zugabe von 8 µl 3 mol/l NaOH-Lösung denaturiert. Für vollständige Denaturierung werden die Proben für 3 min bei 95°C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt. Zur Sulfonierung der Cytosinreste werden der DNA-Lösung 480 µl der Bisulfitlösung zugegeben und sie wird für 6 h folgenden Temperaturzyklen unterzogen: 30 sec bei 95°C und 15 min bei 50°C. Danach folgt die Reinigung mit Wizard®DNA Clean-Up System (Promega). Dadurch wird die DNA von Salzen befreit. Mit 250 µl Wizard®DNA Clean-Up Resin (6 mol/l Guanidinthiocyanat) wird die DNA gemischt, auf eine Säule gegeben und mittels Vakkum durchgesaugt. Die Spülung der Säule erfolgt mit 2 ml 80%igem Isopropanol. Die Säule lässt man 20 sec trocknen, überführt sie in ein Reaktionsgefäß und zentrifugiert 2x 2 min bei 8500 x g (Hermle-Zentrifuge). Die DNA wird 2x mit je 50 µl 70°C warmem H₂O bzw. 80°C warmem H₂O eluiert und mit 11 µl 3 mol/l NaOH für 15 min bei 37°C desulfoniert. Zur Neutralisation der Lösung gibt man 80 µl 6 mol/l Ammoniumacetatlösung (pH 7,0) hinzu. Die Fällung der DNA erfolgt mit dem 2,5fachen Volumen eiskalten Ethanol. In 20 µl H₂O resuspendiert man die DNA.

2.4.3 Methode 2 (nach HAJKOVA et al., 2002)

Vorbereiten der Bisulfitlösung:

1,9 g Natriummetabisulfit (Sigma) werden in einer Lösung aus 2,5 ml H₂O und 750 µl 2 mol/l NaOH gelöst. 0,055 g Hydrochinon (Merck) löst man in 550 µl H₂O bei 50°C. Diese Lösung wird sofort zur Bisulfitlösung gegeben, um ein Ausfällen zu verhindern. Die beiden Lösungen werden gemischt und lichtgeschützt aufbewahrt. 1 ml dieses Bisulfit-Hydrochinon-Gemischs wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 750 µl Heavy white mineral oil (Sigma) überschichtet, so dass man zwei Phasen erhält. Diese kühlt man 30 min auf Eis. Die obere Öl-Phase soll möglichst kühl und dick sein, da sich in dieser Phase die warme geschmolzene Agarose zusammen mit der zu untersuchenden DNA zu einem festen Agarosekügelchen abkühlen soll.

Restriktionsansatz:

700 ng genomische DNA werden mit einem nicht-methylierungssensitiven Restriktionsenzym über Nacht in einem Volumen von 21 µl geschnitten. Verwendet werden HindIII und EcoRI, da sie in der Gensequenz der Alkalischen Phosphatase nicht schneiden.

X	µl DNA	(700 ng)
2,1	µl Puffer B	Boehringer, Mannheim
1	µl HindIII	(12 U/µl), Boehringer, Mannheim
1	µl EcoRI	(10 U/µl), Gibco, Eggenstein
X	µl Aqua dest.	
= 21	µl	

Der Restriktionsansatz wird über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Denaturierung wird der DNA-Ansatz 5 min gekocht und nach kurzem Zentrifugieren sofort auf Eis abgekühlt. 4 µl frische 2 mol/l NaOH-Lösung pipettiert man hinzu, so dass man eine Konzentration von 0,3 mol/l erhält, und inkubiert für 15 min bei 50°C.

50 µl 50°C warme, geschmolzene 2%ige Low Melting Point Agarose (Seaplaque, FMC) werden zupipettiert. 10 µl dieser warmen DNA-Agarose-Lösung tropft man in das vorbereitete gekühlte 2 ml Röhrchen mit dem Bisulfit-Hydrochinon-Gemisch und dem Heavy white mineral oil (vgl. Kap. 2.4.3, Vorbereiten der Bisulfitlösung). Die DNA-Agarose soll, bevor sie in der Bisulfit-Phase angelangt ist, eine Kugel gebildet haben. Dafür ist es notwendig, dass die Ölschicht gekühlt ist. Nach 5 min Warten wird der Vorgang wiederholt, solange bis die ganze Agarose-DNA-Lösung aufgebraucht ist und daraus ca. sieben Agarosekügelchen entstanden sind. Eine Kugel enthält ca. 100 ng DNA. Sobald die Agarosekügelchen in der Bisulfitlösung angelangt sind, erfolgt dort die Sulfonierung der Cytosinreste für 3 ½ h bei 50°C und 330 Upm (Thermomixer) inkubiert. Die Lösung wird entfernt und die Kügelchen vorsichtig mit TE-Puffer (pH 8) 2x gewaschen. Zur Desulfonierung der DNA pipettiert man 500 µl 2 mol/l NaOH-Lösung hinzu und inkubiert damit 2x für 15 min. Nach Entfernen der Lösung erfolgt das Waschen der Kügelchen mit TE-Puffer (pH 8,0) für 3x 10 min. Die Lösung wird abpipettiert, die Kugeln werden mit TE-Puffer bedeckt und bei 4°C aufbewahrt. Um das EDTA des Puffers zu entfernen, wäscht man die Agarose-Kügelchen vor der PCR mit H₂O 2x für 15 min. Pro PCR wird ein Kügelchen eingesetzt.

2.5 Isolierung von RNA aus Meningeomzellkulturen

Aus primären Zellkulturen von Meningeomen wird RNA mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert. Dabei stammen die Zellkulturen von drei verschiedenen Tumoren (T 5502, T 5416, T 5327), die zunächst untersucht wurden.

Die Zellzüchtung und - pelletierung erfolgt wie in Kapitel 2.1 beschrieben.

Das Zellpellet wird in 600 µl Lysis-Puffer (RLT-Puffer) aufgenommen, gemischt und auf eine Qias shredder-Säule (Qiagen) pipettiert. Zum Homogenisieren zentrifugiert man 2 min mit 15500 x g (Hermle) bei 20°C. 600 µl 70% Ethanol werden zum Eluat gegeben und damit vermischt. In Portionen wird das Gemisch auf eine RNeasy-Säule pipettiert und 15 sec bei 8500 x g (Hermle) und 20°C zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen. 700 µl RW1-Puffer werden zur Säule gegeben, 15 sec zentrifugiert und das Eluat verworfen. 500 µl RPE-Puffer werden zupipettiert und 15 sec zentrifugiert. 500 µl RPE-Puffer werden erneut hinzugegeben und 2 min zentrifugiert. Das Eluat wird nochmals 1 min zentrifugiert. Die RNeasy-Säule wird auf ein Reaktionsgefäß übertragen und man pipettiert 30 µl RNase freies Aqua dest. hinzu. Zum Eluieren wird 1 min zentrifugiert.

Es folgt die OD-Messung der isolierten RNA und anschließend eine RT-PCR (vgl. Kap. 2.7.2).

Nach OD-Messung ergeben sich folgende RNA-Mengen:

T 5502: 0,9 µg/µl

T 5416: 0,69 µg/µl

T 5327: 0,74 µg/µl

2.6 Gewinnung von cDNA (RT-Reaktion)

RNA der Meningeome T 5502, T 5416 und T 5327 wird nach Isolierung (vgl. Kap.2.5) zur RT-Reaktion verwendet. Dabei wird RNA mit Reverser Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben, die dann als Ausgangsmaterial für die Amplifikation durch PCR dient. Die RT-Reaktion wird mit verschiedenen Enzymen und Protokollen durchgeführt, wie im Folgenden beschrieben.

2.6.1 RT-Reaktion mit SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase

Pro Tumor werden drei Ansätze gemacht. Ansatz 1 dient jeweils als Negativkontrolle; hier wird keine Reverse Transkriptase zugegeben. Ansatz 1 und 2 eines jeden Tumors enthalten 3 µg RNA, der Ansatz 3 jeweils 1 µg RNA.

Tumor T 5416:

Ansatz	1	2	3
	Negativkontrolle, keine RT		
RNA T 5416	3 µg ≅ 4,3 µl	3 µg ≅ 4,3 µl	1 µg ≅ 1,4 µl
OligodT	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Aqua dest.	6,7 µl	6,7 µl	9,6 µl

Tab. 1: Pipettierschema für RT-Reaktion mit RNA von T 5416

Tumor T 5327:

Ansatz	1	2	3
	Negativkontrolle, keine RT		
RNA T 5327	3 µg ≅ 4,0 µl	3 µg ≅ 4,0 µl	1 µg ≅ 1,35 µl
OligodT	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Aqua dest.	7,0 µl	7,0 µl	9,7 µl

Tab. 2: Pipettierschema für RT-Reaktion mit RNA von T 5327

Die Ansätze werden jeweils mit Aqua dest. auf 12 µl aufgefüllt. Für 10 min werden sie bei 72°C inkubiert, danach sofort auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert.

Pro Ansatz pipettiert man 4 µl 5x first strand buffer, 2 µl 0,1 mol/l DTT (Merck) und 1 µl dNTP-Mix hinzu und inkubiert für 2 min bei 42°C. Nun fügt man den Ansätzen 2 und 3 jeweils 1 µl Superscript II (Gibco) bei und inkubiert für 50 min bei 42°C und für 15 min bei 70°C. Es schließt sich eine PCR an (vgl. Kap. 2.7.2).

2.6.2 RT-Reaktion mit Sensiscript

Es werden 50 µg RNA pro Ansatz eingesetzt.

Ansatz	1	2	3
Tumor-RNA von	T 5502	T 5416	T 5327
10x RT-Puffer	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
dNTP-Mix (5mM von jedem dNTP)	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
OligodT-Primer (10 µM), (Operon)	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
RNase-Inhibitor RNaseOUT™(Gibco) (10 U/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Sensiscript-RT (Qiagen)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
RNase-freies H₂O	11,1 µl	11,3 µl	11,3 µl
50 µg RNA	0,6 µl	0,7 µl	0,7 µl

Tab. 3: Pipettierschema für RT-Reaktion mit Sensiscript Reverser Transkriptase

Das Volumen jedes Ansatzes wird mit RNase-freiem H₂O auf 20 µl aufgefüllt, zuletzt gibt man die RNA zu den Ansätzen. Die Ansätze werden kurz gemischt, zentrifugiert und für 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Sensiscript-RT erhitzt man für 5 min auf 93°C. Nach der RT-Reaktion folgt die PCR (vgl. Kap. 2.7.2).

2.6.3 RT-Reaktion mit Omniscript

Es werden 2 µg RNA pro Ansatz verwendet.

Ansatz	1	2	3
Tumor-RNA von	T 5502	T 5416	T 5327
10xRT-Puffer	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
dNTP-Mix (5 mM von jedem dNTP)	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
OligodT-Primer (10 µM), (Operon)	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
RNase-Inhibitor RNaseOUT™(Gibco) (10 U/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Omniscript-RT (Qiagen)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
RNase-freies H₂O	9,8 µl	9,1 µl	9,3 µl
2 µg RNA	2,2 µl	2,9 µl	2,7 µl

Tab. 4: Pipettierschema für RT-Reaktion mit Omniscript Reverser Transkriptase

Das Volumen jedes Ansatzes wird mit RNase-freiem H₂O auf 20 µl aufgefüllt, zuletzt gibt man die RNA hinzu. Die Ansätze werden kurz gemischt, zentrifugiert und für 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Omniscript-RT erhitzt man für 5 min auf 93°C. Nach der RT-Reaktion folgt die PCR (vgl. Kap. 2.7.2).

2.7 PCR, RT-PCR

2.7.1 Prinzip

Die PCR ist eine von Kary Mullis 1984 entwickelte in vitro-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte vervielfältigen kann.

Die Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz beginnt mit der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei etwa 95-100°C. Danach erfolgt die Abkühlung auf 50-60°C, dabei werden zwei zugefügte Primer, aus etwa 15-25 Basen bestehende Oligonukleotide, die der Sequenz an den 3'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär sind, angelagert (annealing). Durch Zusatz einer Taq-Polymerase, einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Or-

ganismus *Thermophilus aquaticus*, werden die beiden Einzelstränge in Anwesenheit von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert.

PCR: Polymerasekettenreaktion

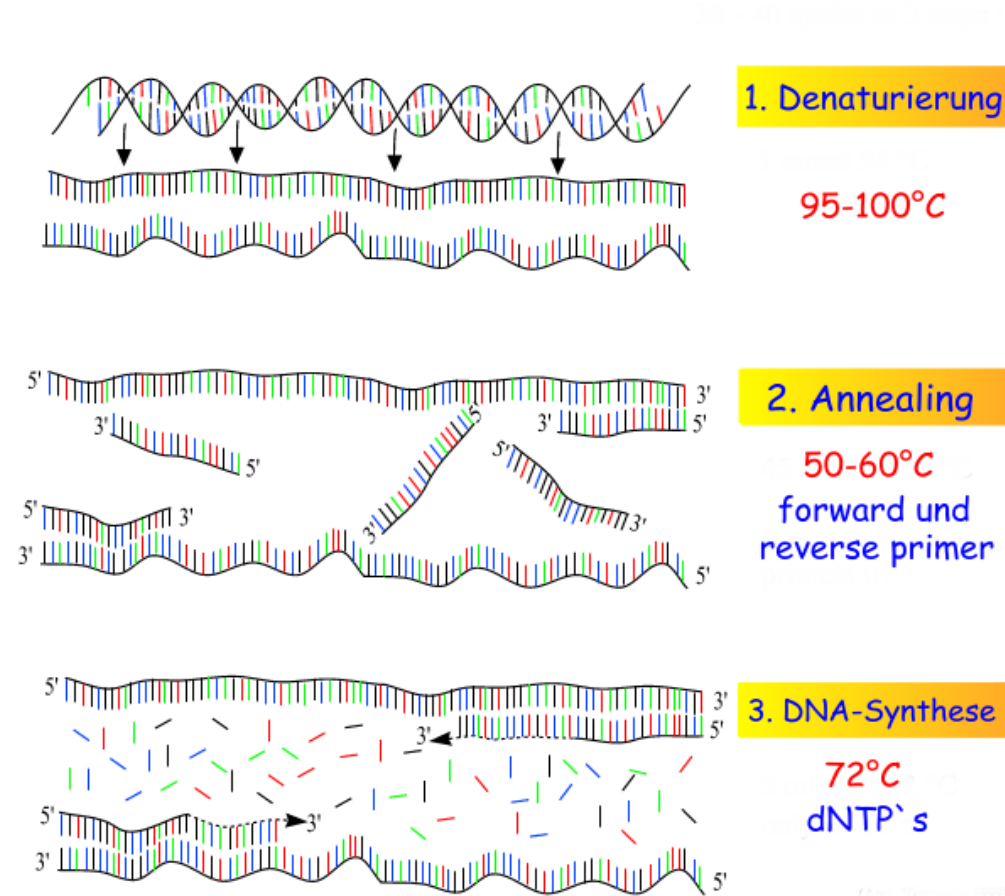


Abb. 2: Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Werden diese Zyklen mehrfach wiederholt, so ergibt sich eine exponentielle Zunahme des DNA-Moleküls (GRAHAM und NEWTON, 1994).

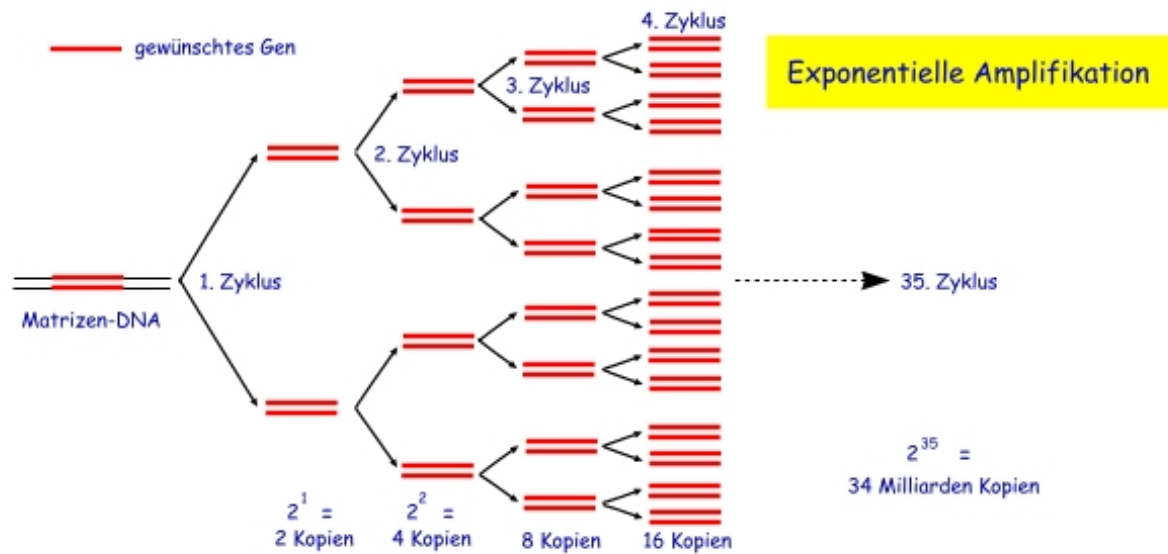


Abb. 3: Exponentielle Amplifikation eines DNA-Moleküls

Als Substrat für die PCR eignet sich sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA oder RNA.

Mit Hilfe der RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) ist es möglich, auch RNA als Ausgangsmaterial zu verwenden. Isolierte mRNA wird zunächst mit der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben, die dann als Matrize für die PCR dient.

2.7.2 PCR – Protokolle

A) HotStarTaq®DNA-Polymerase

1. PCR:

In einem sterilen Reaktionsgefäß werden 5 µl dNTP-Lösung (2 mmol/l), 5 µl Taq-DNA-Polymerase-Puffer (10x) (Qiagen), 0,5 µl Primer X (100 pmol/µl), 0,5 µl Primer Y (100 pmol/µl), 10 µl Q-Lösung (5x) (Qiagen), 0,5 µl DNA und 0,5 µl der HotStarTaq®DNA-Polymerase gemischt. Der Ansatz wird mit sterilem Aqua dest. auf 50 µl aufgefüllt und anschließend 40x folgendem Temperaturzyklus unterzogen:

Vorbehandlung:	95°C	15 min	
Zyklus:	94°C	45 sec	DNA-Denaturierung
	60°C	45 sec	Annealing
	72°C	1 min	DNA-Synthese
Zykluszahl:		40	
Nachbehandlung:	72°C	7 min	

Die Vorbehandlung der HotStarTaq®DNA-Polymerase entspricht einem initialen Aktivierungsschritt. Das Enzym ist zunächst inaktiv und wird erst durch 15-minütige Inkubation bei 95°C aktiviert. Die HotStarTaq®DNA-Polymerase zeigt bei niedrigeren Temperaturen keine Polymeraseaktivität, so dass die Bildung von unspezifischen Produkten und Primer-Dimeren verhindert wird.

2. PCR:

In einer 2. PCR werden 5 µl der 1. PCR mit gleichen Zusatzkomponenten und Temperaturzyklen verwendet.

B) Taq-DNA-Polymerase

1. PCR:

In einem sterilen Reaktionsgefäß werden 5 µl dNTP-Lösung (2 mmol/l), 5 µl Taq-DNA-Polymerase-Puffer (10x) (Pharmacia), 0,5 µl Primer X (100 pmol/µl), 0,5 µl Primer Y (100 pmol/µl), 15 µl Betain (Sigma), 0,5 µl DNA und 0,5 µl der Taq-DNA-Polymerase (Pharmacia) gemischt. Der Ansatz wird mit sterilem Aqua dest. auf 50 µl aufgefüllt und anschließend 35x folgendem Temperaturzyklus unterzogen:

Vorbehandlung:	95°C	2 min	
Zyklus:	94°C	45 sec	DNA-Denaturierung
	55°C	45 sec	Annealing
	72°C	1 min	DNA-Synthese
Zykluszahl:	35		
Nachbehandlung:	72°C	7 min	

2. PCR

In einer 2. PCR werden 5 µl der 1. PCR mit gleichen Zusatzkomponenten und Temperaturzyklen verwendet.

Bei PCR mit bisulfitbehandelter DNA werden die Primer MetPromI und MetPromK eingesetzt. Für die PCR mit cDNA kommen die Primerpärchen TNAP24428/TNAP24429, TNAP90054/TNAP24429, Alp2mRNA5`/Alp2mRNA3`, Alp4mRNA5`/Alp4mRNA3` und Alp2mRNA5`/Alp4mRNA3` zur Verwendung (siehe Tabelle 5).

DNA	Primer X	Primer Y	Produktlänge
bisulfitbehandelte DNA	MetPromI 5'-TTTTTGTTTAGGGGGTGGTTT-3'	MetPromK 5'-CAACCCAACCCTTCCTCTCT-3'	379 bp
cDNA	TNAP 24428 5'-TATCCTGGCTCCGTGCTC-3'	TNAP 24429 5'-TTAGTAAGGCAGGTGCCAATG-3'	214 bp
cDNA	TNAP 90054 5'-AGATGGCCCAGGAAAGAAGTAT-3'	TNAP 24429 5'-TTAGTAAGGCAGGTGCCAATG-3'	278 bp
cDNA	Alp2mRNA5' 5'-TGCACCATGATTCACCATT-3'	Alp2mRNA3' 5'-CAAGCAAGAAGAAGCCTTTG-3'	997 bp
cDNA	Alp4mRNA5' 5'-CGGAACTCCTGACCCTTG-3'	Alp4mRNA3' 5'-CCTCAGAACAGGACGCTCAG-3'	720 bp
cDNA	Alp2mRNA5' 5'-TGCACCATGATTCACCATT-3'	Alp4mRNA3' 5'-CCTCAGAACAGGACGCTCAG-3'	1575 bp

Tab. 5: DNA und Primerpaare

2.8 Gelelektrophorese

2.8.1 Prinzip und Verfahren

Mit der Gelelektrophorese kann man Nukleinsäurefragmente direkt sichtbar machen. Sie basiert darauf, dass Nukleinsäuren bei neutralem pH-Wert aufgrund ihrer Phosphatgruppen Polyanionen sind. Deshalb wandern die Moleküle im elektrischen Feld nach angelegter Spannung auf die Anode zu. Man verwendet eine Gelmatrix, um die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Nach der Auftrennung kann man die Nukleinsäuren im Gel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid anfärben, der in die DNA interkaliert. Unter UV-Licht sind Banden zu erkennen, die mit einem ebenfalls aufgetragenen Molekulargewichtsstandard bekannter Größe verglichen werden können.

In die Geltaschen trägt man den Größenstandard (Nr.VIII, Roche) und die PCR-Produkte mit Zusatz von Auftragspuffer (DNA-BlueRun von AGS) ein.

Nach dem Elektrophoreselauf (60-120 min bei 90V) wird das Gel für 30 min in ein Färbebad mit Ethidiumbromidlösung (75 µg/ml) gelegt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA. Durch UV-Bestrahlung (254 nm) fluoresziert das Ethidiumbromid und die DNA-Fragmente werden als Banden sichtbar und können fotografiert werden. Zur Größenbestimmung verwendet man ein analytisches Gel. Ein dickeres präparatives Gel verwendet man, wenn die DNA nach der Elektrophorese isoliert und weiterverarbeitet wird.

2.8.2 Gelherstellung

Mit Agarose NEEO Ultra-Qualität Rotiagarose®ROTH und 1x TBE-Puffer wird ein 1,5%iges analytisches Gel hergestellt. Die Agaroselösung lässt man zwei bis drei mal aufkochen und vor dem Gießen auf 55°C abkühlen. Dann wird die flüssige Agarose in einen Gelschlitten (OWL Separation Systems, Inc., Model B3) gegossen und ein Probenkamm eingeführt, der das spätere Auftragen der Proben in die entstehenden Geltaschen ermöglicht. Nach 30 min ist die Agarose fest und das Gel kann zur Elektrophorese verwendet werden.

Analog dem analytischen Gel erfolgt die Herstellung eines präparativen Gels (3%) mit Biozym small DNA low melt Agarose und 1x TBE-Puffer.

2.9 DNA-Isolierung aus präparativem Agarosegel

Zum Isolieren der DNA verwendet man den GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Pharmacia).

Nach der Gelelektrophorese werden die fluoreszierenden DNA-Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und abgewogen. Entsprechend dem Protokoll werden für 100 mg Agarose 100 µl des Capture Buffer eingesetzt. Das ausgeschnittene DNA-Agarose-Stückchen wird mit diesem Puffer für 5 min bei 60°C behandelt. Er enthält ein Agens, das vorhandene Proteine denaturiert und die Agarose auflöst. Die Lösung gibt man auf eine GFX-Säule mit Glasfaser-matrix, an der nach Zentrifugation (12 000 x g, 15 sec, Hermle) die DNA bindet. Das Eluat wird verworfen. 500 µl des Wash Buffer pipettiert man zur Säule und zentrifugiert für 1 min bei 12 000 x g (Hermle). Somit erfolgt die Reinigung der matrixgebundenen DNA, wobei Salze und sonstige Kontaminationen entfernt werden. Die gereinigte DNA wird mit 50 µl Aqua dest. durch Zentrifugieren (12 000 x g, 1 min, Hermle) von der GFX-Säule eluiert. Sie wird bei -20°C aufbewahrt.

2.10 Klonieren

2.10.1 Prinzip

Ein DNA-Klonierungsexperiment besteht aus folgenden Schritten:

Ligation: Das zu klonierende DNA-Fragment wird als Insert in einen Vektor eingefügt, so dass ein rekombiniertes Molekül entsteht.

Es werden zum Klonieren sog. TA-Vektoren verwendet. Am 3'-Ende des Vektors befindet sich dabei als überstehende Base ein einzelnes Thymidin. Die Taq-DNA-Polymerase hängt an das 3'-Ende der DNA ein dem Thymidin komplementäres Adenin an. Diese Eigenschaft macht man sich zunutze, um den Einbau des PCR-Produktes in den Vektor zu verbessern.

Zum Klonieren werden die TA-Vektoren pSTBlue-1 (Novagen) und pCR4-TOPO (Invitrogen) eingesetzt:

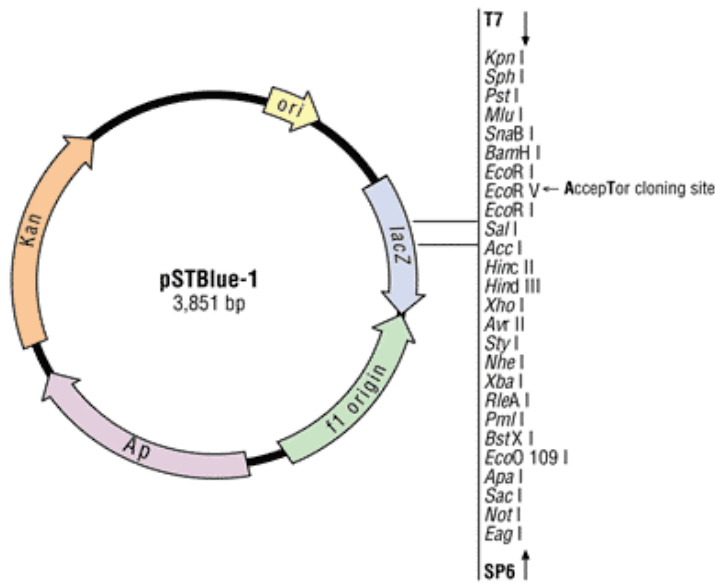


Abb. 4: Vektor pSTBlue-1 mit seinen selektierbaren Markern und Restriktionsschnittstellen

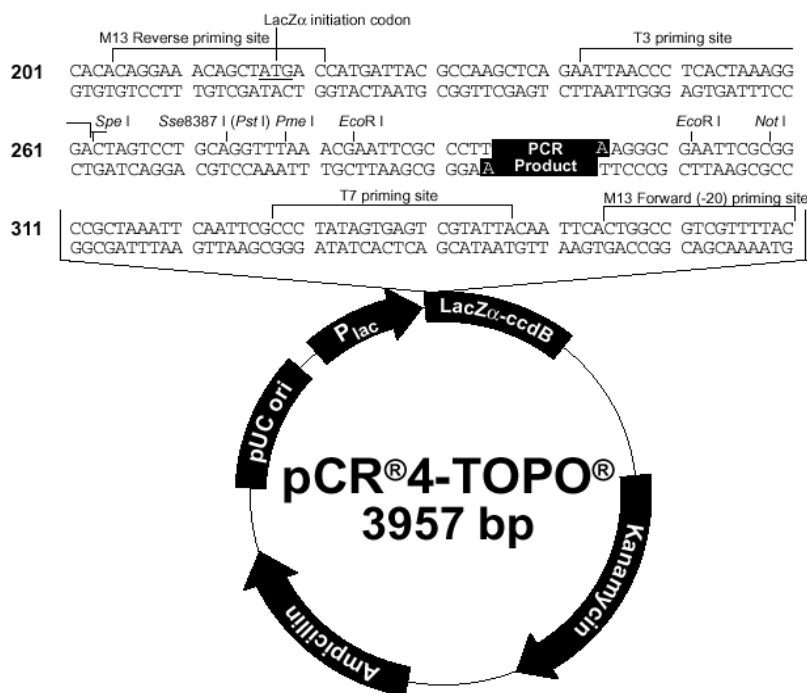


Abb. 5: Vektor pCR4-TOPO mit LacZα-ccdB-Gen, Kanamycin- und Ampicillinresistenzgen, die zur Selektion transformierter und nicht-transformierter Zellen dienen

Beim TOPO TA Cloning® arbeitet eine DNA-Topoisomerase I, die die Eigenschaften eines Restriktionsenzym und einer Ligase kombiniert. Die typische Rolle dieses Enzyms ist das

Spalten und Wiederverbinden der DNA während der Replikation. Die Vacciniavirus-Topoisomerase I erkennt die spezifische Sequenz 5`-(C/T)CCTT-3` (SHUMAN, 1991) und bindet kovalent die Phosphatgruppe des 3`-Thymidins. Sie spaltet einen DNA-Strang und verhindert das Abwickeln der DNA um die Achse des ungespaltenen Stranges. Das Enzym verbindet die Enden des gespaltenen Stranges wieder und wird von der DNA abgelöst.

Transformation: Der Vektor wird in eine kompetente Wirtszelle eingeschleust (z.B. E.coli). Kompetente Zellen sind Bakterienzellen, die derart behandelt werden, dass sie in der Lage sind, Plasmid-DNA aus ihrem Umfeld aufzunehmen.

Die Einschleusung der DNA in die kompetenten Zellen wird durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 42°C erzielt. Bei der Transformation nimmt nicht jede Zelle ein Plasmid auf. Um die transformierten Zellen zu finden, wird ein selektierbarer Marker benutzt, der in dem jeweiligen Plasmid enthalten ist. Es handelt sich um die Resistenz gegen bestimmte Antibiotika, d.h. nur Zellen, die das Plasmid, das Resistenzgene enthält, aufgenommen haben, sind antibiotikaresistent und können nach Ausplattieren auf Selektionsnährböden Kolonien bilden. Somit können transformierte von nicht-transformierten Zellen unterschieden und getrennt werden.

Bei Klonieren mit Acceptor™Vector Kit (Novagen) erfolgt die Selektion durch Antibiotikaresistenzgene und Blau-Weiss-Selektion.

Dieses System basiert auf dem LacZ`-Gen, das einen Teil des Enzyms β -Galaktosidase kodiert. β -Galaktosidase baut Lactose zu Glucose und Galaktose ab.

Der Vektor pST-Blue-1 kodiert für das LacZ- α -Peptid, das das LacZ- ω -Fragment, das die kompetenten Zellen NovaBlue Singles™ enthalten, vervollständigt. Zellen, die ein normales pST-Blue-1 Plasmid tragen, können β -Galaktosidase synthetisieren.

DNA-Fragmente werden in das Gen für das LacZ- α -Peptid inkloniert. Dadurch wird das Gen unterbrochen und kein funktionierendes Peptid synthetisiert. Die Rekombinanten bilden keine β -Galaktosidase.

Um die An- oder Abwesenheit von β -Galaktosidase zu testen, bedient man sich des Lactoseanalogs X-gal, das von β -Galaktosidase zu einem dunkelblauen Reaktionsprodukt abgebaut wird. Dem Agar wird dazu X-gal und der Enzyminduktor IPTG zugesetzt. Die Kolonien, die keine Rekombinanten enthalten, sind blau gefärbt; Rekombinanten, bei denen das LacZ α -Gen unterbrochen ist, können dagegen keine β -Galaktosidase synthetisieren.

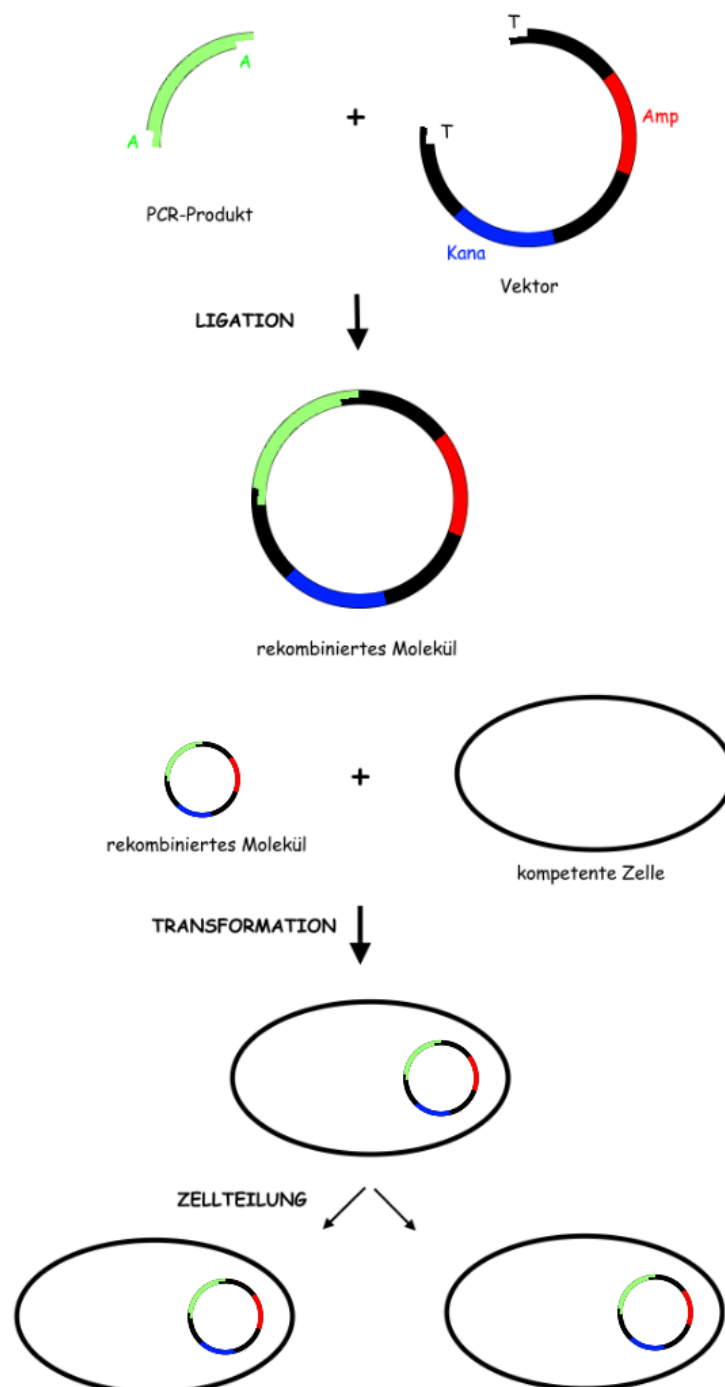


Abb. 6: Schematische Darstellung von Ligation, Transformation und Vermehrung
Kana = Kanamycinresistenzgen; Amp = Ampicillinresistenzgen

Ihre Kolonien sind weiß. Tetracyclin (10 mg/ml) sichert, dass nicht-rekombinante weiße Kolonien eliminiert werden.

pCR4-TOPO erlaubt direkte Selektion der Rekombinanten durch Unterbrechung des letalen E.coli-Gens *ccdB* (control of cell death) (BERNARD und COUTURIER, 1992; BERNARD et al., 1993; BERNARD et al. 1994). Der Vektor enthält das *ccdB*-Gen fusioniert mit dem C-Terminus des *LacZ α* -Fragments. Die Ligation eines PCR-Produktes unterbricht die Expression des *ccdB*-Proteins, das die bakterielle DNA-Gyrase vergiftet und den Zelltod verursacht, und erlaubt nur das Wachstum positiver Rekombinanten bei Transformation in die TOP10-Zellen.

Zur weiteren Selektierung positiver Rekombinanten dient die Antibiotikaresistenz. pCR4-TOPO besitzt Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin. In einem Medium, das eines oder beide Antibiotika beinhaltet, wachsen nur solche E.coli-Zellen, die pCR4-TOPO enthalten.

Vermehrung: Durch Zellteilung vermehren sich die Bakterien und somit auch das Plasmid (siehe Abbildung 6, Seite 35).

Entstehung eines Klons: Durch vielfache Zellteilungen entsteht eine Kolonie, ein Klon gleichartiger Wirtszellen.

Die positiven Klone werden nach dem Ausplattieren in LB-Medium angeimpft und in einer Kontroll-PCR mit Insert-spezifischen Primern auf positive Rekombination hin getestet. Die positiv rekombinierten Plasmide werden nach Vermehrung der transformierten Zellen aus diesen isoliert.

Nach der Plasmidisolierung erfolgt nochmals eine Kontroll-PCR mit Insert-spezifischen Primern. Ist diese positiv, kann das jeweilige Plasmid sequenziert werden.

2.10.2 Vorbereitung der PCR-Produkte zur Ligation

Zur Klonierung werden TA-Vektoren eingesetzt, die ein überstehendes Thymidin am 3'-Ende des Vektors besitzen. Zum erleichterten Einbau der PCR-Produkte in den Vektor hängt die Taq-DNA-Polymerase ein dem Thymidin komplementäres Adenin an die PCR-Produkte an.

In einem sterilen Reaktionsgefäß werden 50 μ l Eluat der DNA-Isolierung (vgl. Kap. 2.9), 6 μ l Taq-DNA-Polymerase-Puffer 10x (Pharmacia), 4 μ l dATP-Lösung (2 mmol/l) und 0,1 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l) gemischt und 15 min bei 72°C inkubiert. Die Klonierung schließt sich an.

2.10.3 Klonierung mit pSTBlue-1

Hier wird der Acceptor™Vector Kit (Novagen) eingesetzt.

Pro 1 ml Agar (1,5 g Bacto-Agar/100 ml LB-Medium) werden vor dem Ausplattieren X-Gal (2 µl), IPTG (2 µl), Carbenicillin (1 µl) und Tetracyclin (1 µl) gegeben.

In einem sterilen Reaktionsgefäß werden 1 µl des Vektors pSTBlue-1, 2 µl DNA, 2 µl Aqua dest. und 5 µl des Clonables™2x Ligation Premix vorsichtig gemischt und 2 h bei 16°C inkubiert. Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut. 1 µl des Ligationsansatzes wird zu den kompetenten Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis gekühlt. Zur Transformation erhitzt man den Ansatz 30 sec auf 42°C und danach kühlt man ihn sofort auf Eis. 250 µl SOC-Medium werden zugegeben und der Ansatz wird 30 min bei 37°C und 300 Upm (Thermomixer) inkubiert. Anschließend erfolgt das Ausplattieren. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.10.4 Klonierung mit pCR4-TOPO

Man verwendet den TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen).

Pro 1 ml Agar (1,5 g Bacto-Agar/100 ml LB-Medium) wird vor dem Ausplattieren Ampicillin (1 µl) zugegeben.

In einem sterilen Reaktionsgefäß werden 4 µl DNA, 1 µl Salt Solution und 1 µl des Vektors pCR4-TOPO vorsichtig gemischt, 5 min bei Raumtemperatur (22-23°C) inkubiert und danach mit Eis gekühlt. 2 µl des Ansatzes werden zu den kompetenten E.coli-Zellen pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Zellen werden 30 min auf Eis inkubiert. Zur Transformation wird der Ansatz 30 sec bei 42°C inkubiert, anschließend sofort auf Eis abgekühlt. 250 µl des SOC-Medium werden zupipettiert. Es folgt die Inkubation auf dem Thermomixer comfort Eppendorf für 60 min bei 37°C und 300 Upm. Dann wird der Ansatz auf zwei Platten ausplattiert. Eine Platte mit 50 µl und eine Platte mit dem Restvolumen. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.10.5 Kontroll-PCR der Klone

Mit den Klonen und Insert-spezifischen Primern wird eine Kontroll-PCR durchgeführt. Dazu verwendet man die HotStarTaq®DNA-Polymerase oder die Taq-DNA-Polymerase mit den in Kapitel 2.7.2 beschriebenen Temperaturzyklen.

2.11 Plasmidisolierung

2.11.1 Plasmidisolierung mit Plasmid Mini Kit (Qiagen)

Das Qiagen Plasmid Purification Mini Protokoll basiert auf alkalischer Lyse (Puffer P2) mit Bindung von Plasmid-DNA an eine Anionen-Austauscher-Harz-Säule unter geeigneten Salz- und pH-Bedingungen. RNA, Proteine, Farbstoffe und Verunreinigungen niederen Molekulargewichts werden durch Waschen mit einem Puffer (Puffer QC) entfernt. Die Plasmid-DNA wird in einem höher salzhaltigen Puffer (Puffer QF) eluiert, konzentriert und anschließend werden durch Fällung mit Isopropanol Salzrückstände herausgelöst.

Das Bakterienpellet wird zur Resuspendierung in 0,3 ml Puffer P1, der RNase A-Lösung enthält, aufgenommen. Von Puffer P2 pipettiert man zur alkalischen Lyse der Zellen 0,3 ml hinzu und inkubiert die Lösung 5 min bei Raumtemperatur. Zur Präzipitation werden 0,3 ml des Acetat enthaltenden Puffer P3 zugegeben. Das Gemisch wird auf Eis gekühlt. Man zentrifugiert 10 min bei 15 500 x g (Hermle) und entfernt sofort den Überstand. Den Überstand gibt man auf eine mit 1 ml Puffer QBT equilibrierte Säule. Die Säule wird mit 4 x 1 ml Puffer QC zum Entfernen von Kontaminationen gewaschen. Mit 0,8 ml Puffer QF wird die Plasmid-DNA eluiert. Die Fällung der DNA erfolgt mit dem 0,7fachen Volumen Isopropanol. Isopropanol wird raumtemperiert eingesetzt, um die Salzfällung zu minimieren. Die DNA wird mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, 5 min getrocknet und je nach Menge in TE-Puffer gelöst.

2.11.2 Plasmidisolierung mit GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Pharmacia)

Zellyse:

1-1,5 ml der Bakterienkultur werden bei 14 000 x g, (Hermle) 30 sec zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert. Das Zellpellet wird vollständig in 150 µl der Lösung I, einer isotonen Lösung, die RNase enthält, durch kräftiges Mischen resuspendiert. 150 µl der alkalischen Lösung II werden hinzugefügt und das Gemisch durch Drehen der Röhrchen vermengt. Die Zellen werden durch die alkalische Behandlung lysiert und chromosomale DNA und Proteine werden denaturiert. 300 µl der Lösung III werden zupipettiert und der Ansatz gemischt bis ein Niederschlag ausflockt. Lösung III ist eine neutralisierende Lösung, die Acetat und eine hohe Konzentration an Salz enthält. Das Salz fördert auch die Bindung der Plasmid-DNA an die Glasfasermatrix. Um die Zellreste zu pelletieren, zentrifugiert man 5 min bei 14 000 x g (Hermle).

DNA-Reinigung:

Den Überstand gibt man auf die GFX-Säule, inkubiert 1 min bei Raumtemperatur und zentrifugiert anschließend 30 sec bei 14 000 x g (Hermle). 300 µl der Lösung III werden zur Säule gegeben und 30 sec zentrifugiert. So werden Reste von Proteinen, Kohlenhydraten und Nukleaseaktivität entfernt.

400 µl des Waschpuffers werden zur Säule pipettiert und 60 sec zentrifugiert. Dadurch werden Salze und andere Kontaminationen entfernt. Das Zentrifugieren dient hierbei auch zum Trocknen der Glasfasermatrix vor dem Eluieren. Man überträgt die GFX-Säule in ein Reaktionsgefäß und eluiert mit 100 µl TE-Puffer (pH 8,0).

2.11.3 Kontroll-PCR

Die Kontroll-PCR der Plasmidisolierung wird mit HotStarTaq®DNA-Polymerase und der Taq-DNA-Polymerase nach den in Kapitel 2.7.2 beschriebenen Temperaturzyklen und mit Insert-spezifischen Primern durchgeführt. Es werden 0,5 µl des isolierten Plasmids eingesetzt.

2.12 Sequenzierung**2.12.1 Prinzip**

Das Didesoxyverfahren (Kettenabbruchverfahren, Terminationsverfahren) nach Sanger basiert auf der enzymatisch katalysierten Synthese einer Population von basenspezifisch endenden DNA-Fragmenten, die nach ihrer Größe gelelektrophoretisch getrennt werden können. Aus dem in einem denaturierenden Polyacrylamidgel entstehenden Bandenmuster kann die Sequenz rekonstruiert werden.

Ausgehend von einer bekannten Startsequenz wird durch Zugabe eines Sequenzierungsprimers, eines Nukleotidgemischs und einer DNA-Polymerase die Synthese eines komplementären DNA-Stranges initiiert. Um die Reaktionsprodukte nachweisen zu können, werden diese mit fluoreszierenden Reportergruppen markiert. Die Reaktion wird in vier parallelen, aliquoten Ansätzen gleichzeitig gestartet, die sich lediglich durch die Verwendung eines unterschiedlichen Nukleotidgemisches unterscheiden. Die mit A, C, G und T bezeichneten Reaktionen enthalten eine Mischung aus den auch natürlicherweise vorkommenden 2'-Desoxynukleotiden und jeweils nur einem Typ synthetischer 2', 3'-Didesoxynukleotide, der sogenannten Terminatoren. Es entstehen also in jedem Reaktionsgefäß Produkte, die nur auf einen Basentyp enden. Die Reaktionsprodukte werden elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe in einem denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt. Die markierten Reaktionsprodukte in allen vier Teilreaktionen erzeugen übereinander gelegt eine "Leiter" von Banden, die

sich jeweils um eine Base unterscheiden. Aus dieser Folge von Sprossen der Teilreaktionen A, C, G und T kann von unten nach oben die Basenfolge abgelesen werden.

Die fluoreszierend markierten Reaktionsprodukte werden als Pseudochromatogramme dargestellt. Hierbei werden die Banden einer Spur durch eine Schnittlinie in Laufrichtung des Gels verbunden und die entsprechenden Bandenintensitäten ermittelt. Auf diese Weise werden die Daten um eine Dimension reduziert und es entsteht eine als *trace data* bekannte Darstellung, die den Intensitätsverlauf in Abhängigkeit von der Zeit darstellt.

Bei dieser Arbeit wird nach dem Prinzip des Cycle-Sequencing, einer Modifikation des Sanger-Verfahrens, gearbeitet. Dabei erfolgt die DNA-Sequenzierung und gleichzeitige Amplifikation. Im Gegensatz zur PCR befindet sich in der Reaktion nur ein Primer, es wird also nur linear und nicht exponentiell amplifiziert. In einer Mischung aus DNA-Matrize, fluoreszenzmarkiertem Primer, thermostabiler DNA-Polymerase und einem dNTP/ddNTP-Gemisch wird ein thermisches Profil, bestehend aus Primerdenaturierung, Primerhybridisierung und DNA-Synthese ca. 30 mal durchlaufen, quasi eine Sequenzierungsreaktion 30 mal wiederholt.

Um mögliche Fehler der Sequenzbestimmung zu unterdrücken, werden die DNA-Sequenzen mehrfach und mit entgegengesetzten Primern sequenziert.

Die Sequenzierungsschritte nach Durchführung der Sequenzierungsreaktionen mit SequiThermEXCEL™II wurden von Frau Daniela Scherer, Institut für Humangenetik (Homburg/Saar), fortgeführt (bzgl. Sequenzierung der Klone Kap.1.3, 2 und 3). Ein Teil der Sequenzierungen (bzgl. Kap.3) einschließlich der Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma GENTERprise (Mainz) vervollständigt.

2.12.2 Sequenzierung mit SequiThermEXCEL™II (Cycle Sequencing Protocol)

Die verwendete Template-Menge beträgt 200 fmol DNA.

Die Formel zur Berechnung des Molekulargewichts von 200 fmol doppelsträngiger Matrize lautet:

$$x \text{ kb} * 66 \text{ ng} * 2$$

Mit dieser Formel erhält man die Menge an DNA, die 200 fmol entsprechen sollen.

Beispiel:

Ein Insert von 214 bp (TNAP 24428/TNAP 24429) wird in den Vektor pCR4-TOPO (3957 bp) inkloniert. Dies ergibt 4 171 bp (3957 bp + 214 bp) = 4,171 kb.

Daraus folgt: $4,171 \text{ kb} * 66 \text{ ng} * 2 = 550 \text{ ng}$

In diesem Beispiel werden 550 ng als Template eingesetzt.

In ein 0,5 ml Reaktionsgefäß (Gesamtvolumen 17 μl = Mix) werden 7,2 μl 3,5x SequiThermEXCEL II Sequenzierpuffer, 2 μl eines fluoreszenz-markierten Primers, 200 fmol DNA-Matrize, eine variable Menge Aqua dest. und 1 μl SequiThermEXCEL II DNA-Polymerase (5 U/ μl) pipettiert und auf Eis gestellt.

Für jedes zu sequenzierende DNA-Molekül werden vier Reaktionsgefäße mit den verschiedenen Nukleotiden auf Eis bereitgestellt:

- 2 μl SequiThermEXCEL II-LC Termination Mix A
- " " Termination Mix T
- " " Termination Mix G
- " " Termination Mix C

Zu den jeweils vier nukleotidgefüllten Reaktionsgefäßen werden 4 μl des Mix zupipettiert.

Die Ansätze werden folgendem Temperaturzyklus unterzogen:

95°C	5 min	} 30 Zyklen
95°C	30 sec	
50°C	15 sec	
70°C	1 min	

3 μl Stop/Lade-Puffer werden zupipettiert. Die Proben werden anschließend durch Gelelektrophorese ausgewertet.

Für die Sequenzierung mit dem Vektor pSTBlue-1 werden die Primer T7 Promotor und SP6 Promotor eingesetzt (siehe Abb. 7 und Tab.6).

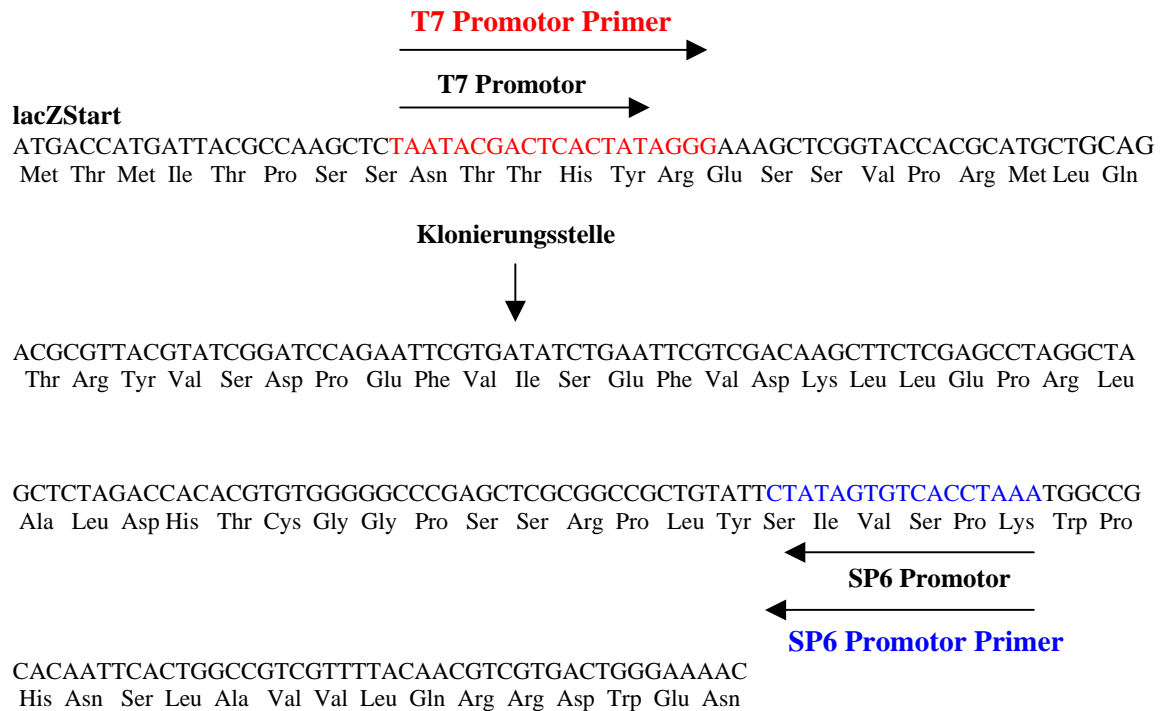


Abb. 7: Klonierungs- und Expressionsregion des Vektors pSTBlue-1 mit Lage der Primer T7 Promotor und SP6 Promotor

In Abbildung 5 ist die Lage der Primer M13 Forward (-20) und M13 Reverse zu sehen, die bei Sequenzierung mit dem Vektor pCR4-TOPO verwendet werden.

Primer	Sequenz
T7 Promotor Primer	5` - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3`
SP6 Promotor Primer	5` - TTT AGG TGA CAC TAT AG - 3`
M13 Forward (-20) Primer	5` - GTA AAA CGA CGG CCA G - 3`
M13 Reverse Primer	5` - CA GGA AAC AGC TAT GAC - 3`

Tab. 6: Sequenzen der eingesetzten Primer

IV. Ergebnisse

1. Das Alkalische Phosphatase-Gen und -Transkript

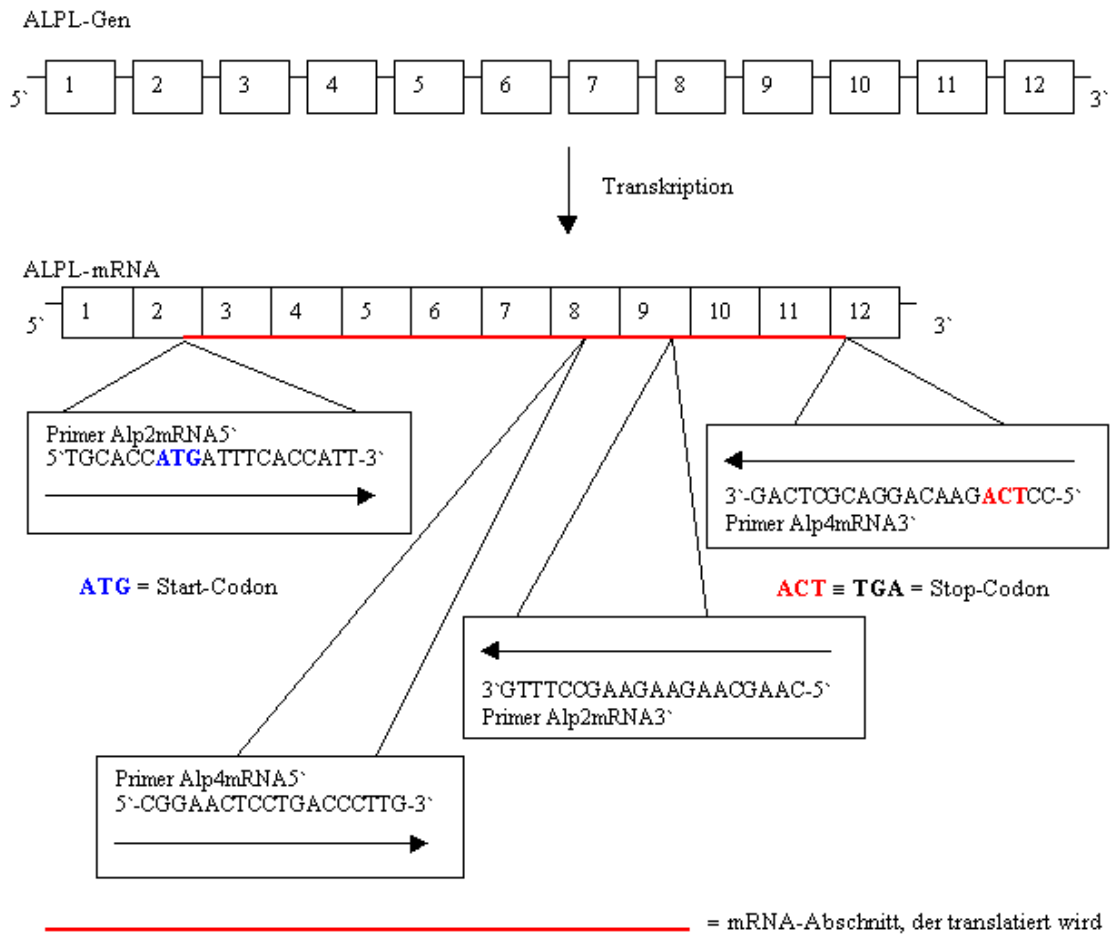
Im Rahmen dieser Arbeit werden mögliche Ursachen für den Verlust der Expression der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase während der Meningeomprogression erforscht. Um verschiedene denkbare Mechanismen, die zum Expressionsverlust beitragen können, zu untersuchen, werden sowohl das ALPL-Gen als auch das Transkript der ALPL analysiert.

Das Alkalische Phosphatase-Gen besteht aus 12 Exons und hat zwei alternative Promotoren. Es gibt zwei verschiedene erste Exons, das Exon 1B (B = bone, Knochen) und das Exon 1L (L = liver, Leber). Diesen beiden ersten Exons ist jeweils ein Promotor vorgeschaltet. Basierend auf alternativem Splicing enthält das Transkript des ALPL-Gens entweder Exon 1B oder Exon 1L. Ist das Exon 1B transkribiert, so entsteht der bone-type der ALPL; der liver-type der ALPL entsteht, wenn das Exon 1L transkribiert wird. Das Start-Codon ATG für die Translation befindet sich in beiden Fällen im Exon 2. Die Exons 2 bis 12 sind bei beiden Transkripten identisch, so dass auch die resultierenden Proteine identisch sind. Nur die Exons 2 bis 12 sind also kodierende Exons und führen nach Translation zum Protein des ALPL-Gens.

1.1 Das Transkript der Alkalischen Phosphatase

Zum Mechanismus des Expressionverlustes der ALPL stellt sich die Frage nach dem Vorhandensein von Mutationen in der ALPL-Sequenz. Durch Mutation ist eine Veränderung des translatierten Proteins möglich und es könnte ein Verlust der Enzymaktivität resultieren.

Um die ALPL-Sequenz nach Mutationen untersuchen zu können, wird das ALPL-Transkript aus primären Meningeomzellkulturen isoliert. Diese isolierte RNA wird mit Hilfe einer Reversen Transkriptase-Reaktion (RT) in cDNA umgeschrieben. Anschließend werden mit verschiedenen Primern bzw. Primerkombinationen, wie sie in Abbildung 8 dargestellt sind, unterschiedliche Fragmente bzw. die cDNA von Exon 2 bis 12 vervielfältigt.

**Abb. 8:**

Schematische Darstellung der 12 Exons des ALPL-Gens. Jedes quadratische Kästchen stellt ein Exon dar, die Linien dazwischen die Introns. In der Abbildung bleiben die unterschiedliche Grösse der Exons und die Grösse der Introns, die meist länger als die Exons sind, unberücksichtigt. Nach Transkription entsteht die mRNA. Aus den kodierenden Exons 2 bis 12 entsteht nach Translation das Enzym. Die Primer, die zur Gewinnung des ALPL-Transkripts verwendet werden, sind hinsichtlich ihrer Position und Richtung dargestellt und im PCR-Ansatz unterschiedlich kombiniert (vgl. Text).

In Abbildung 8 sind die 12 Exons des ALPL-Gens schematisch dargestellt. Jedes Kästchen steht für ein Exon, wobei die Länge der Exons und Introns unberücksichtigt bleibt. Die eingesetzten Primer zur Amplifizierung der ALPL-mRNA, die nach der Transkription entsteht, zeigt die Abbildung 8 in ihrer Position und Richtung.

Die Primerkombination Alp2mRNA5'/Alp4mRNA3' erfasst die Exons 2 bis 12 mit einer Produktlänge von 1575 bp. Ein solch langes Produkt bereitet beim Sequenzieren jedoch Schwierigkeiten. Es kommt vor, dass ein Teil der Sequenz fehlt und nicht sequenziert wird oder dass Abschnitte lücken- oder fehlerhaft abgelesen werden. Aus diesem Grund finden weitere Primerkombinationen Verwendung, die kleinere Produkte ergeben. Das Primerpaar Alp2mRNA5'/Alp2mRNA3' erfasst Exon 2 bis 9 mit einer Länge von 997 bp, das Primerpaar Alp4mRNA5'/Alp4mRNA3' erfasst Exon 8 bis 12 mit einer Produktlänge von 720 bp. Man

kann somit alle erhaltenen Produkte vergleichen und fehlerhaft sequenzierte Abschnitte erkennen.

Für diese Experimente wird das ALPL-Transkript aus drei verschiedenen Meningeomen (T 5502, ohne 1p-Verlust, WHO-Grad I; T 5327, 1p-, WHO-Grad II; T 5416, 1p-, WHO-Grad II) isoliert, analysiert und mit Datenbankeinträgen verglichen.

1.2 Optimierung der Versuchsbedingungen

Nach der RNA-Isolierung aus den Meningeomzellkulturen werden die Reverse Transkriptase-Reaktionen durchgeführt (vgl. Kap. 2.6), wobei mit der SuperScript™II RNase H RT keine zufriedenstellenden Amplifikationsprodukte in der anschließenden PCR erhalten wurden. Es werden deshalb die Sensiscript RT und Omniscript RT zur RT-Reaktion getestet. Es wird versucht, die PCR-Bedingungen nach der RT-Reaktion zu optimieren, das heißt, man versucht, geeignete Annealingtemperaturen für die verwendeten Primer zu finden.

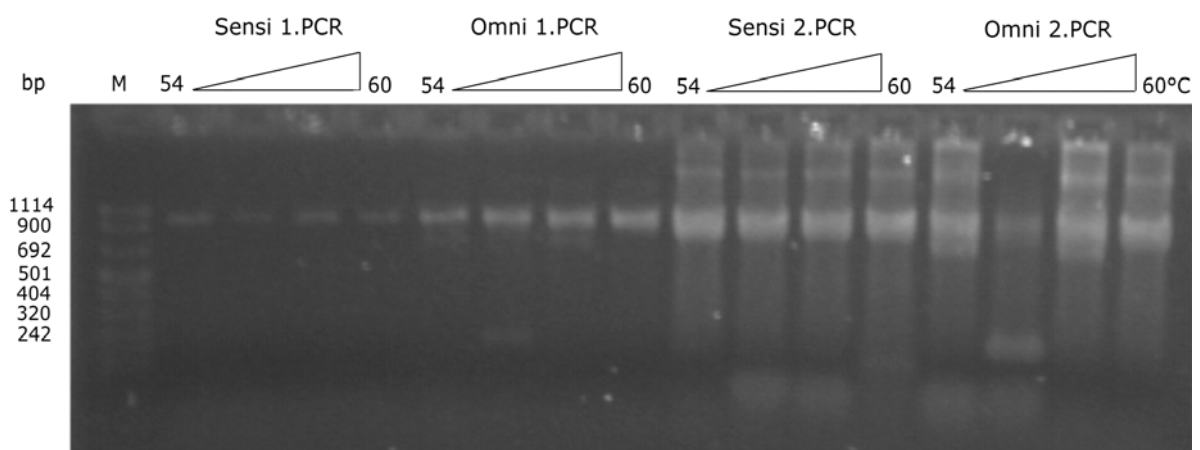


Abb. 9:

Agarosegel (1,5%) nach RT-Reaktion mit Sensiscript RT und Omniscript RT Qiagen und folgender PCR mit der RNA von T 5327. Die Primer Alp2mRNA5` und Alp2mRNA3` wurden bei der PCR verwendet.

Sensi = In diesen Laufspuren sieht man das PCR-Produkt nach RT-Reaktion mit Sensiscript RT Qiagen. Omni = So sehen die Banden nach RT-Reaktion mit Omniscript RT Qiagen aus. 1.PCR: Die 1.PCR ist die auf die RT-Reaktion folgende PCR. 2.PCR: Bei der 2.PCR wird ein Aliquot der 1.PCR verwendet und erneut der PCR unterzogen, um die Menge des Amplikons zu erhöhen. M = Der Molekulargewichtsstandard VIII von Roche ist aufgetragen.

In Abbildung 9 sieht man DNA-Banden gleicher Größe zwischen den Markerbanden von 1114 bp und 900 bp in verschiedener Intensität. Die Banden entstehen nach RT-Reaktion mit den Reversen-Transkriptasen Sensiscript RT Qiagen und Omniscript RT Qiagen und folgender PCR nach Durchführung einer Gelelektrophorese. Die Primer Alp2mRNA5` und Alp2mRNA3` wurden hierbei eingesetzt und es entsteht ein Produkt mit der Länge von 997 bp. Dies entspricht Exon 2 bis Exon 9 des ALPL-Transkripts. Nach der RT-Reaktion jeweils

mit Sensiscript RT und Omniscript RT wurde eine 1. PCR und eine 2. PCR durchgeführt. Die Abbildung 9 zeigt jedoch, dass bei der 2. PCR jeweils zu viele Nebenprodukte entstehen, die sich als dünne Banden anderer Größe und als Schmier in den einzelnen Spuren darstellen. Die Banden, die sich nach RT-PCR mit Sensiscript RT zeigen, erscheinen relativ dünn. Die besten Banden sieht man in den Spuren, die mit Omniscript RT entstanden sind in den höheren Temperaturbereichen um 60°C. Die Banden sind dicker und deutlich dargestellt und es bestehen außerdem kaum oder keine Nebenprodukte, so dass die Omniscript RT für die RT-PCRs verwendet wird.

1.3 Gewinnung des ALPL-Transkriptes

Aus den Meningeomen T 5327, T 5416 und T 5502 erfolgt die RNA-Isolierung. Daran schließt sich die Durchführung einer RT-Reaktion mit Omniscript RT Qiagen an, um nach folgender PCR zur cDNA zu gelangen. Wie oben beschrieben (vgl. Abb. 8 und Kap. 1.1), werden die verschiedenen Primerpaare zur Gewinnung des Transkripts der ALPL bei der PCR eingesetzt.

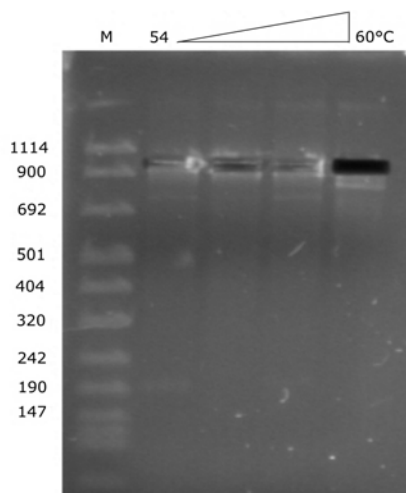


Abb. 10:

Agarosegel (3%) nach RT-Reaktion mit Omniscript RT und folgender PCR mit RNA von T 5502. Die DNA-Banden sind bereits ausgeschnitten. M = Der Molekulargewichtsstandard VIII von Roche ist eingesetzt.

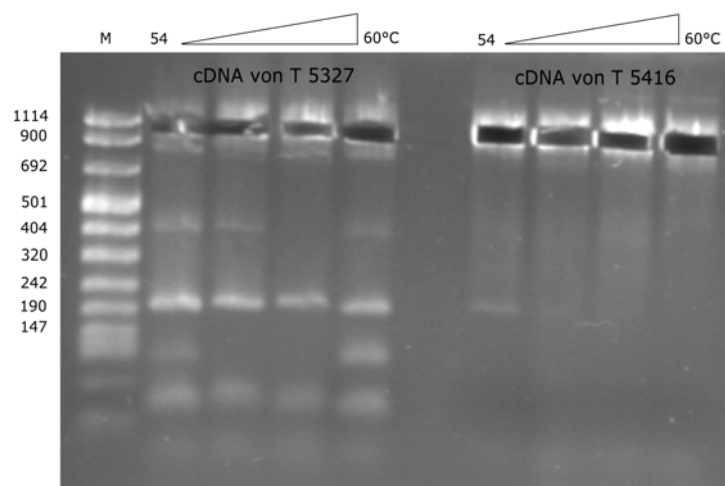


Abb. 11:

Agarosegel (3%) nach RT-Reaktion mit Omniscript RT und folgender PCR mit RNA von T 5327 und T 5416 nach Ausschneiden der DNA-Banden. M = Der Molekulargewichtsstandard VIII von Roche ist verwendet.

In den Abbildungen 10 und 11 sieht man die Agarosegele nach RT-PCR, nachdem die Produkte bereits zum Weiterverarbeiten ausgeschnitten wurden. Die Banden lagen zwischen den Markerbanden 1114 bp und 900 bp. Hier wurde das Primerpaar

Alp2mRNA5`/Alp2mRNA3` verwendet; somit entspricht die Länge der Banden 997 bp. Dies bedeutet, dass ein Teil des ALPL-Transkripts, Exon 2 bis Exon 9, gewonnen ist.

Durch weitere Primerkombinationen werden andere PCR-Produkte der cDNA amplifiziert. Um verschieden lange PCR-Produkte zu erhalten, wurden bei erneuter PCR mit der cDNA der gleichen Meningeome die Primerpaare Alp2mRNA5`/Alp4mRNA3` (1575 bp) und Alp4mRNA5`/Alp4mRNA3` (720 bp) eingesetzt.

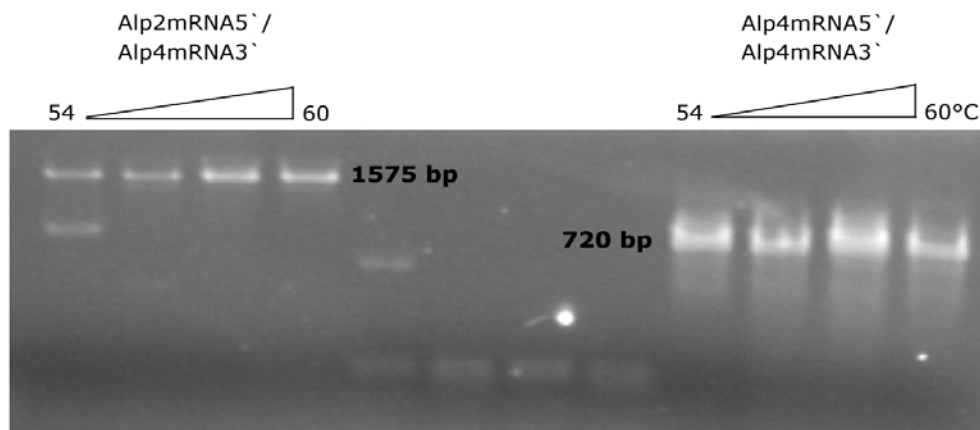


Abb. 12:

Agarosegel (1,5%) nach RT-PCR der RNA von T 5327 mit den Primerpaar Alp2mRNA5`/Alp4mRNA3` und Alp4mRNA5`/Alp4mRNA3`.

In Abbildung 12 sieht man mit 1575 bp das Transkript aus T 5327, das die Exons 2 bis 12 umfasst und DNA-Banden mit einer Länge von 720 bp, die die Exons 8 bis 12 umfassen. Für die Meningeome T 5416 und T 5502 werden die Transkriptabschnitte analog dargestellt und gewonnen.

Nachdem für die Meningeome T 5327, T 5416 und T 5502 alle Transkriptabschnitte als DNA-Banden im Agarosegel erhalten wurden, werden diese ausgeschnitten und die DNA wird aus dem Agarosegel isoliert. Es schließt sich die Klonierung der isolierten DNA mit dem TOPO TA Cloning® Kit (vgl. Kap. 2.10.4) an. Nachdem Kolonien auf Agarplatten herangewachsen sind, werden einige geerntet und es wird in einer Kontroll-PCR getestet, ob sie das gewünschte Insert bzw. den jeweiligen ALPL-Transkriptabschnitt aufgenommen haben.

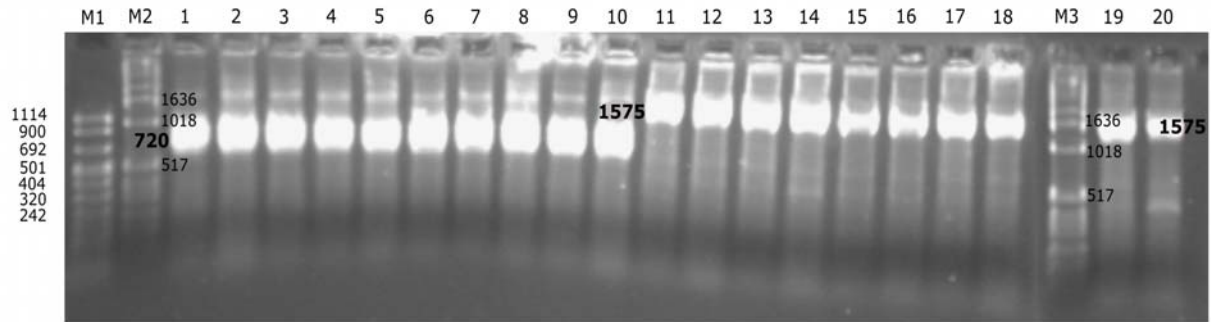


Abb. 13:

Agarosegel (1,5%) nach Kontroll-PCR mit Klonen von T 5502.

Der Molekulargewichtsstandard VIII von Roche (M1) und die 1 kb DNA Ladder von Gibco (M2, M3) sind als Größenmarker eingesetzt. 1-10: In den Laufspuren 1-10 sieht man jeweils das Insert eines bestimmten Klons als Bande, die mit den Primern Alp4mRNA5`/Alp4mRNA3` gewonnen wurde. 11-20: Das Insert, das hier jeweils dargestellt ist, wurde mit den Primern Alp2mRNA5`/Alp4mRNA3` erhalten.

In den Laufspuren der Abbildung 13 ist jeweils eine breite, helle DNA-Bande sichtbar, was darauf schließen lässt, dass das Produkt reichlich vorhanden ist. Jede sichtbare DNA-Bande entspricht jeweils dem DNA-Insert eines bestimmten Klons von T 5502. In den Laufspuren 1 bis 10 sieht man je eine Bande mit einer Länge von 720 bp. Zu deren Nachweis wurden die Primer Alp4mRNA5` und Alp4mRNA3` eingesetzt. Dieses Produkt entspricht den Exons 8 bis 12 des ALPL-Transkripts. In den Laufspuren 11 bis 20 hat das jeweilige PCR-Produkt eine Länge von 1575 bp und wurde durch Einsatz des Primerpärchens Alp2mRNA5`/Alp4mRNA3` gewonnen. Das Produkt der Länge 1575 bp entspricht den Exons 2 bis 12 des ALPL-Transkripts. Dies bedeutet, dass alle geprüften Klone das Insert tragen und positiv sind. Eine Kontroll-PCR zum Nachweis des Inserts der Klone wird gleichermaßen mit den cDNA-Klonen der Meningeome T 5327 und T 5416 durchgeführt.

Nach Anzucht der Klone in LB-Medium erfolgt die Plasmidisolierung. An die Plasmidisolierung schließt sich die Sequenzierung der Plasmid-DNA an. Die erhaltenen Sequenzen werden mit verschiedenen Datenbankeinträgen (GenBank accession no. X14174 und AB011406), die der Sequenz des ALPL-Transkripts entsprechen, verglichen. Das Ergebnis der Sequenzierung im Vergleich mit den Datenbankeinträgen ist in Abbildung 14 gezeigt.

Der Sequenzabgleich aller Sequenzen dieser Arbeit wird mit Hilfe der Software *ClustalW* (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>) durchgeführt.

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75
X14174	ATGATTTACCATTTC	TTAGTACTGGCCATT	GGCACCTGCCTTACT	AACTCCTTAGTGCCA	GAGAAAGAGAAAAGAC					
T5502	ATGATTTACCATTTC	TTAGTACTGGCCATT	GGCACCTGCCTTACT	AACTCCTTAGTGCCA	GAGAAAGAGAAAAGAC					
T5327	ATGATTTACCATTTC	TTAGTACTGGCCATT	GGCACCTGCCTTACT	AACTCCTTAGTGCCA	GAGAAAGAGAAAAGAC					
T5416	ATGATTTACCATTTC	TTAGTACTGGCCATT	GGCACCTGCCTTACT	AACTCCTTAGTGCCA	GAGAAAGAGAAAAGAC					
AB011406	ATGATTTACCATTTC	TTAGTACTGGCCATT	GGCACCTGCCTTACT	AACTCCTTAGTGCCA	GAGAAAGAGAAAAGAC					
	76	90	91	105	106	120	121	135	136	150
X14174	CCCAAGTACTGGCGA	GACCAAGCGCAAGAG	ACACTGAAATATGCC	CTGGAGCTTCAGAAG	CTCAACACCAACGCTG					
T5502	CCCAAGTACTGGCGA	GACCAAGCGCAAGAG	ACACTGAAATATGCC	CTGGAGCTTCAGAAG	CTCAACACCAACGCTG					
T5327	CCCAAGTACTGGCGA	GACCAAGCGCAAGAG	ACACTGAAATATGCC	CTGGAGCTTCAGAAG	CTCAACACCAACGCTG					
T5416	CCCAAGTACTGGCGA	GACCAAGCGCAAGAG	ACACTGAAATATGCC	CTGGAGCTTCAGAAG	CTCAACACCAACGCTG					
AB011406	CCCAAGTACTGGCGA	GACCAAGCGCAAGAG	ACACTGAAATATGCC	CTGGAGCTTCAGAAG	CTCAACACCAACGCTG					
	151	165	166	180	181	195	196	210	211	225
X14174	GCTAAGAATGTCATC	ATGTTCCCTGGGAGAT	GGGATGGGTGTCTCC	ACAGTGACGGCTGCC	CGCATCCTCAAGGGT					
T5502	GCTAAGAATGTCATC	ATGTTCCCTGGGAGAT	GGGATGGGTGTCTCC	ACAGTGACGGCTGCC	CGCATCCTCAAGGGT					
T5327	GCTAAGAATGTCATC	ATGTTCCCTGGGAGAT	GGGATGGGTGTCTCC	ACAGTGACGGCTGCC	CGCATCCTCAAGGGT					
T5416	GCTAAGAATGTCATC	ATGTTCCCTGGGAGAT	GGGATGGGTGTCTCC	ACAGTGACGGCTGCC	CGCATCCTCAAGGGT					
AB011406	GCTAAGAATGTCATC	ATGTTCCCTGGGAGAT	GGGATGGGTGTCTCC	ACAGTGACGGCTGCC	CGCATCCTCAAGGGT					
	226	240	241	255	256	270	271	285	286	300
X14174	CAGTCCACCACAAC	CCTGGGGAGGAGACC	AGGCTGGAGATGGAC	AAGTTCCTTCCGTG	GCCCTCTCCAAGACG					
T5502	CAGTCCACCACAAC	CCTGGGGAGGAGACC	AGGCTGGAGATGGAC	AAGTTCCTTCCGTG	GCCCTCTCCAAGACG					
T5327	CAGTCCACCACAAC	CCTGGGGAGGAGACC	AGGCTGGAGATGGAC	AAGTTCCTTCCGTG	GCCCTCTCCAAGACG					
T5416	CAGTCCACCACAAC	CCTGGGGAGGAGACC	AGGCTGGAGATGGAC	AAGTTCCTTCCGTG	GCCCTCTCCAAGACG					
AB011406	CAGTCCACCACAAC	CCTGGGGAGGAGACC	AGGCTGGAGATGGAC	AAGTTCCTTCCGTG	GCCCTCTCCAAGACG					
	301	●315	316	330	331	345	346	360	361	375
X14174	TACAACACCAAAGCC	CAGGTCCTTGACAGC	GCCGGCACCGCCACC	GCCTACCTGTGTGGG	GTGAAGGCCAATGAG					
T5502	TACAACACCAAATGCC	CAGGTCCTTGACAGC	GCCGGCACCGCCACC	GCCTACCTGTGTGGG	GTGAAGGCCAATGAG					
T5327	TACAACACCAAATGCC	CAGGTCCTTGACAGC	GCCGGCACCGCCACC	GCCTACCTGTGTGGG	GTGAAGGCCAATGAG					
T5416	TACAACACCAAATGCC	CAGGTCCTTGACAGC	GCCGGCACCGCCACC	GCCTACCTGTGTGGG	GTGAAGGCCAATGAG					
AB011406	TACAACACCAAATGCC	CAGGTCCTTGACAGC	GCCGGCACCGCCACC	GCCTACCTGTGTGGG	GTGAAGGCCAATGAG					
	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450
X14174	GGCACCGTGGGGGTA	AGCGCAGCCACTGAG	CGTTCCTCCGGTGCAAC	ACCACCCAGGGGAAC	GAGGTCACTCCATC					
T5502	GGCACCGTGGGGGTA	AGCGCAGCCACTGAG	CGTTCCTCCGGTGCAAC	ACCACCCAGGGGAAC	GAGGTCACTCCATC					
T5327	GGCACCGTGGGGGTA	AGCGCAGCCACTGAG	CGTTCCTCCGGTGCAAC	ACCACCCAGGGGAAC	GAGGTCACTCCATC					
T5416	GGCACCGTGGGGGTA	AGCGCAGCCACTGAG	CGTTCCTCCGGTGCAAC	ACCACCCAGGGGAAC	GAGGTCACTCCATC					
AB011406	GGCACCGTGGGGGTA	AGCGCAGCCACTGAG	CGTTCCTCCGGTGCAAC	ACCACCCAGGGGAAC	GAGGTCACTCCATC					
	451	465	466	480	481	495	496	510	511	525
X14174	CTGCGCTGGGCCAAG	GACGCTGGGAAATCT	GTGGGCATTGTGACC	ACCACGAGAGTGAAC	CATGCCACCCCCAGC					
T5502	CTGCGCTGGGCCAAG	GACGCTGGGAAATCT	GTGGGCATTGTGACC	ACCACGAGAGTGAAC	CATGCCACCCCCAGC					
T5327	CTGCGCTGGGCCAAG	GACGCTGGGAAATCT	GTGGGCATTGTGACC	ACCACGAGAGTGAAC	CATGCCACCCCCAGC					
T5416	CTGCGCTGGGCCAAG	GACGCTGGGAAATCT	GTGGGCATTGTGACC	ACCACGAGAGTGAAC	CATGCCACCCCCAGC					
AB011406	CTGCGCTGGGCCAAG	GACGCTGGGAAATCT	GTGGGCATTGTGACC	ACCACGAGAGTGAAC	CATGCCACCCCCAGC					
	526	540	541	555	556	570	571	585	586	600
X14174	GCCGCTACGCCAC	TCCGCTGACCGGGAC	TGGTACTCAGACAAC	GAGATGCCCCCTGAG	GCCTTGAGCCAGGGC					
T5502	GCCGCTACGCCAC	TCCGCTGACCGGGAC	TGGTACTCAGACAAC	GAGATGCCCCCTGAG	GCCTTGAGCCAGGGC					
T5327	GCCGCTACGCCAC	TCCGCTGACCGGGAC	TGGTACTCAGACAAC	GAGATGCCCCCTGAG	GCCTTGAGCCAGGGC					
T5416	GCCGCTACGCCAC	TCCGCTGACCGGGAC	TGGTACTCAGACAAC	GAGATGCCCCCTGAG	GCCTTGAGCCAGGGC					
AB011406	GCCGCTACGCCAC	TCCGCTGACCGGGAC	TGGTACTCAGACAAC	GAGATGCCCCCTGAG	GCCTTGAGCCAGGGC					
	601	615	616	630	631	645	646	660	661	675
X14174	TGTAAGGACATCGCC	TACCAGCTCATGCAT	AACATCAGGGACATT	GACGTGATCATGGGG	GGTGGCCGAAATAC					
T5502	TGTAAGGACATCGCC	TACCAGCTCATGCAT	AACATCAGGGACATT	GACGTGATCATGGGG	GGTGGCCGAAATAC					
T5327	TGTAAGGACATCGCC	TACCAGCTCATGCAT	AACATCAGGGACATT	GACGTGATCATGGGG	GGTGGCCGAAATAC					
T5416	TGTAAGGACATCGCC	TACCAGCTCATGCAT	AACATCAGGGACATT	GACGTGATCATGGGG	GGTGGCCGAAATAC					
AB011406	TGTAAGGACATCGCC	TACCAGCTCATGCAT	AACATCAGGGACATT	GACGTGATCATGGGG	GGTGGCCGAAATAC					
	676	690	691	705	706	720	721	735	736	750
X14174	ATGTACCCCAAGAAT	AAAACCTGATGTGGAG	TATGAGAGTGACGAG	AAAGCCAGGGGCACG	AGGCTGGACGGCCTG					
T5502	ATGTACCCCAAGAAT	AAAACCTGATGTGGAG	TATGAGAGTGACGAG	AAAGCCAGGGGCACG	AGGCTGGACGGCCTG					
T5327	ATGTACCCCAAGAAT	AAAACCTGATGTGGAG	TATGAGAGTGACGAG	AAAGCCAGGGGCACG	AGGCTGGACGGCCTG					
T5416	ATGTACCCCAAGAAT	AAAACCTGATGTGGAG	TATGAGAGTGACGAG	AAAGCCAGGGGCACG	AGGCTGGACGGCCTG					
AB011406	ATGTACCCCAAGAAT	AAAACCTGATGTGGAG	TATGAGAGTGACGAG	AAAGCCAGGGGCACG	AGGCTGGACGGCCTG					
	751	765	766	780	781	●795	796	810	811	825
X14174	GACCTCGTTGACACC	TGGAAGAGCTTCAA	CCGAGATACAAGCAC	TCCCACCTTCATCTGG	AACCGCACGGAACTC					
T5502	GACCTCGTTGACACC	TGGAAGAGCTTCAA	CCGAGATACAAGCAC	TCCCACCTTCATCTGG	AACCGCACGGAACTC					
T5327	GACCTCGTTGACACC	TGGAAGAGCTTCAA	CCGAGATACAAGCAC	TCCCACCTTCATCTGG	AACCGCACGGAACTC					
T5416	GACCTCGTTGACACC	TGGAAGAGCTTCAA	CCGAGATACAAGCAC	TCCCACCTTCATCTGG	AACCGCACGGAACTC					
AB011406	GACCTCGTTGACACC	TGGAAGAGCTTCAA	CCGAGATACAAGCAC	TCCCACCTTCATCTGG	AACCGCACGGAACTC					

	826	840	841	855	856	•	870	871	•	885	886	900
X14174	CTGACCCTTGACCCC	CACAATGTGGACTAC	CTATTGGGTCTCTTC	GAGCCGGGGGACATG	CAGTACGAGCTGAAC							
T5502	CTGACCCTTGACCCC	CACAATGTGGACTAC	CTATTGGGTCTCTTC	GAGCCAGGGGACATG	CAGTACGAGCTGAAC							
T5327	CTGACCCTTGACCCC	CACAATGTGGACTAC	CTATTGGGTCTCTTC	GAGCCAGGGGACATG	CAGTACGAGCTGAAC							
T5416	CTGACCCTTGACCCC	CACAATGTGGACTAC	CTATTGGGTCTCTTC	GAGCCAGGGGACATG	CAGTACGAGCTGAAC							
AB011406	CTGACCCTTGACCCC	CACAATGTGGACTAC	CTATTGGGTCTCTTC	GAGCCAGGGGACATG	CAGTACGAGCTGAAC							
	901	915	916	930	931		945	946		960	961	975
X14174	AGGAACAACGTGACG	GACCCGTCACCTCTCC	GAGATGGTGGTGGTG	GCCATCCAGATCCTG	CGGAAGAACCCCAAA							
T5502	AGGAACAACGTGACG	GACCCGTCACCTCTCC	GAGATGGTGGTGGTG	GCCATCCAGATCCTG	CGGAAGAACCCCAAA							
T5327	AGGAACAACGTGACG	GACCCGTCACCTCTCC	GAGATGGTGGTGGTG	GCCATCCAGATCCTG	CGGAAGAACCCCAAA							
T5416	AGGAACAACGTGACG	GACCCGTCACCTCTCC	GAGATGGTGGTGGTG	GCCATCCAGATCCTG	CGGAAGAACCCCAAA							
AB011406	AGGAACAACGTGACG	GACCCGTCACCTCTCC	GAGATGGTGGTGGTG	GCCATCCAGATCCTG	CGGAAGAACCCCAAA							
	976	990	991	1005	1006		1020	1021		1035	1036	1050
X14174	GGCTTCTTCTTGCTG	GTGGAAGGAGGCAGA	ATTGACCACGGGCAC	CATGAAGGAAAAGCC	AAGCAGGCCCTGCAT							
T5502	GGCTTCTTCTTGCTG	GTGGAAGGAGGCAGA	ATTGACCACGGGCAC	CATGAAGGAAAAGCC	AAGCAGGCCCTGCAT							
T5327	GGCTTCTTCTTGCTG	GTGGAAGGAGGCAGA	ATTGACCACGGGCAC	CATGAAGGAAAAGCC	AAGCAGGCCCTGCAT							
T5416	GGCTTCTTCTTGCTG	GTGGAAGGAGGCAGA	ATTGACCACGGGCAC	CATGAAGGAAAAGCC	AAGCAGGCCCTGCAT							
AB011406	GGCTTCTTCTTGCTG	GTGGAAGGAGGCAGA	ATTGACCACGGGCAC	CATGAAGGAAAAGCC	AAGCAGGCCCTGCAT							
	1051	1065	1066	1080	1081		1095	1096		1110	1111	1125
X14174	GAGCGGTTGGAGATG	GACCGGGCCATCGGG	CAGGCAGGCAGCTTG	ACCTCCTCGGAAGAC	ACTCTGACCGTGGTC							
T5502	GAGCGGTTGGAGATG	GACCGGGCCATCGGG	CAGGCAGGCAGCTTG	ACCTCCTCGGAAGAC	ACTCTGACCGTGGTC							
T5327	GAGCGGTTGGAGATG	GACCGGGCCATCGGG	CAGGCAGGCAGCTTG	ACCTCCTCGGAAGAC	ACTCTGACCGTGGTC							
T5416	GAGCGGTTGGAGATG	GACCGGGCCATCGGG	CAGGCAGGCAGCTTG	ACCTCCTCGGAAGAC	ACTCTGACCGTGGTC							
AB011406	GAGCGGTTGGAGATG	GACCGGGCCATCGGG	CAGGCAGGCAGCTTG	ACCTCCTCGGAAGAC	ACTCTGACCGTGGTC							
	1126	1140	1141	1155	1156		1170	1171		1185	1186	1200
X14174	ACTGCGGACCATTCC	CACGTCTTCACATTT	GGTGGATACACCCCC	CGTGGCAACTCTATC	TTTGGTCTGGCCCCC							
T5502	ACTGCGGACCATTCC	CACGTCTTCACATTT	GGTGGATACACCCCC	CGTGGCAACTCTATC	TTTGGTCTGGCCCCC							
T5327	ACTGCGGACCATTCC	CACGTCTTCACATTT	GGTGGATACACCCCC	CGTGGCAACTCTATC	TTTGGTCTGGCCCCC							
T5416	ACTGCGGACCATTCC	CACGTCTTCACATTT	GGTGGATACACCCCC	CGTGGCAACTCTATC	TTTGGTCTGGCCCCC							
AB011406	ACTGCGGACCATTCC	CACGTCTTCACATTT	GGTGGATACACCCCC	CGTGGCAACTCTATC	TTTGGTCTGGCCCCC							
	1201	1215	1216	1230	1231		1245	1246		1260	1261	1275
X14174	ATGCTGAGTGACACA	GACAAGAAGCCCTTC	ACTGCCATCCTGTAT	GGCAATGGGCCTGGC	TACAAGTGGTGGGC							
T5502	ATGCTGAGTGACACA	GACAAGAAGCCCTTC	ACTGCCATCCTGTAT	GGCAATGGGCCTGGC	TACAAGTGGTGGGC							
T5327	ATGCTGAGTGACACA	GACAAGAAGCCCTTC	ACTGCCATCCTGTAT	GGCAATGGGCCTGGC	TACAAGTGGTGGGC							
T5416	ATGCTGAGTGACACA	GACAAGAAGCCCTTC	ACTGCCATCCTGTAT	GGCAATGGGCCTGGC	TACAAGTGGTGGGC							
AB011406	ATGCTGAGTGACACA	GACAAGAAGCCCTTC	ACTGCCATCCTGTAT	GGCAATGGGCCTGGC	TACAAGTGGTGGGC							
	1276	1290	1291	1305	1306		1320	1321		1335	1336	1350
X14174	GGTGAACGAGAGAAT	GTCTCCATGGTGGAC	TATGCTCACAACAAC	TACCAGGCGCAGTCT	GCTGTGCCCTGCGC							
T5502	GGTGAACGAGAGAAT	GTCTCCATGGTGGAC	TATGCTCACAACAAC	TACCAGGCGCAGTCT	GCTGTGCCCTGCGC							
T5327	GGTGAACGAGAGAAT	GTCTCCATGGTGGAC	TATGCTCACAACAAC	TACCAGGCGCAGTCT	GCTGTGCCCTGCGC							
T5416	GGTGAACGAGAGAAT	GTCTCCATGGTGGAC	TATGCTCACAACAAC	TACCAGGCGCAGTCT	GCTGTGCCCTGCGC							
AB011406	GGTGAACGAGAGAAT	GTCTCCATGGTGGAC	TATGCTCACAACAAC	TACCAGGCGCAGTCT	GCTGTGCCCTGCGC							
	1351	1365	1366	1380	1381		1395	1396		1410	1411	1425
X14174	CACGAGACCCACGGC	GGGGAGGACGTGGCC	GTCTTCTCCAAGGGC	CCCATGGCGCACCTG	CTGCACGGCGTCCAC							
T5502	CACGAGACCCACGGC	GGGGAGGACGTGGCC	GTCTTCTCCAAGGGC	CCCATGGCGCACCTG	CTGCACGGCGTCCAC							
T5327	CACGAGACCCACGGC	GGGGAGGACGTGGCC	GTCTTCTCCAAGGGC	CCCATGGCGCACCTG	CTGCACGGCGTCCAC							
T5416	CACGAGACCCACGGC	GGGGAGGACGTGGCC	GTCTTCTCCAAGGGC	CCCATGGCGCACCTG	CTGCACGGCGTCCAC							
AB011406	CACGAGACCCACGGC	GGGGAGGACGTGGCC	GTCTTCTCCAAGGGC	CCCATGGCGCACCTG	CTGCACGGCGTCCAC							
	1426	1440	1441	1455	1456		1470	1471		1485	1486	1500
X14174	GAGCAGAACTACGTC	CCCCACGTGATGGCG	TATGCAGCCTGCATC	GGGGCCAACCTCGGC	CACTGTGCTCCTGCC							
T5502	GAGCAGAACTACGTC	CCCCACGTGATGGCG	TATGCAGCCTGCATC	GGGGCCAACCTCGGC	CACTGTGCTCCTGCC							
T5327	GAGCAGAACTACGTC	CCCCACGTGATGGCG	TATGCAGCCTGCATC	GGGGCCAACCTCGGC	CACTGTGCTCCTGCC							
T5416	GAGCAGAACTACGTC	CCCCACGTGATGGCG	TATGCAGCCTGCATC	GGGGCCAACCTCGGC	CACTGTGCTCCTGCC							
AB011406	GAGCAGAACTACGTC	CCCCACGTGATGGCG	TATGCAGCCTGCATC	GGGGCCAACCTCGGC	CACTGTGCTCCTGCC							
	1501	1515	1516	1530	1531		1545	1546		1560	1561	1575
X14174	AGCTCGGCAGGCAGC	CTTGCTGCAGGCCCC	CTGCTGCTCGCTG	GCCCTCTACCCCTG	AGCGTCTGTTCTGA							
T5502	AGCTCGGCAGGCAGC	CTTGCTGCAGGCCCC	CTGCTGCTCGCTG	GCCCTCTACCCCTG	AGCGTCTGTTCTGA							
T5327	AGCTCGGCAGGCAGC	CTTGCTGCAGGCCCC	CTGCTGCTCGCTG	GCCCTCTACCCCTG	AGCGTCTGTTCTGA							
T5416	AGCTCGGCAGGCAGC	CTTGCTGCAGGCCCC	CTGCTGCTCGCTG	GCCCTCTACCCCTG	AGCGTCTGTTCTGA							
AB011406	AGCTCGGCAGGCAGC	CTTGCTGCAGGCCCC	CTGCTGCTCGCTG	GCCCTCTACCCCTG	AGCGTCTGTTCTGA							

Abb. 14:

Abbildung 14 zeigt die Sequenz der cDNA der Meningeome T 5502, T 5327 und T 5416 im Vergleich mit den Datenbankeinträgen X14174 und AB011406 (Datenbankeinträge für ALPL, Variationen). Die Nukleotidpolymorphismen sind rot markiert, z.B. G/C bei Position 1336.

1.4 Variationen im ALPL-Transkript

Nach Weiss et al. (1988) nummeriert man das Adenin (A) des ATG-Start-Codons der cDNA-Sequenz, bei dem die Translation beginnt, als erstes Nukleotid mit +1, wobei man sich an der Transkriptionsrichtung von links nach rechts (5'→3') orientiert. Nukleotide, die in 5'-Richtung vom Adenin liegen, werden mit negativen Ziffern bezeichnet, während hierbei Positionen innerhalb des ersten Introns bei der Nummerierung ignoriert werden.

Bei der Aminosäuresequenz erfolgt die Nummerierung unter Berücksichtigung des Signalpeptids, das dem eigentlichen Protein vorangestellt ist. Das Signalpeptid besteht aus den Aminosäuren 1 bis 17, wobei die Aminosäure Methionin des Start-Codons der ersten Aminosäure entspricht. Die Nummerierung der Aminosäuresequenz unter Berücksichtigung des Signalpeptids, wie sie bei der Angabe der Aminosäurestellen verwendet wird, bezeichnet die Aminosäure Methionin als -17 (siehe Abbildung 15).

ALPL-Protein (Aminosäuresequenz) mit Signalpeptid

```
-17  MISPFVLVAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGD
+44  GMGVSTVTAARILKGQLHHNPGEETRLMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCG
+104 VKANEGTVGVSAATERSRCNTTQGNVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAH
+164 SADRDWYSDNEMPPEALSQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDVEYESDE
+224 KARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSHFIVNRTELLTDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELN
+284 RNNVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIG
+344 QAGSLTSS EDTLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGN SIFGLAPMLS DTDKKPFTAILYGN GPG
+404 YKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSPVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMALLHGVHEQNYV
+464 PHVMAYAACIGANLGHCAPASSAGSLAAGPLLLALALYPLSVLF
```

Abb. 15: ALPL-Protein (Aminosäuresequenz) mit Signalpeptid

Signalpeptid -17 bis 0; Aminosäureabkürzungen: A-Alanin, R-Arginin, N-Asparagin, D-Asparaginsäure, C-Cystein, E-Glutaminsäure, Q-Glutamin, G-Glycin, H-Histidin, I-Isoleucin, L-Leucin, K-Lysin, M-Methionin, F-Phenylalanin, P-Prolin, S-Serin, T-Threonin, W-Tryptophan, Y-Tyrosin, V-Valin; Die Stellen der Aminosäurevariationen sind **rot** gekennzeichnet.

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der Sequenzierung der cDNA im Vergleich mit den Datenbankeinträgen für die ALPL-Variationen.

Datenbank	Basenstelle	Base	T5502	T5327	T5416	As-stelle	Aminosäure
AB011406 X14174	312	T A	x	x	x	87	N K
AB011406 X14174	787	T C	x	x	x	246	Y H
AB011406 X14174	865	T C	x	x	x	272	F L
AB011406 X14174	876	A G	x	x	x	275	Keine AS- änderung
AB011406 X14174	1080	C G	x	x	x	343	Keine AS- änderung
AB011406 X14174	1083	C G	x	x	x	344	H Q
AB011406 X14174	1336	C G	x	x	x	429	P A
AB011406 X14174	1542	T G	x	x	x	Nach STOP	Keine AS- änderung

Tab. 7:

Ergebnisse der Sequenzierung der cDNA im Vergleich zu den an acht Positionen unterschiedlichen Datenbankeinträgen AB011406 und X14174. Die Nukleotidpolymorphismen resultieren in fünf Aminosäurevariationen. As-Stelle = Aminosäurestelle; Bei der Nummerierung der Aminosäuresequenz wird Methionin als Aminosäure des ATG-Start-Codons mit -17 bezeichnet.

Für die Nomenklatur der Aminosäuren gibt es einen Ein-Buchstaben-Code, der ihre Abkürzung in Form eines Großbuchstaben erlaubt, z.B. A für Alanin, K für Lysin, N für Asparagin, usw. Die Nukleotidbasen sind durch ihren Anfangsbuchstaben abgekürzt (A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin).

Im Vergleich mit den Datenbanksequenzen AB011406 und X14174 (vgl. Abb. 14) gibt es acht Nukleotidpolymorphismen (SNPs = **s**ingle **n**ucleotide **p**olymorphisms), die fünf Aminosäurevariationen ergeben. An Basenposition 312 findet man ein T oder A, das an Aminosäurestelle 87 Asparagin (N) bzw. Lysin (K) ergibt. T oder C an Basenstelle 787 resultiert als Phenylalanin (F) bzw. Histidin (H) an Aminosäurestelle 246. Der C/T-Polymorphismus an Basenposition 865 ergibt Leucin (L) oder Phenylalanin (F) an Stelle 272. An Basenstelle 876 kann ein A oder G vorkommen als Triplet CCA oder CCG, wodurch die Aminosäuresequenz allerdings unverändert bleibt. Beide Triplets ergeben an Aminosäurestelle 275 Prolin (P). An Basenstelle 1080 kann ein C oder G vorkommen als Triplet GGG oder GGC. Auch hierdurch wird die Aminosäuresequenz nicht beeinflusst. Die Triplets ergeben an Aminosäurestelle 343 beide Glycin (G). C oder G an Position 1083 ergibt Histidin (H) bzw. Glutamin (Q) an Aminosäurestelle 344 im Protein. An Basenposition 1336 findet man ein C oder G, das an Aminosäurestelle 429 in Prolin (P) oder Alanin (A) resultiert. Der

achte Polymorphismus findet sich an Basenstelle 1542. Er bleibt ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz, da er sich nach dem Stop-Codon befindet.

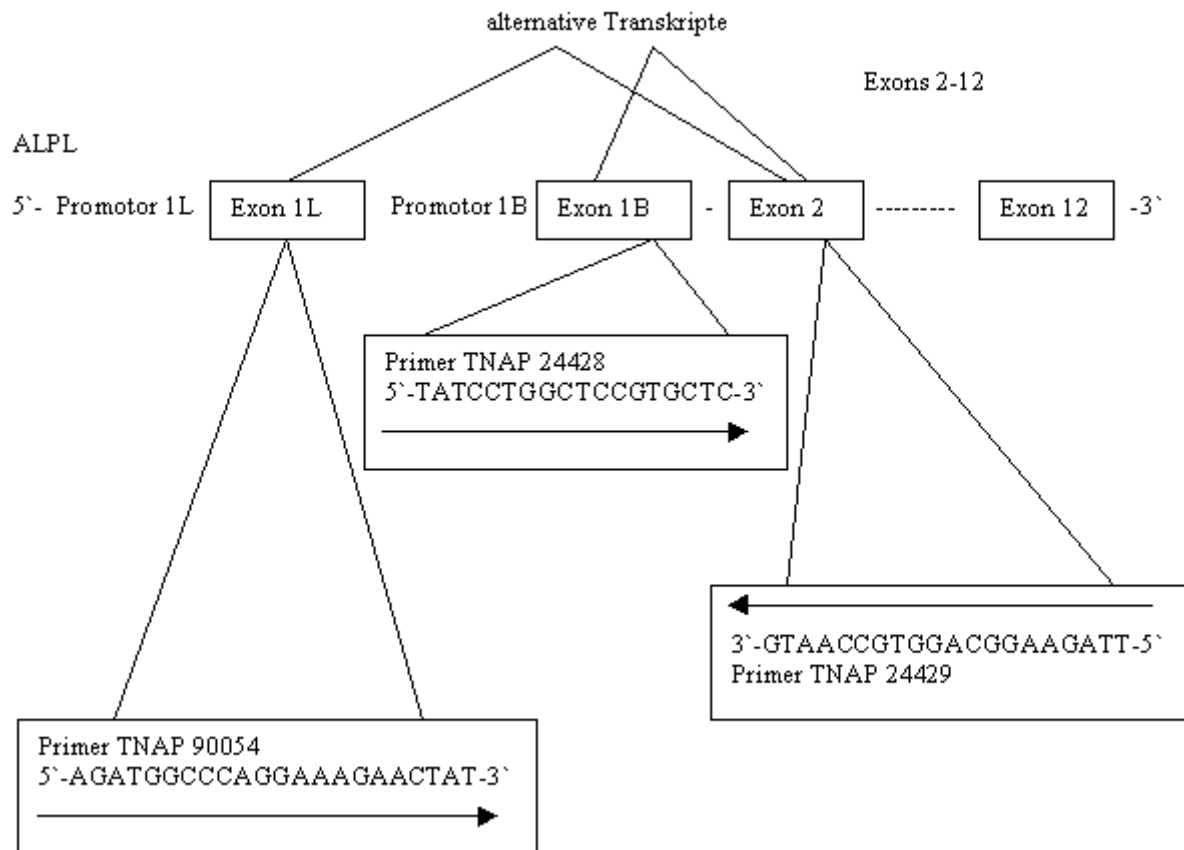
Alle drei untersuchten Meningeome T 5502, T 5327 und T 5416 zeigen die gleichen Basenvariationen entweder entsprechend der Datenbanksequenz AB011046 (SNP 312, SNP 787, SNP 876) oder X14174 (SNP 865, SNP 1080, SNP 1083, SNP 1336) auf. Es werden keinerlei Mutationen nachgewiesen.

2. Promotoraktivität in Meningeomen

Die Ergebnisse der Sequenzierung des ALPL-Transkripts der untersuchten Meningeome schließen Mutationen aus. Man findet lediglich aus den beiden Datenbanken bekannte Nukleotidpolymorphismen, die Aminosäuresequenzvariationen ergeben.

Wenn keine Mutationen vorliegen, muss man eine andere Ursache annehmen, die zum Expressionsverlust der ALPL führt. Als ein möglicher Mechanismus kommt genomisches Imprinting in Betracht, das sich in Form von DNA-Methylierung äußert. Eine heterozygote DNA-Methylierung ist als wesentliche Komponente bei der Verminderung der Expression von Tumorsuppressorgen bekannt und deshalb eine denkbare Ursache im Fall des ALPL-Expressionsverlusts. Die DNA-Methylierung wirkt vor allem im Promotorbereich regulierend auf die Genaktivität. Der Promotor spielt eine wichtige Rolle als eine DNA-Sequenz, die als Erkennungs- und Bindungsregion für die RNA-Polymerase dient. Die RNA-Polymerase katalysiert die Synthese der mRNA aus Nukleotidbasen, wobei die DNA als Matrize dient. Durch DNA-Methylierung im Promotorbereich kann es zur Störung der Anlagerung des Polymerasekomplexes kommen, wodurch das Gen stillgelegt wird. Damit ist die Transkription des Gens und dadurch die Enzymsynthese ebenfalls stillgelegt. Da das ALPL-Gen zwei verschiedene Promotoren besitzt, muss zuerst eruiert werden, welcher Promotor aktiv ist und ob Exon 1L oder Exon 1B exprimiert wird.

Um zu analysieren, welches der aktive Promotor ist, wird mit der mRNA der Meningeome eine exonspezifische PCR durchgeführt. Dabei werden die Primer so gewählt, dass ein Primer (TNAP 24429) in Exon 2 in Richtung 3'-5' liegt. Ein zweiter Primer (TNAP 90054) liegt in Exon 1L in Richtung 5'-3'. Ein dritter Primer (TNAP 24428) liegt in Exon 1B ebenfalls in Richtung 5'-3' (siehe Abbildung 16). Die Primer sind nach den Nummern der Datenbankeinträge (GenBank) der jeweiligen Exonsequenz benannt.

**Abb. 16:**

Schematische Darstellung der beiden ersten Exons 1L und 1B des ALPL-Gens mit ihren jeweils vorgeschalteten Promotoren. Die Exons 2 bis 12 sind kodierende Exons. Durch alternatives Splicing gibt es zwei verschiedene Transkripte, entweder ein Transkript mit Exon 1L (liver-type) oder mit Exon 1B (bone-type). Durch Einsatz der Primer TNAP 90054, TNAP 24428 und TNAP 24429 in der PCR findet man heraus, welches Exon 1 transkribiert wird. Diese verwendeten Primer sind in ihrer Lage und Richtung dargestellt. Die Introns bleiben in der Abbildung unberücksichtigt.

Abbildung 16 zeigt als Schema die beiden ersten Exons 1L und 1B des ALPL-Gens und die ihnen vorgeschalteten Promotoren. Durch alternatives Splicing gibt es zwei verschiedene Transkripte, entweder ein Transkript mit Exon 1L (liver-type) oder mit Exon 1B (bone-type). Die eingesetzten Primer TNAP 90054, TNAP 24428 und TNAP 24429 sind in ihrer Position und Richtung dargestellt.

Verwendet man in einer PCR das Primerpaar TNAP 90054 und TNAP 24429 und erhält ein Produkt, bedeutet dies, dass das Exon 1L transkribiert wird und dass somit der dem Exon 1L zugehörige Promotor aktiv ist. Hierbei hat das Produkt eine Länge von 278 bp und man erhält den Exon1L/Exon 2-Übergang der ALPL.

Kommt bei der PCR das Primerpaar TNAP 24428 und TNAP 24429 zum Einsatz und man erhält ein Produkt, so wird das Exon 1B transkribiert und der dem Exon 1B vorgeschaltete Promotor ist aktiv. Das Produkt hat eine Länge von 214 bp und stellt den Exon1B/Exon 2-Übergang der ALPL dar.

Aus den beiden Meningeomen T 5416 und T 5327 wird mRNA isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Nach der RT-Reaktion wird eine PCR (vgl. Kap. III.2.7.2.B) mit den exonspezifischen Primerpaaren TNAP 90054/TNAP 24429 und TNAP 24428/TNAP 24429 im Promotorbereich durchgeführt, um zu prüfen, welcher Promotor aktiv und welches Exon 1 transkribiert ist.

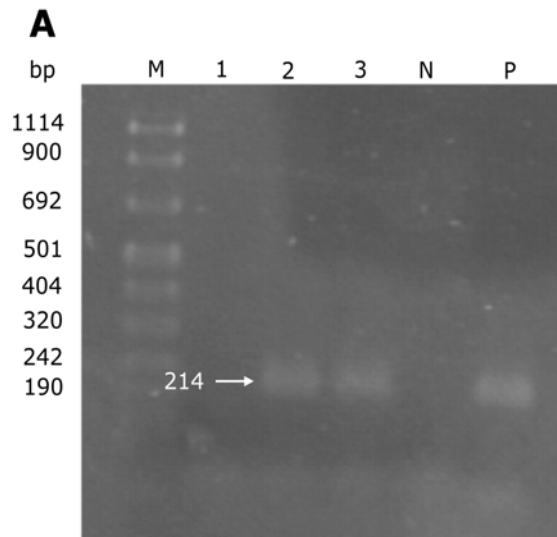


Abb. 17 A:

Agarosegele (2%) der Gelelektrophorese nach RT-Reaktion und PCR mit den exonspezifischen Primern. A: Produkte von T 5416. B: Produkte von Meningeom T 5327.

Abb. 17 A und B: M = Molekulargewichtsstandard VIII von Roche als Größenmarker. N = Negativkontrolle, es wurde keine cDNA in der PCR verwendet. P = Positivkontrolle; RNA, die mit den verwendeten Primern sicher ein Produkt ergibt. 1 = Negativkontrolle, es wurde keine RT in der PCR eingesetzt.

Abb. 17 A: 2 = Produkt nach Einsatz von 3 μ g RNA von T 5416. 3 = Produkt nach Einsatz von 1 μ g RNA von T 5416.

Abb. 17 B: 2 = Produkt nach Einsatz von 1 μ g RNA von T 5327. 3 = Produkt nach Einsatz von 3 μ g RNA von T 5327.

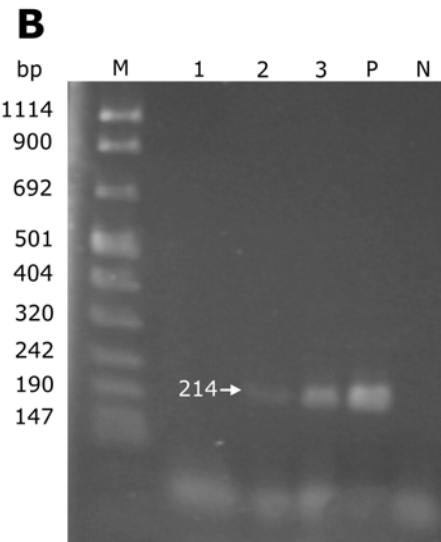


Abb. 17 B:

In den Laufspuren 2, 3 und P der Abbildung 17 A stellt sich jeweils eine Bande dar, mit einer Größe, die zwischen den Markerbanden von 242 bp und 190 bp liegt. Die eingesetzten Primer sind TNAP 24428 und TNAP 24429, die RNA stammt von Meningeom T 5416. Die Banden in Laufspur 2 und 3 entsprechen einem PCR-Produkt mit der Länge von 214 bp und stellen den Exon 1B/Exon 2-Übergang der ALPL dar. Die Bande in Laufspur P ist die Positivkontrolle. Als Positivkontrolle dient RNA, die mit den verwendeten Primern sicher ein Produkt ergibt.

In den Laufspuren 2, 3 und P der Abbildung 17 B sieht man ebenfalls zwischen den Markerbanden 242 bp und 190 bp jeweils eine DNA-Bande. TNAP 24428 und TNAP 24429 sind die verwendeten Primer, die RNA stammt vom Meningeom T 5327. In Laufspur P entspricht die Bande der Positivkontrolle, die Banden in Laufspur 2 und 3 stellen den Exon 1B/Exon 2-Übergang der ALPL mit einer Länge von 214 bp dar.

Nach Verwendung des Primerpaares TNAP 90054/TNAP24429 bei der PCR mit RNA der Meningeome T 5416 und T 5327 war kein Produkt zu erkennen. Das alternative Splicing-Produkt mit Exon 1L kann somit bei beiden Tumoren nicht nachgewiesen werden. In den untersuchten Tumoren findet man den Exon 1B/Exon 2-Übergang als PCR-Produkt, das zeigt, dass das Exon 1B transkribiert wird, dass also der Promotor des Knochentyps der ALPL in Meningeomzellen aktiv ist.

Die Exon 1B-Produkte beider Meningeome werden aus dem Gel isoliert und anschließend in einen T-Vektor (pCR4-TOPO) einkloniert. Zur Überprüfung der Klonierung werden die gewachsenen Kolonien mittels PCR untersucht. Man kann somit erkennen, ob das Insert in den Vektor eingefügt wurde. Aus den positiven Klonen erfolgt die Isolierung der Plasmid-DNA mit dem GFX™ Micro Plasmid Prep Kit. Die Sequenzierung wird mit Sequi-ThermEXCEL™ II durchgeführt. Zur Verifizierung werden die beiden Sequenzen mit der Datenbanksequenz NM_000478 (Datenbankeintrag in GenBank für Bone Alkalische Phosphatase) verglichen. Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt und man erkennt die völlige Übereinstimmung mit dem Datenbankeintrag der ALPL, wie sie im Knochen vorliegt.

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75
NM_000478	ATCCTGGCTCCGTGC	TCCCACGCGCTTGTG		CCTGGACGGACCCTC		GCCAGTGCTCTGCGC		AGGATTGGAACATCA		
T5327	ATCCTGGCTCCGTGC	TCCCACGCGCTTGTG		CCTGGACGGACCCTC		GCCAGTGCTCTGCGC		AGGATTGGAACATCA		
T5416	ATCCTGGCTCCGTGC	TCCCACGCGCTTGTG		CCTGGACGGACCCTC		GCCAGTGCTCTGCGC		AGGATTGGAACATCA		
	76	90	91	105	106	120	121	135	136	150
NM_000478	GTTAACATCTGACCA	CTGCCAGCCCACCCC		CTCCCACCCACGTCG		ATTGCATCTCTGGGC		TCCAGGGATAAAGCA		
T5327	GTTAACATCTGACCA	CTGCCAGCCCACCCC		CTCCCACCCACGTCG		ATTGCATCTCTGGGC		TCCAGGGATAAAGCA		
T5416	GTTAACATCTGACCA	CTGCCAGCCCACCCC		CTCCCACCCACGTCG		ATTGCATCTCTGGGC		TCCAGGGATAAAGCA		
	151	165	166	180	181	195	196	210	211	
NM_000478	GGTCTTGGGGTGAC	CATGATTCACCATT		CTTAGTACTGGCCAT		TGGCACCTGCCTTAC		TAA		
T5327	GGTCTTGGGGTGAC	CATGATTCACCATT		CTTAGTACTGGCCAT		TGGCACCTGCCTTAC		TAA		
T5416	GGTCTTGGGGTGAC	CATGATTCACCATT		CTTAGTACTGGCCAT		TGGCACCTGCCTTAC		TAA		

Abb. 18:

Ergebnis der Sequenzierung des klonierten Exon 1B/Exon 2-Übergangs der cDNA der ALPL von den Meningeomen T 5327 und T 5416. Im Vergleich hierzu ist die Sequenz des Datenbankeintrags NM_000478 (ALPL, bone-type) gegenübergestellt, was die Übereinstimmung der Sequenzen erkennen läßt.

3. DNA-Methylierung des Promotors

Durch die vorangehenden Experimente lässt sich zeigen, dass der dem Exon 1B vorgeschaltete Promotor in den Meningeomzellen aktiv ist. Es wird nun analysiert, ob der Promotor methyliert ist. Eine DNA-Methylierung des für die Transkription verwendeten Promotors würde zu seiner Inaktivierung führen. Damit könnte man einen Verlust der Enzymaktivität erklären.

Zur Untersuchung, ob eine DNA-Methylierung des Promotors vorliegt, wählt man die Methode der Bisulfitbehandlung der DNA (vgl. Kap. III.2.4.1 und Abb. 1) und deren an-

schließende Sequenzierung. Die Bisulfitbehandlung und nachfolgende Sequenzierung erlauben die Differenzierung zwischen nichtmethylierten und methylierten „CpG-islands“. Der Promotor der ALPL ist sehr CG-reich. Die CG-Regionen werden durch die Bisulfitbehandlung umgewandelt, wenn sie nichtmethyliert sind und bleiben unverändert, wenn sie methyliert sind. Somit weiss man nicht im voraus, wie die Sequenz nach der Behandlung an den CG-Regionen aussieht. Die Primer, die gewählt werden, um den Promotorbereich durch PCR zu amplifizieren, dürfen deswegen keine CG's in ihrer Sequenz enthalten. Zwischen den CG's sind oftmals Sequenzen von nur wenigen Basen. Da die Primer aber aus einer Mindestzahl an Basen bestehen müssen, schränkt dies die Möglichkeit der Wahl und Position der Primer ein. Aufgrund dieser Kriterien, die bei der Primerwahl beachtet werden müssen, ist es schwierig, den gesamten Promotor zu erfassen. Deshalb wurde nur ein kleiner Teil des Promotorbereichs auf Methylierung analysiert, der diese Kriterien erfüllt. Dafür werden die beiden Primer MetPromI und MetPromK eingesetzt. Primer MetPromI ist der 5'-Primer, Primer MetPromK der 3'-Primer (siehe Abbildung 19). Die Primer wurden nach Vorgabe synthetisiert (siehe Kap. 1.6, Seite 18).

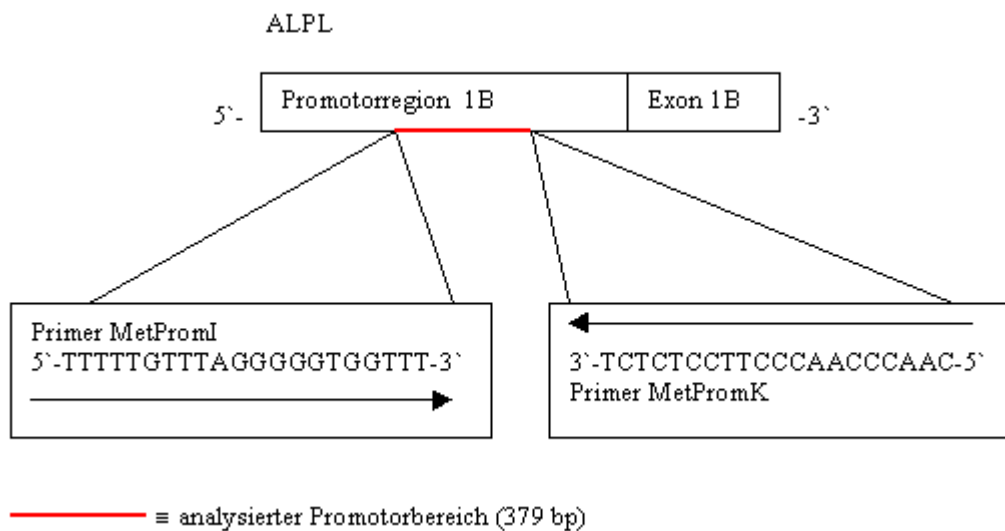


Abb. 19:

Lage der Primer in der Region des Bone Promotors. Die vorgeschaltete Promotorregion und das Exon 1B der ALPL und die Lage und Richtung der Primer MetPromI und MetPromK, die zur Gewinnung des Promotorabschnitts verwendet werden, sind gezeigt.

Die Kombination dieser beiden Primer ergibt ein Produkt mit einer Länge von 379 bp.

Die Abbildung 20 zeigt die Sequenz dieses Produktes bzw. Promotorabschnitts, wie sie sich nach Bisulfitbehandlung und DNA-Methylierung aller 16 potentiellen Methylierungsstellen (CG) darstellen würde.

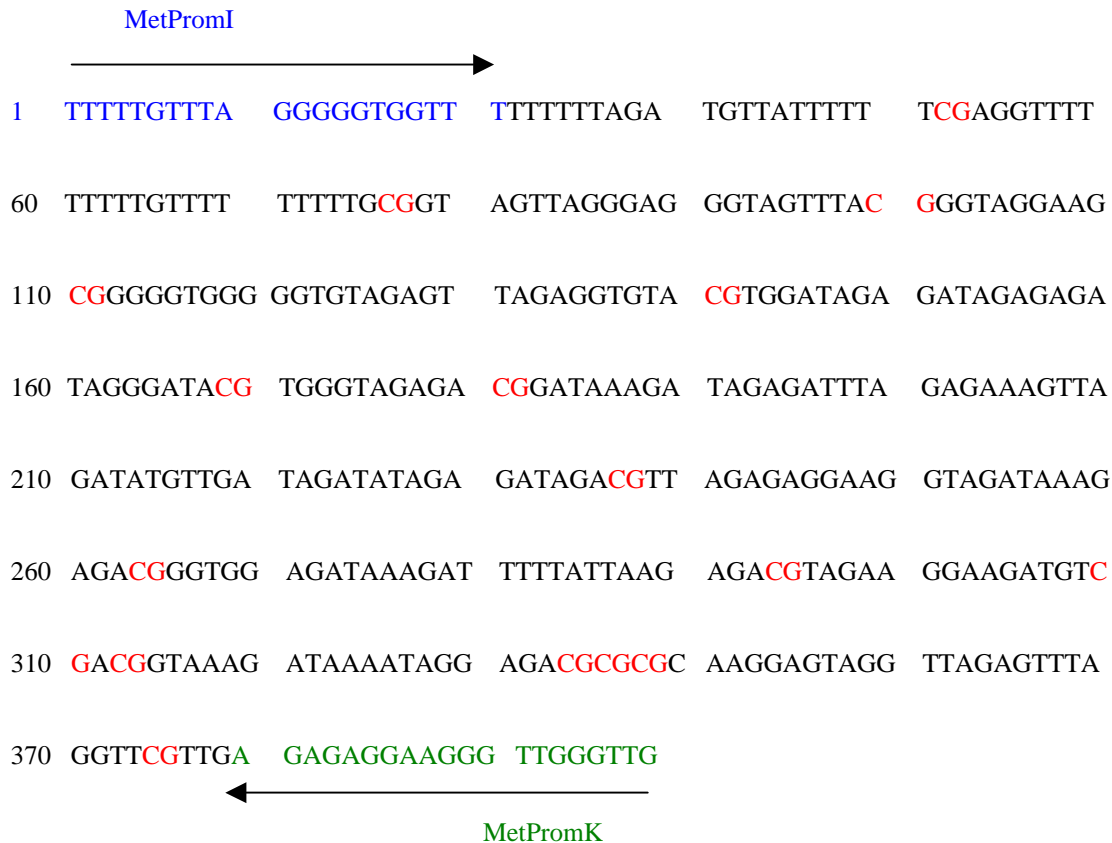


Abb. 20

Sequenz des Promotorbereichs der ALPL, die mit den Primern MetPromI und MetPromK gewonnen werden kann. Das Produkt hat eine Länge von 379 bp. Die Basenabfolge entspricht der Sequenz nach Bisulfitbehandlung und Methylierung aller 16 potentiellen Methylierungsstellen. Die potentiell methylierten CGs sind rot markiert. Die Primer sind mit ihrer Sequenz und Richtung eingezeichnet.

Für die Experimente wurden die fünf karyotypisierten Meningeome T 4557, T 4633, T 4768, T 5327 und T 5416 (vgl. Tab. 1, S.13), die einen Allelverlust bezüglich 1p aufweisen, verwendet. Somit konnte man den Promotorbereich der ALPL auf dem erhaltenen Allel auf 1p untersuchen. Als Vergleich dazu wurde auch der Promotor der ALPL von genomischer DNA untersucht, die aus Blut von gesunden Spendern isoliert wurde.

Nach der Isolierung aus Blut von gesunden Spendern und nach Bisulfitbehandlung wurde genomische DNA mit den Primern MetPromI und MetPromK durch PCR amplifiziert, um den Promotorbereich der ALPL (siehe Abb. 20) als PCR-Produkt zu erhalten.

Es gab jedoch Probleme, die bisulfitbehandelte DNA zu amplifizieren, so dass sich mehrmals bei der PCR keine DNA-Banden zeigten. Daher musste die PCR optimiert werden. Es wurden verschiedene Zusatzlösungen und unterschiedliche Enzyme eingesetzt und die Annealingtemperatur variiert, indem ein Temperaturgradient gewählt wurde (vgl. Kap. III.2.7.2.A).

Nachdem die PCR mit jeweils unterschiedlichen Kombinationen der Versuchskomponenten durchgeführt wurde, erfolgte eine Gelelektrophorese, anhand derer die PCR-Produkte beurteilt werden konnten.

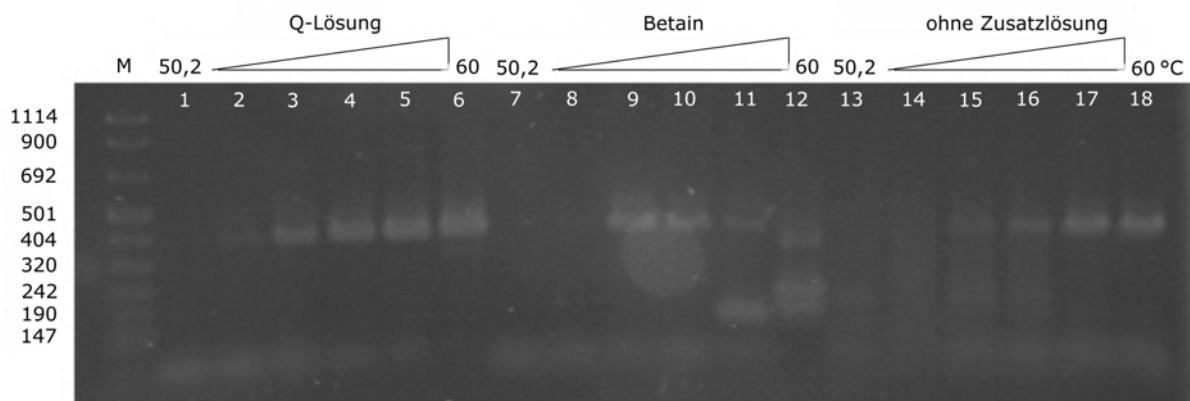


Abb. 21:

Agarosegel nach Gelelektrophorese der PCR mit bisulfitbehandelter genomischer DNA, wobei die Komponenten der PCR variiert wurden. Der Temperaturgradient reicht von 50,2 bis 60°C.

1-6: Hier wird die Q-Lösung als Zusatzlösung gewählt. 7-12: Die Zusatzlösung ist Betain. 13-18: So stellen sich die Produkte ohne Zusatzlösung dar. M = Der Molekulargewichtsstandard VIII von Roche ist verwendet.

Die Abbildung 21 zeigt das Agarosegel nach Gelelektrophorese der PCR mit bisulfitbehandelter genomischer DNA. Der Temperaturgradient startet bei 50,2°C und reicht bis 60°C. Die Zwischenstufen entsprechen 51,5°C, 54°C, 55,5°C und 58,1°C. In den niedrigen Temperaturbereichen (50,2°C und 51,5°C) stellt sich gar keine DNA-Bande dar. In den Laufspuren der Temperaturen ab 54°C ist der Promotorbereich der ALPL mit einer Länge von 379 bp zu erkennen. Ohne Zusatzlösung und bei der Verwendung von Betain (vgl. Kap. 2.7, S. 29) sind die Banden schwach sichtbar. Als Zusatzlösung eignet sich die Q-Lösung (vgl. Kap. 2.7, S. 30) am besten, da hier die Banden intensiv dargestellt werden können. Mit einer Annealingtemperatur von 60°C erzielt man die besten Banden. Die HotStarTaq®DNA-Polymerase hat sich als geeignetes Enzym herausgestellt.

Es werden zwei verschiedene Methoden zur Klonierung eingesetzt, um zu sehen, welche Methode besser für die Methylierungsuntersuchungen geeignet ist. Der Acceptor™Vector Kit (Novagen) mit dem Vektor pST-Blue1 wird verwendet und der TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) mit dem Vektor pCR4-TOPO.

3.1 Promotor der normalen Kontroll-DNA (pST-Blue1)

Nach optimierter PCR und Gelelektrophorese in einem präparativen Agarosegel werden die Banden ausgeschnitten. Die Banden werden aus dem Gel isoliert und in den Vektor pST-

Blue1 einkloniert. Ob die Kolonien das gewünschte Insert aufgenommen haben, überprüft man mittels PCR (vgl. Kap. III.2.7.2.B). Die positiven Klone werden in Flüssigkultur vermehrt und daraus die Plasmid-DNA isoliert. Danach erfolgt die Sequenzierung der erfolgreich isolierten Plasmid-DNA. Es resultieren die Ergebnisse, die in Abbildung 22 dargestellt sind.

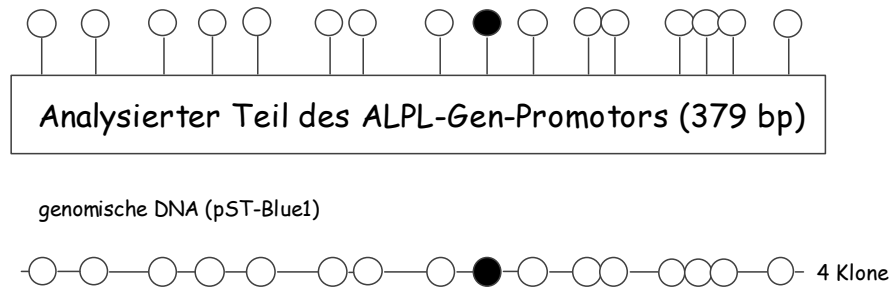


Abb. 22:

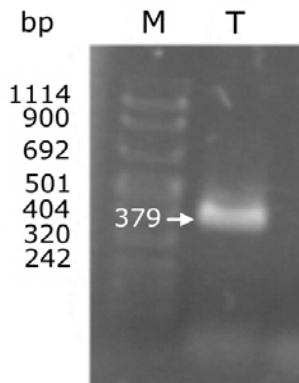
Schematische Darstellung der 16 potentiellen Methylierungsstellen des analysierten Promotorbereichs der ALPL jeweils als Kügelchen. Weiße Kügelchen entsprechen nichtmethylierten CGs, schwarze Kügelchen stellen methylierte CGs dar. Von vier Klonen der bisulfitbehandelten genomischen DNA, die mit pST-Blue1 kloniert wurde, weisen alle Klone eine Methylierungsstelle an der gleichen Position auf.

Abbildung 22 zeigt die Methylierungsstellen des analysierten Promotorbereichs der ALPL. Jedes Kügelchen stellt ein CG dar. Nichtmethylierte CGs sind als weiße Kügelchen dargestellt, methylierte CGs als schwarze. Die unterschiedlichen Abstände der Kügelchen entsprechen verhältnismäßig den Abständen der CGs in der Promotorsequenz. Sich berührende Kugeln stellen benachbarte CGs dar. Alle untersuchten Klone aus normaler Kontroll-DNA (4 von 4) sind an einer Stelle methyliert.

3.2 Promotor der Tumor-DNA (pST-Blue1)

Nachdem die DNA aus Gesunden isoliert und hinsichtlich der Methylierungsstellen des ALPL-Promotorbereichs untersucht wurde, werden nun verschiedene Meningeome analysiert, die einen Allelverlust hinsichtlich 1p aufzeigen.

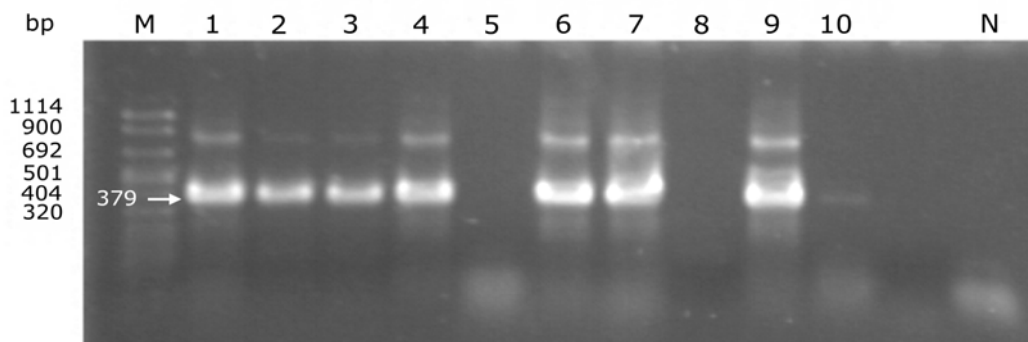
Aus primären Zellkulturen der ausgewählten Meningeome (T 4557, T 4633, T 4768, T 5327, T 5416) mit Verlust von 1p wird DNA isoliert und der Bisulfitbehandlung unterzogen. Mit Hilfe der PCR (vgl. Kap. III.2.7.2.A) wird der Promotorbereich der ALPL amplifiziert, wobei die Primer MetPromI und MetPromK eingesetzt werden.

**Abb. 23:**

Agarosegel nach Gelelektrophorese der PCR mit bisulfitbehandelter DNA des Meningeoms T 5327. T = In Laufspur T sieht man als Bande den Promotorbereich der ALPL von T 5327.

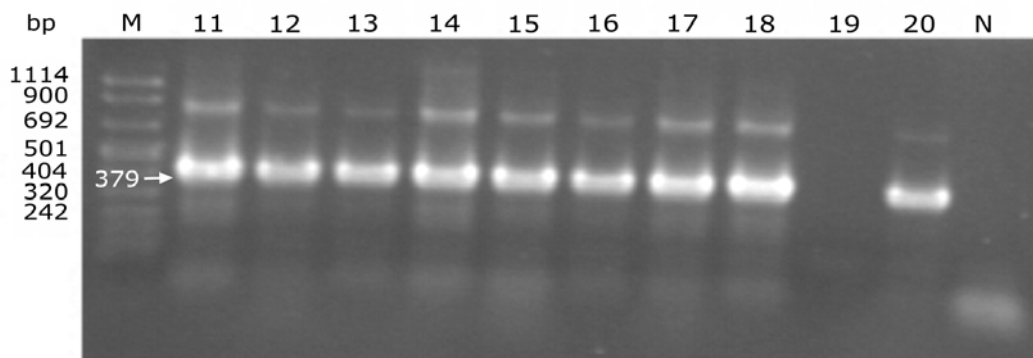
M = Der Molekulargewichtsstandard VIII von Roche

Die Abbildung 23 zeigt in Laufspur T den Promotorbereich der ALPL des Meningeoms T 5327 mit 379 bp. Aus dem präparativen Agarosegel wird die Tumor-DNA isoliert und in den Vektor pST-Blue1 kloniert. Mittels PCR unter Verwendung der Taq-DNA-Polymerase und den Primern MetPromI und MetPromK testet man die nach dem Ausplattieren gewachsenen Klone, ob sie die Tumor-DNA als Insert aufgenommen haben. Es werden 20 Klone überprüft.

**Abb. 24:**

Agarosegel (1,5%) nach Gelelektrophorese der Kontroll-PCR der Klone 1-10 des Meningeoms T 5327. 1-4, 6, 7, 9: Jede Laufspur zeigt als Bande das Insert eines bestimmten Klons. 5, 8, 10: In diesen Laufspuren ist keine Bande sichtbar; die entsprechenden Klone tragen kein Insert. N = Negativkontrolle, bei der PCR wurde keine DNA verwendet. M = Molekulargewichtsstandard VIII von Roche

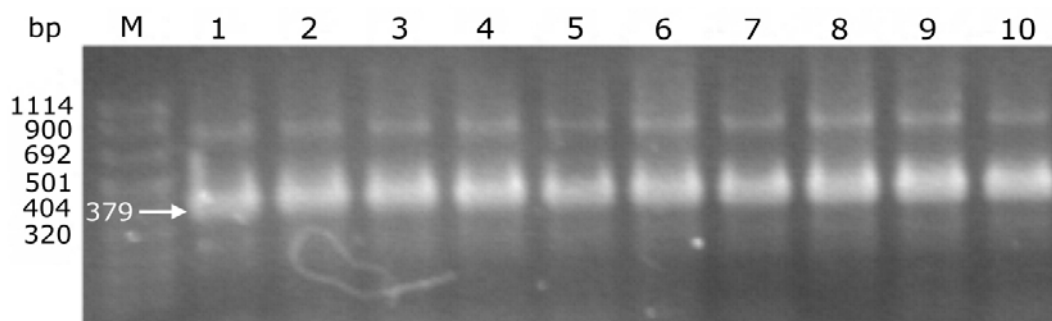
Die Abbildung 24 zeigt das Ergebnis der Kontroll-PCR der Klone 1-10 des Meningeoms T 5327. In den Laufspuren 1-4, 6, 7 und 9 ist das 379 bp lange Insert der jeweiligen Klone als Bande zu erkennen. Somit sind die Klone 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 9 positiv. Die Laufspuren 5, 8 und 10 zeigen keine DNA-Bande. Dies bedeutet, dass die Klone 5, 8 und 10 das Insert nicht aufgenommen haben und negativ sind.

**Abb. 25:**

Agarosegel (1,5%) nach Gelelektrophorese der Kontroll-PCR der Klone 11-20 von T 5327. 11-18, 20: Jede Laufspur zeigt das Insert eines bestimmten Klons als Bande. 19: In dieser Laufspur ist kein Insert als Bande sichtbar, somit ist Klon 19 negativ. N = Negativkontrolle; M = Molekulargewichtsstandard VIII von Roche

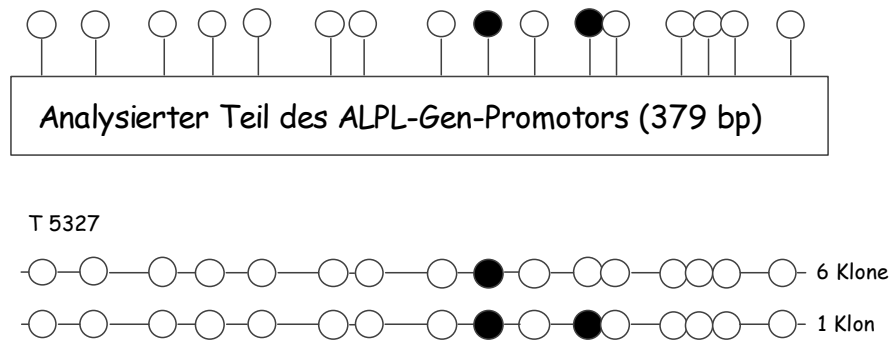
Abbildung 25 zeigt das Agarosegel nach Gelelektrophorese der Kontroll-PCR der Klone 11-20 des Meningeoms T 5327. In den Laufspuren 11 bis 18 und 20 ist jeweils das Insert als DNA-Bande sichtbar. Dies bedeutet, dass die Klone 11 bis 18 und 20 positiv sind. In Laufspur 19 ist keine Bande sichtbar. Klon 19 trägt kein Insert und ist negativ.

Von zehn der 16 positiven Klone wird die Plasmid-DNA isoliert. Zur Kontrolle, ob die Plasmidisolierung erfolgreich verlaufen ist, wird nochmals eine PCR mit der Taq-DNA-Polymerase und den Primern MetPromI und MetPromK durchgeführt.

**Abb. 26:**

Agarosegel (1,5%) nach Gelelektrophorese der Kontroll-PCR der Plasmidisolierung. 1-18: In jeder Laufspur ist die isolierte Plasmid-DNA des jeweiligen Klons als Bande dargestellt. M = Molekulargewichtsstandard VIII von Roche

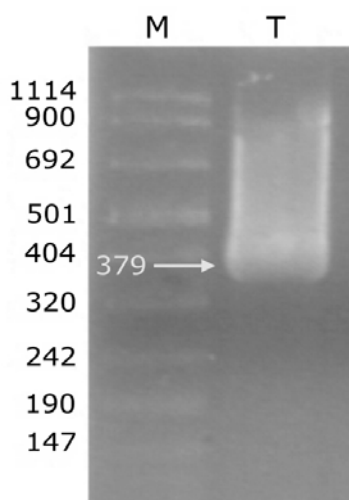
Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Kontroll-PCR der Plasmidisolierung. In jeder Laufspur ist die Plasmid-DNA als Bande sichtbar und kann zum Sequenzieren verwendet werden. Die Sequenzierung gelingt bei der DNA von sieben Klonen.

**Abb. 27:**

Schematische Darstellung der Methylierungsstellen des analysierten Promotorbereichs. Die weißen Kügelchen stellen die nichtmethylierten CGs dar, die schwarzen Kügelchen stehen für methylierte CGs. Sechs Klone des Meningeoms T 5327 weisen jeweils eine Methylierungsstelle an der gleichen Position auf. Ein Klon des Tumors zeigt zwei methylierte CGs.

In Abbildung 27 ist das Ergebnis der Sequenzierung hinsichtlich der Methylierungsstellen von sieben Klonen des Meningeoms T 5327 dargestellt. Die nichtmethylierten CGs sind als weiße Kügelchen dargestellt. Sechs der sieben Klone haben eine Methylierungsstelle, ein Klon hat zwei methylierte CGs, die jeweils als schwarze Kügelchen dargestellt sind. Ein methyliertes CG davon entspricht der Methylierungsstelle der anderen sechs Klone (Position 9), zusätzlich befindet sich ein methyliertes CG an Position 11.

Analog zur Vorgehensweise bei Meningeom T 5327 wird die DNA aus den Meningeomen T 4557, T 4633, T 4768 und T 5416 isoliert und es erfolgt die gezielte Basenumwandlung mit Hilfe der Bisulfitbehandlung. Danach wird der Promotorbereich mittels PCR (vgl. Kap. III.2.7.2.A) und Einsatz der Primer MetPromI und MetPromK vervielfältigt.

**Abb. 28:**

Agarosegel (3%) nach Gelelektrophorese der PCR mit bisulfit-behandelter DNA des Meningeoms T 4633. T = In Laufspur T ist der Promotorbereich der ALPL (379 bp) aus T 4633 dargestellt. M = Molekulargewichtsstandard VIII von Roche

Abbildung 28 zeigt das Agarosegel nach Gelelektrophorese der PCR mit bisulfitbehandelter DNA des Meningeoms T 4633. In Laufspur T ist mit einer Länge von 379 bp der Promotorbereich der ALPL des Meningeoms T 4633 als DNA-Bande dargestellt.

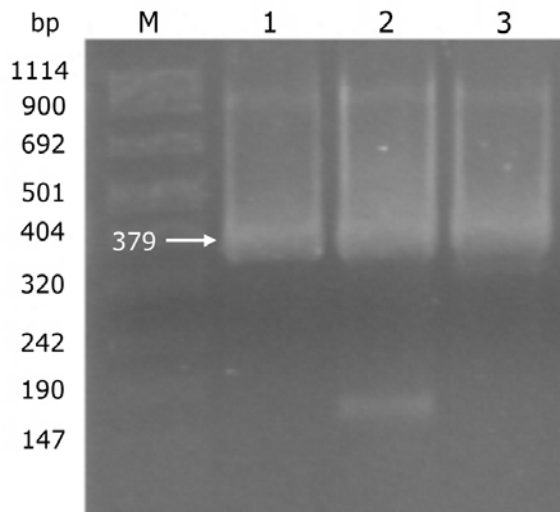
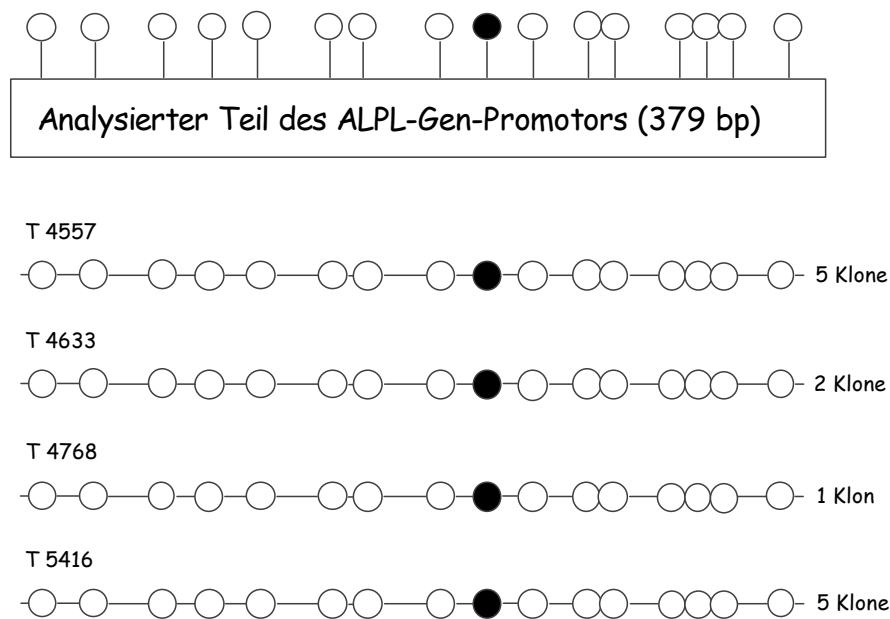


Abb. 29:

Agarosegel (3%) nach Gelelektrophorese der PCR mit bisulfitbehandelter DNA von T 4557, T 4768 und T 5416. 1: In Laufspur 1 ist der Promotorbereich der ALPL aus T 4557 dargestellt. 2: Laufspur 2 zeigt den Promotorbereich der ALPL aus T 4768. 3: In Laufspur 3 sieht man den Promotorbereich der ALPL aus T 5416. M = Molekulargewichtsstandard VIII von Roche

Abbildung 29 zeigt ein Agarosegel nach Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit bisulfitbehandelter DNA. Die Banden der Laufspuren 1 bis 3, die auf dem Gel zu sehen sind, stellen den ALPL-Promotorbereich aus den Meningeomen T 4557 (Laufspur 1), T 4768 (Laufspur 2) und T 5416 (Laufspur 3) dar.

Die Tumor-DNA wird aus den präparativen Agarosegelen isoliert und in den Vektor pST-Blue1 inkloniert. Ein Teil der gewachsenen Klone wird mit PCR (vgl. Kap. III.2.7.2.B) unter Gebrauch der Taq-DNA-Polymerase und der Primer MetPromI und MetPromK in Bezug auf die Aufnahme der Tumor-DNA als Insert überprüft. Die getesteten Klone enthalten alle das Insert und sind hiermit positiv. Aus den Klonen erfolgt die Plasmidisolierung, an die sich die Sequenzierung der Plasmid-DNA anschließt. Im Folgenden werden die Sequenzierergebnisse von Klonen der bisulfitbehandelten Meningeom-DNA von T 4557, T 4633, T 4768 und T 5416 präsentiert (siehe Abbildung 30). Die Anzahl der Klone pro Tumor variiert, da die Sequenzierung nicht immer und nicht bei allen Klonen erfolgreich war.

**Abb. 30:**

Schematische Darstellung der Methylierungsstellen des analysierten Promotorbereichs der Meningeome T 4557, T 4633, T 4768 und T 5416. Nicht methylierte CGs sind als weiße Kügelchen dargestellt, methylierte als schwarze Kügelchen. Alle Klone dieser Tumoren, die erfolgreich sequenziert werden konnten, weisen jeweils eine Methylierungsstelle an gleicher Position auf.

Die Abbildung 30 zeigt die Sequenzierergebnisse der Klone der bisulfitbehandelten TumordNA der Meningeome T 4557, T 4633, T 4768 und T 5416.

Von Meningeom T 4557 konnten fünf Klone erfolgreich sequenziert werden, von Meningeom T 4633 zwei Klone, von Meningeom T 4768 konnte nur ein Klon sequenziert werden und von Meningeom T 5416 wurden fünf Klone erfolgreich sequenziert. Alle Klone dieser Meningeome (T 4557, T 4633, T 4768, T 5416), bei denen die Sequenzierung erfolgreich war, haben ein methyliertes CG an Position 9.

3.3 Promotor normaler Kontroll-DNA (pCR4-TOPO)

Die bisulfitbehandelte genomische DNA von zwei gesunden Spendern wird als Vergleichsexperiment in den Vektor pCR4-TOPO inkloniert. Mittels PCR wird getestet, ob die Kolonien das gewünschte Insert aufgenommen haben.

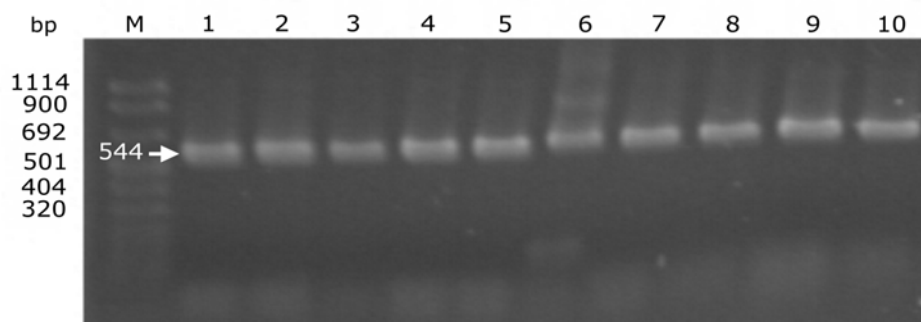
Die Kontroll-PCR der Klone (vgl. Kap. III.2.7.2.B) wird mit der Taq-DNA-Polymerase und Betain als Zusatzlösung durchgeführt. Die auf dem Vektor liegenden Primer M13 forward und M13 reverse werden zur PCR verwendet.

	M13 reverse Primer Stelle				
			→		
201	CACACAGGAA GTGTGTCCTT	ACAGCTATGA TGTCGATACT	CCATGATTAC GGTACTAATG	GCCAAGCTCA CGGTTTCGAGT	
241	GAATTAACCC CTTAATTGGG	TACTAAAGG AGTCATTTC	GACTAGTCCT CTGATCAGGA	GCAGGTTTAA CGTCCAAATT	
281	ACGAATTCGC TGCTTAAGCG	CCTT GGAA-	PCR- Produkt	-AGGGC TTCCCG	GAATTCGCGG CTTAAGCGCC
311	CCGCTAAATT GGCGATTTAA	CAATTCGCC GTAAAGCGGG	TATAGTGAGT ATATCACTCA	CGTATTACAA GCATAATGTT	
	M13 forward Primer Stelle				
			←		
351	TTCACTGGCC AAGTGACCGG	GTCGTTTAC CAGCAAAATG			

Abb. 31:

Ausschnitt des Vektors pCR4-TOPO mit den Primern M13 forward und M13 reverse und der Klonierungsstelle mit Lage des PCR-Produktes.

Die Abbildung 31 zeigt einen Ausschnitt des Vektors pCR4-TOPO mit der Sequenz der Klonierungsstelle. Die beiden Primer M13 forward und M13 reverse sind in ihrer Lage und Richtung dargestellt. Der Promotorbereich der ALPL als Insert hat wiederum eine Länge von 379 bp. In der Kontroll-PCR der Klone mit den Primern M13 forward und M13 reverse ist das Produkt länger als 379 bp, da ein Teil des Vektors mitamplifiziert wird. Die Vektorsequenz entspricht einer Länge von 165 bp. Diese Größe und die Größe des Promotorbereichs ergeben zusammen ein Produkt mit einer Länge von 544 bp.

**Abb. 32:**

Agarosegel (1,5%) nach Gelelektrophorese der Kontroll-PCR der Klone.

1-10: In den Laufspuren sind die Produkte jeweils unterschiedlicher Klone zu sehen. Die Bande in Spur 1 entspricht dem Insert und einem Teil der Vektorsequenz des Klon 1, die Bande in Spur 2 dem Insert und einem Teil der Vektorsequenz des Klon 2, usw.; M = Molekulargewichtsstandard VIII von Roche

In Abbildung 32 ist das Ergebnis der Kontroll-PCR der Klone dargestellt. In jeder Laufspur ist eine DNA-Bande sichtbar, deren Größe zwischen den Markerbanden 692 bp und 501 bp liegt und einer Länge des PCR-Produktes von 544 bp entspricht. Die DNA-Banden stellen jeweils den Promotorbereich der ALPL und den Vektorausschnitt dar, die zusammen dem Produkt der Größe 544 bp entsprechen und in jedem getesteten Klon vorhanden sind. Dies bedeutet, dass jeder Klon das Insert trägt und somit positiv ist. Die positiven Klone werden in Flüssigkultur vermehrt. Daraus isoliert man die Plasmid-DNA. Um zu testen, ob die Plasmidisolierung erfolgreich verlaufen ist, führt man eine Kontroll-PCR mit der Taq-DNA-Polymerase und der Zusatzlösung Betain durch. Es werden die Primer MetPromI und MetPromK eingesetzt. Wenn die erhaltenen PCR-Produkte mit den Primern MetPromI und MetPromK eine Größe von 379 bp haben, ist die Plasmidisolierung erfolgreich gewesen.

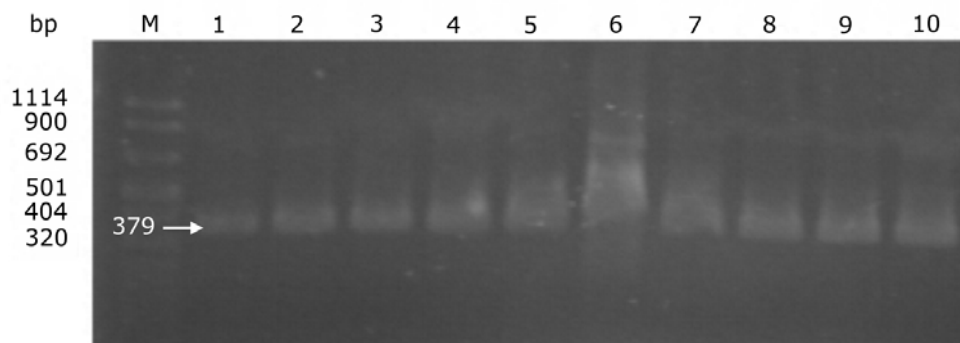
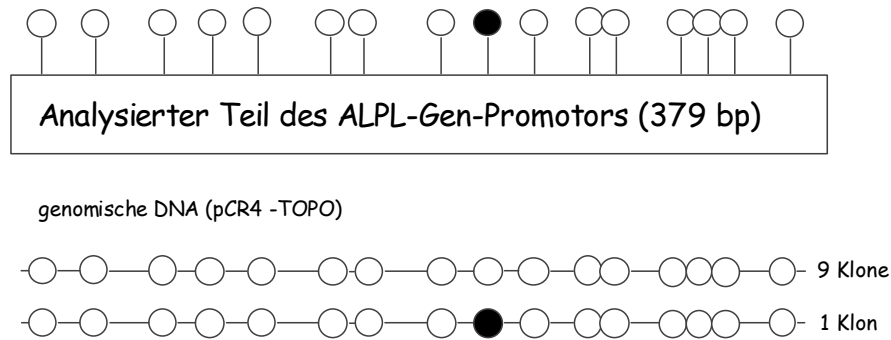


Abb. 33:

Agarosegel (1,5%) nach Gelelektrophorese der Kontroll-PCR der isolierten Plasmide, wobei sich in jeder Laufspur ein Produkt mit 379 bp darstellt. 1-10: In Laufspur 1 ist die Plasmid-DNA von Klon 1 zu sehen, in Laufspur 2 die Plasmid-DNA von Klon 2, usw.; M = Molekulargewichtsstandard VIII von Roche

In Abbildung 33 ist das Agarosegel nach Gelelektrophorese der Kontroll-PCR der isolierten Plasmid-DNA zu sehen. Jedes PCR-Produkt entspricht einer Länge von 379 bp und stellt den amplifizierte Promotorbereich der ALPL dar. In jeder Laufspur zeigt sich die isolierte Plasmid-DNA eines bestimmten Klons.

Die Plasmid-DNA wird nun mit SequiThermEXCEL™II sequenziert. In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der Sequenzierung hinsichtlich der Methylierungsstellen aufgeführt.

**Abb. 34:**

Schematische Darstellung der 16 potentiellen Methylierungsstellen des analysierten Promotorbereichs der ALPL jeweils als Kügelchen. Weiße Kügelchen entsprechen nichtmethylierten CGs, schwarze Kügelchen stehen für methylierte CGs. Von zehn Klonen der bisulfitbehandelten genomischen DNA, die mit pCR4-TOPO kloniert wurde, weisen neun Klone keine Methylierungsstelle auf. Bei einem Klon kann ein methyliertes CG nachgewiesen werden.

Die Abbildung 34 zeigt die 16 potentiellen Methylierungsstellen des analysierten Promotorbereichs der ALPL. Jedes Kügelchen stellt ein CG dar. Die weißen Kügelchen stellen nicht methylierte CGs dar, die schwarzen Kügelchen methylierte CGs. Von den zehn getesteten Klonen weisen neun keine Methylierung auf. Ein Klon besitzt ein methyliertes CG.

Nur einer von zehn Klonen zeigte eine Methylierungsstelle nach Klonierung mit dem TOPO TA Cloning®Kit. Bei Klonierung mit diesem Kit erhält man zwei unterschiedliche Klone (Abb. 34), bei dem Acceptor™Vector Kit nur denjenigen mit einer Methylierungsstelle. Für die Fragestellung der Methylierung bei der Tumor-DNA wurde der Acceptor™Vector Kit verwendet. Da der TOPO TA Cloning®Kit Klone mit verschiedenen Methylierungsmustern erzeugt, sollte die Tumor-DNA ebenfalls mit diesem Klonierungssystem untersucht werden.

V. Diskussion

Die Meningeome mit Deletion eines Chromosomenarms 1p mit dem Genort der ALPL stellen die Tumorgruppe mit der höchsten Rezidivrate dar (KETTER et al., 2001). In der Studie von Zang et al. (2001) an 394 Meningeomen ergibt sich eine hohe Korrelation zwischen einer Deletion von 1p und einem kompletten oder auf einzelne Areale begrenzten Aktivitätsverlust der ALPL in den Tumorschnitten. Die Studien von Zang et al. (1982) und Niedermayer et al. (1997) zeigen eine starke homogene Expression des Enzyms in niedriggradigen Meningeomen, zunehmenden Expressionsverlust in verschiedenen Arealen in atypischen Meningeomen und kompletten Verlust in anaplastischen Meningeomen. Der Verlust des kurzen Arms eines Chromosoms 1 bedeutet, dass noch eine Kopie in den Zellen vorhanden ist. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, warum trotz des verbleibenden Allels der ALPL keine Aktivität mehr nachzuweisen ist. Dazu werden molekulare Mechanismen analysiert, die zur Inaktivierung führen könnten.

Zuerst wurde daher in dieser Arbeit untersucht, ob es im ALPL-Transkript Mutationen gibt. Einerseits könnte durch eine Mutation ein Stop-Codon entstehen mit daraus folgendem verfrühtem Abbruch der Transkription des Gens und Synthesestop des ALPL-Enzyms mit resultierendem Funktionsverlust. Andererseits könnte ein Nukleotidaustausch durch Mutation zur Veränderung der Aminosäuresequenz des ALPL-Proteins führen, wodurch sich ebenfalls ein Funktionsverlust des Enzyms ergeben könnte.

Die ermittelten cDNA-Sequenzen der analysierten ALPL-Transkripte von T 5502 (WHO-Grad I, ohne 1p-Verlust, ALPL positiv), T 5327 (WHO-Grad II, 1p-Verlust, ALPL negativ) und T 5416 (WHO-Grad II, 1p-Verlust, ALPL negativ) wurden dazu mit Datenbankeinträgen verglichen.

In unseren Experimenten zeigten sich bei der Sequenzierung der ALPL-Transkripte von drei Tumoren die gleichen Sequenzen. Der Vergleich mit Datenbankeinträgen für Alkalische Phosphatase zeigt acht Nukleotidpolymorphismen (SNPs = single nucleotide polymorphisms). Dabei ergeben sich fünf Aminosäurevariationen. Es gibt zwei Nukleotidpolymorphismen, bei denen aufgrund des degenerierten genetischen Codes keine Aminosäureänderungen eintreten, da verschiedene Codons für dieselbe Aminosäure kodieren. Die Nukleotidpolymorphismen entsprechen entweder der Aminosäuresequenz der ALPL-Sequenz X14174 oder AB011406 aus der GenBank für Alkalische Phosphatase. An Basenstelle 312, 787 und 876 entsprechen alle drei Meningeome dem Datenbankeintrag AB011406 auf. An Basenstelle 865, 1080, 1083 und 1336 liegen bei den drei Meningeomen

Basen vor, die dem Datenbankeintrag X14174 entsprechen. Somit ist das Muster der Nukleotidpolymorphismen bei allen drei Meningeomen identisch.

Es gibt keinen Unterschied zwischen den Transkripten des ALPL-positiven Meningeoms (T 5502) und der ALPL-negativen Meningeome (T 5327 und T 5416).

In unseren Experimenten haben sich im ALPL-Gen keine Mutationen nachweisen lassen. Somit sind in diesen Tumoren Mutationen nicht für den Enzymverlust bzw. den Verlust der Enzymaktivität verantwortlich.

Von anderen Autoren wurden andere Tumorsuppressorgene, die auf 1p lokalisiert sind, auf Mutationen analysiert: RAD54L (ein DNA-Reparaturgen, früher bekannt als hRAD54) (MENDIOLA et al., 1999) und p18^{INK4C} (ein CDKN-Gen = cyclin-dependent kinase inhibitor-Gen) (LEURAUD et al., 2000; SANTARIUS et al., 2000; BOSTRÖM et al., 2001), beide lokalisiert auf 1p32 und TP73 (ein TP53 homologes Gen, lokalisiert auf 1p36.33) (LOMAS et al., 2001). Mendiola et al. (1999) untersuchten 29 Meningeome mit 1p-Deletion auf RAD54L-Mutationen, Leuraud et al. (2000) analysierten 19 Meningeome mit 1p-Verlust und Santarius et al. (2000) 40 Meningeome mit LOH des p18-Gen-Locus. Es wurden bei 67 untersuchten Meningeomen keine inaktivierenden Mutationen in diesen Genen gefunden, außer in einem atypischen Meningeom mit 1p-Verlust ein Austausch von Cytosin durch Thymin (R68X) im p18^{INK4C}-Gen (BOSTRÖM et al., 2001). Bei weiteren 30 analysierten Meningeomen fand sich in einem Fall mit interstitieller Deletion von 1p ein Austausch von Adenin durch Guanin (N204S) in Exon 5 von TP73 (LOMAS et al., 2001).

Da keine Mutationen des ALPL-Gens in den von uns untersuchten Meningeomen vorliegen, wird in dieser Arbeit eine andere Möglichkeit der molekularen Veränderung des ALPL-Gens untersucht.

Eine epigenetische Veränderung in Tumoren, die zur Genrepression führt, ist beispielsweise die DNA-(Hyper)Methylierung, die bei einer Vielzahl von Tumorsuppressorgenen als Inaktivierungsmechanismus bekannt ist (BAYLIN et al., 1998). Angriffspunkt der DNA-Methylierung sind unmethylierte sogenannte „CpG-islands“, die in den Promotorregionen der Gene lokalisiert sind (BAYLIN et al., 1998). Daher wurde von uns in den Meningeomen der Promotor des ALPL-Gens auf (Hyper)Methylierung analysiert.

Die Alkalische Phosphatase besitzt zwei Promotoren und es liegt eine gewebeabhängig unterschiedliche Expression vor. Es mußte zuerst geklärt werden, welcher Promotor in den Meningeomzellen aktiv ist und welcher mRNA-Typ dementsprechend exprimiert wird, entweder die Leber-Form (liver-type) oder die Knochen-Form (bone-type) der ALPL.

In den hierauf untersuchten Meningeomen T 5327 (WHO-Grad II, 1p-Verlust, ALPL-negativ) und T 5416 (WHO-Grad II, 1p-Verlust, ALPL-negativ) finden sich ausschließlich Transkripte mit Exon 1B, das heißt, der Promotortyp der Knochen-Form ist in den Meningeomzellen aktiv. Da dieser Promotor im Vergleich zur Promotorsequenz des Exons 1L CG-reicher ist, sollte untersucht werden, ob eine Änderung in der Methylierung vorliegt und es dadurch zu seiner Inaktivierung und zum Funktionsverlust des ALPL-Enzyms kommen könnte.

Auch in der Maus, bei der das ALPL-Gen auf Chromosom 4 lokalisiert ist, besteht das ALPL-Gen aus 12 Exons wie beim Menschen. In der erwachsenen Maus wurden zwei verschiedene Transkripte gefunden, die von verschiedenen ersten Exons (Exon 1A und Exon 1B) und von der gleichen kodierenden Sequenz abstammen (TERAO et al., 1990; STUDER et al., 1991). Der Promotor, der dem Exon 1A (E1A) vorgeschaltet ist, ist der dominierende Promotor, der während der Entwicklung der Maus aktiv ist (ESCALANTE-ALCALDE et al., 1996).

Bei der Maus geht man davon aus, dass DNA-Methylierung des E1A-ALPL-Promotors an der Regulation der ALPL-Expression involviert ist (ESCALANTE-ALCALDE et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Analyse des Promotorbereichs der Alkalischen Phosphatase zwei unterschiedliche Klonierungssysteme verwendet, um festzustellen, welches für die Methylierungsuntersuchungen am geeignetsten ist.

Zur Kontrolle wurde die ALPL-Promotor-DNA aus Blut von gesunden Spendern isoliert und analysiert.

Die Sequenzierungsergebnisse nach Klonierung einer Promorteilsequenz von 379 bp mit dem Acceptor™Vector Kit zeigen, dass alle Klone der normalen DNA an einer von 16 möglichen Methylierungsstellen eine Methylierung aufweisen.

Im Vergleich dazu ergeben die Sequenzierungen nach Klonierung mit dem TOPO TA Cloning®Kit, bei 9 von 10 der Klone aus normaler DNA keine DNA-Methylierung. Nur ein Klon zeigt eine einzelne CG-Methylierung.

Die beiden Klonierungssysteme zeigen also bei diesem Experiment Unterschiede im Methylierungsmuster der untersuchten Klone.

Fünf verschiedene Meningeome mit 1p-Verlust (T 4557, T 4633, T 4768, T 5327 und T 5416) wurden auf Promotor-(Hyper)Methylierung des verbliebenen Allels untersucht, um eventuelle tumorspezifische Promotorveränderungen aufzudecken.

Unsere Ergebnisse zeigen nach Klonierung mit dem Acceptor™Vector Kit, bei allen sequenzierten Klonen aller Tumore eine Methylierung von einem CG. Alle Klone der

Meningeome weisen die Methylierung an der gleichen CG-Position auf. Lediglich bei einem der WHO-Grad II-Tumoren (T 5327) fand sich eine Methylierung an zwei CG-Stellen.

Es ist unwahrscheinlich, dass die bei der Meningeom-DNA gefundene geringe Methylierung der Promotorregion für deren Inaktivierung ausreicht, zumal die Sequenzierung normaler DNA mit dem gleichen Kit ebenfalls jeweils eine Methylierung in einer CG-Position ergeben hat. Es gibt nur einen Klon des Tumors T 5327, bei dem zwei Methylierungsstellen (12,5%) vorliegen und der somit eine stärkere Methylierung aufweist als die DNA von gesunden Spendern (6,25%).

Das Vergleichsexperiment mit dem anderen Klonierungskit (TOPO TA Cloning®Kit) zeigte auch in der Normal-DNA einen Klon, der an einer CG-Position methyliert ist und zwar an selber Stelle wie die Tumor-DNA. Zwar ist eine monoallelische Inaktivierung des ALPL-Gens auch bei einem gesunden Blutspender nicht auszuschließen; diese Frage und auch die Frage, ob die gefundene geringe Methylierung der Tumor-DNA für die Inaktivierung der Promotorregion ausreicht, ist jedoch aufgrund der kleinen Anzahl der untersuchten Meningeome mit dieser Arbeit nicht zu beantworten. Wichtiger erscheint jedoch, dass nur ein Teil des Promotorbereichs der ALPL (379 bp) aufgrund der Aufwendigkeit der Methode analysiert wurde und es möglich ist, dass eine stärkere CG-Methylierung im nicht untersuchten Bereich vorliegt.

Es ist bekannt, dass einige Gruppen von Genen durch sogenannte „imprinting centers“ gemeinsam kontrolliert werden können z.B. auf den Chromosomen 11 und 15 (REIK und WALTER, 2001). Da nahezu 80% der imprimierten Gene gekoppelt liegen, erscheint es möglich, dass jeweils noch weitere Gene desselben Chromosoms inaktiviert sind. So ist bekannt, dass TP73 und NOEY (ARHI), beide auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 lokalisiert, monoallelisch exprimiert werden.

In der Studie von Lomas et al. (2004) wurde der Methylierungsstatus von TP73, lokalisiert auf 1p36.33, bei 60 Meningeomen mit und ohne 1p-Verlust untersucht. In 13 Fällen (22%) konnte Hypermethylierung des bestehenden Allels gezeigt werden. Nozaki et al. (2001) fanden aberrante TP73-Methylierung häufiger in Meningeomen mit 1p-Verlust (10 von 30 Fällen = 33%) als in Meningeomen ohne 1p-Verlust (3 von 30 Fällen = 10%). TP73-Hypermethylierung bestand bei 7 von 33 Grad I-Tumoren (21%) und bei 6 von 27 Grad II- und Grad III-Tumoren (22%). Dementsprechend scheint die epigenetische Veränderung von TP73 nicht mit dem Malignitätsgrad der Meningeome zu korrelieren. In einigen malignen

Meningeomen wurde sogar eine erhöhte TP73-Expression beschrieben (NOZAKI et al., 2001).

Das Prinzip des „two-hit“-Mechanismus im Sinne von Deletion des einen und Promotor-Hypermethylierung des anderen Allels für die Inaktivierung von Genen, wie es beim Meningeom also offenbar vorliegt, ist bei vielen anderen Tumorarten beschrieben.

Ein ebenfalls auf dem Chromosomarm 1p lokalisiertes Tumorsuppressorgen RIZ1 (**retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene**, 1p36), spielt eine Rolle bei der Entstehung endokriner Tumore. In Tumoren der Nebenschilddrüse gibt es Veränderungen des RIZ1-Gens zum einen durch heterozygoten Allelverlust (LOH) und zum anderen durch Promotor-Hypermethylierung (CARLING et al., 2003).

Ein mögliches Tumorsuppressorgen in Tumoren des Magens ist das TFF1-Gen (**trefoil factor**). In einer Studie von Carvalho et al. (2002) wurden 90 Magenkarzinome untersucht. Es wurden keine Punktmutationen im TFF1-Gen gefunden. Der Verlust der TFF1-Expression lässt sich auch hier bei einem Teil der analysierten Tumore durch eine Kombination von Deletion (LOH) und Promotor-Hypermethylierung erklären (CARVALHO et al., 2002).

Das FHIT-Gen (**fragile histidine triad gene**), lokalisiert auf Chromosomarm 3p14.2, ist ein mögliches Tumorsuppressorgen beim Mammakarzinom. Yang et al. (2002) untersuchten 46 Tumoren, von denen 31 (67%) aberrante FHIT Protein Expression zeigten. Darunter fanden sich sieben Tumore mit LOH und Hypermethylierung zugleich, bei denen ein kompletter Verlust der FHIT Protein Expression vorlag. Somit führt die biallelische Inaktivierung von FHIT durch Deletion (LOH) und Hypermethylierung zur vollständigen Inaktivierung des FHIT-Gens bei Patientinnen mit Brustdrüsenkarzinomen (YANG et al., 2002).

Der „two-hit“-Mechanismus aus Allelverlust und epigenetischer Veränderung des zweiten Allels für die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen findet sich auch bei nicht kleinzelligen Lungentumoren. Das SEMA3B-Gen (**semaphorin 3B**) wird in 7 von 8 Tumoren, die Kombination aus LOH und Hypermethylierung aufweisen, nicht exprimiert. Nach Behandlung mit dem Demethylierungsmittel 5-Azacytidin zeigt sich die Reexpression des SEMA3B-Gens in den Zelllinien nicht kleinzelliger Lungentumoren (KUROKI et al., 2003).

Um zu testen, ob die gefundene DNA-Methylierung des Promotors der Meningeome zur Genstilllegung ausreicht, kann man die primären Meningeomzellkulturen mit 5-Azacytidin behandeln. 5-Azacytidin wirkt durch Inhibition der DNA-Methyltransferase (JONES PA, 1984). Es hemmt die de novo DNA-Methylierung in Zellen, so dass neu replizierte

Sequenzen, bei denen Methylierung die Transkription behindert hat, transkribiert werden können. In den mit 5-Azacytidin behandelten Zellen müsste dann die ALPL-Expression ansteigen. Sollte sich ein Anstieg der Expression unter Wirkung von 5-Azacytidin nachweisen lassen, würde dies für eine Regulation der Alkalischen Phosphatase durch DNA-Methylierung sprechen, möglicherweise auch in einem Teil des Gens, der in dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

Die Chromatinstruktur kann im Hinblick auf die Inaktivierung von Genen auch eine wichtige Rolle spielen. Eine Modifikation der Chromatinstruktur kann als transkriptioneller Repressor fungieren und somit Einfluss ausüben (ROUNTREE et al., 2001). Hierbei spielen Unterschiede in der Acetylierung von Histonen eine entscheidende Rolle. Acetylierung bzw. Deacetylierung von Lysinen in den amino-terminalen Enden der Kernhistone werden durch die Aktivität von Histon-Deacetylasen (HDACs) und Histon-Acetyltransferasen (HATs) kontrolliert (MARKS et al., 2004). Chromatin, das hypoacetylierte Lysine in Histonen enthält, hat eine erheblich kompaktere Struktur, die die Transkription behindert. Inhibitoren von Histon-Deacetylasen können Chromatin zu einer offenen Struktur konvertieren und dadurch bestimmte Gene aktivieren (MOMPARLER, 2003). Ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Histon-Acetylierung und -Deacetylierung scheint für normales Zellwachstum essentiell zu sein (WATERBORG, 2002).

DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung können auch gemeinsam auftreten und zusammen zur Stilllegung von Genen führen (MOMPARLER, 2003).

Um zu prüfen, ob eine Histon-Deacetylierung als mögliche Inaktivierungsursache der ALPL in Frage kommt, müsste ein in vivo-Experiment mit einem Histon-Deacetylase-Inhibitor, beispielsweise Trichostatin A, durchgeführt werden. Ein Anstieg der Expression unter Wirkung des Trichostatin A würde nachweisen, dass die ALPL-Gen-Repression durch Histon-Deacetylierung bedingt ist.

Eine weitere Möglichkeit zur Inaktivierung des Enzyms wäre eine Inaktivierung der ALPL-mRNA durch RNAi (RNA interference). RNA interference ist ein evolutionär erhaltener Prozeß, bei dem die Expression eines bestimmten Gens post-transkriptionell durch eine antisense-RNA die aus noch unbekanntem Gründen transkribiert wird und mit einer kurzen Sequenz von sense-RNA interferiert und eine Duplexstruktur bildet, die Kernexport und /oder Translation hemmt (PERSENGIEV et al., 2004). Genetische und chemische Untersuchungen zeigten einen Zweischnitt-Mechanismus der RNAi-induzierten Genstilllegung: Der erste Schritt

besteht aus der Degradierung von Doppelstrang-RNA (dsRNA = double stranded RNA) zu siRNA (small interfering RNA) (AGRAWAL et al., 2003). Im zweiten Schritt sind die siRNAs Teil eines RNA-Komplexes, der „Adapter“-Proteine und wahrscheinlich RNase und RNA-Helicase umfasst und der an der verwandten mRNA agiert und sie zum Abbau bringt.

SiRNA kann auch mit DNA interagieren und eine Heterochromatisierung und/oder DNA-Methylierung induzieren. Diese RNA-vermittelte DNA-Methylierung (RNA directed DNA methylation, RdDM) stellt eine transkriptionelle Genrepression dar.

Bemerkenswerterweise führt nur die Methylierung von Promotorsequenzen zu transkriptioneller Genstilllegung, während Methylierung von kodierenden Sequenzen durch die Veränderung der Basensequenz erst posttranskriptionell zur Genstilllegung führt (PICKFORD und COGONI, 2003).

Eine Änderung im Methylierungsmuster des ALPL-Gens könnte also nicht nur im Promotorbereich, sondern auch an kodierender Stelle zu einer Inaktivierung führen.

Außerdem zeigten die Klonierungssysteme, die bei den Experimenten hinsichtlich der Promotor-Methylierung der DNA von gesunden Spendern verwendet wurden, Unterschiede. Für die Fragestellung der Methylierung des Promotors bei der Tumor-DNA wurde in dieser Arbeit nur ein System getestet (AcceptorTMVector Kit).

Da der TOPO TA Cloning®Kit verschiedene Sorten von Klonen und Unterschiede in der Methylierung gezeigt hat, sollte die Tumor-DNA ebenfalls mit diesem Klonierungssystem analysiert werden, um eventuell vorliegende verschiedene Methylierungsmuster der Tumor-DNA aufdecken zu können.

Die vorliegende Arbeit liefert eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur epigenetischen Veränderung des Gens der Alkalischen Phosphatase (PROWALD et al.). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in einem bei einer Reihe von Tumorsuppressorgenen beobachteten Zweischritt-Prozess einerseits eine mikroskopisch erkennbare Deletion eines Allels und andererseits die DNA-Methylierung des verbleibenden Allels erfolgt.

Unsere Arbeitsgruppe führte nach Abschluss dieser Doktorarbeit Experimente an Meningeomzellkulturen mit dem Demethylierungsagens 5-Azacytidin durch. Es zeigte sich die Richtigkeit der in dieser Arbeit vorgetragenen Hypothese, dass das ALPL-Enzym durch die Behandlung (monoallelisch) reaktiviert werden konnte, das zweite Allel also nicht defekt ist.

VI. Literaturverzeichnis:

1. Adegbite AB, Khan MI, Paine KWE, Tan LK (1983) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *Journal of Neurosurgery* 58: 51-56
2. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 657-685
3. Ahuja N, Issa J-P J (2000) Aging, methylation and cancer. *Histol Histopathol* 15: 835-842
4. Antinheimo J, Sankila R, Carpen O, Pukkula E, Sainio M, Jääskeläinen J (2000) Population-based analysis of sporadic and type 2 neurofibromatosis-associated meningiomas and schwannomas. *Neurology* 54: 71-76
5. Baylin SB, Mahos M, Wu JJ, Yen RW, De Bustros A, Vertino P, Nelkin BD (1991) Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression. *Cancer Cells* 3: 383-390
6. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72: 141-196
7. Baylin SB (2002) Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 12: 331-337
8. Beks JWF, De Windt HL (1988) The recurrence of supratentorial meningiomas after surgery. *Acta Neurochir* 95: 3-5
9. Bello MJ, De Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA (1994) Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes, Chromosomes & Cancer* 9: 296-298

10. Bernard P, Couturier M (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 226: 735-745
11. Bernard P, Kezdy KE, Van Melderen L, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN, Couturier M (1993) The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol* 234: 534-541
12. Bernard P, Gabant P, Bahassi EB, Couturier M (1994) Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* 148: 71-74
13. Bird AP (1986) CpG-rich island and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209-213
14. Bornman DM, Mathew S, Alsrue J, Herman JG, Gabrielson E (2001) Methylation of the E-cadherin gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals. *Am J Pathol* 159: 831-835
15. Borovich B, Doron Y (1986) Recurrence of intracranial meningiomas: the role played by regional multicentricity. *Journal of Neurosurgery* 64: 58-63
16. Boström J, Mühlbauer A, Reifenberger G (1997) Deletion mapping of the short arm of chromosome 1 identifies a common region of deletion distal to D1S496 in human meningiomas. *Acta Neuropathol* 94: 479-485
17. Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP, Reifenberger G (2001) Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16^{INK4a}), p14^{ARF}, CDKN2B (p15^{INK4b}), and CDKN2C (p18^{INK4c}) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol* 159: 661-669
18. Carling T, Du Y, Fang W, Correa P, Huang S (2003) Intragenic allelic loss and promoter hypermethylation of the RIZ1 tumor suppressor gene in parathyroid tumors and pheochromocytomas. *Surgery* 134: 932-939; discussion 939-940

19. Carvalho R, Kayademir T, Soares P, Canedo P, Sousa S, Oliveira C, Leistenschneider P, Seruca R, Gott P, Blin N, Carneiro F, Machado JC (2002) Loss of heterozygosity and promoter methylation, but not mutation, may underlie loss of TFF1 in gastric carcinoma. *Lab Invest.* 82: 1319-1326
20. Chan RC, Thompson GB (1984) Morbidity, mortality, and quality of life following surgery for intracranial meningiomas. A retrospective study in 257 cases. *Journal of Neurosurgery* 60: 52-60
21. Constancia M, Pickard B, Kelsey G, Reik W (1998) Imprinting mechanisms. *Genome Research* 8: 881-900
22. Droufakou S, Deshmane V, Roylance R, Hanby A, Tomlinson I, Hart IR (2001) Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *Int J Cancer* 92: 404-408
23. Dumanski JP, Carlom E, Collins VP, Nordenskjöld M (1987) Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci, USA* 84: 9275-9279
24. Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjöld M, Collins VP (1990) Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* 50: 5863-5867
25. Eastman JR, Bixler D (1983) Clinical, laboratory, and genetic investigations of hypophosphatasia: support for autosomal dominant inheritance with homozygous lethality. *J Craniofac Genet Dev Biol* 3: 213-234
26. Eberic F, Hartenfels S, Pralle H, Kabish A (1984) Adult hypophosphatasia without apparent skeletal disease: 'odontohypophosphatasia' in four heterozygote members of a family. *Klin Wochenschr* 62: 371
27. Escalante-Alcalde D, Recillas-Targa F, Hernandez-Garcia D, Castro-Obregon S, Terao M, Garattini E, Covarrubias L (1996) Retinoic acid and methylation cis-regulatory

- elements control the mouse tissue non-specific alkaline phosphatase gene expression. *Mechanisms of Development* 57: 21-32
28. Evans DGR, Huson M, Donnai D, Neary W, Blair V, Newton V, Harris R (1992) A clinical study of type-2 neurofibromatosis. *Quart J Med* 84: 603-618
 29. Evans JJ, Jeun SS, Lee JH, Harwalkar JA, Shoshan Y, Cowell JK, Golubic M (2001) Molecular alterations in the neurofibromatosis type 2 gene and its protein rarely occurring in meningothelial meningiomas. *J Neurosurg* 94: 111-117
 30. Graham A, Newton CR (1994) PCR, 2.Aufl., Spektrum Akadem.Verlag GmbH
 31. Griffin C, Smith M, Henthorn P, Harris H, Weiss M, Raducha M, Emanuel B (1987) Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-q37. *Amer J Hum Genet* 41: 1025-1034
 32. Gusella JF, Ramesh V, MacColin M, Jacoby LB (1999) Merlin: the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1423: M29-M36
 33. Hajkova P, El-Maarri O, Engemann S, Oswald J, Olek A, Walter J (2002) DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method. *Method Mol Biol* 200: 143-154
 34. Harris H (1989) The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clinica Chimica Acta* 186: 133-150
 35. Henn W, Cremerius U, Heide G, Lippitz B, Schröder JM, Gilsbach JM, Büll U, Zang KD (1995) Monosomy 1p is correlated with enhanced in vivo glucose metabolism in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 79: 144-148
 36. Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Reichardt S, Freiler A, Zang KD (2003) Monosomy 7p in meningiomas: a rare constituent of tumor progression. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 144: 65-68

37. Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB (1996b) Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15^{INK4B}. *Cancer Research* 56: 722-727
38. Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB (1997) Distinct patterns of inactivation of p15^{INK4B} and p16^{INK4A} characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Research* 57: 837-841
39. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB (1998) Incidence and functional consequence of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6870-6875
40. Hitotsumatsu T, Iwaki T, Kitamoto T, Mizoguchi M, Suzuki SO, Hamada Y, Fukui M, Tateishi J (1997) Expression of neurofibromatosis 2 protein in human brain tumors: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 93: 225-232
41. Horsthemke B, Dittrich B, Buiting K (1997) Imprinting mutations on human chromosome 15. *Human Mutation* 10: 329-337
42. Huynh DP, Mautner V, Baser ME, Stavrou D, Pulst SM (1997) Immunohistochemical detection of schwannomin and neurofibromin in vestibular schwannomas, ependymomas and meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 382-390
43. Ikeda K, Saeki Y, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V, Chiocca EA (1999) Inhibition of NF2-negative and NF2-positive primary human meningioma cell proliferation by overexpression of merlin due to vector-mediated gene transfer. *J Neurosurg* 91: 85-92
44. Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S, Date K, Mori T, Fulimoto M, Nakagawa Y, Ueda S, Abe T, Inazawa J (1998) Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent in situ hybridization. *Cancer* 83: 360-366

45. Jones PA: Gene Activation by 5-azacytidine. In Razin A, Cedar H, Riggs AD (eds) DNA methylation, biochemistry, and biological significance. Springer-Verlag, New York, USA, pp.165-187, 1984
46. Jones PA (1996) DNA methylation errors and cancer. *Cancer Research* 56: 2463-2467
47. Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics* 21: 163-167
48. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan J-C, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias J-M, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90: 809-819
49. Kallio M, Sankila R, Hakulinen, Jääskeläinen J (1992) Factors affecting operative and excess long-term mortality in 935 patients with intracranial meningioma. *Neurosurgery* 31: 2-12
50. Kepes JJ (1982) Meningiomas: biology, pathology and differential diagnosis (Masson Publishing, New York)
51. Ketter R, Henn W, Niedermayer I, Steilen-Gimbel H, König J, Zang KD, Steudel W-I (2001) Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. *J Neurosurg* 95: 601-607
52. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993) Histological typing of tumours of the central nervous system. WHO international classification of tumours, 2nd edition Springer, Berlin Heidelberg New York, und Kommentar: The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathology* 3: 255-268
53. Knudson AG, JR. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 820-823

54. Kolles H, Niedermayer I, Schmitt C, Henn W, Feld R, Steudel W-I, Zang KD, Feiden W (1995) Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings and cytogenetics. *Acta Neurochir (Wien)* 137: 174-181
55. Kujas M (1993) Meningioma. *Current opinion in neurology and neurosurgery* 6: 882-887
56. Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM (2003) Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 63: 3352-3355
57. Lamszus K, Kluwe L, Matschke J, Meissner H, Laas R, Westphal M (1999) Allelic losses at 1p, 9q, 10q, 14q, and 22q in the progression of aggressive meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 110: 103-110
58. Landow H, Kabat EA, Newman W (1942) Distribution of alkaline phosphatase in normal and in neoplastic tissues of the nervous system. *Arch Neur and Psychiat* 48: 518-530
59. Lantos PL, Vandenberg SR, Kleihues P (1996) *Tumors of the nervous system* (Arnold, London).
60. Leuraud P, Marie Y, Robin E, Huguet S, He J, Mokhtari K, Cornu P, Hoang-Xuan K, Sanson M (2000) Frequent loss of 1p32 region but no mutation of the p18 tumor suppressor gene in meningiomas. *J Neurooncol* 50: 207-213
61. Lindblom A, Rutledge M, Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski JP (1994) Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 56: 354-357

62. Lomas J, Bello MJ, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Alonso ME, De Campos JM, Vaquero J, Ruiz-Barnes P, Sarasa J, Cassartelli C, Rey JA (2001) Analysis of p73 gene in meningiomas with deletion at 1p. *Cancer Genet Cytogenet* 129: 88-91
63. Lomas J, Aminoso C, Gonzalez-Gomez P, Alonso ME, Arjona D, Lopez-Marin I, De Campos JM, Isla A, Vaquero J, Gutierrez M, Sarasa JL, Bello MJ, Rey JA (2004) Methylation status of TP73 in meningiomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 148: 148-151
64. Lopez-Gines C, Cerda-Nikolas M, Gil-Benso R, Callaghan R, Collado M, Roldan P, Llombart-Bosch A (2004) Association of loss of 1p and alterations of chromosome 14 in meningioma progression. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 148:123-128
65. Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, Von Deimling A, Kepes JJ: Meningiomas, in Kleihues P, Cavaneer W (eds): *Pathology and genetics of tumours of the nervous system. World health organization classification of tumours (IARC Press, Lyon 2000)*
66. Ludwin SK, Rubinstein LJ, Russell DS (1975) Papillary meningioma: a malignant variant of meningioma. *Cancer* 36: 1363-1373
67. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M (2001) E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene* 20: 1525-1528
68. Mahmood A, Caccamo DV, Tomecek FJ, Malik GM (1993) Atypical and malignant meningioma: a clinicopathological review. *Neurosurgery* 33: 955-963
69. Mahmood A, Qureshi NH, Malik GM (1994) Intracranial meningiomas: analysis of recurrence after surgical treatment. *Acta Neurochir* 126: 53-58
70. Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H (1992) Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *J Neurosurgery* 77: 616-623

71. Maltby EL, Ironside JW, Battersby RDE (1988) Cytogenetic studies in 50 meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 31: 199-210
72. Mark J (1970) Chromosomal patterns in human meningiomas. *Eur J Cancer* 6: 489-498
73. Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK (2004) Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res* 91: 137-168
74. Martin D, Tucker DF, Gorman P, Sheer D, Spurr NK, Trowsdale J (1987) The human placental alkaline phosphatase gene and related sequences map to chromosome 2 band q37. *Ann Hum Genet* 51: 145-152
75. Matsuura S, Kishi F, Kajii T (1990) Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene: two kinds of mRNA from a single gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168: 993-1000
76. McCarthy BJ, Davis FG, Freels S, Surawicz TS, Damek DM, Grutsch J, Menck HR, Laws ER Jr. (1998) Factors associated with survival in patients with meningioma. *Journal of Neurosurgery* 88: 831-839
77. McComb RB, Bowers GN JR., Posen S (1979) Alkaline phosphatase. Plenum Publishing Corp. New York
78. McCutcheon IE (1996) The biology of meningiomas. *Journal of Neuro-Oncology* 29: 207-216
79. Mendiola M, Bello MJ, Alonso J, Leone PJ, Vaquero J, Sarasa JL, Kusak ME, De Campos JM, Pestana A, Rey JA (1999) Search for mutations of the RAD54 gene in sporadic meningiomas with deletion at 1p32. *Mol Carcinog* 24: 300-304
80. Menon AG, Rutter JL, Von Sattel JP, Synder H, Murdoch C, Blumenfeld A, Martuza RL, Von Deimling A, Gusella JF, Houseal TW (1997) Frequent loss of chromosome

- 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative tumor progression locus. *Oncogene* 14: 611-616
81. Momparler RL (2003) Cancer epigenetics. *Oncogene* 22: 6479-6483
82. Müller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel W-I, Zang KD, Steilen-Gimbel H (1999) Deletion of chromosome 1p and loss of expression of alkaline phosphatase indicate progression of meningiomas. *Clinical Cancer Research* 5: 3569-3577
83. Myöhänen SK, Baylin SB, Herman JG (1998) Hypermethylation can selectively silence individual p16^{INK4A} alleles in neoplasia. *Cancer Research* 58: 591-593
84. Niedermayer I, Kolles H, Henn W, Zang KD, Steudel W-I, Feiden W (1997) Meningeome. Klassifikation und Grading. *Der Pathologe* 18:353-358
85. Niedermayer I, Kolles H, Feiden W (1998) Klassifikation und Grading von Gliomen und Meningeomen. *Der Radiologe* 38: 888-897
86. Nishizaki T, Kamiryo T, Fujisawa H, Ohshita N, Ishihara H, Ito H, Aoki H (1994) Prognostic implications of meningiomas in the elderly (over 70 years old) in the era of magnetic resonance imaging. *Acta Neurochir (Wien)* 126: 59-62
87. Nozaki M, Tada M, Kashiwazaki H, Hamou M-F, Diserens A-C, Shinohe Y, Sawamura Y, Iwasaki Y, De Tribolet M, Hegi ME (2001) P73 is not mutated in meningiomas as determined with a functional yeast assay but p73 expression increases with tumor grade. *Brain Pathol* 11:296-305
88. Ohtani-Fujita N, Dryja TP, Rapaport JM, Fujita T, Matsumura S, Ozasa K, Watanabe Y, Hayashi K, Maeda K, Kinoshita S, Matsumura T, Ohnishi Y, Hotta Y, Takahashi R, Kato MV, Ishizaki K, Sasaki MS, Horsthemke B, Minoda K, Sakai T (1997) Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 98: 43-49

89. Pasquier B, Gasnier F, Pasquier D, Keddari E, Morens A, Couderc P (1986) Papillary meningioma: clinicopathologic study of seven cases and review of the literature. *Cancer* 58: 299-305
90. Perry A, Jenkins RB, Dahl RJ, Moertel CA, Scheithauer BW (1996) Cytogenetic analysis of aggressive meningiomas. Possible diagnostic and prognostic implications. *Cancer* 77: 2567-2573
91. Persengiev SP, Zhu X, Green MR (2004) Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 10:12-18
92. Pickford AS, Cogoni C (2003) RNA-mediated gene silencing. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 871-882
93. Plass C, Soloway PD (2002) DNA methylation, imprinting and cancer. *European Journal of Human Genetics* 10: 6-16
94. Prowse AH, Webster AR, Richards FM, Richard S, Olschwang S, Resche F, Affara NA, Maher ER (1997) Somatic inactivation of the VHL gene in Von-Hippel-Lindau disease tumors. *Am J Hum Genet* 60: 765-771
95. Prowald A, Vater K, Peters J, Ketter R, Henn W, Feiden W, Zang KD, Steudel W-I Two-step inactivation of the tissue non-specific alkaline phosphatase (ALPL) and p73 gene during progression of meningioma by microscopic deletion plus promotor methylation. Zur Publikation eingereicht.
96. Rasmussen H (1983) Hypophosphatasia. In: *The metabolic basis of inherited disease*. Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JH, Brown MS, eds. New York: McGraw-Hill. 1497-1507
97. Recillas-Targa F (2002) DNA-methylation, chromatin boundaries, and mechanisms of genomic imprinting. *Arch Med Res* 33: 428-438

98. Reik W, Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Reviews Genetics* 2: 21-32
99. Rempel SA, Schwechheimer K, Davis RL, Cavanee WK, Rosenblum ML (1993) Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res* 53: 2386-2392
100. Ribeiro-Filho LA, Franks J, Sasaki M, Shina H, Li L-C, Nojima D, Arap S, Carroll P, Enokida H, Nakagawa M, Yonezawa S, Dahiya R (2002) CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. *Molecular Carcinogenesis* 34: 187-198
101. Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuang K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B, Pulst S, Lenoir G, Bijlsma E, Fashold R, Dumanski J, Dejong P, Parry D, Elridge R, Aurias A, Delattre O, Thomas G (1993) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature* 363: 515-521
102. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB (2001) DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 20: 3156-3165
103. Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjöld M, Collins VP, Dumanski JP, Rouleau GA (1994) Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nature Genetics* 6: 180-184
104. Sanson M, Cornu P (2000) Biology of meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 142: 493-505
105. Santarius T, Kirsch M, Nikas DC, Imitola J, Black PM (2000) Molecular analysis of alterations of the p18^{INK4C} gene in human meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26: 76-75

106. Shuman S (1991) Site-specific DNA cleavage by vaccinia virus DNA topoisomerase I. Role of nucleotide sequence and DNA secondary structure. *J Biol Chem* 266: 1796-1803
107. Si HX, Tsao SW, Lam KY, Srivastava G, Liu Y, Wong YC, Shen ZY, Cheung AL (2001) E-cadherin expression is commonly downregulated by CpG island hypermethylation in esophageal carcinoma cells. *Cancer Letters* 173: 71-78
108. Simon M, Von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM, Menon AG (1995) Allelic loss on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Research* 55: 4696-4701
109. Singer H, Zang KD (1970) Cytologische und cytogenetische Untersuchungen an Hirntumoren. I. Die Chromosomenpathologie des menschlichen Meningeoms. *Humangenetik* 9: 172-184
110. Smith M, Weiss MJ, Griffin CA, Murray JC, Buetow KH, Emanuel BS, Henthorn PS, Harris H (1988) Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1p36.1-p34. *Genomics* 2: 139-143
111. Stigbrand T, Fishman WH (1984) Human alkaline phosphatases. New York, AR Liss.
112. Studer M, Terao M, Gianni M, Garattini E (1991) Characterization of a second promotor for the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene: cell and tissue specific expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 179: 1352-1360
113. Terao M, Studer M, Gianni M, Garattini E (1990) Isolation and characterization of the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene. *Biochem J* 268: 641-648
114. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa J-P J (1999a) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8681-8686

115. Toyota M, Issa JP (2000) The role of DNA hypermethylation in human neoplasia. *Electrophoresis* 21: 329-333
116. Tycko B (1997) DNA methylation in genomic imprinting. *Mutation Research* 386: 131-140
117. Waterborg JH (2002) Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover? *Biochem Cell Biol* 80: 363-378
118. Weber RG, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter P (1997) Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci, USA* 94: 14719-14724
119. Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H (1988) Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 12002-12010
120. Wellenreuther R, Kraus J, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, Von Deimling A (1995) Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 146: 827-832
121. Wheeler JM, Kim HC, Efsthathiou JA, Ilyas M, Mortensen NJ, Bodmer WF (2001) Hypermethylation of the promotor region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. *Gut* 48: 367-371
122. Whyte MP, Fallon MD, Murphy WA (1979) Adult hypophosphatasia: clinical, laboratory and genetic investigation of a large kindred with review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 58: 329-347
123. Whyte MP, Fallon MD, Murphy WA (1982) Adult hypophosphatasia with chondrocalcinosis and arthropathy: variable penetrance of hypophosphatasemia in a large Oklahoma kindred. *Am J Med* 72: 631

124. Whyte MP (1994) Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 15: 439-461
125. Yang Q, Nakamura M, Nakamura Y, Yoshimura G, Suzuma T, Umemura T, Shimizu Y, Mori I, Sakurai T, Kakudo K (2002) Two-hit inactivation of FHIT by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer. *Clin Cancer Res* 8: 2890-2893
126. Yu Y, Xu F, Peng H, Fang X, Zhao S, Li Y, Cuevas B, Kuo W-L, Gray JW, Siciliano M, Mills GB, Bast RC JR. (1999) NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 214-219
127. Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 216: 84-85
128. Zang KD (1982) Cytogenetical and cytological studies on human meningiomas – An overview. *Cancer Genet Cytogenet* 6: 249-274
129. Zang KD (2001) Meningioma: A cytogenetic model of a complex human benign tumor, including 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 93: 207-220
130. Zankl H, Zang KD (1971) Cytological and cytogenetic studies on brain tumors. III. Ph¹-like chromosomes in human meningiomas. *Humangenetik* 12: 42-49
131. Zankl H, Zang KD (1972) Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. IV. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as No 22 by fluorescence technique. *Humangenetik* 14: 167-169
132. Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD (2001b) Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Research* 61: 249-255

133. Zorludemir S, Scheithauer BW, Hirose T, Van Houten C, Miller G, Meyer FB (1995)
Clear cell meningioma. A clinicopathological study of a potentially aggressive variant
of meningioma. *Am J Surg Pathol* 19: 493-505

VII. Publikationen/Dank

Publikationen

Tagungsbeiträge:

- Analysis of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene in meningiomas
Prowald A., Vater K., Ketter R., Henn W., Zang K.D., Steudel W.I.
Abstract + Poster: 25. Deutscher Krebskongress in Berlin, 10.-14. März 2002
- Down-regulation of the expression of the tissue-unspecific alkaline phosphatase enzyme during progression of meningioma
Prowald A., Vater K., Ketter R., Henn W., Zang K.D., Steudel W.I.
Abstract + Poster: 53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) in Halle/Saale, 2.-5. Juni 2002
- Two-step inactivation of the tissue non-specific alkaline phosphatase (ALPL) gene during progression of meningiomas by deletion plus promotor methylation
Alexandra Prowald, Katja Vater, Judith Peters, Ralf Ketter, Wolfram Henn, Wolfgang Feiden, Klaus D. Zang, Wolf-Ingo Steudel
Poster: Epigenetics - Annual Meeting of the German Genetics Society in Kassel, 26.-29. September 2003
Abstract + Poster: 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Marburg, 1.-4. Oktober 2003

Zeitschriftenbeiträge:

- Two-step inactivation of the tissue non-specific alkaline phosphatase (ALPL) gene during progression of meningiomas by deletion plus promotor methylation
Alexandra Prowald, Katja Vater, Judith Peters, Ralf Ketter, Wolfram Henn, Wolfgang Feiden, Klaus D. Zang, Wolf-Ingo Steudel
Medizinische Genetik (2003) 15(3): 347
- Two-step inactivation of the tissue non-specific alkaline phosphatase (ALPL) and p73 gene during progression of meningioma by microscopic deletion plus promotor methylation.
Prowald A, Vater K, Peters J, Ketter R, Henn W, Feiden W, Zang KD, Steudel W-I
Zur Publikation eingereicht.

Dank

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. Klaus D. Zang für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die konstruktive Kritik und freundliche Unterstützung während der Bearbeitung.

Herrn Prof. Dr. med. Wolf-Ingo Steudel, Direktor der Neurochirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes, danke ich für die Bereitstellung der Tumorsektate.

Meiner wissenschaftlichen Betreuerin Dr. rer. nat. Alexandra Prowald danke ich herzlich für die theoretische und praktische Einführung in die molekularbiologischen Techniken und die Betreuung meiner Arbeit. Ihre freundliche Unterstützung und die zahlreichen Gespräche trugen wesentlich zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit bei.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für Ihre Hilfe. Insbesondere danke ich Frau Daniela Scherer für ihre Hilfe bei den Sequenzierungen. Frau Sylvia Reichardt danke ich für ihre Unterstützung bei der Züchtung der Zellkulturen.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Feiden, Direktor der Abteilung für Neuropathologie der Universität des Saarlandes, danke ich für die Bereitstellung der histologischen Charakterisierung der Meningeome.

Herzlich danken möchte ich meinen Eltern, ohne die ein Medizinstudium nicht möglich gewesen wäre und die mich in jeder Hinsicht unterstützen, sowie meinem Bruder Jochen, der mir bei Computerfragen behilflich war.

VIII. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Katja Vater
Geburtsdatum: 24.01.1979
Geburtsort: Landstuhl
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1985-07/1989: Theodor-Heuss-Grundschule Landstuhl/Atzel
08/1989-06/1998: Sickingen-Gymnasium Landstuhl, Abschluss: Abitur

Studium:

10/1998: Beginn des Medizinstudiums an der Universität des Saarlandes
09/2000: Physikum
04/2001-08/2002: Durchführung des experimentellen Teils der Doktorarbeit am Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes/Homburg
03/2002: erstes Staatsexamen
08/2002-01/2003: Auslandssemester an der Universität in Oslo/Norwegen
03/2004: zweites Staatsexamen
04/2004-03/2005: Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Homburg/Saar, Wahlfach Neurologie
05/2005: drittes Staatsexamen

Praktische Tätigkeiten:

07-10/1999: Ausbildung zur Rettungssanitäterin in Mainz
03/2001: Famulatur Innere Medizin (St.Elisabeth-Krankenhaus Zweibrücken)
09-10/2001: Famulatur Allgemeinchirurgie (Kantonsspital St.Gallen/Schweiz)
02-03/2003: Praxisfamulatur Dermatologie (Ramstein)
03/2003: Praxisfamulatur Pädiatrie (Landstuhl)
08-09/2003: Famulatur Neurologie (Universitäts-Nervenlinik Homburg/Saar)