INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN und

INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, GESELLSCHAFT FÜR STRAHLENFORSCHUNG, NEUHERBERG

LOH Untersuchung eines Locus auf Chromosom 9 in einem murinen, transgenen Model für Osteosarkome

Ioannis Pappou

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. H. K. Höfler 2. Univ.-Prof. F. Fend 3. Univ.-Prof. St. Burdach

Die Dissertation wurde am 08.06.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2007 angenommen.

DANKSAGE

Ich möchte mich besonders bedanken bei:

- Prof. H. Höfler für die Erlaubnis diese Arbeit zu vollbringen.
- Dr. M. Atkinson und Dr. M. Rosemann f
 ür Zuteilung dieser Arbeit, kontinuerliche Unterst
 üzung, Geduld, kreativen Ideen und das Lesen dieser Arbeit.
- Dr. V. Kuosaite für Ihre Vorarbeit an dem Thema und ihre wertvolle Hilfe beim Beginn der Arbeit.
- Dem Personal an der GSF f
 ür Tierhaltung und insbesondere das Laborpersonal f
 ür Tumorisolierung, Tumorfixierung und Gewebsschnittanfertigung.

WIDMUNG

An meine Eltern (Panagiotis und Chrysanthi) und Brüder (Manolis und Vasilis) für ihre Liebe und Unterstützung

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG1
1.1 Allgemeines zum Osteosarkom beim Menschen, Demographie1
1.2 Osteosarkom Histologie, Grading und Staging1
1.3 Osteosarkom bei der Maus2
1.4 Osteosarkom Ätiologie3
1.4.1 Genetische Veranlagung zu Osteosarkom
1.4.2 Strahlungsinduziertes Osteosarkom7
1.4.3 Chemische Induktion von Osteosarcom
1.4.4 Virale Induktion von Sarkomen9
1.4.5 Regeneration und Trauma als Induktoren von Osteosarkomen10
1.5 Molekulare Mechanismen für Karzinogenese allgemein10
1.6 Wert der LOH in der Analyse der Krebsentstehung16
1.7 Bekannte Molekulare Mechanismen beim menschlichen Osteosarkom17
1.7.1 Tumorsuppressorgen Inaktivierung18
1.7.2 Onkogen-Aktivierung20
1.7.3 Paget-assoziierte Gene22

1.7.4 Viren
1.7.5 Zusammenfassung22
1.8 Osteosarcom-Loci ohne bekannte Funktion25
1.9 Tiermodelle für Tumore26
1.9.1 Bedeutung der Maus als Model für Osteosarkome26
1.9.2 Konkordanz zwischen Tiermodel und menschlichen Tumoren27
1.9.3 Diskordanz zwischen Menschen und Tiermodellen28
1.10 Das Tiermodel in dieser Arbeit
1.10.1 Stämme und Kreuzung31
1.10.2 Das Patched Gen32
1.10.3 Das p53 Gen
1.10.4 Transgene Tiere mit 2 genetisch manipulierten Gene
2 ZIEL DER ARBEIT 37
3 MATERIALIEN 38
3.1 Geräte
3.2 Verbrauchsmittel
3.3 Mäusestämme
3.4 Kits
3.5 DNA-Längenstandards
3.6 Enzyme

3.7 Nukleotide	
3.8 Reagenzien für Elektrophorese	
3.9 Andere Chemikalien	
3.10 Puffer	40
3.11 PCR-Primer	40
3.11.1 Maus Mikrosatelliten	40
3.11.2 OSM Primer	41
3.11.3 Ptch1 und p53 Primer	41
4 METHODEN	42
4.1 Osteosarcom Induktion und Tumordiagnose	42
4.1.1 Mäuse-Zucht	42
4.1.2 Osteosarkominduktion	42
4.1.3 Überwachung der Tumorentstehung	42
4.1.4 Präparation von Tumor- und Normalgewebe fü molekulare Untersuchungen	r histologische und 42
4.1.5 Histologische Befundung von Osteosarkomen	43
4.2 DNA Extraktion	43
4.2.1 DNA Extraktion aus tiefgefrorenem Tumorgewel	be43
4.2.2 DNA Extraktion aus tiefgefrorenen Schwanzspitz	zen44
4.2.3 DNA Extraktion aus mikrodissizierten Tumorzel	len45

4.3 Spektrophotometrische Messung der DNA-Konzentration46
4.4 Kontrolle der DNA-Integrität durch Gel-Elektrophorese47
4.5 Allgemeine Molekularbiologische Methoden47
4.5.1 PCR Amplifikation
4.5.2 Elektrophoretische Trennung der DNA Extraktions- und PCR Amplifikationsprodukte
4.6 Amplifikation von DNA Mikrosatelliten49
4.6.1 PCR Amplifikation von Mikrosatteliten auf Chromosom 949
4.6.2 Amplifikation von p53 und Ptch150
4.6.3 Auswahl der Elektrophoresentechnik für die Auftrennung der Allele
4.6.4 Dokumentation der Elektrophorese-Ergebnisse
4.7 LOH/AI Bestimmung
4.8 Statistische Methoden
5 ERGEBNISSE 54
5.1 Tumore die benutzt wurden54
5.1.1 Tumorentwicklung54
5.1.2 Tumorfreies Überleben55
5.2 Polymorphe Marker für LOH Analyse55
5.2.1 Eignung der Marker im Chromosom 955
5.2.2 Weitere Marker für LOH im Chromosom 958
5.3 Informative Tumoren

5.4	LOH/AI Ergebnisse	59
5.4.	1 LOH/AI bei mikrodissizierten Fällen	59
5.4.	2 LOH/AI bei tiefgefrorenen Tumoren	60
5.4.	3 LOH/AI der p53 und Ptch1 Gene	61
6	DISKUSSION	64
6.1	Tumorinzidenz	64
6.2	LOH im Chromosom 9	64
6.3	Bevorzugter C57BL/6 Allelverlust	65
6.4	Tumorsuppressorgene auf Chromosom 9	65
6.5	LOH im p53 Locus	66
6.6	LOH im Ptch1 Locus	67
6.7	LOH und Tumorgröße und – latenz	67
7	SCHLUSSFOLGERUNGEN	69
8	ZUSAMMENFASSUNG	70
9	SUMMARY	72
10	REFERENZEN	74

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1 *Histologisches Bild von Osteosarkom (Maus) mit Osteoidproduktion aus malignen Zellen. Aus Eulep Databank, Bild von der GSF.*

Abb. 2 G1->S Kontrolpunkt: Rb1 Phosphorylierung ermöglicht den Übergang in die S-Phase. Die Phosphorylierung wird durch Cyclin/CDKinasen und Inhibitoren der Kinasen reguliert (p15, p16, p21, p27).

Abb. 3 *p53 Funktion: p53 wird durch apoptotische Signale und DNA Schaden aktiviert und kontrolliert den Zellzyklus über BAX, p21, GADD 45, IGF-BP3.*

Abb. 4 Genealogischer Baum der Mäuse in dieser Arbeit mit (F0), (F1) und (F2) Generationen. Die (F2) p53 -/- Mäuse wurden für Medulloblastome beobachtet und für andere Arbeiten benutzt. Die hier benutzten Tiere sind die Ptch1 +/-, p53 +/- Hybride (90) aus der F2 Generation (417).

Abb. 5 SHH/PTC Signalübermittlung in der Drosophila. PTC und SMO bilden einen inaktiven Komplex. Sezeniertes SHH bindet an PTC, SMO wird befreit und übermittelt das Wachstums-/Differenzierungssignal über Mitglieder der GLI Familie. Die aktvierten Gene sind wg (WNT bei Wirbeltieren), dpp (TGF-β/BMP's) und PTC. Aus <u>http://www.biocarta.com/pathfiles/h_ptc1Pathway.asp</u>

Abb. 6 Tumorfreies Überleben der Ptch1 +/-, p53 +/- Tiere.

Abb. 7 Elektrophorese der Marker D9Mit73, D9 Mit 263 und D9 Mit 304 (Längenstandard= Marker VIII). DNA aus CD1, C57BL/6 und ein 1:1 Gemisch aus beiden (um ein Heterozygotes Tier zu simulieren) wurden nebeneinander aufgetragen. Marker 304 ist nicht polymorph, während Marker 263 polymorph ist und sich für eine LOH Analyse eignet. Beim Marker 73 wird ein unterschiedliches elektrophoretisches Laufverhalten der CD1 und C57Bl/6 Allele festfgestellt, allerdings reicht das Trennungsvermögen von Agarosegelen nicht aus um einen Polymorphismus beim Gemisch von CD1xC57BL/6 zu verdeutlichen, weswegen er weiter auf Polyacrylamidgel getestet wurde (Abb.9), wo er sich als polymorph aufweist.

Abb. 8 Polymorphismus des Marker D9Mit73 bei PAGE.

Abb. 9 Für 2 Fälle (01/1444 und 01/1445) sind Tumor und Normalgewebe (NG) nebeneinander aufgetragen. Die relative Intensität des C57BL/6 (schwere Bande, obere) zum CD1 Allel (leichtere Bande, unten) ist gleich im Tumor und Normalgewebe für 01/1444. Für 01/1445 jedoch ist die C57BL/6 Bande wesentlich schwächer als die CD1 Bande im Vergleich zum Normalgewebe, dies wurde als LOH/AI registriert.

Abb. 10 Lage der polymorphen Marker auf Chromosom 9. D9Mit291 und MS1 grenzen die zu untersuchende Region ein.

Abb. 11 *PCR Optimierung für das p53. WT ist das leichtere Allel. Im 1:1 Verhältnis zu MUT wird es überamplifiziert, aber im Verhältnis WT 1:4 MUT werden beide Allele ungefähr gleich stark amplifiziert.*

Abb. 12 PCR Optimierung für das Ptch1. 3 ist DNA aus dem 01/1444 Ptch1 heterozygoten Tier, 1+2 ist 1 zu 1 Gemisch aus CD1 und C57BL/6 DNA. Getestet wurden 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 Verhältnis des WT zu MUT. WT ist für Ptch1h1 das schwerere Allel und wird bei einem molaren Verhältniss der beiden alternativen Vorwärts-Primer von 1:1 viel stärker exprimiert als das MUT Allel. Erst ein Verhältniss der beiden Vorwärtsprimer von WT:MUT wie 1:4 liefert ungefähr gleich starke Banden in der Elektrophorese.

Abb. 13 Grösse der Tumoren (in mm) mit LOH (links) und ohne LOH (rechts).

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Sequenz der OSM Marker.

Tabelle 2:Sequenz der Marker für das Ptch1 und p53.

Tabelle 3: Beobachtete Osteosarkome und entsprechende Information überSektionsnummer, Fallnummer, Polymorphismus im Chromosom 9, Tumorgröße in
mm, Lebensdauer in Tagen, Tumorlokalisation und Extraktionsmethode.

Tabelle 4: Marker auf Chromosom 9 die mittels Agarosegelelektrophorese auf

 Polymorphismus getestet.

Tabelle 5: Marker auf Chromosom 9 die mittels PAGE auf Polymorphismus getestet wurden

Tabelle 6: Liste der OSM (Osteosarkom Marker) die auf Polymorphismus getestet wurden.

Tabelle 7: Ergebnis der LOH Analyse für die FFPE Fälle.

Tabelle 8: Ergebnis der LOH Analyse bei den tiefgefrorenen Fällen.

Tabelle 9: Ergebnis der LOH Analyse für das Ptch1 und p53 bei den tiefgefrorenen Fällen.

ABKÜRZÜNGEN

AI	Allelic Imbalance (Allelisches Mißverhältnis)
BCC	Basal Cell Carcinoma (Basalzellkarzinom)
CDK	Cyclin-Dependent-Kinase
CGH	Comparative Genom Hybridisation (vergleichende Genomhybridisierung)
DMBA	Dimethylbenz[a]anthracene
FBJ	Finkel-Binkis-Jinkins-Virus
FEO	Familial Expansile Osteolysis
FFPE	Formalin-fixiert, paraffin-eingebettet
ICH	Immunhistochemie
INK	Inhibitor of Kinase
LET	Linearer Energie Transfer
LOH	Loss of Heterozygosity (Verlust der Heterozygosität)
MDR	Minimal Deleted Region (Region des minimalen Verlustes)
MFH	Malignes Fibrohistiozytom
MUT	Mutante
NNK	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
OSM	Osteosarkom Marker
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasenkettenreaktion)
Ptch1	Maus Patched 1 Homolog
PTCH1	Humane Patched 1 Homolog
SHH	Sonic Hedgehog
SMO	Smoothened
TP53	Tumor-Related protein 53, humanes
WT	Wildtyp

Das ist eine Liste der häufigsten Abkürzungen. Die übrigen Abkürzungen werden im Text an der entsprechenden Stelle erklärt

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeines zum Osteosarkom beim Menschen, Demographie

Osteosarkom ist ein seltener maligner primärer Knochentumor aus Gewebe mesenchymalen Ursprungs. Charakteristisch für das Osteosarkom ist seine Fähigkeit, knochenartige Matrix zu bilden (Unni 1998). Die geschätzte Inzidenz ist 0.11 – 1 aus 100.000 Einwohnern (<0.001%). Die kumulative Inzidenz nach Altersgruppen weist 2 Gipfel auf, der erste und grössere sind Kinder und Jugendliche (durchschnittliches Alter bei Diagnose 15), während der zweite bei älteren Patienten auftritt (über 60 Jahre alt), wobei letztere oft eine präexistierende Knochenerkrankung haben. 60% der Fälle treten im 2. Lebensjahrzehnt, während 80% der Fälle vor dem 30. Lebensjahr auftreten. Jungen haben insgesamt eine höhere Wahrscheinlichkeit Osteosarkoma zu entwickeln als Mädchen (M:F 1.25). Bei letzteren ist ein maximale Inzidenz erst nach dem 15. Lebensjahr zu beobachten, was ein Hinweis auf die Bedeutung des Wachstumschubs bei der Entwicklung von Osteosarkoma ist. Afroamerikanische Patienten haben eine höhere Wahrscheinlichkeit Osteosarkoma zu entwickeln als kaukasische. 47.5 % der Tumore treten um das Knie auf (31.5 distales % Femur und 16% proximale Tibia), 9% der Tumore treten im proximalen Humerus, 8% im Kiefer/Schädel Bereich und 10% im Pelvis (Gurney 1995; Unni 1998; Cripe 2004).

1.2 Osteosarkom Histologie, Grading und Staging

Das Osteosarkom ist histologisch sehr variabel mit einer Vielfalt von Sub-typen, die hier kurz aufgelistet werden: Osteoblastisches, chondroblastisches, fibroblastisches, telangiectatisches, parosteales, periostales, intrakortikales und kleinzelliges. 75% der Fälle gehören dem typischen Osteosarkom an (osteoblastischer Typ mit evtl Anteilen von chondroblastischer oder fibroblastischer Differenzierung) . Bezüglich der Prognose verhält sich der periostale und nochmehr der parosteale Subtyp günstiger als das typische Osteosarkom. Telangiektatische Osteosarkome scheinen eine schlechtere Prognose zu haben, neue Studien aber zeigen, daß bei optimierter Therapie ein ähnlicher Verlauf wie beim typischen Osteosarkom zu erreichen ist; der chondroblastische Subtyp weisst generell eine bessere Prognose auf (Hauben 2002). Die Histologie erlaubt ausser der Sicherung der Diagnose und der histologischen Typen auch eine Einteilung der Tumoren in verschiedene Grade, wobei die Malignität anhand folgender Kriteria abschätzt wird: Anteil nekrotischen Gewebes, Zahl der Mitosen, Zellularität, Tumordifferenzierung, Kernatypien und Gefäßinvasion (Unni 1984).

Das Grading korreliert mit der Prognose des Tumors und ist wichtig für die Therapie-Wahl, für die aber das Staging noch entscheidender ist. Das am meisten benutzte Staging System (Enneking 1986) besteht aus Grading (G0-G2), Tumorgrösse und Begrenzung (T1-2) und dem Vorhandensein von Metastasen (M0-1). Nachdem alle 3 benannten Faktoren berücksichtigt werden, werden Sarkome in Stage 1-3, A oder B klassifiziert. Stage I beinhaltet benigne Tumore und Tumore mit niedrigem malignen Potential, Stage II beinhaltet maligne Tumore mit hohem malignen Potential und Stage III umfasst alle Tumore mit Metastasen. A ist für intrakompartimentelle Tumoren, B für kompartimentüberschreitende Tumoren.

1.3 Osteosarkom bei der Maus

Spontane Osteosarkome bei der Maus sind, wie beim Menschen, seltene Tumore mit Inzidenzrate <1% (Luz 1991). Was die Lokalisation betrifft, ist die Wirbelsäule am häufigsten beteiligt, gefolgt vom distalen Femur/ proximaler Tibia. Das Histologiespektrum der Mausosteosarkome variiert, je nach Differenzierungsgrad und Knochenmatrixproduktion, allerdings von den vielen histologischen Typen, die beim Menschen angetroffen werden, findet man in der Maus nur wenige: Der häufigste ist das osteoblastische Osteosarkom (Abb.1), Tumore können auch Areale mit fibroblastischer und chondroblastischer Differenzierung haben (Gossner 1985)

Insgesamt sind die Osteosarkome beim Menschen komplexer, jedoch weisen sie Ähnlichkeiten zwischen den 2 Spezies auf. Diese betreffen vor allem das hochgradige osteoblastische Osteosarkom und damit den häufigste histologischen Typ bei beiden Spezies. Diese Ähnlichkeit, sowie die bevorzugte intramedulläre Lokalisation gaben Anlaß zu vermuten, daß spontane, sowie radiogene Osteosarkome bei der Maus und Menschen durch ähnliche Prozesse hervorgerufen werden (Gossner 1985; Luz 1991). Deswegen könnten molekulare Untersuchungen am Maus-Osteosarkom auch von grossem Wert für das bessere Verständniss seines humanen Gegenstückes sein (über den Wert molekularer Mechanismen bei Tiermodellen s. 1.8).



Abb.1 *Histologisches Bild von Osteosarkom (Maus) mit Osteoidproduktion aus malignen Zellen. Aus Eulep Databank, Bild von der GSF.*

1.4 Osteosarkom Ätiologie

Obwohl die Mehrheit der Osteosarkome bei Patienten unter 30 ohne eine präexistierende Knochenerkrankung auftreten (Fuchs 2002), hat ein Teil der Patienten eine genetische Veranlagung dazu , wie es unten besprochen wird. Bei Kindern die mit Chemotherapie und Bestrahlung behandelt wurden ist Osteosarkom der wichtigste Knochentumor in dern ersten 20 Jahren nach der Behandlung, besonders wenn die Kinder eine genetische Veranlagung zu Tumoren haben (Smith 1993; Chauveinc 2001)(s.unten).

In älteren Patienten tritt ein großer Teil der Tumore auf dem Boden einer präexistierenden Knochenerkrankung auf. Die wichtigsten sind: M. Paget (McNairn 2001), fibröse Dysplasie (besonders polyostotische Form), Exostosen (besonders beim Syndrom der multiplen Exostosen), multiple Enchondromatose (M. Ollier und M. Mafucci), Knocheninfarkte und Knochenfibrose nach Bestrahlung (Huvos 1985).

1.4.1 Genetische Veranlagung zu Osteosarkom

Es gibt mehrere genetische Syndrome die mit Osteosarkomentwicklung einhergehen, sie sind aber insgesamt selten (Hauben 2003). Die stärkste Veranlagung zur Osteosarkomentwicklung weisen Patienten mit Rotmund-Thomson Syndrom auf (Defekt in einer DNA-Helikase der RecQ-Familie), das aber aufgrund seines rezessiven Erbganges und einer sehr geringen Häufigkeit des mutierten Alleles ausgesprochen selten auftritt.

Häufiger begegnet man dagegen Patienten mit einer früheren Retinoblastom-Anamnese, das in der familiären Form autosomal dominant verebt wird. Diese Patienten haben ein 230fach erhöhtes Risiko als die Allgemeinpopulation Osteosarkom zu entwickeln (Matsunaga 1980). Wenn Retinoblastome mit Bestrahlung behandelt wurden, ist das Risiko für Tumore im Bestrahlungsfeld sogar um das 446fache erhöht (Abramson 1976; Chauveinc 2001). Sekundärtumoren bei Überlebenden von Retinoblastom sind häufig, die Mehrheit dabei besteht aus Weichteilsarkomen, unter denen das Osteosarkom mit 50% den grössten Anteil ausmacht, gefolgt von Fibrosarkomen, Leiomyosarkomen und Liposarkomen (Matsunaga 1980; Draper 1986; Smith 1993; Hauben 2003). Die familiäre From des Retinoblastoms beruht auf der Keimbahnmutation einer Kopie des Rb Tumor-Suppressor-Genes (Fearon 1997).

Die intakte Genkopie kann im Laufe des Lebens durch mutagene Ereignisse in somatischen Zellen inaktiviert werden und zu Retinoblastomen und anderen Tumoren führen. Dies hat Knudson dazu geführt, seine berühmte 2-Hit Hypothesis zu postulieren, wonach die Entwicklung eines Retinoblastoms eine Inaktivierung beider Genkopien erfordert, bei der familiären Form ist die eine Mutation schon in der Keimbahn vorhanden, das zweite Ereignis erfolgt im Laufe des Lebens, bei der sporadischen Form erfolgen beide Mutationen im Laufe des Lebens. Damit konnte die unterschiedlichen Altersverteilungen der familiären und der sporadischen Form des Retinoblastoms erklärt werden (Knudson 1975). Das Retinoblastom ist das erste familiäre Krebssyndrom, das auf einen definierten Gen-Defekt zurückgeführt werden konnte (Rb1, 13q14.1-14.2) (Friend 1986). Wegen der Funktion des nicht-mutierten Form von Rb1 bei der Unterdrückung der Tumorigenese wurde es als Tumorsuppressorgen bezeichnet (Friend 1988). Ein anderes familiares, autosomal dominant vererbtes Syndrom mit Veranlagung zu Tumoren und Osteosarkomentwicklung ist das Li-Fraumeni Syndrom (LFS) (Hauben 2003). LFS beruht auf einer Inaktivierung des Gens für das p53 Protein (17p13) (Malkin 1990), welches auch ein Tumorsuppressor Gen ist, analog zum Rb1. Verdacht auf Li-Fraumeni Syndrom besteht bei Patienten mit einem Sarkom vor dem 45 Lebensjahr, wenn bei einem Verwandten ersten Grades und einem Verwandten zweiten Grades ebenfalls ein Sarkom oder ein anderer Tumor aufgetreten war (Carnevale 1997). LFS Patienten neigen zu Entwicklung von Osteosarkom und Weichteilsarkomen, Brustkrebs, Hirntumoren, akuter Leukämie, adrenokortikalen Tumoren und Keimzelltumoren vom Riesenzelltyp (Birch 2001).Studien zeigten eine 1.3 -11.2% Häufigkeit von TP53 Keimbahnmutation bei pädiatrischen Osteosarkomen (Porter 1992; McIntyre 1994; Carnevale 1997; Hauben 2003). Obwohl die Keimbahnmutation von Rb1 und p53 charakteristische Tumore hervorruft, sind sie in einer grossen Anzahl von Tumoren inaktiviert, was die tumorsuppressive Wirkung dieser Gene in vielen Gewebetypen verdeutlicht.

Eine interessante Gruppe von Syndromen die mit Entwicklung von Tumoren, unter anderen Osteosarkom, Strahlungs- und Sonnenempfindlichkeit und vorzeitiger Alterung einhergeht, sind die Progerie Syndrome (Mohaghegh 2002). Denen ist pathogenetisch gemeinsam, dass sie auf Mutation von Genen beruhen, die an der DNA Reparatur massgeblich beteiligt sind und werden meistens rezessiv vererbt.

Rothmund Thompson Syndrom (RTS), anders bekannt als Poikiloderma atrophicans und Katarakt, geht mit Hautatrophie, Pigmentierung, Telangiektasie einher und ist häufig von juveniler Katarakt, Sattelnase, kongenitale Knochenläsionen, Haarwachstums-störungen und Hypogonadismus begleitet. Knochendefekte sind kongenitale Radiusaplasie und Daumenaplasie (Aplasien des ersten Strahles) (Pujol 2000; Wang 2001). In der grössten RTS Studie ist Osteosarkom in 32% der Patienten aufgetreten (Wang 2001). Der genetische Defekt geht einher mit Aneuploidien des gesamten Chromosom 8 oder Deletionen bzw. Translokationen von (8q). Häufig beobachtet man Mosaikbildung (das Nebeneinandervorhandensein von normalen Zellen und Zellen mit verändertem Karyotyp) (Der Kaloustian 1990; Ying 1990; Lindor 1996). Eine Mutation des RECQL4 Gens (8q24.3), eine Helicase, konnte in 3 aus 6 RTS Patienten gezeigt werden (Kitao 1999), in sporadischen Osteosarkomen ist das Gen aber selten mutiert(0 aus 71) (Nishijo 2004), im Gegensatz zu TP53 und Rb1.

Werner Syndrom charakterisiert von Sclerodermie-ähnlicher Haut, besonders an den Extremitäten, Kataract, subkutaner Kalzifikation, vozeitiger Arteriosklerose, Diabetes Mellitus II und einem vorzeitig gealtertem Gesicht mit schnabelähnlicher Nase ist ebenfalls ein Progerie Syndrom (Zalla 1980; Yu 1994; Mohaghegh 2002). Das verantworliche Gen, RECQL2 (8p12-p11.2) ,wie das Gen für das RTS, ist auch eine Helicase (Yu 1994). Patienten mit Werner Syndrom haben ein erhöhtes Risiko Osteosarkome zu entwickeln (Murata 1999; Ishikawa 2000; Tsuji 2000; Hauben 2003). Bedeutung hat das mutierte RecQL2-Allel wie das Werner-Syndrom selber auch allerdings nur in Japan.

Bloom Syndrom gehört ebenfalls der Progerie-Gruppe an und ist mit vorzeitiger Alterung, Diabetes Mellitus II, Teleangiektasien und Chromosomeninstabilität verbunden (Mohaghegh 2002). Das verantwortliche Gen ist die Blooms-Helikase RecQL3 (15q26.1), ein Enzym notwendig für DNA Reparaturen, Replikation und Rekombinationen.

In der Literatur gibt es auch sporadische Berichte über Osteosarkomentwicklung in Patienten mit erblichen Defekten, bei denen die genomische Stabilität gestört ist, wie z.B. Fanconi Anemia (Levinson 1997) und Ataxie-Telangiektasie (Makis 2004).Diese Syndrome machen klar wie man aus einer seltenen Krankheit wichtige Einblicke in die Funktion normaler Gene gewinnen kann.

Morbus Paget ist eine relativ häufige Knochenerkrankung, mit einer Prävalenz von 0.3% in Männern und Frauen über 55 Jahre (van Staa 2002), die Prävalenz variiert jedoch abhängig von der Abstammung (Armas 2002), sie ist häufiger bei Patienten Europäischer Herkunft (Gomez Acotto 2001). M. Paget wurde ursprünglich als chronische Knocheninflammation beschrieben und Osteitis deformans benannt (Paget 1877). In der Tat scheint die Klinik des M. Paget mit 3 Stadien Ähnlichkeiten mit einer Inflammation zu haben: 1) Akute Phase, Schmerzen im betroffenen Knochen, erwärmte Haut darüber, erhöhte BSG und Osteopenie im Röntgenbild. 2) Subakute Phase mit Linderung der Beschwerden, im Röntgenbild Remodellierung des

Knochens 3) Chronische Phase mit Knochen Deformation und Sklerose im Röntgenbild (Rosenberg 1999).

Die inflammatorische Pathogenese des Pagets wurde aber oft bezweifelt, bis Inklusionskörperchen in den Zellen von pagetischen Knochen entdeckt wurden, die mit Paramyxo-Viren (ähnlich dem Masern-Virus) angefüllt waren (Mills 1976; Harvey 1982). Das führte zur Klassifizierung von M. Paget als eine Art von slow virus Erkrankung (Hughes 1992), wie man sie auch von der Subakuten Sklerosierende Panenzephalitis (SSPE, verursacht von Masern) kennt. Auf die Bedeutung von Viren für die Entwicklng von Osteosarkoma wird in 1.3.4 eingegangen.

Es gibt geographische und familiäre Häufung M. Paget. Die familiäre Form von Paget hat verschiedene Vererbungsmodi und ist mit folgenden Genloci verbunden: 18q22.1, in dieser Region kodiert RANK, ein Protein wichtig für die Osteoklastdifferenzierung (Hughes 2000; Hofbauer 2004); 18q22.3,(Good 2001); 5q35 (PDB3), wo eine Mutation im SQSTM1 Gen gefunden wurde, das entsprechende Protein ist mit der RANK Kaskade assoziiert (Laurin 2002). Der Wissensstand derzeit jedoch ist, daß obwohl anfangs anders vermutet wurde (Hughes 2000) das RANK mit der familiären oder sporadischen Form von M. Paget in einer größeren Studie nicht assoziiert ist (Good 2001), sondern ein anderes kolokalisiertes Gen. Osteosarkom tritt in ungefähr 1% von Patienten mit M. Paget auf, was ein über 1000fach erhöhtes Risiko als für die Allgemeinpopulation darstellt (McNairn 2001).

FEO (Familiar Expansile Osteolysis) ist ebenfalls eine metabolische Erkrankung, mit histologischen Ähnlichkeiten mit M.Paget, tritt jedoch viel seltener auf. Das dafür verantwortliche Gen konnte auf 18q22.1 kartiert werden (Hughes, Ralston et al. 2000). Dies hat dazu geführt zu postulieren, daß FEO und M. Paget als Spektrum einer Mutation in einem gemeinsamen Gen angesehen werden.

1.4.2 Strahlungsinduziertes Osteosarkom

Strahlung hat eine kanzerogene Wirkung (Burch 1960; Tullis 1961), das Tumorspektrum variiert abhängig vom bestrahlten Gewebe (Abramson 1976; Francois 1977; Huvos 1985; Zhang 1997; Hahn 1998), der Intensität, Zeitverteilung und Art der Strahlung (α , β , γ) (Preston 2003) und vom Alter der Personen zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Strahlungen interagieren mit lebendem Gewebe auf verschiedenster Weise, die persistenten genomische Veränderungen nach Bestrahlung sind aber zum grössten Teil der DNA-schädigenden Wirkung von ionisierender Strahlung zuzuschreiben (Turner 2004).

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Strahlung und Osteosarkomentwicklung gab das Auftreten von Osteosarkomen (Evans 1967) bei Arbeiterinnen, die Leuchtzifferblätter für Flugzeug-Instrumente produzierten, und dazu die Pinsel mit der Radiumhaltigen Farbe mit dem Mund abgefeuchtet hatten (Boyd 1966). Radium, ein α -Strahler, kann perkutan in diesen Dosen keine Osteosarkome hervorrufen, weil aufgrund seines hohen LET (linearer Energie Transfer) die Strahlung nur eine geringe Eindriengstife hat. Bei diesen Arbeiterinnen aber wurde es enteral absorbiert und im Knochen abgelagert wo es seine mutagene Wirkung entfaltet hat . β -Strahlung kann perkutan den Knochen nicht erreichen um mutagen zu wirken und die karzinogene Wirkung von γ -Strahlung ist weniger organspezifisch, ausserdem würde es hier bei höheren Dosen in erster Linie zu akut toxischen Effekten in schnell proliferierendem Gewebe kommen (Darm, Haarfollikel, Knochenmark) (Potten 1978).

Ähnlich wie das Radium wirken andere α -Strahler die absorbiert werden und lokal im Knochen hohe Energien freisetzen. Beispiele sind Plutonium (Altner 1972; Sindelar 1978; Koshurnikova 2000; Miller 2003), Thorotrast (Altner 1972; Sindelar 1978), und Peteosthor (Ra224). Die zwei letzteren wurden auch für medizinische Zwecke benutzt (Thorotrast als Kontrastmittel und Peteosthor zur Therapie der Knochen-Tuberkulose und des Morbus Bechterew).

Die Wirkung unterschiedlicher Strahlenarten mit ihrem charakteristischen LET auf das betroffenen Gewebetyp erklärt, warum keine erhöhte Inzidenz von Osteosarkomen bei Überlebenden der Hiroshima und Nagashaki Atombomben, gefunden wurde. Diese Personengruppe wurde durch die Bombenexplosionen hauptsächlich mit γ- und Neutronen-Strahlung im Bereich zwischen 0.05 und 3 Sv exponiert (Shigematsu 1994). Dagegen können Retinoblastom-Patienten, die in einem eng begrenzten Strahklungsfeld mit weit höheren therapeutischen γ-Dosen behandelt wurden, Osteosarkome im bereich der mitbestrahlten Gesichtsknochen entwickeln. Diese Tumoren traten 1.3 Jahre früher auf als Osteosarkome ausserhalb des Feldes und zeigten eine bimodale kumulative Inzidenz (Francois 1977; Chauveinc 2001). Aufgrund dessen wurde postuliert, daß bei den früh auftretenden Osteosarkomen die Strahlung die übriggebliebene Kopie des Rb1 inaktiviert, während bei den spätauftretenden auch andere Mechanismen dafür verantwortlich gemacht werden können. Auf die Wirkung von Chemotherapie und Radiotherapie wird unten eingegangen

1.4.3 Chemische Induktion von Osteosarcom

Es wurde für eine Reihe von chemischen Stoffen gezeigt, daß sie Osteosarkom induzieren können, wie Methylcholanthren, Nitroquinoline1-Oxide, 7,12-Diimethylbenz[alpha]anthracene (Sato 1978), Beryllium Oxid (Hiruma 1991) und Zink Beryllium Silikat (Mazabraud 1975). Diese Stoffe haben Tumoren durch Lokalexposition bei Versuchstieren, Zink Beryllium Silikat sogar bei intravenöser Injektion verursacht. Klinisch wichtiger ist das Auftreten von Osteosarkomen als Zweittumoren bei Radio- und/oder Chemotherapie für andere Tumore, wo sie sogar der häufigste Zweittumor sind mit 21.26% (Smith 1993). Hier wird die kooperative Wirkung von 2 Karzinogenen deutlich, Chemotherapie alleine verursacht sehr selten Osteosarcom als Sekundärtumor und perkutane γ – Strahlung verursacht selten Osteosarkome (ausser bei Retinoblastom Patienten, s.o.). Wenn beide Modalitäten jedoch eingesetzt werden, steigt die Osteosarkominzidenz um ein mehrfaches. Patienten mit DNA - Reparaturdefekten und chromosomaler Instabilität sind besonders prädestiniert Osteosarkom als Fogle von Chemotherapie alleine zu entwickeln, wie z.B. Patienten mit Diamond Blackfan Syndrom (Aquino 1996; Lipton 2001), Ataxie-Telangieactasie (Makis 2004).

1.4.4 Virale Induktion von Sarkomen

Rous hat in 1912 bei seiner Arbeit an Hühnern gefunden, dass zellfreie Extrakte aus Fibrosarkomen neue Tumore in gesunden Tieren, denen sie injiziert wurden, induzierten (Rous P 1912). Später wurde das ätiologische Agens gefunden, es handelt sich um ein RNA-Virus oder Retrovirus, das Rous Sarcoma Virus. Das Virus enthält ein Gen das v-src (v für viral), welches als Onkogen identifiziert wurde (Pritchard DJ 1975; Friend 1988). Gesunde Zellen enthalten ein dem v-src sehr ähnliches Gen, das c-src (c für cellular). Dies hat gezeigt, daß eine enge Beziehung zwischen einem normalen, zellulären Gen und einem viralen Onkogen bestand und dass Tumore aus der Wirkung von normalen oder fast normalen Genen verursacht werden kann. Solche Gene die Onkogenen ähnlich sind, selbst aber in normalen Zellen enthalten sind heissen Proto-onkogene und sind erst bei Veränderungen, die Überaktivierung des Gens zufolge haben in der Lage Tumore zu induzieren (Ponder 2001). Viralen Onkogene sind wohl aus der Transduktion von Protoonkogenen ins virale Genom entstanden mit einer nachfolgenden Mutation des Promoters, so dass es nicht mehr unter der Kontrolle der normalen Zellmechanismen steht und zu einem Onkogen aktiviert wird (Bishop 1981). Mehrere Onkogene sind dann in Retroviren identifiziert worden, was auf das Vorhandensein mehrerer Protoonkogene im Genom höherer Organismen schliessen lässt, die bei entsprechenden aktivierenden Mutationen zu einem Onkogen transformiert wurden (Friend 1988).

Im Hinblick auf die Osteosarkom-Entwicklung gibt es noch ein ganz prominentes Retrovirus. Es handelt sich um das FBJ Virus bei Mäusen (Finkel 1966), das entsprechende Onkogen und Protoonkogen sind v-fos und c-fos (Barker 1984). Das FBJ Virus verursacht Osteosarkome und Fibrosarkome bei fast 100% der Tiere die damit inokuliert warden, Aktivierungen des c-fos sind bei vielen Tumorarten nachzuweisen, unter anderem beim Osteosarkom (s.1.5).

1.4.5 Regeneration und Trauma als Induktoren von Osteosarkomen

In der Literatur gibt es einige Berichte über Patienten, die ein Osteosarkom nach Trauma entwickelt haben. Ob es an der regenerativen Antwort, der Inflammation und damit verbunden Gewebsproliferation oder dem Zufall liegt ist unbekannt. (Monkman 1974). Osteosarkom ist neben einem chirurgischen Schwamm, der in einem Hund versehentlich vergessen wurde, beobachtet worden (Pardo 1990) und in einem Fokus von Myositis ossificans nach elektrischer Verbrennung beschrieben worden (Aboulafia 1999). Diese Art der Karzinogenese scheint aber praktisch keine Bedeutung für die allgemeine Praxis zu haben.

1.5 Molekulare Mechanismen für Karzinogenese allgemein

Krebsentstehung ist ein komplexes Geschehen, dem mehrere genetische Läsionen zugrunde liegen. Nach Hanahan und Weinberg sind beim Darmkrebs 6 Veränderungen in der normalen Zell-Funktion notwendig, damit es zur malignen Transformation kommt (Hanahan 2000). Selbständigkeit in Wachstumssignalen, Insensitivität für wachstumshemmende Signalen, Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose), grenzenloses replikatives Potential, ausreichende Angiogenese und Gewebsinvasion und Metastase. Diese Schrite werden kurz diskutiert.

<u>Selbständigkeit in Wachstumssignalen</u>: Normale Zellen brauchen Wachstumssignale um die Transition aus einer ruhenden in eine proliferierende Form zu machen. Diese Signale können aus Wachstumsfaktoren, Zell-Matrix Komponenten und Zell-Zell Interaktionen stammen und werden meistens über Membranrezeptoren oder das Zytoskelett an das Zellinnere weitergeleitet, über Kaskaden die mehrere Proteine enthalten und die Aktivierung von mitose-anregenden Genen im Kern zufolge haben. Aktivierungen in jedem Mitglied dieser Kaskaden können ein erhöhtes Zellwachstum hervorrufen und zu Krebs prädisponieren, wie es bei der Aktivierung von Protoonkogenen der Fall ist. Beispiele hierfür sind:APC, PDGF, TGF-β, Neu/Her-2, Ras/Raf Kaskade, c-fos, c-myc, CDK 4 (Fearon 1997).

Insensitivität für Wachstumshemmende Signale: Unter normalen Bedigungen werden ruhende Zellen durch multiple wachstumshemmende Signale in ihrer ruhige Lage gehalten. Ähnlich wie die Wachstumssignale werden sie über sezenierte Moleküle, Zell-Matrix oder Zell-Zell Interaktionen, meistens über Zellmembranproteinen oder das Zytoskelett und andere Kaskaden ins Zellinnere vermittelt. Wachstumsinhibitoren können die Zelle in die G0 Phase des Zyklus zwingen oder einen Proliferationsblock in der Transition von der G1 in die S Phase vermitteln. Diese Stelle des Zellzyklus, die G1->S Transition ist sehr wichtig und eine Störung des Gleichgewichts wird sehr häufig bei vielen Tumorarten gefunden, weswegen sie näher erläutert wird.

Wie es der Abb.2 zu entnehmen ist, erfolgt die Transition von der G1 in die S Phase über eine Phosphorylierung des Retinoblastom-proteins (pRB). Das unphosphorylierte pRB bindet an Proteinen der E2F Familie und ist inaktiv, bei Phosphorylierung aber löst es sich von diesen Bindungen ab und ist an der Transkription einer Reihe von Gene beteiligt, die für die den Start der S-Phase und die DNA Replikation notwendig sind. Dazu zählen DNA-Polymerasen, Thymidinkinasen, Dihydrofolatreduktasen und viele mehr. Die Phosphorylierung



Abb. 2 G1->S Kontrolpunkt: Rb1 Phosphorylierung ermöglicht den Übergang in die S-Phase. Die Phosphorylierung wird durch Cyclin/CDKinasen und Inhibitoren der Kinasen reguliert (p15, p16, p21, p27). Aus <u>http://www.biocarta.com /pathfiles /h_rbPathway.asp</u>

von Rb erfolgt über mehrere CDK-Cyclin Komplexe. CDK's sind Kinasen die erst durch Cycline aktiviert werden (Cyclin Dependent Kinase). Wenn die Zelle ein Wachstumssignal erhält wird Cyclin D produziert, welches an CDK 4 und 6 bindet und später wird auch Cyclin E produziert, welches an CDK 2 bindet. In der Progression von der S Phase in die G2 wird Cyclin A hochreguliert und es werden die CDK 1 und 2 aktiviert. In der G2 Phase wird Cyclin B hochreguliert und zusammen mit Cyclin 1 reguliert es die Transition in die M Phase. Die Aktivität der Cyclin/CDK Komplexe wird über mehrere inhibitorische Proteine reguliert, sogennante INK's (Inhibitors of Kinases). p21, p27, p57 hemmen mehrere Cyclin/CDK Komplexe, während p15, p16, p18, p19 hauptsächlich die CyclinD/CDK4 und CyclinD/CDK6 hemmen . Diese Zellzyklusregulierung ist bei sehr vielen Zelltypen aktiv, was die zentrale Rolle des pRb, der Cycline und der INK's bei der Krebsentstehung verdeutlicht. So sind Inaktivierungen des pRb, p16 (Tumorsuppresor-Gen) oder Aktivierungen des Cyclins 4 bei vielen Tumoren häufig, bei manchen schon in Initialstadien (Park 1998).

<u>Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose)</u>: Ein apoptotisches Programm ist in den meisten Zelltypen vorhanden, welches die Zellen überwacht und bei Schädigung / Mutationen aktiviert wird, um der Zelle Gelegenheit zu Reparaturen zu geben. Wenn dies die Zelle nicht schafft, die Schädigung oder das apoptotische Signal zu stark sind und die Zelle zu weit im Zell-Zyklus ist, wird eine Kaskade initiiert die den Zelltod zufolge hat. Charakteristisch für viele Tumorzellen ist aber, daß sie eine erhöhte antiapoptotische Resistenz aufweisen. Das System besteht mechanistisch aus Sensoren, die Zellschäden registrieren und Effektoren, die den Zelltod verursachen. Der Hauptsensor ist TP53, ein Protein das im Nukleus lokalisiert ist und bei Schädigung des Genoms, etwa UV-Strahlung oder chemische Substanzen schnell durch Phoshorylierung stabilisert wird, wodurch es als transkriptioneller Aktivator einer Reihe proapoptotischer Gene (z.B. Bax, Igfbp3) wirken kann. Seine Wirkung wird anhand des folgenden Bildes erläutert (Abb.3).



Abb. 3 TP53 Funktion: TP53 wird durch apoptotische Signale und DNA Schaden aktiviert und kontrolliert den Zellzyklus über BAX, p21, GADD 45, IGF-BP3. Aus <u>http://www.biocarta.com/pathfiles/h_p53Pathway.asp</u>

Das hochregulierte p53 bindet an die DNA und stimuliert die Transkription von mehreren Genen, welche die 2 grossen Wirkungen des p53 ausüben: Inhibition des Zell-Zyklus und Apoptose. Die Inhibition des Zellzyklus erfolgt hauptsächlich über das p21 (ein CDK inhibitor wie es oben geschildert wurde und der Zelle Zeit zum Reparieren gibt) und GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage, trägt über unbekannte Mechanismen zur Zellreparatur bei). p53 aktiviert auch das MDM2 Gen, dessen Produkt bei erfolgreicher Zell Reparatur das p53 hemmt und den Zellzyklus Block aufhebt. Die apoptotischen Genen, die von p53 aktiviert werden, sind das BAX und das IGF-BP3 (IGF Binding Protein). Lassen sich DNA-oder Chromosmenschäden aufgrund ihrer Komplexität nicht mehr reparieren, kann die Zelle zum Schutz des Gesamt-Organismus zerstört werden. Das BAX bindet an bel-2, ein antiapoptisches Molekül und IGF-BP3 wirkt über Hemmung der Wachstummssignale von IGF. Die ultimativen Effektoren des Systems sind Caspasen, Proteasen die Proteine zwischen Cystein und Aspartat schneiden und den Tod der Zelle durch [Ca⁺²] Erhöhung, Destruktion des Zytoskeletts und andere Mechanismen herbeiführen. Ähnlich wie pRB hat p53 eine sehr wichtige Rolle als Hemmer von Tumorentstehung und wurde als "Genome Guardian" charakterisiert. Es wird auch klar, dass MDM (als p53 Antagonist) und bcl-2 (als Apoptose-Hemmer) als Onkogene wirken und die Zelle apoptose-resistent machen (Cotran 1999a).

<u>Grenzenloses replikatives Potential</u>: Menschliche Zellen in Kultur können eine definierte Anzahl von Mitosen durchmachen, dann sterben sie, im Gegensatz zu Tumorzelllinien, die unsterblich sind. Der Grund hierfür liegt in der limitierten Aktivität des Enzyms Telomerase, welches die Chromosomenenden repariert. Bei jeder Mitose gehen nämlich Teile der Telomere verloren und sie werden nur unvollständig repariert. Bei Erreichen einer unteren Schwellenlänge der Telomere stellt die Zelle weitere Teilungen ein und gerät in den relativ irreversible Zustand der Senescence (Cotran 1999b). Stammzellen haben eine erhöhte Aktivität der Telomerase und je mehr sie sich in somatische Zellen differenzieren geht die Aktivität des Enzyms verloren. Die Telomeraseaktivität ist bei vielen Tumorarten erhöht, bei Osteosarkomen spielt sie jedoch keine nachweisbare Rolle (Nakashima 2003). <u>Neo-Angiogenese</u>: Bei Erreichen einer kritischen Grösse des Tumors (1-2mm), wo die Diffusion zur Zellversorgung nicht ausreicht, müssen Gefässe in den Tumor einwachsen, damit dieser ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden kann (Cotran 1999c). Die Angiogense wird über VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF1 (Fibroblastic Growth Factor) und FGF2 aktiviert, über Thrombospondin 1 gehemmt. Die Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese sind ein Feld aktiver Forschung, das sich ständig ändert.

<u>Gewebsinvasion und Metastase</u>: Tumoren können invasiv wachsen und in andere Organe metastasieren, Metastasen sind die Haupttodesursache bei über 90% der soliden Tumoren. Tumorzellen erreichen dies, indem sie Proteine, welche die Zell-Zell-Interaktionen vermitteln (wie E-Cadherin), inaktivieren. Auf dem Weg der Invasion und Metastase müssen sie sich einen Weg durch die extrazelluläre Matrix verschaffen, wozu verschiedene Gewebe-Proteinasen exprimiert werden (es existieren Serin, Cysteine und Matrixmetalloproteinasen), welche auch die Basalmembranen errodieren (Kollagenase IV) (Cotran 1999a).

Diese kurze Einleitung verdeutlicht die Komplexität der Krebsentstehung und die Tatsache, dass Krebs eine multifaktorielle Erkrankung ist. Entscheidend ist aber, dass Tumorzellen im Verlauf ihrer Entwicklung genetische Läsionen akkumulieren, die nicht mehr reversibel sind (Fearon 1998; Ponder 2001). Einige dieser genetischen Veränderungen in Tumorzellen sind essentiell schon für bei Vorläuferläsionen zu registrieren, andere sind erst in späteren Stadien wirksam. Am klarsten ist das im Verlaufe der Progression von Polypen zu Karzinom im Kolon zu beobachten, wo zunehmende Dysplasie und Malignität mit anderen Läsionen assoziiert sind (Fearon 1994).

Verschiedene Gene sind bei jedem Gewebstyp für die Tumorentstehung wirksam, weswegen es nicht DAS Tumorgen gibt. Auch innerhalb der selben Kaskade sind nicht alle Gene gleich betroffen, was für das unterschiedliche onkogene Potential der Gene spricht. Gene wie APC, p53, pRb die früh betroffen und kritisch für die Tumorentstehung sind, werden als "Gatekeeper genes" bezeichnet, er reicht meist eine Keimbahnmutation eines Gens aus, damit sich Tumore entwickeln. Gene die für die DNA Reparatur wichtig sind (z.B BRCA 1 und 2, HSMS - hier nicht besprochen -, Ataxie-Telangiektasie - Genprodukt) werden als "caretaker genes" bezeichnet und deren Funktionsverlust führt zu Mutationen von gatekeeper genes. Eine Keimbahnmutation von einem caretaker gene wird erst dann wirksam, wenn die zweite Kopie ausgeschaltet wurde und dann zusätzlich gatekeeper genes betroffen werden. Deswegen werden familiäre Krebssyndrome die mit gatekeeper Genes assoziiert sind autosomal dominant vererbt und solche die mit caretaker Genes assoziiert sind autosomal rezessiv (Fearon 1997; Gupta 1997; Kinzler 1997).

1.6 Wert der LOH in der Analyse der Krebsentstehung.

Krebs ist ein komplexes Geschehen mit der Akkumulierung mehrerer genetischer Läsionen. Dabei werden Tumorsuppressorgene inaktiviert und Onkogenene aktiviert. Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kann durch Deletion großer chromosomaler Fragmente erfolgen, die man mit einer LOH Analyse (Loss of Heterozygosity) erfassen kann. Deswegen besteht bei Loci mit konsistentem LOH Verdacht auf das Vorhandensein von Tumorsuppressorgenen in der Region (Devilee 2001).

Ein Missverhältnis zwischen 2 Allelen (die Kopien eines Gens, die auf einem Chromosomenpaar vorhanden sind) kann durch Deletion, Duplikation, Mitotische Rekombination, Chromosomenerlust mit oder ohne Duplikation (Monosomie), Chromosomengewinn (Disomie) und Genkonversion (Devilee 2001). Die mitotische Rekombination ist wohl quantitativ der wichtigste Mechanismus (Gupta 1997).

Die Detektion von Amplifikationen und Deletionen im Genom bilden die Basis für das Entdecken von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen. Die Entdeckung von ploymorphen Mikrosatelliten hat es möglich gemacht, diese als allelspezifische DNA-Marker einzusetzen und damit das Auftreten von allelischer Imaballance entlang der Chromosomen zu kartieren. Mikrosatteliten sind kurze, einfache repetitive Sequenzen im Säugertieregenom wie (CA)_n, die zufällig im Genom verteilt sind. Die Länge dieser Sequenzen variiert erheblich interindividuell und macht sie zu sehr wichtigen, leicht zugänglichen polymorphen genetischen Marker für Gene, die in der Nähe liegen (Dietrich 1994). Mikrosatellitensequenzen können mit der PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifiziert werden und die unterschiedliche Länge der Sequenz auf jedem Chromosom führt zu 2 PCR Produkten mit jeweils anderer Länge und z.B. anderem Laufverhältnis in einer Agargelelektrophorese, das man sich zunutze macht.

Das Problem mit der LOH Analyse ist, dass sie lediglich eine Abweichung vom normalen 1:1 Verhältniss der beiden elterlichen Allele nachweisen kann, nicht aber deutlich macht, ob es sich um eine Deletion eines Allels handelt, eine Amplifikation des anderen oder ein preferentielle Amplifizierung eines Allels in der PCR. Das hatte zur Folge, daß zunehmend anstatt von LOH von einem AI gesprochen wird, nämlich von Allelic Imbalance (allelisches Mißverhältnis) (Devilee 2001). Andere Methoden, wie die CGH (Comparative Genome Hybridisation) können nicht nur Missverhältnise entdecken, sondern auch zeigen ob es sich um Deletionen oder Amplifikationen handelt (Shi 1997; Hodgson 2001).

Nichtdestotrotz hat sich die LOH-Analyse als Suchmethode für Tumorsuppressorgene bewährt, weil in vielen Loci von konsistenter LOH anschliessend Tumorsuppressorgene identifiziert und kloniert wurden (Fearon 1995; Fearon 1997). Die LOH dient meistens als Suchmethode für Kandidaten Tumorsuppressorgene, darauf hin schließen sich andere Methoden zur definitiven Identifizierung des Gens an (Dietrich 1994; Gupta 1997; Lander 1997; Girard 2000; Ho 2002; French 2004). Beispiele von Tumorsuppressorgenen, die mittels LOH erkannt wurden und sich anschließend als Tumorsuppressorgene bestätigten, sind: LCRG1 Gen, von dem LOH Locus 17q12-21.1, welches schon aus Prostata und Larynxkarzinomen bekannt war (Li 2004) und das MADH6 Gen (aus der MAD Familie die an der TGF-β Signalkette beteiligt ist), bekannt aus dem Locus 13q12-q14, zwischen dem BRCA2 and RB1 Gen, eine Region die bei Mamma und Prostata oft LOH aufweist (Watanabe 1997). Für Tumorsuppressorgenne aus hereditären Syndromen konnte gezeigt werden, dass sie auch bei sporadischen Tumoren oft von LOH betroffen sind, z.B. das p53 und Rb1 bei sporadischen Osteosarkomen (s.1.6).

1.7 Bekannte Molekulare Mechanismen beim menschlichen Osteosarkom Die in 1.4 diskutierten allgemeingültigen Mechanismen der Tumorentstehung sollen im Folgenden für das Osteosarkom präzisiert werden. Dabei werden die bereits klar identifizierten Tumorsuppressorgene und Onkogene des Osteosarkoms zusammengefasst wird. Das Osteosarkom, wie jeder Tumor, ist keine monogene Erkrankung, sondern beruht auf dem Zusammenspiel mehrerer genetische Läsionen. Dennoch scheinen manche Gene und Signalwege besonders häufig bei Osteosarkomen betroffen zu sein.

1.7.1 Tumorsuppressorgen Inaktivierung

p53: Wie aufgrund seiner Schlüsselrolle in der Regulierung des Zellüberlebens und Zellzykluses zu erwarten ist findet man das p53 Gen bei sehr vielen Tumorarten von Veränderungen betroffen. Zahlreiche Studien zeigen, dass p53 sehr häufig auch bei sporadischen Osteosarkomen betroffen ist und nicht nur bei LFS-Osteosarkomen.
Anomalien im p53 Gen werden in 31.5- 50 % der Fälle mit verschiedenen Methoden (LOH, Southern und Northern Blot) identifiziert (Scholz 1992; Toguchida 1992;
Yamaguchi 1992; Wadayama 1993; Miller 1996; Pellin 1997; Goto 1998; Tsuchiya 2000; Kawaguchi 2002; Patino-Garcia 2003; Tsai 2004). p53 wird in nur 27 – 44.8 % der Fälle mit Immunhistochemie (IHC) detektiert (Park 1995; Geradts 1999; Benassi 2001; Hu 2001; Kawaguchi 2002; Nakashima 2003; Tsai 2004).

Weiterhin korelliert eine Veränderung des p53 Gens mit schlechtem Ansprechen auf Chemoresistenz (Goto 1998) und schlechterer Prognose (Tsuchiya 2000). Ein LOH im p53 ist mit hoher genomischer Instabilität verbunden, was als Zeichen der Tumorprogression und nicht als frühes Ereignis gedeutet wurde (Overholtzer 2003). In low grade Osteosarkomen ist p53 in 15.7% verändert, jedoch war es in keinem aus 8 parostealen Sarkomen mutiert (Radig 1998).

<u>pRb</u>: Ähnlich wie das p53 ist pRb ein zentrales Protein in der Regulierung des Zellzyklus und ist bei einem grossen Teil der Osteosarkome betroffen, wie es mehrere Studie nahelegen. Das Gen ist in 19 -70% der Fälle verändert (Scholz 1992; Yamaguchi 1992; Wadayama 1994; Belchis 1996; Feugeas 1996; Miller 1996; Pellin 1997; Patino-Garcia 2003). Anhand der größeren Studien scheint eine Rate von 40 -70% realistisch zu sein (Wadayama 1994; Belchis 1996; Feugeas 1996; Patino-Garcia 2003).

Eine konkordante Mutation in p53 und pRB wurde in 1 aus 7 Tumoren mit Rb Mutation (Scholz 1992) und in 5 aus 7 Tumoren einer anderen Studie (Miller 1996) gefunden. LOH für das p53 korellierte mit einer 43% 5-Jahresüberlebenschance (Feugeas 1996), während 100% der Patienten ohne LOH nach 5 Jahren lebten. In einer anderen Studie wiesen 44% der Tumore Mikrosatteliteninstabilität auf, was sehr wahrscheinlich machte, daß Osteosarkome genetisch instabil sind (Belchis 1996).

Interessanterweise zeigte es sich, daß 50% der Tumore mit LOH doch eine Expression des pRb aufwiesen, während 50% der Tumore ohne LOH keine/schwache Expression von pRb hatten (Wadayama 1994). Das gibt Hinweise auf die Bedeutung von epigenetischen Phänomen in der Tumorentstehung.

Im Proteinniveau zeigte Benassi, daß nur 40-46% der Fälle eine positive pRb Expression mit IHC hatten, weiter konnte die reduzierte Expression von pRb als schlechter prognostischer Faktor identifiziert werden (Benassi 1997; Benassi 1999). Ähnliche Ergebnisse mit IHC hatte Nielsen, der eine niedrige Rb1 Expression in 46% der Fälle feststellte (Nielsen 1998), während Maitra eine reduzierte Rb Expression in 29% der Tumore entdeckte (Maitra 2001).

In low-grade Osteosarkomen war das Rb1 in keinem der analysierten Tumore mutiert (Wunder 1991).

p15, p16, p18, p19: Diese Proteine bilden die Gruppe von INK4s (Inhibitors of Kinase
4), weil sie hauptsächlich über den CDK4/Cyclin D Komplex ihre Kontrolle auf den
Zellzyklus ausüben, wo sie als Tumorsuppressorgene fungieren (s. 1.4). Ihre
Beteiligung am Osteosarkom ist durch mehrere Studein belegt: Auf genomischer
Ebene werden Veränderungen bei p16 selten (5.5-19%) detektiert (Miller 1996;
Tsuchiya 2000; Patino-Garcia 2003). p14 sind in 9% und p15 in 15% der Fälle
betroffen (Tsuchiya 2000). Auf Proteinniveau zeigte sich jedoch eine verringerte
Expression von p16 in 24% der Fälle, in 4/5 dieser Tumore konnte eine CDK2NA
Deletion gezeigt werden (CDK2NA ist das Gen das für p16 kodiert) (Nielsen 1998).
pRb war in 46% niedrig exprimiert in der gleichen Studie, jedoch waren in keinem
Tumor gleichzeitig beide Tumorsuppresorgene niedrig exprimiert. Entweder das eine, oder das andere war betroffen. Ähnlich konnte Maitra mit Immunhistochemie zeigen, daß in 16% der Fälle eine niedrige Expression von p16 bestand und in einem weiteren
29% von pRb. Wie in der Studie von Nielsen, waren in keinem Tumore gleichzeitig beide Gene niedrig exprimiert.

Daraus kann man vermuten, daß Veränderungen entweder im Rb oder im p16 notwendig für die Tumorigenese sind, sich aber gegenseitig ausschließen, denn beide wirken im gleichen Zellzykluskontrollpunkt (1.4). Die niedrige Expression von p16 war ein schlechter prognostischer Faktor, während die pRb Expression keinen Einfluss auf das Survival hatte.

Einblick in die molekulare Mechanismen der Inaktivierung von p16 geben Studien, die eine Hypermethylierung des p16 Promoters in Fällen mit niedriger p16 Expression bei fehlender LOH oder Mutation zeigen.(Benassi 1999; Benassi 2001)

Dies erklärt die Diskrepanz zwischen den Studien, die nur selten Deletionen von p16 auf genomischer Ebene entdeckten, während die Proteinuntersuchungen einen höheren Prozentsatz von p16 Inaktivierung indizierten. Hypermethylierung ist neues Konzept für Tumorsuppressorgen- inaktivierung von dem eine Reihe von Genen betroffen sind (Feinberg 2001a; Feinberg 2001b).

1.7.2 Onkogen-Aktivierung

Eine Fülle von Studien belegt auch die Beteiligung von Onkogenen an der Osteosarkomentstehung.

<u>Cyclin D-CDK4</u>: CDK4 war in einer Arbeit nicht hoch exprimiert (Nielsen 1998), während Benassi mit Immunhistochemie und Immunoblots eine Überexpression des CDK4 in über 80% fand, aber keine Expression des CDK4/Cyclin Komplexes (Benassi 1997). In einer anderen Studie wurde bei 92 Osteosarkomen mittels Immunhistochemie keine oder nur schwache Expression des Cyclins D fesgestellt, der totale Verlust des Cyclins D korrelierte mit schlechter Prognose (Molendini 1998). In Akkordanz dazu war Cyclin D nicht oder niedrig exprimiert (Maitra 2001).

Eine sehr interessante Verbindung zwischen CDK4 Überexpression und low grade Osteosarkomen, besonders parostealen, konnte aus mehreren Studien gezogen werden (Ragazzini 1999; Wunder 1999; Gamberi 2000; Gisselsson 2002). CDK4 wird in einem hohen Prozentsatz von low grade Osteosarkomen überexprimiert, bei parostealen sogar zu 100% (Wunder 1999), während in der gleichen Studie keines der high grade Osteosarkome eine Überexpression von CDK 4 aufwies.

<u>MDM 2:</u> Das MDM2 Protein kann bei bei Überexpression das p53 inaktivieren und damit Zellen apoptose-resistent machen, jedoch zeigten anfängliche Studien Amplifikation von MDM2 in nur 0 -14% der Fälle (Miller 1996; Pellin 1997; Tsuchiya 2000; Kawaguchi 2002). Ähnlich wie beim CDK4 zeigte sich jedoch auch stärkere Beteiligung von MDM2 bei low grade Osteosarkomen, bei denen 21-35% (Tarkkanen 1998; Ragazzini 1999; Wunder 1999; Gamberi 2000; Gisselsson 2002) eine Amplifikation aufwiesen. Die häufigsten Fälle einer MDM2 Dysregulation wurden bei parosteoalen Osteosarkomen festgestellt, bei denen in 5 von 6 Fällen, jedoch in keinem einzigen high-grade Osteosarkom eine transkriptionelle Überexpression (Wunder 1999).

<u>SAS</u>: Sarkoma Amplified Sequence wurde zunächst als ein Amplifikationslokus in MFH (Meltzer 1991) und anderen Weichteilsarkomen (Smith 1992) entdeckt und es wurde postuliert, daß SAS ein Onkogen ist. Dazu gibt's Hinweise aus Studien an Osteosarkomen, besonders aus low-grade Tumoren. Ragazzini hat eine SAS Amplifikation in 15% von intramedullären low-grade Tumoren (Ragazzini 1999) gezeigt, in parostealen Osteosarkomen liegt die Amplifikationsrate wesentlich höher mit 100% (Noble-Topham 1996; Wunder 1999)

<u>Cycline A, E</u>: Immunhistochemische Untersuchungen an 92 high-grade Tumoren zeigten eine hohe Expression von Cyclin A in 59% und Cyclin E in 47% der Fälle (Molendini 1998).

<u>C-fos, c-jun</u>: C-fos ist ein humanes Protoonkogen, es bildet mit c-jun ein Heterodimer und aktiviert Gene mit Ap1 Elementen in ihrem Promoter. C-fos entspricht dem viralen v-fos aus dem FBJ-Virus (Finkel-Biskis-Jinkins), das Osteosarkome (und weniger Fibrosarkome) in einem hohen Prozentsatz von exponierten Mäusen verursacht (s. 1.4). Mehrere Studien zeigen eine Überexpression von c-fos mit Immunhistochemie in 40-61 % der Fälle (Wu 1990; Franchi 1998; Gamberi 1998; Weisstein 2001). In der Analyse von Franchi waren alle Osteosarkome mit c-fos/c-jun Koexpression high grade, während 1 telangiektatisches, 1 periostales, 1 parosteales und 2 low-grade zentrale keine c-Fos Aktivität zeigten, was für die Aktivierung von c-fos in highgrade Tumore spricht. Ferner, konnte c-fos und c-myc Koproduktion als prognostischer Faktor für Metastasen in 6 aus 7 Fällen (93%) identifiziert werden (Gamberi, 1998).

<u>Her-2/neu</u>: Her-2/neu ist der Rezeptor für EGF und somit an der Übermittlung von Wachstumssignalen beteiligt. Im Osteosarkom ist er allerdings selten betroffen (Anninga 2004; Tsai 2004), allerdings ist eine Überexpression ein schlechter prognostischer Faktor (Gorlick 1999)

1.7.3 Paget-assoziierte Gene

Ein Lokus in 18q22 kodiert für Gene die mit familiären Formen des M.Paget und der FEO assoziiert sind. Dieser Lokus ist auch häufig von LOH bei spontanen und pagetoiden Osteosarkomen betroffen (Nellissery 1998; McNairn 2001). Mehrere Gene kodieren in der Region und wurden als Tumorsuppressorgenen verdächtigt, unter anderen, das in dieser Region vorhandene bcl-2 (s. 1.4) und das RANK Gen (Receptor Activator of NF-κB), das für die Osteoklasten Differenzierung notwendig ist (Hughes 2000). Es zeigte sich jedoch , daß RANK und bcl-2 nicht in der MDR (Minimal Deleted Region) von Osteosarkomen enthalten ist (Johnson-Pais 2003) und auch nicht an sporadischen und familiären Formen des M. Paget in größeren Studien beteiligt ist (Good 2001). Somit müssen andere Gene oder Gengruppen in diesem Locus für M. Paget, FEO und Osteosarkom gesucht werden.

1.7.4 Viren

Beim Menschen sind keine Retroviren bekannt die Osteosarkom induzieren wie das FBJ Virus in Mäusen, jedoch hat eine Studie gezeigt, daß 46.3 % von Osteosarkomen und Blutzzellen von Patienten in Japan Sequenzen aus dem SV-40 Virus enthalten, während nur 4.7% der Kontrollen SV-40 Sequenzen in Blutzellen aufwiesen (Yamamoto 2000).

1.7.5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren gelang die Identifikation einer Reihe von Genen, die beim Osteosarkom betroffen sind. Unter den Tumorsuppressorgenen ist das Rb und p53 sehr prominent, mit Beteiligung in 40-70 % und respektiv 30-50 % der Fälle. Die Rb1 Inaktivierung auf genomischer Ebene scheint nicht immer mit entsprechender Expressionsänderung verbunden zu sein, was epigenetische Phänomene als potentiell wichtig erscheinen lässt (Wadayama 1994). Es gibt Hinweise auf gleichzeitige Inaktivierung von Rb und p53 (Scholz 1992; Miller 1996), die p53 LOH ist jedoch am ehesten als ein spätes Ereigniss im Verlaufe der Tumorprogression zu deuten (Overholtzer 2003). Rb Inaktivierung scheint ein wichtiger prognostischer Faktor zu sein (Feugeas 1996), während p53 Inaktivierung (Goto 1998) mit Chemoresistenz und reduzierter Überlebensrate verbunden ist. Im Hinblick auf die Metastasenentstehung korelliert die Koproduktion von c-fos und c-myc stark mit Metastasierung (Gamberi 1998).

Der G1->S Transitionspunkt ist ganz prominent in der Zellzyklusderegulierung und Tumorentstehung. Außer dem pRb sind noch andere Proteine daran beteiligt, von den das p16 am häufigsten betroffen ist (Tsuchiya 2000) und zwar in Fällen , wo das Rb nicht betroffen war (Nielsen 1998; Maitra 2001). Somit ist denkbar, daß Mutationen in einem der 2 Gene für die Tumorentstehung reicht und Veränderungen in beiden Genen sich gegenseitig ausschließen. Insgesamt ist dieser Kontrollpunkt in 45-66% der Fälle mit Expressionsstudien betroffen Das p16 scheint nicht so sehr auf genetischer Ebene inaktiviert zu sein sondern durch epigenetische Phänomene, besonders Hypermethylierung (Benassi 1999; Benassi 2001).

Andere Gene die bei der Entstehung von high grade Osteosarkomen beteiligt sind, sind das c-fos/c-jun und c-myc (Wu 1990; Franchi 1998; Gamberi 1998; Weisstein 2001).

Interessanterweise, ist eine andere Gruppe von Genen in der Entwicklung von lowgrade Sarkomen beteiligt, besonders bei parostealer Lokalisation. Onkogene, wie das MDM2, CDK4 und SAS scheinen oft koamplifiziert zu sein, während das p53 und Rb Gen seltener betroffen sind. Ganz deutlich wird es bei parostealen Osteosarkomen, wo in 100% der Fälle SAS und CDK 4 amplifiziert waren, während Rb oder p53 Deletionen nicht dektetiert wurden (Wunder 1991; Noble-Topham 1996; Radig 1998; Tarkkanen 1998; Ragazzini 1999; Gisselsson 2002). Bei high-grade Tumoren existiert das umgekehrte Verhältnis. Man kann postulieren, daß für die Entstehung von low grade Osteosarkomen, v.a. parostealen, ein anderer Weg von Tumorigenese bestritten ist und zu Tumoren mit anderem klinischem Verhalten und Prognose führt.

Auf dem 18q Lokus, der mit M. Paget, FEO und Osteosarkomen assoziiert ist, ist das entscheidende Gen bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen worden. Zwar war das RANK-Gen auf Grund seiner Funktion lange Zeit ein prominenter Kandidat (Hofbauer 2004), wurde jedoch auf Grund seiner Lokalisation ausserhalb der minimal deletierten Regionen in letzter Zeit ausgeschlossen (Johnson-Pais 2003).

Virale Mechanismen scheinen bei der Osteosarkominduktion beim Menschen nicht so emminent zu sein, wie bei der Maus. Ein Nachweis von SV 40 Sequenzen in 46.3% der Fälle, der allerdings nur in einer japanischen Studie gefunden wurde (Yamamoto 2000) ist signifikant und könnte für eine Fazilitierung in der Entwicklung von Osteosarkomen sprechen .

Für therapeutische Fragestellungen wäre es interessant Gene zu definieren, die speziell beim Osteosarkom betroffen sind und deren Funktion günstig zu beeinflüssen wäre oder deren Funktion selektiv in Osteosarkomzellen beeinflußt werden kann, ohne nachteilige Wirkung auf normale Zellen. Dies ist bisher jedoch nur bei einigen wenigen, molekular sehr genau definierten Tumortypen gelungen (z.B. Her2neu positive Mamma-Karzinome, Bcr-Abl translozierte Leukaemien), wogegen das Osteosarkom auf Grund seiner genetischen Heterogenität für diesen Ansatz nicht sehr vielversprechend ist . Eine bahnbrechende Studie zeigt aber, daß diese Möglichkeit vielleicht doch nicht so weit ist. Das p53 mit seiner zentralen Rolle als Tumorsuppressorgen und Genombeschützer bietet sich als therapeutischer Ansatzpunkt an, wenn man dessen Expression in Tumorzellen selektiv erhöhen könnte. Snyder konnte zeigen, dass in Mäusen mit Peritonealkarzinose und einem Model von Peritoneallymphom ein transduzibles D-isomer RI-TATp53C' Peptid das p53 selektiv in Tumorzellen, aber nicht in Normalzellen aktiviert und die Lebensspanne dieser Mäuse >6 fach erhöhte (Snyder 2004). Die Erforschung dieser Gentherapie ist in terminalen Fällen auch beim Menschen geplant (Lane 2004; Lane 2004).
1.8 Osteosarcom-Loci ohne bekannte Funktion.

Damit ist nicht alles Wissen über Osteosarkomen abgeschlossen, sondern nur prominente Fakten und konretes Wissen über bestimmte Gene dargestellt, denn wie mehrere CGH und LOH Studien nahe legen sind 30 Loci bei Osteosarkomen bekannt mit Amplifikationen oder Verlusten von genetischem Material. Im Kontrast dazu jedoch sind weit weniger beteiligte Gene erkannt worden, so daß es sich bei diesen Loci um Genominstabilitäten bei Tumorprogression handeln könnte. Weiterhin, deutet Data aus menschlichen Tumoren darauf, daß für die Entstehung eines Tumors beim Menschen Veränderungen in durchschnittlich 5-6 Genen ausreichen (Renan 1993).

Der Durchschnitt von genetischen Veränderungen die mit CGH identifiziert werden liegt bei 16-18.5 (Brinkschmidt 1998; Stock 2000; Ozaki 2002), für low grade Osteosarkome ist es viel niedriger mit 5 (Tarkkanen 1998) und insgesamt sind um die 30 Loci mit Gewinn oder Verlust an genetischem Material bekannt - mehr Loci mit Gewinn als Verlust.

Loci mit Gewinn an genetischem Material sind 1p21-31, 1q21-24, 3q, 4q27-33, 5p, 6p21-23, 6q16-25, 7p13-22, 7q11-36, 8q23-24, 12q, 12p, 13q14, 16p,17p13, 19p, 21q (Forus 1995; Brinkschmidt 1998; Tarkkanen 1998; Stock 2000; Batanian 2002; Ozaki 2002; Lau 2004).Die häufigsten Loci sind 1p21-31 (Brinkschmidt 1998; Stock 2000; Hodgson 2001; Batanian 2002; Ozaki 2002), 8q12, 8q23-24 (Brinkschmidt 1998; Stock 2000; Batanian 2002; Ozaki 2002),6p (Forus 1995; Tarkkanen 1998; Batanian 2002; Ozaki 2002),6p (Forus 1995; Tarkkanen 1998; Batanian 2002; Ozaki 2002),6p (Forus 1995; Batanian 2002; Ozaki 2002; Lau 2004), 17p (Forus 1995; Batanian 2002; Ozaki 2002; Lau 2004); (Batanian 2002), 12q (Forus 1995; Brinkschmidt 1998; Tarkkanen 1998). Auf 12q kodieren MDM-2, SAS und CDK4, die Onkogene die präferentiell bei low-grade Osteosarkomen betroffen sind, auf 8q kodiert unter anderen c-myc, das in high-grade Osteosarkomen eine Rolle spielt.

Loci mit Verlust sind 2q, 3p, 3q, 5q, 6q, 9p, 10q, 11p, 13q, 16p. (Forus 1995; Brinkschmidt 1998; Tarkkanen 1998; Stock 2000; Batanian 2002; Ozaki 2002; Lau 2004).Häufig sind 3p, 3q, 5q, 10q, 13q, 16p (Forus 1995; Brinkschmidt 1998; Batanian 2002; Ozaki 2002). In 13q kodiert Rb1, ein beim Osteosarkom häufig von LOH betroffenes Gen (s.1.5). Die Studie von Lau hat viele neue Loci mit Amplifikationen und Verlusten entdeckt, die bis dahin nicht so oft aufgetreten waren.

Es sei hier bemerkt, daß noch keine Berichte über den Locus 18q vorliegen, der mit Osteosarkomen, M. Paget und FEO assoziiert ist. Somit, könnte es sich bei dieser registrierten AI um Gewinn an chromosomalem Material handeln und nicht Verlust und in dieser Region könnte ein Onkogen kodieren, anstatt Tumorsuppressorgen, wie bislang vermutet. Eine Fülle von Gene sind schon bekannt, beim Osteosarkom beteiligt zu sein, aus diesen Daten geht aber hervor, daß es noch mehr geben könnte, die noch nicht identifiziert worden sind.

1.9 Tiermodelle für Tumore

1.9.1 Bedeutung der Maus als Model für Osteosarkome

Die Tumorentstehung ist mit der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und der Aktivierung von Onkogenen verbunden (Ponder 2001), die man als LOH/AI registrieren kann (Devilee 2001). Die Analyse von LOH Loci hat zur Entdeckung von zahlreichen Tumorsuppressorgenen geführt, jedoch könnte sich bei den meisten dieser Loci um sekundäre Ereignisse als Zeichen der Tumorprogression handeln. Es ist schwierig, wenn es sich um Regionen mit nicht etablierten Tumorsuppressorgene handelt, zu unterscheiden, welche dieser Loci kausal an der Tumorentstehung beteiligt sind. Eine wertvolle Hilfe in diesem Zusammenhang bietet der Vergleich von LOH Loci auf homologen chromosomalen Regionen in verschiedenen Spezies (Nathrath 2002).

Die meisten Tumorsuppressorgene, nämlich, sind erst beim Menschen identifiziert und kloniert worden und dann in Tumoren anderen Spezies bestätigt worden, auch in der Maus, wo sie auf homologen, sog. syntenischen Regionen kodieren (Wiseman 1994; Zenklusen 1995; Lander 1997). Die Tumorsuppressorgene und Onkogen haben meistens Sequenzen die zu einem hohen Prozentsatz zwichen den Spezies konserviert sind, sogar zwischen Drosophila und Menschen; das Patched Protein (s.1.8.2) z.B ist zu 95% zwischen Mensch und Maus konserviert (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u> <u>UniGene/ clust.cgi?ORG=Hs&CID=159526)</u>, das Rb1 zu 89.4 %

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Hs&CID=408528) und das p53 zu 77.27%

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Hs&CID=408312).

Deswegen ist es denkbar, daß man aus der Analyse tierischer Tumore Informationen über menschliche Tumore gewinnen kann (Jacks 1996).

Hierin liegt der große Vorteil von Tiermodellen in der Krebsforschung. Man kann seltene Tumore durch spezifische Methoden induzieren und sie in einer relativ grossen Anzahl analysieren, wie es sonst unter klinischen Bedigungen nur schwierig und interdisziplinär zu erzielen ist. Somit kann die Wirkung und Dosis-Effekt
Beziehung von Kanzerogenen verschiedener Art untersucht werden, zB Strahlung, Chemische Induktoren. Ein weiter Vorteil liegt darin, daß man Labortiere als reine
Stämme konservieren kann und die Tumore in der Kreuzung 2 Stämme analysiert.
Damit ist der genetische Hintergrund der Tumore einheitlich und es entsteht eine große Anzahl von heterozygoten Tieren, die sich für LOH Analysen besonders eignen.
Dadurch, daß die Tiere unter gleichen Bedigungen gezüchtet werden, wird die Ausschaltung von äußeren Faktoren auf die Tumorentstehung gewährleistet (Harvey 1993; Donehower 1995; Harvey 1995; Donehower 1996; French 2001; French 2001).

Dies ist insbesondere beim Osteosarkom sehr wichtig, weil ein großer Teil der Tumore genetisch instabil ist und bei Diagnose sich in einem fortgeschrittenen Stadium befindet. Letzlich können Daten aus Tiermodellen Hinweise auf die Tumorentstehung beim Menschen geben (Nathrath 2002; French 2004).

1.9.2 Konkordanz zwischen Tiermodel und menschlichen Tumoren

Viele Tumorarten sind in Tiermodellen untersucht worden. Loci die amplifiziert oder deletetiert sind wurden identifiziert und die darin enthaltenen Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen selektiv analysiert. Dies hat gezeigt, daß in vielen Fällen die genetischen Läsionen die für menschliche Tumore charakteristisch sind, bei Tieren sich auch wiederfinden lassen (Hahn 1999; Wagner 2001).

Der erste Schritt, die Identifizierung von Loci mit LOH oder Amplifikationen erfolgt mit Methoden, die das gesamte Genom untersuchen, wie Ganzgenom-LOH- Analyse (Dietrich 1994; Radany 1997; Shi 1997; French 2001; Herzog 2002; Wu 2002; Benavides 2003) oder CGH (Comparative Genome Hybridisation) (Shi 1997; Hodgson 2001; Wu 2002). CGH bei der Maus wird nicht so lange benutzt wie LOH Analysen, die Ergebnisse aus beiden jedoch scheinen zu korrespondieren (Shi 1997). Eine große Anzahl von Tumoren die in Mäusen und Menschen analysiert worden sind, zeigen, daß die murinen Tumore die Stadien der menschlichen Tumorentstehung rekapitulieren (s. auch 1.8.3, 1.8.2). Das wird anhand eines Mausmodells für Pankreastumore deutlich, das unter anderen den Wert der Tiermodelle unterstützt. Pankreastumore sind beim Menschen mit der höchsten Letalitätsrate und kurzem Überleben nach Diagnose trotz Maximaltherapie verbunden (Michaud 2004). Das macht ein Tiermodell erforderlich, um die Tumorentstehung zu verstehen und evtl. Therapiemethoden auszuprobieren. Es gibt mehrere Modelle für Pankreaskarzinom (Leach 2004), orthotope Transplantationsmodelle, wo Zellen aus menschlichen Pankreaskarzinom Zelllinien Mäusen in das Pankreas injiziert werden und die Tiere dann Tumore entwickeln (Buchler 2004), neurdings auch ein transgenes Tiermodell mit TGFa Überexpression aufgrund eines Promoters der selektiv im Pankreas aktiviert wird (Greten 2001). Aus menschlichen Tumoren sind Aktivierungen im ras Onkogen und Inaktivierungen im SMAD Tumorsuppressorgen bekannt und Analysen von Tumoren bei transgenen Mäusen haben ähnliche Veränderugen für diese Gene gezeigt (Wagner 2001).

Auch Gentherapie für Pankreaskarzinom ist an Tieren schon erprobt worden (Duda 2003). Menschliche Pankreaskarzinomzelllinien wurden immunodefizienten Mäusen implantiert und das SMAD4 Gen durch Adenoviren in den Tumor eingeschleust, was zu einer signifikanten Angiogenese- und Invasionshemmung führte. Dies demonstriert sehr schön, wie ein Tiermodell mit den menschlichen Daten korrespondiert, daß die Ergebnisse aus dem Tiermodell verwertbar und vergleichbar den menschlichen sind und Therapiemethoden bei Tieren versucht werden können und evtl auf den Menschen extrapoliert werden.

1.9.3 Diskordanz zwischen Menschen und Tiermodellen

Der zweithäufigste Tumor beim Menschen (Mann und Frau) ist Lungenkrebs, er hat jedoch die größte Anzahl an Opfern bei beiden Geschlechtern und ist mit nur 15% 5 Jahre-Überlebensrate verbunden (Jemal 2004). Auch für die Erforschung dieses häufigen und epidemiologisch wichtigen Tumors bieten sich Tiermodelle an (Herzog 1997; Zhao 2000). Lungenkrebs ist beim Menschen mit Mutationen in verschiedenen Genen (p53, p16, Rb, K-ras, PTEN, Myo18B) verbunden (Yokota 2004). Mutationen im *p53* sind in 20-70% erwähnt (Miller 1992; Liloglou 1997; Girard 2000; Sarkar 2001; Vahakangas 2001; Zienolddiny 2001; Ho 2002; Gregorc 2003). Mutationen im K-ras in 8-54.5% (Sarkar 2001; Vahakangas 2001; Duda 2003; Petmitr 2003; Zhang 2003), im p16 32-41% (Geradts 1999; Girard 2000; Ho 2002; Jarmalaite 2003; Destro 2004) und im Rb in 47.6-60% (Geradts 1999; Girard 2000; Sugio 2001; Ho 2002; Gregorc 2003).

Mäuse können Lungentumore auf mehrere Wege entwickeln, z.B. Bestrahlung (Zhang 1997), chemisch (Re 1992; Hegi 1993; Hegi 1994; Matzinger 1995; Herzog 2002; Benavides 2003) und durch genetische Manipulationen die transgene Mäuse zufolge haben (Zhao 2000). Diese Tumore sind meistens vom nicht-Kleinzelltyp (Non Small Cell Lung Cancer = NSLC) und weisen Ähnlichkeiten im Genmutationsspektrum, jedoch in anderen Raten als die Menschlichen.

K-ras Verlust ist ein sehr häufiges Ereignis mit 80-97% (Re 1992; Matzinger 1995; Herzog 1997), was auf seine Bedeutung als frühe Läsion hinweist. p53 Mutationen werden in 0-12.5% gefunden (Re 1992; Hegi 1993; McDoniels-Silvers 2001), also seltener als beim Menschen, während es in einem Strahlungsmodell in 97% der Tumore gefiunden wurde(Zhang 1997). Rb1 ist ebenfalls in 0-25% von LOH betrofffen (Re 1992; Zhang 1997; McDoniels-Silvers 2001; Benavides 2003), seine Expression ist jedoch bei einem höheren Prozentsatz von Tumoren erniedrigt (Re 1992). P16 ist in 50% betroffen (Herzog 1997; McDoniels-Silvers 2001). Neuerdings gibt es auch ein neuentwickeltes Mausmodell von SCLC (Small Cell Lung Cancer= Kleinzelliger Typ), das die Forschung dieses malignen Tumors erleichtern wird (Minna 2003).

Unterschiede zwischen Menschen und Tiermodellen gibt es nicht nur in der Frequenz und Reihe mit der verschiedene Gene bei bestimmten Tumoren betroffen werden, sondern auch in der Funktion der Onkogene und Tumorsuppressorgene selbst. Als Beispiel sei hier das pRb Protein gennant, daß eine zentrale Rolle in der Tumorentwicklung und Zellzyklusregulierung spielt. Rb1 beim Menschen, nämlich, reguliert die Expression verschiedener Gene, über Promoter die E2F regulatorische Elemente enthalten. Unphosphoryliert verhindert es die Aktivierug von Genen, die für die G1->S Transition notwendig sind. Beim Menschen jedoch vermag Rb auch proapoptotische Genen zu induzieren. Das Rb bindet konstitutionell an den Promoter dieser Gene und supprimiert deren Expression, Rb Funktionsverlust direkt, durch Phosphorylierung oder durch E2Fdb oder E1 aktiviert diese Gene und induziert den Zelltod.

Ein Funktionsverlust des Rb bei Mäusen führte nicht zu einer Expression der homologen apoptischen Gene, weil ihr Promoter in der Maus keine Rb Bindungsstelle enthält. Dies erklärt den Unterschied in der Apoptoseresistenz menschlicher und muriner Zellen bei Rb Inaktivierung, menschliche Zellen sind nämlich resistenter. Außerdem ist Rb 20-35fach höher in Menschenzellen exprimiert (Young 2004).

Als weiteres Beispiel für das unerwartete Verhalten von Genen in Tiermodellen sei hier das BRCA1 Gen erwähnt. Das BRCA1 Gen kodiert für ein Protein, daß an der DNA Reparatur und der Zellzyklus Kontrolle in G2->M beteiligt ist (Kinzler 1997; Lee 2002). Frauen mit einer Keimbahnmutation des BRCA1 haben eine 48% Chance an Brustkrebs zu erkranken, während 0.7% der Frauen mit Brustkrebs eine Keimbahnmutation des BRCA1 aufweisen (Group 2000), außerdem ist BRCA1 Mutation mit ovariellen Tumoren verbunden(Lynch 2004). Der Brustkrebs als häufigster Krebs bei Frauen, dabei auch jungen Alters, ist epidemiologisch sehr wichtig, weswegen ein Tiermodell das Verständnis der Pathogenese des Tumors erleichtern und Ansatzpunkt für Therapien bilden kann. Transgene Mäuse mit BRCA1 Inaktivierung wurden entwickelt, die Tiere jedoch starben in Utero und die Brustkrebsentwicklung konnte nicht studiert werden. Seitdem, allerdings, gibt es transgene Tiere mit hypomorpher Variation des BRCA1, die Brustkrebs entwicklen und molekularbiologisch Ähnlichkeiten mit den menschlichen Tumoren aufweisen (Moynahan 2002).

Wir stellen also fest, daß Krebs bei Menschen und Tiermodellen ein polygenetisches Ereignis ist, wo je nach Gewebe verschiedene Gene betroffen sind. Ergebnisse aus Tiermodellen korellieren oft mit denen aus Menschen und können sogar bei unbekannten Fällen auf den Menschen extrapoliert werde. Nichdestotrotz gibt es auch Speziesunterschiede wie es die Lungentumore deutlich machen. Trasngene Mausmodelle sind inzwischen für mehrere Tumorarten etabliert, zB für Medulloblastome, Mamma- und Lungenkrebs, Pankreaskarzinom und viele andere und sind ein essentieller Teil der Tumorforschung (Ward 2004).

1.10 Das Tiermodel in dieser Arbeit

1.10.1 Stämme und Kreuzung

Der genealogische Baum der in dieser Arbeit benutzten Mäuse ist in Abb. 4 dargestellt. Eine männliche p53 +/- transgene Maus auf einem C57Bl/6 genetischen Hintergrund wurde mit einer weiblichen Ptch1 +/- transgenen Maus auf einem CD1 genetischem Hintergrund gekreuzt (F0). Die CD1x C57Bl/6 Nachfolger aus der (F1) Generation wurden kurz nach Ihrer Geburt mittels aus Schwanspitzen gewonnener DNA genotypisiert und doppelt-heterozygote (p53+/- Ptch1+/-) Tiere wurden untereinander gekreuzt. Es wurden mehrere Tiere der (F1) Generation für multiple Paarungen benutzt. In den Nachfolgern (F2) können 9 Genotypen entstehen (s. Abb. 4). Die (F2) Tiere wurden ebenfalls genotypisiert (J. Calzada-Wack, U. Schnitzbauer) und die Ptch1 +/- p53 +/-, also die doppelt haploinsuffizienten Tiere, wurden für die vorliegende Arbeit benutzt. Die Kreuzung ist deshalb so kompliziert, weil sie vorerst dazu dienen sollte p53 -/- Ptch1 -/- Mäuse für andere Arbeiten zu produzieren.

Davon konnte man erwarten, daß nur 50% der Tiere für eine LOH Analyse in Frage kämen. Der Grund dafür liegt darin, daß bei der F1 beide Elternteile CD1x C57Bl/6 als genetischen Hintergrund haben, so daß 50% der (F2) Tiere CD1xC57Bl/6 heterozygot sind, 25% CD1 homozygot und 25% C57Bl/6 homozygot. Tiere vom gleichen genetischen Hintergrund haben identische Mikrosatteliten und können mit LOH nicht analysiert werden.



Abb. 4 Genealogischer Baum der Mäuse in dieser Arbeit mit (F0), (F1) und (F2) Generationen. Die hier benutzten Tiere sind die Ptch1 +/-, p53 +/- Hybride (90) aus der F2 Generation.

1.10.2 Das Patched Gen

Das PTCH1 Gen kodiert für ein Transmembranprotein, daß als Rezeptor für das HH (Hedgehog) Protein fungiert. Das HH ist ein sezeniertes Protein, das die Entwicklung vieler Gewebe während der Differenzierung beeinflüßt (Bale 2001). Hedhog, Patched und die anderen Mitglieder der Signalübertragungskette wurden zuerst bei Biologen bei Embryogenesearbeiten an der Fruchtfliege, Drosophila melanogaster, entdeckt (Nusslein-Volhard 1980). In der Drosophila vermitteln die HH/PTC-mediierten Signale die anterio-posteriore(ap) Polarität des Embryos (Segmentpolarität) und Defekte darin verursachen Verlust der ap-Orientierung und Fusion von paarig angelegten Strukturen die normalerweise vorne und hinter getrennt sind oder Duplikation von Strukturen, die eine vordere und hintere Seite haben sollten. Die Abb. 5 soll der Erklärung der HH/PTC Signalübermittlung in Drosophila dienen. Alle Drosophila Gene sind als Gruppe von Homologen Genen beim Menchen konserviert. HH gibt es als SHH (Sonic), IHH (Indian), DHH (Desert). PTC als PTC 1 und 2, wobei PTC1 der wichtigste Rezeptor für alle 3 HH Proteine ist. SMO (Smoothened) gibt es als Gene der WNT-Rezeptor Familie. Über Gene der GLI Familie aktiviert SMO die Transkprition von Gene der WNT-Familie, PTC (negative Rückkopplung), TGF-β/BMP's (Bone Morphogenetic Proteins).



Abb. 5 SHH/PTC Signalübermittlung in der Drosophila. PTC und SMO bilden einen inaktiven Komplex. Sezeniertes SHH bindet an PTC, SMO wird befreit und übermittelt das Wachstums-/Differenzierungssignal über Mitglieder der GLI Familie. Die aktvierten Gene sind wg (WNT bei Wirbeltieren), dpp (TGF-β/BMP's) und PTC. Aus <u>http://www.biocarta.com/pathfiles/h_ptc1Pathway.asp</u>

Das PTC und noch andere Segmentspolaritätsgene sind bei Wirbeltieren entdeckt worden (Wicking 1999), auch beim Menschen (Hahn 1996; Johnson 1996) und der Maus (Goodrich 1996), in den meisten Fällen sogar entspricht ein Gen in Drosophila einer homologen Genfamilie in Wirbeltieren. Mutationen des Ptc und anderer Gene in dieser Signalkette bei Mäusen und Menschen verursachen Polaritätsstörungen, sind an Geburtsdefekten und sporadischen oder familiären Tumoren beteiligt (Wicking 1999). Gene, die in der Embryogenese aktiv sind, können bei der Krebsentstehung aktiviert werden, da in vielen Fällen die Tumorentstehung sich Mechanismen zunutze macht, die in der Embryonalzeit aktiv sind (Wicking 1999; Borczuk 2003). Patched wirkt als Tumorsuppressorgen, während Smoothened ein Onkogen ist (Bale 2001). Keimbahnmutation des PTCH1 Gen (9q22.3) beim Menschen verursacht das Gorlin oder Basallzellnävus-Syndrom (Gorlin 1995), ein autosomal dominantes Syndrom charakterisiert von Kieferzysten, Haut- und Skelettproblemen (Daumen und oder Radiusaplasie/hypoplasie, Polydaktylie),Augenanomalien, Lippen-Kiefer-Gaumen Spalte und Ovarialfibrom (Kimonis 1997). Die Nävi sehen histologisch aus wie Basaliome, klinisch verhalten sie sich aber noch nicht invasive, können aber zu Basaliomen entarten. Gorlin Patienten können eine Anzahl von Tumoren entwickeln, nämlich Basaliome, Medulloblastome, Ovarialfibrome und weniger häufig Fibrosarkome, Meningiome, Rhabdomyo- sarkome und kardiale Fibrome. Mutationen des Patched werden jedoch oft auch bei Spontantumoren angetroffen, wie Basaliomen (Gailani 1996), Basaliomen von Xeroderma Pigmentosum Patienten (Bodak 1999), Medulloblastomen (Zurawel 2000) und bei Tumoren die im Gorlin Syndrom typischerweise nicht auftreten, wie Blasenkrebs (Aboulkassim 2003).

Das Maus-Ptch1 Gen (13 36.0 cM, 95% Homologie zum menschlichen, UniGene Cluster Hs .159526) funktionert in der Maus über eine Signalkette ähnlich der menschlichen (Goodrich 1996). Es gibt ein transgenes Ptch1 +/- Mausmodel auf einem CD1 genetischen Hintergrund mit einer defekten Kopie des patched, die durch Austausch der Exons 6 und 7 durch eine Neomycin-Kasette entstanden ist. Mäuse Homozygot für das mutierte Ptch1 sterben alle in Utero und weisen Defekte im Verschluß der Neuralfalten auf. Diese Ptch1 ^{neo67/+} Mäuse entwickeln Veränderungen und Tumore (z.B. Medulloblastome, Rhabdomyo-sarkome) analog zum Gorlin Syndrom, außerdem sind sie empfindlicher gegen Strahlung (Hahn 1998).

Interessanterweise ist in Rhabdomyosarkomen gefunden worden, daß das mutierte Allel hochexprimiert wird (allerdings als Splicevariante, wo einfach die Exons 6 und 7 ausgelassen werden) und das Wildtypallel (WT) supprimiert ist, ohne LOH aufzuweisen. Daraus kann man vermuten, daß das WT Allel selektiv supprimiert wird und nicht deletiert wird, der Mechanismus der Inaktivierung könnte ein epigenetisches Phänomen, wohl Promoter-Hypermethylierung, wie bei p16 sein (Calzada-Wack 2002). Alternativ, könnte auch eine Haploinsuffizienz von Ptch1 für die Tumorigenese reichen, was auf das 2-Hit Modell von Knudson verstößt. Die Hochexpression des mutierten Ptch1 ist als Wegfallen der negativen Rückkopplung zu deuten. Keimbahn und sporadischen Mutationen des PTCH1 sind auch bei Neuralrohrdefekten beim Menschen angetroffen, genauer gesagt der Holoprosenzephalie (HPE). Das PTCH1 bei der HPE jedoch ist aktiviert oder das SMO kann inaktiviert sein und somit kann man HPE als das genetische Gegenstück von Gorlin (Inaktivierung des Ptc Gens) betrachten (Wallis 1999).

1.10.3 Das p53 Gen

Die Funktion des p53 Gens wurde in 1.4 erklärt. Hier wird nur das transgene Tiermodell besprochen. Mehrere Gruppen haben p53 transgene Tiere hergestellt mit einer defekten Kopie, der Mechanismus ist aber in den meisten Fällen ähnlich, nämlich eine Deletion eines Genteils, die eine hemizygote Maus zur Folge hat, die nur die Gesunde Genkopie exprimiert (Donehower 1996). p53^{+/-} Mäuse sind eines der ersten Tiermodelle für menschliche Tumore und entsprechend ist das Tumorspektrum bei Ihnen wohl bekannt. Bei 18 Monaten (halbe Lebensspanne) haben 50% der Mäuse Tumore entwickelt, ähnlich den LFS-Patienten, wo 50% der Leute Tumore vor dem 50 Lebensjahr entwicklen. Am häufigsten sind Lymphome (27-30 %), Osteosarcome (24-30 %) und andere Weichteilsarkome (29 %). Das Spektrum ist dem menschlichen LFS Syndrom ähnlich, mit dem großen Unterschied jedoch, daß Mäuse keinen Brustkrebs entwickeln (Donehower 1995; Harvey 1995; Donehower 1996).

p53^{-/-} Mäuse haben eine sehr kurze Überlebenszeit, höchstens 10 Monate, wo alle Tiere an Tumoren sterben , mit anderem Tumorspektrum jedoch (Lymphome 83%, Osteosarkome 5%, Weichteilsarkome 4%) und weisen zudem eine erhöhte Embryonalletalität von 5-23% aufgrund von Exenzephalie, ein Neuralrohrverschlußdefekt (Donehower 1995; Harvey 1995; Donehower 1996).

p53 defiziente Mäuse werden schon länger benutzt zum Austesten von Carcinogenen (Hegi 1993; Tennant 1995; French 2004), Strahlung (Chang 2001), und Tumorpräventionsmethoden (Hursting 1994; Hursting 1995). Durch Karzinogene die selektiv auf ein Organ wirken und der inherenten Neigung zur Tumorentwicklung können bei diesen Mäusen auch andere Tumore induziert weren, wie Leberhämangiosarkome mit Dimethylnotrosamin (Harvey 1993), Blasenkrebs mit π -

Cresidine (French 2001), Mammakrebs durch DMBA (Jerry 1994) und Lungenadenome durch NNK (Matzinger 1995).

1.10.4 Transgene Tiere mit 2 genetisch manipulierten Genen

Tiermodelle wo 2 Gene genetisch manipuliert worden sind, meistens beide inaktiviert, sind ebenfalls nicht selten und werden auch seit langem benutzt. Studien mit diesen Tieren können Hinweise auf die Zusammenarbeit mehrerer Gene bei der Krebsentstehung geben, auch wenn diese Gene durch unterschiedliche Signalketten wirken und Hinweise auf die Verbindungen der Signalketten geben (sog. Crosstalk) (Donehower 1996). Außerdem können sie andere Tumorspektra aufweisen, hier werden beispielhaft erwähnt: p53 und Rb defiziente Mäuse, neue Tumore: Inselzelladenome, Hypophysenadenome und Pinealoblastome (Harvey 1995); p53 und APC defizient, neue Tumore: Pankreaskarzinome (Clarke 1995); p53 und Wnt-1 defizient, neuer Tumor: Mammakrebs (Donehower 1995).

Das Modell in dieser Arbeit ist schon mal für Medulloblastome benutzt worden (Wetmore, 2001), wo für p53 -/- Ptch1 +/- Mäuse eine Verkürzung der Tumorinduktionszeit, sowie Erhöhung der Tumorinzidenz beobachtet wurde im Vergleich zu p53 +/- Ptch1 +/- und p53 +/+ Ptch1 +/- Mäuse, die untereinander hinsichtlich der Medulloblastomentwiklung vergleichbar waren.

2 ZIEL DER ARBEIT

Frühere Arbeiten aus dem Institut für Pathologie, GSF, Neuherberg haben bei einer Gesamt-Genom LOH Analyse von strahlungsinduzierten Maus-Osteosarkomen die Bedeutung von 2 Loci auf Chromosom 9 für die Osteosarkomentstehung hervorgehoben (Rosemann 2002). Der proximale Locus, zwischen den Mikrosatelliten D9Mit144 und D9Mit133 (7.6 cM), und der distale Locus, zwischen den Mikrosatelliten D9Mit291 und MS1 (~3cm oder ~700 kb), waren beide in 78% der Fälle betroffen. Der erste Locus ist syntenisch beim Menschen für 15q21 und der zweite für 6q14. Eine LOH Analyse in 42 menschlichen Osteosarkomen hat AI von 6q in 77% und 15q in 58% der Fälle entdeckt (Nathrath 2002). Solch ein hoher Prozentsatz von AI bei der Maus und beim Menschen sprechen gegen einen zufälligen Alleleverlust durch allgemeine genomische Instabilität, sondern lassen einen kausalen Zusammenhang mit der Osteosarkomentstehung, möglicherweise durch Verlust eines bisher noch nicht identifizierten Tumorsuppressorgenes schliessen (s. 6.4).

Ziel dieser Arbeit war:

- Den distalen 9q LOH Locus beim transgenen Modell zu überprüfen
- Die Wildtyp Ptch1 und p53 Allele auf LOH zu untersuchen und
- Die Osteosarkominzidenz in diesem Tiermodell zu erfassen.

3 MATERIALIEN

3.1 Geräte

Balance BA4100	Sartorius, Göttingen
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer, Neuried
Horizontal Gel Elctrophoresis Chamber	Bio Rad, München
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Hettich EBA12R	Tuttlingen
Mikrotom HM 355	Microm, Walldorf
Minishaker MS2	Labor Schubert & Weiss, München
pH-Meter CG714	Schott Geräte, München
Polytron®Homogenizer	Kinematica AG, Luzern, Schweiz
Semiautomatic Pipette 20,100,200,1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Spectrophotometer DU-62	Beckmann, München
Speedvac Concentrator Univapo 100H	Uniequip, München
Stereo-microscope STEMI SV8	Carl Zeiss, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraturrax	IKA Labortechnik, Staufen
Vertical Gel Electrophoresis Chamber	GSF custom made
Video Camera System DokuGel	Mitsubishi Japan
Vortex	IKA Labortechnik, Staufen
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus, Hanau

3.2 Verbrauchsmittel

Eppendorf tubes (1.5 ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon Tubes(25 ml,50 ml)	Becton Dickinson, France
GeneAmp PCR Reaction Tubes	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Microscope Slides SuperFrost	Roth Karlsruhe
PCR 5 Strip Tubes	Eppendorf, Hamburg
Pipette (5ml, 10 ml, 25 ml)	Nunc, Wiesbaden
Pipette Tips (20, 100, 1000 µl)	Eppendorf Hamburg
Skalpel	Wagner&Munz, München
Eukitt Deckgläser	Electron Microscopy Sciences, Hatfield,
	Philadelphia
Superfrost Objektträger	Medite GmbH, Burgdorf
Sterile Nadeln	

3.3 Mäusestämme

Die Kreuzung und Stämme der Mäuse, die benutzt wurden, wird in 1.10 erklärt.

3.4 Kits

QIAamp Tissue Kit und QIAamp DNA Mini Kit

3.5 DNA-Längenstandards

DNA-Molecular weight Marker (V,VI,VII,VIII) Roche, Mannheim

3.6 Enzyme

Proteinase K	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Eurobio, Raunheim

3.7 Nukleotide

Ultrapur dNTP(5mM)

Amersham Pharmacia, Freiburg

3.8 Reagenzien für Elektrophorese

TEMED	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ammonium Persulfat(APS)	Sigma, Deisenhofen
Ethidium Bromid	Sigma, Deisenhofen
Acrylamide/Bisacrylamide 19:1 (40%)	Appligene oncor, France

3.9 Andere Chemikalien

Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ampuwa (pyrogen freies Wasser)	Fresenius, Bad Homburg
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Minerlöl	Sigma, Deisenhofen
Xylol	Merck, Darmstadt

310 Puffer

5x TBE Puffer	0.4 M Tris	

	0.4 Borsäure
	0.001 M EDTA
	рН 8.0
10x Ladepuffer	50% Glycerin
	1mM EDTA, pH 8.0
	0.2% Bromphenolblau
	0.2% Xylencyanol
10xPCR Puffer	100mM Tris-HCL,
	500mM KCL
	15mM MgCl ₂
Lyse Puffer	10mM Tris-HCL
	100 mM Nacl
	10mM EDTA
	01.% SDS
Formalin Puffer	

3.11 PCR-Primer

Alle Primer für diese Arbeit wurden von der AG BioDV, GSF geliefert. Die Synthese erfolgte mittels eines DNA Synthesizer 394 (Applied Biosystems Inc., USA). Lyophilisierte Oligonukleotide für PCR Amplifikation sind in 400 µl steriles Wasser verdünnt worden, für 2 Stunden bei 40°C inkubiert, spektrophotometrisch quantifiziert und gemischt in Paaren (5′-und 3′-) um eine Arbeitskonzentration von 5 pM/µl zu geben.

3.11.1 Maus Mikrosatelliten

Genetische Karten für die Maus stammen aus der The MIT/Whitehead Institute Databank <u>www.genome.wi.mit.edu/mouse_rh//</u>, The Chromosome Committee Reports 2000 von The Jackson Laboratories Databank – <u>www.informatics.jax.org/ccr/</u> und der RH Datenbank der Jackson Laboratories

<u>www.jax.org/resources/documents/cmdata/rhmap</u>. Die Marker für Chromosom 9, die auf Polymorphismus getestet wurden stammen aus früheren Arbeiten im Institut für Pathologie, GSF. Die Mikrosatellitenprimer für Chromosom 9, die hier benutzt wurden sind in 5.3.1 aufgelistet. Ihre Sequenz ist einer Datenbank der Jackson Laboratories erhältlich: <u>ftp://ftp.informatics.jax.org/pub/reports/PRB_PrimerSeq.rpt</u>

3.11.2 OSM Primer

Einige Primer die hier benutzt wurden sind vom Dr. M.Rosemann, Institut für Pathologie GSF, entwickelt worden, aus Sequenzierungsdaten der Region für eine andere Arbeit (s. 5.4) (Rosemann 2003). Die Sequenz der hier benutzten Primer in 5'-3' Richting steht in der Tabelle 1.

Tabelle 1: Sequenz der OSM Marker.

OSM10f	GGGGACTCTGGGAGAACAGT	OSM42f	GTCCCCTGCCTCATTTTAAG
OSM10r	TCCTTCCTAGCCCTCTCTCTC	OSM42r	AAAAAGGCATCAAAGGCTCT
OSM14f	CAGGAGTACCAGAGGGAAATG	OSM55f	AGAGTCAGCTGAATTAAAGACA
OSM14r	AGACACCTGCTGGCCTTTT	OSM55r	CTCTGTGGCACAAAAGTTCT
OSM17f	AAGTCAACCCTCAGCCTTCA	OSM62f	AGCCATATATCCAAGTTCCAT
OSM17r	TCTCTTTTCCCTCCTGATCC	OSM62r	AAAGCCACTGTGGACCTTAC
OSM33f	AAGAAAACAGCTGCCACATT	OSM66f	CAATTTGGGGGTAATATGCAA
OSM33r	CCAAGTCCTTCTTCAGCAAT	OSM66r	ATTTTCATGTGTGGTATGTAGC
OSM34f	AATTGTGCTAAGCATGAGTGC	OSM68f	CCTTCAAAAGGTTACTTGCAT
OSM34r	CAGCTGTTGGTAAGGAGCAT	OSM68r	GGACAGCGACTCAACACTCT
OSM35f	CCTCTGTGGACACCTGTA	OSM69f	GTTCCAACGTTTTTGCATTC
OSM35r	ACCAGATCCCTTCATTCAT	OSM69r	CCCAGTCCATGGTGTATTGT

3.11.3 Ptch1 und p53 Primer

Die Primer für Ptch1 und p53 wurden von Dr. J. Calzacka, Institut für Pathologie aus anderen Arbeiten übernommen. Die Sequenz dieser Primer in 5'-3' Richtung steht in der Tabelle 2.

Tabelle 2: Sequenz der Marker f

 in das Ptch1 und p53.

 Ptch1

 //

 //
 in das Ptch1

Ittill		
P ₅ t ₄ k	GGG AGG GGA TTT CAG AAT GTT	
NeoL	AGT GCC AGC GGG GCT GCT AAA	
$M_{11}R_{3}$	GTA CCC ATG GCC AAC TTC GGC TTT	
		-

p53

P	
Exon7r	ATA GGT CGG TTC AT
Exon6f	CCC GAG TAT CTG GAA GAC AG
Neof	AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC

4 METHODEN

4.1 Osteosarcom Induktion und Tumordiagnose

4.1.1 Mäuse-Zucht

Die Mäuse wurden aus CD1x C57Bl/6 p53+/- Ptch1+/- Eltern gezüchtet (s. 1.10.1) und entsprechend des Tierschutzgesetzes behandelt. Die Tiere wurden in Macrolon-Standard Käfigen Typ2 aufbewahrt. Ohrmarken wurden benutzt zur Identifikation. Wasser und Futter (Altromin 1313, Altromin GmbH) waren verfügbar ad lib. Die Temperatur in der Mäusehaltung betrug 22°C, die relative Feuchtigkeit 55% und die Beleuchtung funktionierte mit einem 12 Stunden-Tages/Nacht-Rhytmus.

4.1.2 Osteosarkominduktion

Die Osteosarkome sind spontan in den transgenen tieren entstanden ohne Chemische Induktion oder Bestrahlung.

4.1.3 Überwachung der Tumorentstehung

Die Mäuse sind 5 Mal die Woche auf klinische Anzeichen einer Tumorbildung (Knoten, Paresen, Gewichtsabnahmen, Atrophien) untersucht worden. Sterbende Mäuse und diese mit klnischen Zeichen von Tumorbildung sind autopsiert worden, wobei die Mäuse durch CO₂ Asphyxie getötet wurden. Bei der Autopsie wurden auch Röntgenaufnahmen des Skeletts angefertig, wodurch sich auch klinisch nicht auffällige Knochenläsionen durch Änderung im Mineralisierungs-Muster nachweisen lassen.

4.1.4 Präparation von Tumor- und Normalgewebe für histologische und molekulare Untersuchungen

Tumorbehandlung - Schock-Einfrieren, Formalin Fixierung

Bei makroskopischen Tumoren (>5-7 mm) wurde der Tumor mit einem Einmal Skalpel aus dem umgebenden Gewebe dissiziert und in zwei Teile geschnitten. Die eine Hälfte des Tumors wurde in Flüssigstickstoff eingefroren und auf -70°C aufbewahrt vor der DNA Extraktion. Die andere Hälfte wurde für eine Woche in Formalin Puffer fixiert vor der weiteren Aufbereitung. Von diesen grösseren Tumoren wurde auch ein Schwanzstück als Normalgewebe in Flüssigstickstoff eingefroren und auf -70°C gelagert. Kleine Tumoren (<5mm) wurden in toto mit Teilen von umgebendem Gewebe in Formalin fixiert.

Entkalkung und Einbetten in Paraffin

Nachdem die Tumore fixiert wurden, sind sie in 0.5 M Tetrasodium-EDTA ph 7.4 für wenigstens 2 Monate zur Entkalkung eingelegt. Den formalin-fixierten, nun weichen und entkalkten Tumoren wurde Wasser in einem aufsteigenden Ethanol -Gradient entzogen (70-80-96-100%), daraufhin folgte Xylol und am Ende Flüssigparaffin laut dem Protokoll Tissue - Tek III - Vakuum Infiltrationsprozessor. Feste Paraffinblöcke wurden in Tissue-Tek-Thermal/Dispersing/Cryo-Unit produziert.

4.1.5 Histologische Befundung von Osteosarkomen

Aus formalin fixierten, parafin-eingebetteten (FFPE) Tumoren wurden 5µm Schnitten mit einem Mikrotom HM 355 angefertigt, in Xylol für 10 Minuten entparaffiniert und in einem absteigenden Ethanolgradient (100–100–96–96–80–70–50–30%, jeweils 5 Minuten) rehydriert. Die Schnitte wurden mit Haematoxylin-Eosin laut dem Mayer Protokoll angefärbt, in einem aszendierenden Ethanolgradient (70–96–96–100–100%, jeweils 2 Minuten) entwässert und mit Eukitt gedeckt zum Mikroskopieren. Oft wurden zusätzlich Schnitte mit Van Gieson gefärbt zur Sicherung der Diagnose. Die histopathologische Diagnosen wurde von Dr. Markus Kremer (Klinkikum Rechts der Isar, Institut für Pathologie, TU München) und Prof. Laetticia Quintanilla-Martinez, (Institut für Pathologie, GSF) gestellt.

4.2 DNA Extraktion

4.2.1 DNA Extraktion aus tiefgefrorenem Tumorgewebe

Die Extraktion von genomischer DNA aus tiefgefrorenen Osteosarkomen erfolgte mit dem QIAAmp DNA Mini Kit nach dem Protokoll des Herstellers. Der Prozeß basiert auf der spezifischen Bindung von Nukleinsäuren an einem positiv geladenen Ionenaustauscher-Harz.

Das Gewebsstück wurde in 80 µl PBS puffer gelegt und mit dem Ultraturrax Stator-Rotor Homogenisator zerkleinert. Der Homogenisator wurde vorher 30 Minuten in 5% Essigsäure gelegt und anschliessend mit sterilem Wasser abgewaschen, um Kontaminationen zu eliminieren. Es wurden 180 µl (oder für grössere Tumoren 260 μl) ATL Puffer (im Kit) und 20 μl (respektiv 40 μl Protease K) hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf einem Thermostat Wärmeschüttler auf 56°C inkubiert und alle 30-40 Minuten wurde es mit einer 100 μl Pipette aufgezogen und durchmischt bis es vollständig lysiert war.

Dem Lysat wurde AL Puffer (im Kit) im 1:1 Volumenverhältnis hinzugefügt und für 10 Minuten auf 70 °C in einem Wärmeschüttler inkubiert. Dann wurde Ethanol 100% 1:1 (Volumen) hinzugegeben und das Gemisch wurde auf die Qiagen Säule mit dem Anionaustauscher Harz aufgetragen.

Es wurde für 1 min mit 8.000 rpm zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Dann wurden 500 µl AW1 Puffer (im Kit) auf die Säule aufgetragen, nochmal mit 8.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Anschliessend wurden 500 µl AW2 Puffer (im Kit) auf die Säule aufgetragen, mit 13.000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert, das Zentrifugat verworfen und zum letzten Mal für 1 Minute auf 13.000 rpm zentrifugiert, um alle Puffer zu eliminieren.

Die Säule wurde auf einem 1.5 ml Eppendorf Gefäß gelegt, auf die Säule 100 μ l modifizierter AE Puffer gelegt (AE Puffer im Kit, modifiziert = auf ein Drittel mit sterilem Wasser verdünnt) und die Säule für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde die DNA mit Zentrifugation für 1 Minute, 8.000 rpm eluiert und es erfolgte eine Zweite Elution mit 50 μ l modifieziertem AE Puffer. Die DNA Konzentration und Integrität wurde mit Spektrophotometrie (s. 3.3) und Elektrophorese (s. 3.4) kontrolliert.

4.2.2 DNA Extraktion aus tiefgefrorenen Schwanzspitzen

Grössere Tumoren konnten meistens mit dem Skalpell scharf von umgebendem Gewebe getrennt werden, weswegen man in diesen Fällen auch Schwanzspitzen als Normalgewebe konserviert hatte.

1 Stück Schwanzspitze in einem 2ml Eppendorf Gefäss wurde mit 730 μl Lyse-Puffer (10mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS) und 20 μl Proteinase K (50 mg/ml) übernacht bei 55°C auf einem Thermomixer Wärmeschüttler inkubiert und verdaut. Am nächsten Morgen wurden 250 μl 6M (gesättigt) NaCl hinzugegeben und mit dem Vortex geschüttelt. Das Gemisch wurde bei 4 °C, 10.000 rpm für 30 Minuten in der Kühlzentrifuge Biofuge fresco zentrifugiert. 800 μ l aus der Mitte des Gemisches wurden mit 700 μ l Isopropanol versetzt und geschüttelt bis die DNA ausgefallen ist. Dann wurde die DNA mittels Zentrifugierung bei 13.000rpm für 10 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde 2 mal für 30 Minuten mit 75% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 200 μ l TE Puffer aufgenommen. Die DNA Konzentration und Integrität wurde anschliessend spektrophotometrisch und elektrophoretisch knotrolliert.

4.2.3 DNA Extraktion aus mikrodissizierten Tumorzellen

Kleinere Tumoren die makroskopisch nicht aufgefallen waren, sind meistens nach radiologischer Lokalisierung mit dem Skalpel dissiziert worden, häufig mit umgebendem Normalgewebe (Muskel, Knochen, Knochenmark) und in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken sind 5-10 Schnitte 5-10 µm dick angefertig worden, mit dem Ziel ungefähr die Gleiche Menge an Tumor zu beinhalten. Die genomische DNA wurde mit einem Protokoll aus dem DNA Mini Kit extrahiert.

Mikrodissektion

4-5 Schnitte sind auf einem Superfrost Objektträger gelegt worden, der eine feste Bindung des Gewebes zur Oberfläche erlaubt. Die Schnitte wurden zuerst 2 Stunden in Xylol eingelegt, anschliessend mit einem absteigenden Ethanolgradienten (100%-10 Minuten, 90 – 70 – 50%, jeweils 5 Minuten) und 5 Minuten im Wasser rehydriert und dann luftgetrocknet. Unter einem Stereo-Mikroskop wurde das Tumorareal identifiziert. Als Referenz hat ein HE und evtl. ein van Gieson gefärbter Schnitt gedient. Das umgebende Normalgewebe (Muskel, Knochen, Knochenmark) wurde mit einer sterilen Nadel aus dem Osteosarkom gekratzt und in 1.5 ml Eppendorf Röhrchen mit 180 µl ATL Puffer gelegt. Die Objektträger wurden kurz mit Wasser gewaschen und das Osteosarkom in ein anderes 1.5 ml Eppendorf Röhrchen mit 180 µl ATL Puffer mittels einer neuen sterilen Nadel gelegt. In Fällen wo der Tumor klein und umgeben von Muskel oder Blutgefässe war, wurden die Schnitte leicht mit Eosin angefärbt zur erleichterten Identifizierung des Tumors.

DNA Extraktion mit dem DNA Mini Kit

Dem Mikrodissektat wurden 20 µl Protease K vom Kit gegeben und das Gemisch wurde übernacht bei 56°C auf einem Thermostat bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Dem Lysat wurden 200µl AL Puffer (im Kit enthalten) hinzugefügt und für 10 Minuten auf 70 °C in einem Wärmeschüttler inkubiert. Dann wurden 200 µl Ethanol hinzugegeben und das Gemisch wurde auf die Qiagen Säule mit dem Anionaustauscher Harz aufgetragen.

Es wurde für 1 min mit 8.000 rpm zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Dann wurden 500 µl AW1 Puffer (im Kit) auf die Säule aufgetragen, nochmal mit 8.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Anschliessend wurden 500 µl AW2 Puffer (im Kit) auf die Säule aufgetragen, mit 13.000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen, mit nochmaliger Zentrifugierung für 1 Minute auf 13.000 rpm, um alle Puffer zu eliminieren.

Die Säule wurde auf ein 1.5 ml Eppendorf Gefäss gelegt, auf die Säule 100 μ l modifizierter AE Puffer aufgetragen (AE Puffer im Kit, modifiziert=auf ein Drittel mit sterilem Wasser verdünnt) und die Säule für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde die DNA mit Zentrifugation für 1 Minute, 8.000 rpm eluiert und es erfolgte eine zweite Elution mit 50 μ l mod. AE Puffer. Die DNA Konzentration und Integrität wurde mit Spektrophotometrie (s. 4.3) und Elektrophorese (s. 4.4) kontrolliert.

4.3 Spektrophotometrische DNA Messung

Die DNA Konzentration und Reinheit wurden mittels Spektrophotometrie bestimmt. Die Absorbtion bei A_{260} , A_{280} und das Verhältnis A_{260}/A_{280} wurden bestimmt. Die DNA Konzentration wurde mit folgender Formel bestimmt: [DNA] (µg/ml) = $A_{260} \times 50(µg/ml) \times Verdünnungssfaktor$ wo 50 die Konzentration einer doppelstrandigen DNA ist, die eine Absorbtion A_{260} von 1 hat.

Der Verdünnungsfaktor betrug 100 für die makroskopischen Tumoree, 2 µl Probe und 198 µl steriles Wasser wurden gemischt. Der Verdünnungsfaktor betrug 20 für die mikrodissizierten Tumore, 10 µl Probe und 190 µl Sterilles Wasser wurden gemischt. Die DNA Reinigkeit wurde vom Verhältnis A₂₆₀/A₂₈₀ geschätzt, weil kontaminierendes Protein ein Absorbtionsmaximum bei 280 nm hat. Reine DNA hat ein A_{260}/A_{280} Verhältnis von 1.7 – 1.9. Die extrahierte DNA wurde auf -20 °C gelagert. DNA Arbeitslösungen wurden auf 20 ng/ml mit sterilem Wasser titriert und auf +4 °C gelagert.

4.4 Kontrolle der DNA-Integrität durch Gel-Elektrophorese

Während Konzentration und Reinheit der extrahierten DNA über Spektrophotometrie bestimmt wurden, diente zur Integritätsbestimmung eine Agarose Gelelektrophorese der extrahierten DNA. 2-5 µl extrahierter DNA und 15-18 µl sterilen Wassers (Totalvolumen 20 µl) sind mit 2 µl 10fach konzentrierten Ladepuffers gemischt und in einem 1-1.5% Agarose Gel getrennt worden (Elektrophoresebedingungen siehe 3.5.2). Färbung mit Ethidium Bromid erlaubte eine Visualisierung von mindestens 5 ng doppelsträngiger DNA. Fragmentierte genomische DNA ergibt eine dickere Bande und ein Schmier von kleineren Produkten, während hochmolekulare genomische DNA eine schmälere Bande ohne grossen Schmier ergibt. Die DNA von mikrodissizierten Tumoren war ausnahmlos fragmentiert, im Kontrast zur DNA von makroskopischen Tumoren.

4.5 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

4.5.1 PCR Amplifikation

Bei der PCR (Polymerase Chain Reaktion oder Polymerasenkettenreaktion) wird ein definiertes Fragment genomischer DNA mit spezifischen Oligonukleotiden (sogenannte Primer) selektiv amplifiziert (Mullis 1992).

Primer sind kurze, synthetische Oligonukleotide um die 20 Basenpaare(bp) komplementär zum Anfang (5'End, Links oder Vorwärtsprimer) und zum Ende (3'End, Rechts oder Rückwärtsprimer) des Fragments das amplifiziert werden soll.

Im ersten Schritt wird die doppelsträngige genomische DNA bei 95 °C denaturiert, im zweiten Schritt der PCR erfolgt die Bindung (annealing) der Primer zum komplementären DNA Einzelstrang. Die Bindung erfolgt bei einer Temperatur von 45-68 °C und hängt von der Länge der Primer und des relativen Anteiles von Guanosin/Cytosin-Paaren ab. Im nächsten Schritt, werden die Primer in 5'-3' Richtung durch die thermostabile Taq DNA-Polymerase (vom Thermophilus aquaticus) in Anwesenheit von dNTPs (Deoxytriphosphonukleotide) bei der optimalen Enzymtemperatur von 72 °C verlängert. Der Vorgang von Denaturation, Annealing, Verlängerung wird 30-40 mal wiederholt , wobei die Menge des amplifizierten Segments (Amplikon) exponentiell erhöht wird und zur Molekularanalyse verfügbar wird. Eine Negativkontrolle (PCR ohne genomische DNA) diente zur Kontaminationskontrolle. Eine Positivkontrolle (PCR mit bekannter genomischer DNA) diente zur Validierung des PCR Produkts.

4.5.2 Elektrophoretische Trennung der DNA Extraktions- und PCR Amplifikationsprodukte.

DNA/RNA Extraktions- und PCR Amplifikationsprodukte wurden mittels Agarose oder Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE) aufgetrennt. In der Elektrophoresekammer (horizontal gestellt für Agarose Gele und vertikal für Polyacrylamid Gele) wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Die Auftrennung hängt von der Grösse des Molekuls ab, weil die Laufgeschwindigkeit durch die Gelporen proportional zum inversen Logarithmus des Molekulargewichts ist. Die Visualisierung der DNA im Gel durch Ethidium Bromid-Färbung erlaubt eine Abschätzung der Grösse und Menge.

Agarose Gel

Agarose Gele wurden benutzt zur DNA Extraktions- und PCR Amplifikationsproduktenauflösung und -visualisierung. Abhängig von der Grösse des PCR Produkts wurden 1-3% Agarose Gele hergestellt, indem 1.0-3.0 g Agarose Pulver in 100 ml 1xTBE Puffer (hergestellt von einer 5x TBE Pufferstocklösung) aufgelöst wurden. Für die DNA Extraktionsprodukte 1% Agarose Gel wurde benutzt. Agarose wurde durch Aufkochen für 2-3 Minuten in der Mikrowelle aufgelöst. Nach Abkühlung auf etwa 50 °C unter ständigem Rühren wurden dem Gel 5 μ l Ethidium Bromid (10 μ g/ μ l) zugesetzt, um später eine Visualisierung der DNA im UV Licht zu ermöglichen. Das warme Gemisch wurde in einen Gelablagekasten gegossen, in den ein Gel-Kamm (1mm stark, Zähne 6mm breit) eingehängt war. Nach minimum 30 Minuten Verfestigungszeit wurde der Kamm entfernt und das Gel entweder mit kleiner Menge gleichprozentigen TBE Puffers in eine sterile Nylontasche luftdicht verpackt und bei +4°C gelagert worden oder direkt in die Elektrophorese Kammer mit 1x TBE Puffer eingesetzt. Vor der Elektrophorese wurde 15µl jeder Probe mit 1.5µl 10x Ladepuffer vermischt und in eine Gel-Tasche geladen. Der Ladepuffer verhindert das Ausweichen der Probe von der Tasche und diente gleichzeitig als sichtbarer Co-Marker. 1 µl DNA eines Molekulargewicht-Markers (Nummer VI – VIII, 0.25 µg/ml) wurde mit 8µl sterilen Wassers und 1 µl 10x Ladepuffers gemischt. Der Marker und die Proben wurden gleichzeitig geladen, um eine Grössenbestimmung der DNA Proben zu ermöglichen. Die Elektrophorese ist für 60-90 Minuten bei 60-90 Volt gelaufen, je nach gewünschter Auflösung.

Polyacrylamide Gel Electrophorese (PAGE)

Mikrosatelliten, die sich weniger als 10% in der Allellänge unterscheiden, wurden mittels nicht-denaturierender Polyacrylamid Gel-Elektrophorese aufgetrennt, da diese ein viel höheres Auflösungsvermögen als Agarose Gele aufweisen. 12% nicht denaturierendes Polyacrylamid Gel wurde mit 12 ml 40% Acrylamide/ Bisacrylamide 19:1, 6ml TBE Puffer, 12 ml steriles Wasser, 200 µl 10% APS und 60 µl TEMED hergestellt. Die Mischung wurde zwischen zwei abgedichteten Glasplatten 20x20 cm and 18x20 cm in Grösse gegossen und ein 15 oder 22 Taschen bildender Kamm wurde angelegt. Nach minimum 30 Minuten Verfestigungszeit wurde der Kamm entfernt und die Glasplatten mit dem Gel sind in eine mit 0.5% TBE gefüllte, vertikale Elektrophoresekammer gelegt worden. PCR Produkte wurden mit 10x Ladepuffer in einem Verhältnis 10:1 vermischt und in die Taschen geladen, 1 µl DNA eines Längen Markers (Nummer V – VIII, 0.25 µg/ml) wurde mit 8µl sterilen Wassers und 1 µl 10x Ladepuffers gemischt und in eine Tasche geladen worden. Die Elektrophorese ist für 7-12 Stunden bei 90-130 Volt je nach Produktgröße gelaufen. Anschliessend wurden die Glasplatten getrennt und das Acrylamid Gel manuell oder mit einer Spatel in einen Behälter mit 10 µg Ethidium Bromid in 100 ml 0.5x TBE Puffer für 10-15 Minuten gelegt worden, um die DNA zu visualisieren.

4.6 Amplifikation von DNA Mikrosatelliten

4.6.1 PCR Amplifikation von Mikrosatteliten auf Chromosom 9

Die PCR zum Amplifizieren der Mikrosatelliten erfolgte in 0.2 ml PCR Reaktions-Gefässen (Eppendorf) mit dem folgenden Reaktionsansatz:

	Volumen
10xPuffer	2 µl
1.2mM dNTPs	2 µl
Steriles Wasser	9.1 µl
(L+R Primer) (5pM/µl)	1 µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.2 µl
Genomische DNA (20 ng/µl)	5 µl
MgCl ₂ 45mM	0.7 µl
Endvolumen	20 µl

Die PCR- Bedingungen entsprechen den Empfehlung des MIT/Whitehead Institut (Dietrich 1994):

Program	Temperatur/Zeit	
Anfängliche Denaturation	94°C/4 Min	
3-Schritt Zyklus		
Denaturierung	94°C/1 Min	
Annealing	55°C/1 Min	
Verlängerung	72°C/1 Min	
Anzahl der Zyklen: 30		
Letzte Verlängerung	72°C/7 Min	
Abkühlung	$4^{\circ}C/\infty$	

Negativ- und Positivkontrollen sind parallelgelaufen. Die Negativen enthielten keine DNA, die positiven enthielten DNA aus reinen C57Bl/6 und CD1 Stämmen. Die Reaktionen wurden durch Abkühlen auf 4°C gestoppt und die Reaktionsprodukte anschliessend durch Elektrophorese visualisiert.

4.6.2 Amplifikation von p53 und Ptch1

Die optimalen PCR Bedigungen für das p53 Gen unterschieden sich von den oben angegeben. Die zu amplifizierende Sequenz ist GC reich, weswegen der Puffer mit MgCl₂ und DMSO angeichert war. Außerdem wurden 2 Sequenzen amplifiziert, indem man den gleichen Rückwärtsprimer benutzt hat, aber 2 verschiedene Vorwärtsprimer (sog. Multiplex PCR), wie folgt:

	Volumen
10xPuffer	2 µl
1.2mM dNTPs	2 µl
Steriles Wasser	7.3 μl
Exon7r (5pM/µl)(Rückwärts)	2 µl
Exon6f (1pM/ µl)(Vorwärts)	
Neof $(4pM/\mu l)(Vorwärts)$	
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.2 µl
Genomische DNA (20 ng/µl)	5 µl
MgCl ₂ 45mM	0.9 µl
DMSO	0.6 µl
Endvolumen	20 µl

Damit etwa gleichstarke Banden von wt und knock-out Allele in der Elektrophorese erreicht werden, mußte das Verhältnis von exon6f zu Neof-Primer ausgetestet werden (siehe 5.5.3).

Die Zyklus Konditionen waren wie folgt:

Program	Temperatur/Zeit		
Anfängliche Denaturation	94°C/7 Min		
3-Schritt Zyklus			
Denaturation	90°C/1 Min		
Annealing	56°C/1 Min 15 sek		
Verlängerung	72°C/1 Min		
Anzahl der Zyklen:	35		
Letzte Verlängerung	72°C/7 Min		
Abkühlung	$4^{o}C/\infty$		

Der PCR Puffer für die Ptch1 Amplifikation war leicht verändert, denn auch hier wurden für eine Multiplex PCR zwei unterschiedliche Vorwärtsprimer und ein gemeinsamer Rückwärtsprimer benutzt.

	Volumen
10xPuffer	2 µl
1.2mM dNTPs	2 µl
Steriles Wasser	8.8 µl
$P_5 t_4 K$ (5pM/µl)(Rückwärts)	2 µl
$m_{11}R_3 (1pM/\mu l)(Vorwärts)$	
NeoL (4pM/ µl)(Vorwärts)	
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.2 µl
Genomische DNA (20 ng/µl)	5 µl
Endvolumen	20 µl

Ähnlich wie für das p53 mußte das Verhältnis zwischen $m_{11}R_3$ und neoL ausgetestet werden (s. 5.5.3).

Die PCR Bedigungen unterschieden sich ebenfalls von jenen für die Chromosom 9 Marker:

Program	Temperatur/Zeit
Anfängliche Denaturation	94°C/7 Min
3-Schritt Zyklu	S
Denaturation	90°C/1 Min
Annealing	60°C/1 Min 15 Sek
Verlängerung	72°C/1 Min
Anzahl der Zykler	1:35
Letzte Verlängerung	72°C/7 Min
Abkühlung	$4^{\circ}C/\infty$

4.6.3 Auswahl der Elektrophoresentechnik für die Auftrennung der Allele

Normalgewebe von CD1, C57Bl/6 und (CD1x C57Bl/6) Mäusen ist auf Polymorphismus getestet worden. Mikrosatelliten sind mit PCR amplifiziert worden und die Produkte auf 3% Agarose Gel getrennt worden. Mikrosatelliten die eine schlechte Auflösung auf Agarose Gel aufwiesen sind mit 8 -12% nicht denaturierender PAGE getrennt worden.

4.6.4 Dokumentation der Elektrophorese-Ergebnisse

PCR Produkte auf Agarose und Polyacrylamid Gelen sind mittels Ethidium Bromid unter UV Licht visualisiert und einem Mitsubishi video camera System photographiert und ausgedruckt worden.

4.7 LOH/AI Bestimmung

LOH/AI ist mit dem Auge beurteilt worden, indem man die Intensität der Banden des PCR Produkts im Normalgewebe zu denen im Tumorgewebe verglichen hat. Da die LOH/AI meistens deutlich war ist keine digitale quantifizierung erfolgt worden.

4.8 Statistische Methoden

Das Osteosarkomfreie Überleben von Osteosarcomen in den p53 +/-, Ptch1 +/- Tieren ist mittels der Kaplan Meier Methode analysiert worden. T-Test für zwei Proben

wurde benutzt um die mittlere Grösse und Tumorinzidenz der Tumore mit und ohne LOH zu vergleichen und der χ^2 Test für Kontigenzabellen (statistiche Signifikanz wurde auf p=0.5 gestellt). Das dafür verwendete Programm war XL-Stat (v7.5.2, 1995-2004, Addinsoft, New York, NY).

5 ERGEBNISSE

5.1 Tumore die benutzt wurden

5.1.1 Tumorentwicklung

Wie schon erwähnt (1.10.1), wurden (F2) Mäuse von anderen Mitarbeitern (J.

Calzacka, U. Schnitzbauer) genotypisiert. Es wurden 90 p53 +/-, Ptch1 +/- (F2)

Mäuse identifiziert, die auf Tumorentwicklung beobachtet wurden. Es wurden 21

Osteosarkome festgestellt (s. Tabelle 3).

Tumor	Fall	Polv	G(mm)	(d)	Lokalisation	Extraktion
01-1444	1	ja	10	311	Kalotte	Qiagen(aus N2)
01-1445	2	ja	7	336	Kalotte	Qiagen(aus N2)
01-1833	3	ja	6	392	Sternum/Rippe	Qiagen(aus N2)
01-1838	4	ja	12	396	Sacrum	Qiagen(aus N2)
02-02	5	ja	2	440	Tibia	Qiagen(Mikrodiss.)
02-177	6	ja	2.5	496	Mandibula	Qiagen(Mikrodiss.)
02-247	7	ja	10	513	BWS	Qiagen(aus N2)
02-258	8	ja	10	510	Sacrum	Qiagen(aus N2)
02-74	9	ja	4	465	Femur	Qiagen(Mikrodiss.)
02-78	10	ja	9	439	Sacrum	Qiagen(Mikrodiss.)
02-89	11	ja	1	446	Sternum/Rippen	Qiagen(Mikrodiss.)
02-209		nein	6	498	Scapula	Qiagen(Mikrodiss.)
02-95		nein	4	473	Sacrum	Qiagen(Mikrodiss.)
02-01		nein	4	439	LWS/BWS	Qiagen(Mikrodiss.)
01-1955		nein	4	406	Mandibula	Qiagen(Mikrodiss.)
01-1873		nein	9	387	Schwanzwurzel	Qiagen(Mikrodiss.)
01-1795		nein	6.5	386	Os ilii	Schwanzspitze
01-1767		nein	4	371	LWS	Schwanzspitze
01-1288		nein	4	327	Sacrum/Ilium	Schwanzspitze
02-427*		VE	7	559	Kalotte	
$02-400^{*}$		VE	2.5	540	Nase	

Tabelle 3: Beobachtete Osteosarkome und entsprechende Information über Sektionsnummer, Fallnummer, Polymorphismus im Chromosom 9, Tumorgröße in mm, Lebensdauer in Tagen, Tumorlokalisation und Extraktionsmethode.

*: Diese Tumore wurden am Versuchsende aufgefunden, wo alle bis dahin gesunde Tiere dissiziert wurden und wurden nicht in die Analyse eingenommen, aus Gründen, die später erklärt werden (s.4.5.1).

5.1.2 Tumorfreies Überleben

Das osteosarkomfreie Überleben für die 90 Ptch1+/-,p53 +/- Tiere wurde anhande der Kaplan-Meier Methode kalkuliert und für andere Todesursachen korrigiert (Abb.7). Das durchschnittliche Überleben waren 265.8 Tage und die durchschnittliche Tumorlatenz 434.76 Tage.



Abb. 6 Tumorfreies Überleben der Ptch1 +/-, p53 +/- Tiere.

5.2 Polymorphe Marker für LOH Analyse

5.2.1 Eignung der Marker im Chromosom 9

Wie schon erwähnt (1.10) sollte eine Region im Chromosom 9 um das Interval zwischen D9Mit291 und MS1 auf LOH getestet werden. Um das zu verwirklichen wurden erst mehrere Marker auf Polymorphismus zwischen den CD1 und C57Bl/6 Stämmen getestet. Am Anfang wurden die PCR Produkte auf 3% Agarose Gelen getrennt, bei Hinweisen auf Polymorphismus, der in der Agar-Elektrophorese nicht deutlich genug war schloß sich eine PAGE an. Beispiele für polymorphe und nicht polymorphe Marker auf Agarose Gele (Abb. 7):



Abb. 7 Elektrophorese der Marker D9Mit73, D9 Mit 263 und D9 Mit 304 (Längenstandard= Marker VIII). DNA aus CD1, C57Bl/6 und ein 1:1 Gemisch aus beiden (um ein Heterozygotes Tier zu simulieren) wurden nebeneinander aufgetragen. Marker 304 ist nicht polymorph, während Marker 263 polymorph ist und sich für eine LOH Analyse eignet. Beim Marker 73 wird ein unterschiedliches elektrophoretisches Laufverhalten der CD1 und C57Bl/6 Allele festfgestellt, allerdings reicht das Trennungsvermögen von Agarosegelen nicht aus, um einen Polymorphismus beim Gemisch von CD1-C57Bl/6 zu verdeutlichen, weswegen er weiter auf Polyacrylamidgel getestet wurde (Abb.8), wo er sich als polymorph aufweist.



Abb. 8 Polymorphismus des Marker D9Mit73 bei PAGE.

Insgesamt wurden auf Agarosegel 38 Marker auf Polymorphismus zwischen CD1 und C57Bl/6 getestet, davon waren 4 polymorph. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Marker, die auf Agarose zwar einen Hinweis auf Polymorphismus zeigten bei denen aber die beiden Allele sich nicht klar genug trennen liessen, wurden weiter mit PAGE getestet. 16 Marker wurden getestet, davon waren 2 polymorph. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 aufgeführt:

Marker	Polymorph	Marker	Polymorph
D9Mit9	Nein	D9Mit164	Nein
D9Mit10	Nein	D9Mit177	Nein
D9Mit35	Ja	D9Mit179.1	Nein
D9Mit48	k.P.	D9Mit182	Nein*
D9Mit50	Ja	D9Mit242	Nein
D9Mit73	Nein	D9Mit245	Nein
D9Mit105	Nein	D9Mit259	Nein
D9Mit105	Nein	D9Mit261	Nein
D9Mit107	Nein	D9Mit263	Ja
D9Mit108	Nein	D9Mit264	Nein
D9Mit110	Nein	D9Mit269	Nein
D9Mit111	Nein	D9Mit270	Nein
D9Mit113	Nein	D9Mit271	Nein
D9Mit115	Nein	D9Mit272	Nein
D9Mit133	Nein	D9Mit289	Nein
D9Mit134	Nein	D9Mit304	Nein
D9Mit135	Ja	D9Mit305	k.P.
D9Mit144	Nein*	D9Mit307	k.P.
D9Mit154	Nein	D9Mit339	k.P.

Tabelle 4: Marker auf Chromosom 9 die mittels Agarosegelelektrophorese auf

 Polymorphismus getestet wurden.

k.P.=Kein Produkt

*=Bei diesen Marker war CD1 in sich polymorph. Eines der CD1 Allele hatte ähnliches elktrophoretisches Verhältnis wie C57Bl/6 und war somit für LOH ungeeignet.

Tabelle 5: Marker auf Chromosom 9 die mittels PAGE auf Polymorphismus getestet wurden.

Marker	Polymorph	Marker	Polymorph
D9Mit9	Nein	D9Mit154	Nein
D9Mit73	Ja	D9Mit177	Nein
D9Mit108	Nein	D9Mit245	Nein
D9Mit110	Nein	D9Mit259	Nein
D9Mit111	Nein	D9Mit269	Nein
D9Mit113	k.P.	D9Mit271	Nein
D9Mit115	Ja	D9Mit289	Nein
D9Mit134	Nein	D9Mit304	Nein

Die Sequenz und das kartieren aller dieser Marke wurde anhand der MIT/Whitehead und Jackson Laboratories Datenbanken ermittelt (s. 3.11.1).

5.2.2 Weitere Marker für LOH im Chromosom 9

Außer dieser frei erhältlichen Markersequenzen wurden zusätzliche Marker getestet die in der zu untersuchenden Region kartieren. Diese Marker wurden anhand von Sequenzierungsdaten dieser Region von anderen Arbeiten hergestellt (Rosemann 2003), indem (CA) reiche Regionen identifiziert wurden (s.3.11.2). Es wurden 18 Marker getestet (Tab. 6) von denen 3 polymorph waren (OSM2, OSM4, OSM62). Nur der OSM2 wurde weiter benutzt, denn die PCR hat nur bei diesem Marker robust funktioniert.

maraem.					
Marker	Polymorph	Marker	Polymorph	Marker	Polymorph
OSM2	Ja	OSM33	Nein	OSM42	Nein
OSM4	Ja	OSM34	Nein	OSM55	k.P.
OSM9	Nein	OSM35	Nein	OSM62	Ja
OSM10	Nein	OSM36	Nein	OSM66	k.P.
OSM14	Nein	OSM37	k.P.	OSM68	k.P.
OSM17	Nein	OSM38	k.P.	OSM69	Nein

Tabelle 6: Liste der OSM (Osteosarkom Marker) die auf Polymorphismus getestet wurden.

5.3 Informative Tumoren

Wie schon in 1.10.1 erwähnt, konnte man erwarten, daß nur 50% der Tumore heterozygot/polymorph auf den Locus im Chromosom 9 wären, denn diese Tiere waren der Nachwuchs der Kreuzung zweier CD1xC57Bl/6 Mäuse und somit wären 50% heterozygot.

Der Polymorphismus wurde mit dem Marker D9Mit263 getestet, denn dieser Marker hat ein sehr gutes Laufverhalten auf Agarose-Gelen (gute Alleltrennung nach 50 Minuten bei 80V). Aus den in 4.2.1 aufgeführten Tumoren waren 11 polymorph und 8 nicht polymorph. Die anderen 2 Tumore wurden aus zeitlichen Gründen nicht in die Studie aufgenommen (sie hätten die Ergebnisse nicht wesentlich verändert, denn die mikrodissizierten Fälle wiesen erhebliche Probleme bei der PCR auf, wie es unter 5.5 erklärt wird).

Die 11 polymorphe Tumore waren 01-1444, 01-1445, 01-1833, 01-1838, 02-02, 02-74, 02-78, 02-89, 02-177, 02-247, 02-258 und wurden dann auf LOH mit den oben angegeben, polymorphen Markern analysiert.

5.4 LOH/AI Ergebnisse

Die Analyse wurde wesentlich dadurch beeinträchtigt, daß die PCR bei den mikrodissizierten Tumoren nur für den Marker D9Mit263 funktioniert hat. Als Ursachen sind denkbar: eine schlechtere DNA Qualität aus Mikrodissektaten, die Größe der anderen Marker (D9Mit263 ist der kürzeste) und die Fragmentation der mikrodissizierten DNA gegenüber der DNA aus tiefgefrorenen Tumoren. Die LOH/AI wurde optisch mit dem Auge registriert, denn sie war in den meisten Fällen klar. Als Beispiel dient folgendes Photo (Abb. 9).



Abb. 9 Für 2 Fälle (O1/1444 und 01/1445) sind Tumor und Normalgewebe (NG) nebeneinander aufgetragen. Die relative Intensität des C57Bl/6 (schwere Bande, obere) zum CD1 Allel (leichtere Bande, unten) ist gleich im Tumor und Normalgewebe für 01/1444. Für 01/1445 jedoch ist die C57Bl/6 Bande wesentlich schwächer als die CD1 Bande im Vergleich zum Normalgewebe, dies wurde als LOH/AI registriert.

5.4.1 LOH/AI bei mikrodissizierten Fällen

Für die mikrodissizierten Tumore, hat die PCR nur für einen Marker (D9Mit263) einwandfrei und aussagekräftig funktioniert.

Mit den anderen Markern war das Produkt zu schwach oder gar nicht vorhanden. Dies hat Anlaß zu mehrfachen Wiederholungen der PCR ohne Erfolg, daraufhin erneute Extraktion aller Fälle aus neuen Gewebeschnitten und wiederholte Versuche. Alles blieb jedoch ohne Erfolg. Die Ergebnisse für diese Fälle werden in der Tabelle 7 zusammengefaßt.

	Position					
Marker	(<i>cM</i>)	02-177	02-89	02-78	02-74	02-02
D9 Mit263	42	Keine	keine	Keine	keine	keine
D9 Mit73	41					
D9 Mit135	48		Kein oder	nur schwac	hes	
OSM2*	48.5		Produkt			
D9 Mit50	49					
D9 Mit115	56					

Tabelle 7: Ergebnis der LOH Analyse für die FFPE Fälle.

*Die Position von OSM2 bezieht sich auf der Position von Tbx18.

Keiner der mikrodissizierten Fälle wies einen LOH für den Marker D9Mit263 auf. Das Mißlingen der PCR für alle Marker außer D9Mit263 ist wohl auf die starke Fragmentierung der genomischen DNA der mikrodissizierten Fälle zurückzuführen, während D9Mit263 der kürzeste aller Marker war. Das war ein weiterer Grund dafür, die zwei am Versuchsende entdeckten mikrodissizierten Fälle nicht aufzunehmen.

5.4.2 LOH/AI bei tiefgefrorenen Tumoren

Für die tiefgefrorenen Tumore konnte die LOH für mehrere Marker registriert werden. Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

	Position						
Marker	(cM)	02-258	02-247	01-1838	01-1833	<i>01-1445</i>	<i>01-1444</i>
D9 Mit73	41	n.polym.	n.polym.	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6	keine
D9 Mit263	42	C57Bl/6	CD1	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6	keine
D9 Mit135	48	C57Bl/6	n.polym.	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6	keine
OSM2*	48.5	C57Bl/6	n.polym.	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6	keine
D9 Mit50	49	C57Bl/6	CD1	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6	keine
D9 Mit115	56	C57B1/6	CD1	n polym	n polym	C57B1/6	keine

Tabelle 8: Ergebnis der LOH Analyse bei den tiefgefrorenen Fällen.

*Die Position von OSM2 bezieht sich auf der Position von Tbx18.

CD1 bedeutet Velust der Intensität der zum CD1 Allel entsprechenden Bande, ähnlich für C57Bl/6. Einige der Tumore waren für bestimmte Marker nicht polymorph, wenn sich in der Elektrophorese der Normalgewebs PCR nur eine Bande zeigte. Diese Fälle gelten dann als nicht-informative Tumoren für LOH/AI Nachweis.

Die Marker sind so angeordnet, wie sie laut Genom-Karte der Jackson-Laboratory/ Maus-Genome Database (MGD) entlang des Chromosom 9 kartieren, und zwar von
proximal nach distal. Die folgende Zeichnung (Abb. 11) verdeutlicht die Lage der Marker auf dem Chromosom 9.



Abb. 10 Lage der polymorphen Marker auf Chromosom 9. D9Mit291 und MS1 grenzen die zu untersuchende Region ein.

Wir stellen fest, daß wenn ein Tumor eine oder keine LOH bei einem Marker aufwies, ähnliches Ergebnis auch für die übrigen Marker aufwies. Das deutet daraufhin, daß diese LOH/AI das Produkt großer chromosomaler Verluste sind. Es gab keinen Fall, wo ein Tumor bei einigen Markern LOH/AI aufwies und bei anderen eine Retention der Heterozygosität. Damit konnte die MDR (Region des kleinsten Verlustes) leider nicht eingeengt werden. Insgesamt wiesen 5 aus 11 polymorphen Fällen eine LOH auf und in 4/5 Fällen war das verlorene Allel das C57Bl/6.

5.4.3 LOH/AI der p53 und Ptch1 Gene

Da in unserem Tiermodell die Osteosarkome spontan in transgenen Tieren entstanden sind, war es von Interesse den Zustand des Wildtyp p53 und Ptch1 zu untersuchen und evtl. einen Zusammenhang mit der Osteosarkomentstehung festzustellen. Über LOH des Ptch1 Gens bei Osteosarkomen insbesondere wird nichts in der Litteratur berichtet. Die Sequenz der Primer, die benutzt wurden, wird in 3.11.3 aufgeführt. Die PCR Bedigungen war für die Amplifikation des p53 und Ptch1 Gens angepasst worden (siehe 4.6.2). In der PCR konnten damit jeweils das wt- und das transgene Allele mittels Multiplex-PCR simultan und in etwa mit gleicher Intensität amplifiziert werden.

Bei einem molaren Verhältnis des mutierten (MUT) und Wildtyp (WT) Allels von 1 :1 entstanden ungleich starke Banden in der Elektrophorese, eines der beiden Allele war bevorzugt amplifiziert. Für das p53 und Ptch1 war das WT Allel stärker amplifiziert. Somit hatte die PCR keine hohe Aussagekraft über LOH/AI, denn die Banden müssen sich im Normalgewebe ungefähr gleichstark anfärben (im Idealfall gleichstark, kleine Intensitätsunterschiede können toleriert werden). Deswegen wurde die PCR mit verschiedenen molaren Verhältnissen für das WT und MUT Allel für beide Gene geeicht, um jenes Verhältnis zu finden, bei dem beide Allele gleichstark amplifiziert werden (Abb. 11 und 12).

Daraufhin wurden die Tumore auf LOH/AI des Ptch1 und p53 getestet. Ähnlich wie bei den Markern für Chromosom 9 jedoch, hat die PCR bei den mikrodissizierten Tumoren kein oder sehr schwaches Produkt geliefert und somit konnten die Tumore nicht auf den Status des p53 und Ptch1 Gens geprüft werden. Die Ergebnisse der LOH/AI Analyse für die tiefgefroreren Tumoren werden in Tabelle 9 aufgeführt. Keiner der Tumore hatte eine LOH/AI für das WT Ptch1 Gen, während bei 1/6 Fällen das WT p53 Allel von einer LOH/AI betroffen war.



Abb. 11 PCR Optimierung für das p53. WT ist das leichtere Allel. Im 1:1 Verhältnis zu MUT wird es überamplifiziert, aber im Verhältnis WT 1:4 MUT werden beide Allele ungefähr gleich stark amplifiziert.

Ptch1



Abb. 12 PCR Optimierung für das Ptch1. 3 ist DNA aus dem 01/1444 Ptch1 heterozygoten Tier, 1+2 ist 1 zu 1 Gemisch aus CD1 und C57Bl/6 DNA. Getestet wurden 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 Verhältnis des WT zu MUT. WT ist für Ptch1 das schwerere Allel und wird bei einem molaren Verhältniss der beiden alternativen Vorwärts-Primer von 1:1 viel stärker exprimiert als das MUT Allel. Erst ein Verhältniss der beiden Vorwärtsprimer von WT:MUT wie 1:4 liefert ungefähr gleich starke Banden in der Elektrophorese.

Tabelle 9: Ergebnis der LOH Analyse für das Ptch1 und p53 bei den tiefgefrorenen

 Fällen.

	02-258	02-247	01-1838	01-1833	01-1445	01-1444
Ptch1	keine	keine	Keine	Keine	Keine	Keine
p53	keine	keine	WT	Keine	Keine	keine

6 DISKUSSION

6.1 Tumorinzidenz

Die Spontanosteosarkominzidenz in den p53 +/-, Ptch1 +/- Tieren vom CD1x C57Bl/6 genetischen Hintergrund war 23,3% (21/90). Die Osteosarkominzidenz bei p53 +/- Mäusen in der Litteratur wird zwischen 24-36% (Harvey 1995; Donehower 1996) angegeben und somit ist diesem Tumormodell vergleichbar. Das deutet auch darauf hin, daß obwohl die Ptch1 Mutation das Tumorspektrum ändert (die Mäuse mit diesem Genotyp entwickelten einige Medulloblastome sowie Rhabdomyosarkome, Data wird hier nicht präsentiert, dazu s. Hahn 1999), sie keinen Einfluss auf die Osteosarkominzidenz hatte.

6.2 LOH im Chromosom 9

Wie schon erwähnt wurde, ist die LOH/AI - Analyse eine Methode um Tumorsuppressorgene zu entdecken und das Hauptziel dieser Arbeit war zu bestätigen, ob eine LOH die bei radiogenen Mausosteosarkomen entdeckt wurde, auch bei diesen durch genetische Manipulationen entstandenen Osteosarkomen vorhanden ist, als Hinweis auf das Vorhandensein eines Tumorsuppressorgens.

Die Analyse wurde wesentlich dadurch beeinträchtigt, daß die PCR aus den mikrodissizierten Tumoren, trotz Wiederholung und Reextraktion nicht funktionert hat, außer bei D9Mit263. Deswegen kann für diese Fälle nur dieser Marker als Hinweis auf das Vorhandensein einer LOH benutzt werden.

Aus den mikrodissizierten Tumoren hatte keiner eine LOH für den D9Mit263 (0/5). Aus den tiefgefroreren Tumoren haben 5/6 die LOH aufgewiesen und zwar ist in 4 Fällen das C57Bl/6 Allel betroffen und in nur einem das CD1 Allel, was für einen präferentiellen Allel Verlust spechen könnte. Die LOH war, wenn sie einmal nachgewiesen wurde, für alle getestete Marker vorhanden, es gab keinen Tumor der bei einem Marker eine Retention der Heterozygosität aufwies, deswegen konnte man die Region des minimalen Verlustes nicht eingrenzen. Solche Ergebnisse sind Folge großer Chromosomaler Verluste. Über genomische Instabilität bei Osteosarkomen wird berichtet (Belchis 1996; Radig 1998) und sie wird deutlich wenn man bedenkt (s.1.8), daß über 30 Loci mit Verlust oder Gewinn an chromosomalem Material bei Osteosarkomen bekannt sind. Die Genominstabilität ist insbesondere bei Verlust des p53 Gens betont (Overholtzer 2003), was zu diesem Tiermodell passen würde.

6.3 Bevorzugter C57Bl/6 Allelverlust

In 4/5 Fällen war das C57Bl/6 Allel und in nur 1/5 das CD1 Allel von der LOH betroffen. Dieser Unterschied war statistisch unsignifikant (p=0.264). Es könnte aber möglicherweise ein Hinweis auf einen funktioneller Unterschied zwischen dem CD1 und dem C57Bl/6 Allel sein. Dabei hätte das C57Bl/6 Allel eine stärkere schutzgebende Wirkung, weswegen es bevorzugt verloren ging. Die Bedeutung diseses Befundes ist aufgrund der kleinen Fallzahl limitiert. In einer anderen Studie, gingen Tbx 18 Allele (in dieser Region kodierendes Gen, s.6.4) aus beiden Elternteilen gleichermaßen verloren (Rosemann 2003).

6.4 Tumorsuppressorgene auf Chromosom 9

Der Lokus im Chromosom 9 zwischen D9Mit291 und MS1, dessen LOH Status in dieser Arbeit zu untersuchen galt, wurde bei einer Ganzgenom LOH Analyse von radiogenen Osteosarkomen entdeckt (Rosemann 2002). Daraufhin wurde nach bekannten Genen in der Region des minimalen Verlustes und die syntenischen Regionen beim Menschen untersucht (Nathrath 2002). Die syntenische Region beim Menschen ist 6q14.1-15 und war bei 77% aus 42 spontanen Osteosarkomen von LOH/AI betroffen. Aus den Mausversuchen konnte man als Kanditat-Tumorsuppressorgen das Tbx 18 identifizieren (Rosemann 2003), was sich auch auf den Menschen übertragen ließ, wenn man die LOH Data aus beiden Spezies und die kartierenden Gen in der Region betrachtet hat.

Tbx 18 gehört zur T-Box Gruppe von Genen, eine neue Familie von Genen, die als regulatorische Elemente fungieren und während der Embryogenese aktiv sind (He 1999; Yi 1999; Kraus 2001). Tbx 18 wir in den Extremitäten-knospen von Hühnerembryos nachgewiesen (Haenig 2004), bei Mäusen wird es u.a. in den Extremitätenknospen und in der anterioren Somitenhälfte exprimiert (Kraus 2001; Bussen 2004), somit ist es wichtig für die Skelettdifferenzierung. Tumore rekapitulieren oft die Stadien der Embryogenese (Borczuk 2003), dabei werden Gene aktiviert, die während der Frühentwicklung aktiv waren, deswegen wird die Rolle des Tbx18 als Tumorsuppressorgen gerechtfertigt.

Eine AI/LOH Studie mit intragenischen Marker für das Tbx 18 hat eine AI/LOH in 16/17 Tumoren für alle Marker insgesamt demonstriert, nur 1 Tumor war nicht von LOH/AI betroffen (Rosemann 2003). Das macht die Rolle des Tbx18 als Tumorsuppressorgen in der Region sehr wahrscheinlich, allerdings war das zweite Tbx18 Allel nicht von Mutationen oder Deletionen betroffen und somit fehlt der zweite "hit" nach der Knudson-Hypothese. Eine Insel von Hypermethylierung einer CpG Insel 5kb aufwärts des Tbx-Promoters bei 30% von Lungenadenocarcinomen (Shiraishi 2002) könnte ein epigenetisches Phänomen als inaktivierendes Ereignis der zweiten Genkopie verantwortlich machen. Nichtdestotrotz, gibt es einen Zuwachs an Daten, die indizieren, daß Karzinogenese schon bei Verlust einer Kopie eines Tumorsuppressorgens beginnt (Santarosa 2004). Das wurde auch für das Tbx18 postuliert (Rosemann 2003) und wird gegenwärtig am GSF Institut für Pathologie durch Osteosarkominduktion an heterozygoten Tbx18 knockout Mäusen getestet. Die LOH Data aus der vorliegenden Arbeit unterstützt weiter die Vermutung, daß eine LOH in diesem 9q Locus von zentraler Bedeutung für die Osteosarkomentstehung ist.

6.5 LOH im p53 Locus

Wie schon in 1.7.1 erwähnt, ist das p53 sehr häufig bei menschlichen Osteosarkomen von LOH betroffen und zwar in 30-50% der Fälle. In p53 +/- Mäusen kann der zweite Hit nach der Knudson "2 Hit "Hypothese nicht immer detektiert werden (Venkatachalam 1998). Aus einer vorigen Arbeit im Institut für Pathologie, GSF war bei radiogenen Osteosarkomen das p53 von LOH in 89% der Fälle betroffen (Rosemann 2002). Die in dieser Arbeit benutzten Mäuse waren haploinsuffizient und somit hatten von Geburt an eine LOH/AI. Eine Inaktivierung des Wildtyp-Allels wurde durch LOH in einem aus sechs tiefgefrorenen Tumoren gefunden.

Da die PCR bei den mikrodissizierten Tumoren nur für einen Marker robust funktioniert hat, kann man sich nicht sicher sein, daß diese Tumore doch keine LOH für diese Region im Chromosom 9 aufweisen. Wenn man nur die Information aus den tiefgefrorenen Tumoren betrachtet, liefert diese Arbeit Ergebnisse in Konkordanz zu denen aus den radiogenen Osteosarkomen. Das p53 Gen war in beiden Arbeiten in einem hohen Prozentsatz von LOH betroffen (89% vs 100% in dieser Arbeit durch genetische Manipulation) (Rosemann 2002). Der Locus im distalen Ende des Chromosoms 9 war ebenfalls in beiden Arbeiten in einem hohen Prozentsatz von LOH betroffen (16/17=94.1% vs 5/6=83.3%) (Rosemann 2003). Daraus könnte man postulieren, daß sowohl strahlungsinduzierten als auch spontanen Osteosarkomen ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt, der in beiden Fällen genetische Läsionen in p53 und distalen Chromosom 9 involviert.

6.6 LOH im Ptch1 Locus

Das Ptch1 ist ein bekanntes Tumorsuppressorgen für Medulloblastome, Basaliome, Rhabdomyosarkome und andere Tumore (1.10.2). In Medulloblastomen von Ptch1 +/-Mäusen die bestrahlt wurden, wurde eine Ptch1 Deletion in allen untersuchten Tumoren festgestellt (Pazzaglia 2006). In Basalzellkarzinomen von bestrahlten Ptch1 +/- Mäusen wurde eine Ptch1 Deletion in 93-100% der Tumore festgestellt (Mancuso 2004; Pazzaglia 2004). Allerdings scheint das WT Ptch1 auf andere Weise inaktiviert werden zu können und nicht nur durch Gendeletion. Bei spontanen Rhabdomyosarkomen in Ptch1 +/- Mäusen wurde keine Deletion detektiert (Calzada-Wack 2002). Über eine LOH in Osteosarkomen wird weder bei Menschen noch Mäusen berichtet. Obwohl die PCR bei den mikrodissizierten Fällen nicht funktioniert hat, wurde keine LOH des Ptch1 Gens in den tiefgefrorenen Tumoren gefunden (0/6). Ob die Ptch1 Mutation die Entwicklung von Osteosarkomen fazilitert, kann aus dieser Arbeit nicht geschlossen werden, man kann aber feststellen, daß einem evtl. Funktionsverlust des Wildtypallels keine größere Deletion als verursachander Mechanismus zugrundeliegt. Die Osteosarkominzidenz schien in diesem transgenen Tiermodell von der Ptch1 Mutation unbeeinflußt zu sein.

6.7 LOH und Tumorgröße und - latenz

Tumoren mit LOH und ohne LOH wiesen eine ähnlich Tumorlatenz auf (429.4 \pm 78.6 Tage mit, 432.8 \pm 63.5 ohne LOH, p=0.938). Eine interessante Beziehung konnte zwischen LOH und Tumorgröße gezogen werden, denn die Tumore mit LOH waren größer als jene (Durchmesser 9 \pm 2.5mm mit, 4.8 \pm 3.8mm ohne LOH, p= 0.061) (Abb. 13).



Abb.13 Grösse der Tumoren (in mm) mit LOH (links) und ohne LOH (rechts).

Dieser Unterschied war nahe der Grenze der statistischen Signifikanz (p=0.61). Der Verlust des Tbx18 oder anderer Gene in diesem Locus auf Chromosom 9 könnte das schnellere Wachstum der Tumorzellen begünstigen, während es mit der Prognose nicht korrelierte.

7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

- Bei einer Ganz-Genom Analyse in einem murinen, strahlungsinduzierten Model für Osteosarkome wurde eine Region auf Chromosom 9 zwischen den Mikrosatelliten D9Mit291 und MS1 entdeckt, die eine hohe LOH/AI Rate aufwies und Verdacht auf das Vorhandensein eines Tumorsuppresorgens schliessen liess. Das Tbx18 kodiert als Kandidat-Tumorsuppresorgen in dieser Region und wies eine hohe Rate von LOH/AI mit intragenischen Markern (16/17) im selben Model auf.
- Diese LOH/AI Region wurde in spontanen Osteosarkomen von transgenen p53 +/-Ptch1 +/- Mäusen untersucht. Die LOH wurde bestätigt, was auf die Rolle eines in dieser Region kodierenden Gens bei der Entwicklung von Osteosarkomen weiter unterstützt.
- Die LOH/AI war in 0/5 mikrodissizierten Fällen für den Marker D9Mit263 vorhanden. Die PCR bei anderen Markern hat keine aussagekräftigen Ergebnisse geliefert. Die LOH/AI war in 5/6 makroskopischen, tiefgefroreren Tumoren für mehrere Marker vorhanden. Die Region des minimalen Verlustes (MDR) konnte nicht eingeengt werden. Das C57Bl/6 Allel war in vier Fällen betroffen und das CD1 in einem.
- Eine LOH/AI des WT p53 Gens wurde in 1/6 tiefgefrorenen Tumoren gefunden. Die PCR für das p53 bei den mikrodissizierten Fälle hat keine aussagekräftigen Ergebnisse geliefert.
- Die Ergebnisse aus den tiefgefroren Tumoren ist in Konkordanz zu denen aus radiogenen Osteosarkomen, wo eine LOH des p53 und des 9q Locus eine zentralle Rohe in der Tumorigenese zu spielen scheinen.
- Das Wildtyp Ptch1 Gen wies in den tiefgegroreren Tumoren keine LOH auf. Seine Rolle im Hinblick auf die Osteosarkomentwicklung ist immernoch unklar, die Osteosarkominzidenz war nicht beeinflußt.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Krebs ist ein komplexes Geschehen, bedingt durch die klonale Proliferation von malignen Zellen, die mehrere genetische Läsionen akkumuliert haben und unter einer Dysregulierung des Zellzyklus, -wachstums und –todes leiden. Osteosarkom ist ein seltener primärer Knochentumor, der sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen auftritt und vergleichbar zwischen diesen Spezies ist. Über seine Entstehung ist vieles bekannt, die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung deuten auf Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, sowie Aktivierung von Onkogenen. Eine besondere Rolle spielen Keimbahnmutationen von Tumorsuppressorgenen, hier sind v.a. p53 und Rb hervorzuheben. Eine Methode zur Tumorsuppressorgenentdeckung ist die LOH/AI Analyse. Tiermodelle liefern wertvolle Informationen über Tumorigenese, die auf den Menschen extrapoliert werden können, wie das für das Tbx 18 gezeigt werden konnte.

Bei einer vorigen Arbeit in diesem Institut wurde die Bedeutung eines LOH/AI Locus im Chromosom 9 (zwischen D9Mit291 und MS1) bei radiogenen Osteosarkomen in der Maus festgestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Inzidenzrate von Osteosarkomen in p53 +/- und Ptch1 +/- Mäusen erfaßt, außerdem wurden die Tumore auf LOH/AI für diesen Locus auf Chromosom 9, den p53 und auch den Ptch1 Locus untersucht. Die Inzidenrate der Tumore ist 23.07 %. Die LOH Analyse wurde von der mißlungenen PCR bei mikrodissizierten Tumoren beeinträchtigt, allerdings konnte man einen Marker als Hinweis auf das Vorhandensein der LOH bei diesen Fällen benutzen. Von den mikrodissizierten Fällen wies keiner eine LOH/AI im Chromosom 9 auf, von den tiefgefroreren Tumoren allerdings war sie in 5/6 Fällen nachzuweisen. Interessanterweise war in 4/5 Fällen das C57BI/6 verloren. Bei einer anderen LOH/AI Studie für das Tbx18 Gen gingen allerdings Allele aus beiden Eltern gleichermaßen verloren.

Weiterhin ließ sich keine Retention der Heterozygosität bei den getesteten Markern nachweisen, was einerseits das Eingrenzen der LOH nicht zuließ, andererseit für große chromosomale Deletionen spricht. Insgesamt, wurde die LOH im Chromosom 9 auch im transgenen Tiermodel bestätigt und unterstützt die Data zur Rolle des Tbx18 (oder eines anderen, in dieser Region kodierenden Gens) als Tumorsuppressorgen. Der p53 Locus war in 1/6 tiefgefroreren Fällen von LOH/AI betroffen. Deletionen im p53 als auch in der untersuchten Region auf Chromosom 9, scheinen sowohl bei radiogenen als auch spontanen Osteosarkomen von Bedeutung zu sein. Eine LOH/AI des Ptch1 Locus ist bei Osteosarkomen noch nicht beschrieben, obwohl Ptch1 ein bekanntes Tumorsuppressorgen ist und an Skelettdifferenzierungsvorgängen beteiligt ist. Hier konnte in 6 tiefgefrorenen Fällen keine LOH/AI nachgewiesen werden. Letztlich, korrelierte die Größe des Tumors positiv mit dem Vorhandensein der LOH auf Chromosom 9.

9 SUMMARY

Tumorigenesis is a complex process, caused by the clonal proliferation of malignant cells, that have accumulated several genetic lesions and suffer from a dysregulation of the cell-cycle, -growth and –death. Osteosarcoma is a rare primary bone tumor, which occurs both in human and mice and is comparable between these species. A great deal is known about its development, the molecular mechanisms of tumorigenesis point towards inactivation of tumor suppressor genes and activation of oncogenes. Germline mutations of tumor suppressor genes play a prominent role, especially of the p53 and Rb genes. A method for the detection of tumor suppressor genes is the LOH/AI analysis. Animal models can provide useful data about tumorigenesis, which can be extrapolated to the human species, as was shown for the Tbx 18 gene.

In a previous work from this institute the significance of a LOH/AI locus on chromosome 9 (between D9Mit291 and MS1) in radiogenic murine ostesarcomas was discovered. In the present work the incidence rate of osteosarcomas in p53 +/- and Ptch1 +/- mice was described, furthermore the tumors were analyzed for a LOH/AI of the locus on Chromosome 9, the p53 and the Ptch1 loci. The tumor incidence rate was 23.07%. The LOH analysis was hampered by the unsuccessful PCR in microdissected cases, however one marker could be used as a hint to the presence of LOH/AI in these cases. None of the microdissected cases displayed a LOH/AI on chromome 9, whereas this was shown for 5/6 deep frozen tumors. Interestingly, the C57BI/6 allele was lost in 4/5 cases. In a different LOH/AI study of the Tbx 18 gene however, alleles of both parental sides were lost.

Moreover, no retention of heterozygosity was found for the tested markers, which on the one did not allow a narrowing of the LOH, on the other points out to large chromosomal deletions. In total, the LOH on chromosome 9 was confirmed also in the transgene animal model and supports the data on the role of Tbx 18 (or of an other gene, coding in this region) as tumor suppressor gene.

The p53 locus displayed a LOH/AI in 1/6 deep frozen cases. Deletions in p53 and in the examined region on Chromosome 9, seem to be important for the development of

both radiation-induced and spontaneous osteosarcomas. A LOH/AI of the Ptch1 locus has not been described in osteosarcomas yet, although Ptch1 is a known tumor suppressor gene and participates in skeletal differentiation processes. A LOH/AI of the Ptch1 locus was not found in any of the six deep frozen cases. Finally, tumor size correlated positively with the presence of LOH.

10 REFERENZEN

- Aboulafia, A. J., Brooks, F., Piratzky, J. and Weiss, S. (1999). "Osteosarcoma arising from heterotopic ossification after an electrical burn. A case report." <u>J Bone Joint Surg Am</u> 81: 564-70.
- Aboulkassim, T. O., LaRue, H., Lemieux, P., Rousseau, F. and Fradet, Y. (2003). "Alteration of the PATCHED locus in superficial bladder cancer." <u>Oncogene</u> 22: 2967-71.
- Abramson, D. H., Ellsworth, R. M. and Zimmerman, L. E. (1976). "Nonocular cancer in retinoblastoma survivors." <u>Trans Am Acad Ophthalmol</u> <u>Otolaryngol</u> 81: 454-7.
- Altner, P. C., Simmons, D. J., Lucas, H. F., Jr. and Cummins, H. (1972). "Osteogenic sarcoma in a patient injected with Thorotrast." <u>J Bone Joint</u> <u>Surg Am</u> 54: 670-5.
- Anninga, J. K., van de Vijver, M. J., Cleton-Jansen, A. M., Kristel, P. M., Taminiau, A. H., Nooij, M., Egeler, R. M. and Hogendoorn, P. C. (2004).
 "Overexpression of the HER-2 oncogene does not play a role in highgrade osteosarcomas." <u>Eur J Cancer</u> 40: 963-70.
- Aquino, V. M. and Buchanan, G. R. (1996). "Osteogenic sarcoma in a child with transfusion-dependent Diamond-Blackfan anemia." <u>J Pediatr Hematol</u> <u>Oncol</u> 18: 230-2.
- Armas, J. B., Pimentel, F., Guyer, P. B., Cooper, C., Pye, S. R. and O'Neill, T. W. (2002). "Evidence of geographic variation in the occurrence of Paget's disease." <u>Bone</u> 30: 649-50.
- Bale, A. E. and Yu, K. P. (2001). "The hedgehog pathway and basal cell carcinomas." <u>Hum Mol Genet</u> 10: 757-62.
- Barker, P. E., Rabin, M., Watson, M., Breg, W. R., Ruddle, F. H. and Verma, I. M. (1984). "Human c-fos oncogene mapped within chromosomal region 14q21----q31." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 81: 5826-30.
- Batanian, J. R., Cavalli, L. R., Aldosari, N. M., Ma, E., Sotelo-Avila, C., Ramos, M. B., Rone, J. D., Thorpe, C. M. and Haddad, B. R. (2002). "Evaluation of paediatric osteosarcomas by classic cytogenetic and CGH analyses." <u>Mol Pathol</u> 55: 389-93.
- Belchis, D. A., Meece, C. A., Benko, F. A., Rogan, P. K., Williams, R. A. and Gocke, C. D. (1996). "Loss of heterozygosity and microsatellite instability at the retinoblastoma locus in osteosarcomas." <u>Diagn Mol Pathol</u> 5: 214-9.
- Benassi, M. S., Molendini, L., Gamberi, G., Magagnoli, G., Ragazzini, P., Gobbi, G. A., Sangiorgi, L., Pazzaglia, L., Asp, J., Brantsing, C. and Picci, P. (2001). "Involvement of INK4A gene products in the pathogenesis and development of human osteosarcoma." <u>Cancer</u> 92: 3062-7.
- Benassi, M. S., Molendini, L., Gamberi, G., Ragazzini, P., Sollazzo, M. R., Merli, M., Asp, J., Magagnoli, G., Balladelli, A., Bertoni, F. and Picci, P. (1999).
 "Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma." <u>Int J</u> <u>Cancer</u> 84: 489-93.
- Benassi, M. S., Molendini, L., Gamberi, G., Sollazzo, M. R., Ragazzini, P., Merli, M., Magagnoli, G., Sangiorgi, L., Bacchini, P., Bertoni, F. and Picci, P. (1997). "Altered G1 phase regulation in osteosarcoma." <u>Int J Cancer</u> 74: 518-22.

- Benavides, F., Conti, C. J., LaCava, M., Flores, M., Glasscock, E., Sternik, G., Gimenez-Conti, I. B., Johnston, D. A., Dunsford, H. A., Goldstein, L. S. and Rodriguez, L. V. (2003). "Loss of heterozygosity analysis of mouse pulmonary adenomas induced by coal tar." <u>Environ Mol Mutagen</u> 41: 300-8.
- Birch, J. M., Alston, R. D., McNally, R. J., Evans, D. G., Kelsey, A. M., Harris, M., Eden, O. B. and Varley, J. M. (2001). "Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations." <u>Oncogene</u> 20: 4621-8.
- Bishop, J. M. (1981). "Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes." <u>Cell</u> 23: 5-6.
- Bodak, N., Queille, S., Avril, M. F., Bouadjar, B., Drougard, C., Sarasin, A. and Daya-Grosjean, L. (1999). "High levels of patched gene mutations in basal-cell carcinomas from patients with xeroderma pigmentosum." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> 96: 5117-22.
- Borczuk, A. C., Gorenstein, L., Walter, K. L., Assaad, A. A., Wang, L. and Powell, C. A. (2003). "Non-small-cell lung cancer molecular signatures recapitulate lung developmental pathways." <u>Am J Pathol</u> 163: 1949-60.
- Boyd, J. T., Brown, W. M., Vennart, J. and Woodcock, G. E. (1966). ''Chromosome studies on women formerly employed as luminous-dial painters.'' <u>Br Med J</u> 5484: 377-82.
- Brinkschmidt, C., Blasius, S., Burger, H., Simon, R., Diallo, R., Battmann, A., Winkelmann, W., Bocker, W. and Dockhorn-Dworniczak, B. (1998). ''[Comparative genomic hybridization (CGH) for detecting a heretofore undescribed amplified chromosomal segment in high-grade medullary osteosarcoma].'' <u>Verh Dtsch Ges Pathol</u> 82: 184-8.
- Buchler, P., Reber, H. A., Lavey, R. S., Tomlinson, J., Buchler, M. W., Friess, H. and Hines, O. J. (2004). "Tumor hypoxia correlates with metastatic tumor growth of pancreatic cancer in an orthotopic murine model." <u>J Surg Res</u> 120: 295-303.
- Burch, P. R. (1960). "Radiation carcinogenesis: a new hypothesis." <u>Nature</u> 185: 135-42.
- Bussen, M., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Leitges, M., Gossler, A. and Kispert, A. (2004). "The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments." <u>Genes Dev</u> 18: 1209-21.
- Calzada-Wack, J., Kappler, R., Schnitzbauer, U., Richter, T., Nathrath, M., Rosemann, M., Wagner, S. N., Hein, R. and Hahn, H. (2002). "Unbalanced overexpression of the mutant allele in murine Patched mutants." <u>Carcinogenesis</u> 23: 727-33.
- Carnevale, A., Lieberman, E. and Cardenas, R. (1997). "Li-Fraumeni syndrome in pediatric patients with soft tissue sarcoma or osteosarcoma." <u>Arch</u> <u>Med Res</u> 28: 383-6.
- Chang, P. Y., Kanazawa, N., Lutze-Mann, L. and Winegar, R. A. (2001). "p53 deficiency alters the yield and spectrum of radiation-induced lacZ mutants in the brain of transgenic mice." <u>Mutagenesis</u> 16: 7-15.
- Chauveinc, L., Mosseri, V., Quintana, E., Desjardins, L., Schlienger, P., Doz, F. and Dutrillaux, B. (2001). "Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period." <u>Ophthalmic Genet</u> 22: 77-88.

- Clarke, A. R., Cummings, M. C. and Harrison, D. J. (1995). "Interaction between murine germline mutations in p53 and APC predisposes to pancreatic neoplasia but not to increased intestinal malignancy." Oncogene 11: 1913-20.
- Cotran, R. S., Kumar, V. and Collins, T. (1999). Mechanisms of invasion and metastasis. <u>Robbins pathologic basis of disease</u>. Cotran, R.S., Kumar, V. and Collins, T. Philadelphia, Saunders: 302-305.
- Cotran, R. S., Kumar, V. and Collins, T. (1999). Telomeres and Cancer. <u>Robbins</u> <u>pathologic basis of disease</u>. Cotran, R.S., Kumar, V. and Collins, T. Philadelphia, Saunders: 296.
- Cotran, R. S., Kumar, V. and Collins, T. (1999). Tumor angiogenesis. <u>Robbins</u> <u>pathologic basis of disease</u>. Cotran, R.S., Kumar, V. and Collins, T. Philadelphia, Saunders: 301-302.
- Cripe, T. P. (2004, Last Update: February 10 2004). "Osteosarcoma." Retrieved September, 2004, from <u>www.emedicine.com/ped/topic1684.htm</u>.
- Der Kaloustian, V. M., McGill, J. J., Vekemans, M. and Kopelman, H. R. (1990). "Clonal lines of aneuploid cells in Rothmund-Thomson syndrome." <u>Am J</u> <u>Med Genet</u> 37: 336-9.
- Destro, A., Bianchi, P., Alloisio, M., Laghi, L., Di Gioia, S., Malesci, A., Cariboni, U., Gribaudi, G., Bulfamante, G., Marchetti, A., Bosari, S., Infante, M., Ravasi, G. and Roncalli, M. (2004). "K-ras and p16(INK4A)alterations in sputum of NSCLC patients and in heavy asymptomatic chronic smokers." <u>Lung Cancer</u> 44: 23-32.
- Devilee, P., Cleton-Jansen, A. M. and Cornelisse, C. J. (2001). "Ever since Knudson." <u>Trends Genet</u> 17: 569-73.
- Dietrich, W. F., Miller, J. C., Steen, R. G., Merchant, M., Damron, D., Nahf, R., Gross, A., Joyce, D. C., Wessel, M., Dredge, R. D. and et al. (1994). "A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms." <u>Nat Genet</u> 7: 220-45.
- Dietrich, W. F., Radany, E. H., Smith, J. S., Bishop, J. M., Hanahan, D. and Lander, E. S. (1994). "Genome-wide search for loss of heterozygosity in transgenic mouse tumors reveals candidate tumor suppressor genes on chromosomes 9 and 16." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 91: 9451-5.
- Donehower, L. A. (1996). "The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies." <u>Semin Cancer Biol</u> 7: 269-78.
- Donehower, L. A., Godley, L. A., Aldaz, C. M., Pyle, R., Shi, Y. P., Pinkel, D., Gray, J., Bradley, A., Medina, D. and Varmus, H. E. (1995). "Deficiency of p53 accelerates mammary tumorigenesis in Wnt-1 transgenic mice and promotes chromosomal instability." <u>Genes Dev</u> 9: 882-95.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Vogel, H., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Park, S. H., Thompson, T., Ford, R. J. and Bradley, A. (1995). "Effects of genetic background on tumorigenesis in p53-deficient mice." <u>Mol Carcinog</u> 14: 16-22.
- Draper, G. J., Sanders, B. M. and Kingston, J. E. (1986). "Second primary neoplasms in patients with retinoblastoma." <u>Br J Cancer</u> 53: 661-71.
- Duda, D. G., Sunamura, M., Lefter, L. P., Furukawa, T., Yokoyama, T., Yatsuoka, T., Abe, T., Inoue, H., Motoi, F., Egawa, S., Matsuno, S. and Horii, A. (2003). "Restoration of SMAD4 by gene therapy reverses the invasive phenotype in pancreatic adenocarcinoma cells." <u>Oncogene</u> 22: 6857-64.

- Enneking, W. F. (1986). "A system of staging musculoskeletal neoplasms." <u>Clin</u> <u>Orthop</u>: 9-24.
- Evans, R. D. (1967). "The radium standard for boneseekers--evaluation of the data on radium patients and dial painters." <u>Health Phys</u> 13: 267-78.
- Fearon, E. R. (1994). "Molecular genetic studies of the adenoma-carcinoma sequence." <u>Adv Intern Med</u> 39: 123-47.
- Fearon, E. R. (1995). "Molecular genetics of colorectal cancer." <u>Ann N Y Acad</u> <u>Sci</u> 768: 101-10.
- Fearon, E. R. (1997). "Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer." <u>Science</u> 278: 1043-50.
- Fearon, E. R. (1998). <u>The Genetic Basis of Human Cancer</u>. New York, McGraw Hill.
- Feinberg, A. P. (2001). "Cancer epigenetics takes center stage." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> 98: 392-4.
- Feinberg, A. P. (2001). "Methylation meets genomics." Nat Genet 27: 9-10.
- Feugeas, O., Guriec, N., Babin-Boilletot, A., Marcellin, L., Simon, P., Babin, S., Thyss, A., Hofman, P., Terrier, P., Kalifa, C., Brunat-Mentigny, M., Patricot, L. M. and Oberling, F. (1996). "Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma." <u>J Clin</u> Oncol 14: 467-72.
- Finkel, M., Biskis, B. and Jinkins, P. (1966). "Virus induction of
- osteosarcomas in mice." Science: 698-701.
- Forus, A., Weghuis, D. O., Smeets, D., Fodstad, O., Myklebost, O. and Geurts van Kessel, A. (1995). "Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: II. Identification of novel amplicons at 6p and 17p in osteosarcomas." <u>Genes Chromosomes Cancer</u> 14: 15-21.
- Franchi, A., Calzolari, A. and Zampi, G. (1998). "Immunohistochemical detection of c-fos and c-jun expression in osseous and cartilaginous tumours of the skeleton." <u>Virchows Arch</u> 432: 515-9.
- Francois, J. (1977). "Retinoblastoma and osteogenic sarcoma." <u>Ophthalmologica</u> 175: 185-91.
- French, J., Storer, R. D. and Donehower, L. A. (2001). "The nature of the heterozygous Trp53 knockout model for identification of mutagenic carcinogens." <u>Toxicol Pathol</u> 29 Suppl: 24-9.
- French, J. E. (2004). "Identification and characterization of potential human carcinogens using B6.129tm1Trp53 heterozygous null mice and loss of heterozygosity at the Trp53 locus." <u>IARC Sci Publ</u>: 271-87.
- French, J. E., Lacks, G. D., Trempus, C., Dunnick, J. K., Foley, J., Mahler, J., Tice, R. R. and Tennant, R. W. (2001). "Loss of heterozygosity frequency at the Trp53 locus in p53-deficient (+/-) mouse tumors is carcinogen-and tissue-dependent." <u>Carcinogenesis</u> 22: 99-106.
- Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M. and Dryja, T. P. (1986). "A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma." <u>Nature</u> 323: 643-6.
- Friend, S. H., Dryja, T. P. and Weinberg, R. A. (1988). "Oncogenes and tumorsuppressing genes." <u>N Engl J Med</u> 318: 618-22.
- Fuchs, B. and Pritchard, D. J. (2002). "Etiology of osteosarcoma." <u>Clin Orthop</u>: 40-52.

- Gailani, M. R., Stahle-Backdahl, M., Leffell, D. J., Glynn, M., Zaphiropoulos, P. G., Pressman, C., Unden, A. B., Dean, M., Brash, D. E., Bale, A. E. and Toftgard, R. (1996). "The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas." <u>Nat Genet</u> 14: 78-81.
- Gamberi, G., Benassi, M. S., Bohling, T., Ragazzini, P., Molendini, L., Sollazzo, M. R., Pompetti, F., Merli, M., Magagnoli, G., Balladelli, A. and Picci, P. (1998). "C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression." <u>Oncology</u> 55: 556-63.
- Gamberi, G., Ragazzini, P., Benassi, M. S., Ferrari, C., Sollazzo, M. R., Molendini, L., Merli, M., Magagnoli, G., Ruggieri, P., Balladelli, A., Orlando, C., Bacchini, P., Pazzagli, M. and Picci, P. (2000). "Analysis of 12q13-15 genes in parosteal osteosarcoma." <u>Clin Orthop</u>: 195-204.
- Geradts, J., Fong, K. M., Zimmerman, P. V., Maynard, R. and Minna, J. D. (1999). "Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers." <u>Clin Cancer Res</u> 5: 791-800.
- Girard, L., Zochbauer-Muller, S., Virmani, A. K., Gazdar, A. F. and Minna, J. D. (2000). "Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering." <u>Cancer Res</u> 60: 4894-906.
- Gisselsson, D., Palsson, E., Hoglund, M., Domanski, H., Mertens, F., Pandis, N., Sciot, R., Dal Cin, P., Bridge, J. A. and Mandahl, N. (2002).
 "Differentially amplified chromosome 12 sequences in low- and high-grade osteosarcoma." <u>Genes Chromosomes Cancer</u> 33: 133-40.
- Gomez Acotto, C. and Mautalen, C. A. (2001). "European origin of patients with Paget's disease of bone in the Buenos Aires area." <u>Eur J Epidemiol</u> 17: 409-11.
- Good, D., Busfield, F., Duffy, D., Lovelock, P. K., Kesting, J. B., Cameron, D. P. and Shaw, J. T. (2001). "Familial Paget's disease of bone: nonlinkage to the PDB1 and PDB2 loci on chromosomes 6p and 18q in a large pedigree." J Bone Miner Res 16: 33-8.
- Goodrich, L. V., Johnson, R. L., Milenkovic, L., McMahon, J. A. and Scott, M. P. (1996). "Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog." <u>Genes</u> <u>Dev</u> 10: 301-12.
- Gorlick, R., Huvos, A. G., Heller, G., Aledo, A., Beardsley, G. P., Healey, J. H. and Meyers, P. A. (1999). "Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma." J Clin Oncol 17: 2781-8.
- Gorlin, R. J. (1995). "Nevoid basal cell carcinoma syndrome." <u>Dermatol Clin</u> 13: 113-25.
- Gossner, W. (1985). <u>Pathogenesis of radionuclide-induced bone tumros</u>. Lancaster, MTP Press.
- Goto, A., Kanda, H., Ishikawa, Y., Matsumoto, S., Kawaguchi, N., Machinami, R., Kato, Y. and Kitagawa, T. (1998). "Association of loss of heterozygosity at the p53 locus with chemoresistance in osteosarcomas." Jpn J Cancer Res 89: 539-47.
- Gregorc, V., Darwish, S., Ludovini, V., Pistola, L., De Angelis, V., Mihaylova, Z., Bellezza, G., Sidoni, A., Cavaliere, A., Bucciarelli, E., Massaro, G. and Tonato, M. (2003). "The clinical relevance of Bcl-2, Rb and p53

expression in advanced non-small cell lung cancer." <u>Lung Cancer</u> 42: 275-81.

- Greten, F. R., Wagner, M., Weber, C. K., Zechner, U., Adler, G. and Schmid, R. M. (2001). "TGF alpha transgenic mice. A model of pancreatic cancer development." <u>Pancreatology</u> 1: 363-8.
- Group, A. B. C. S. (2000). "Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases." <u>Br J</u> <u>Cancer</u> 83: 1301-8.
- Gupta, P. K., Sahota, A., Boyadjiev, S. A., Bye, S., Shao, C., O'Neill, J. P., Hunter, T. C., Albertini, R. J., Stambrook, P. J. and Tischfield, J. A. (1997). "High frequency in vivo loss of heterozygosity is primarily a consequence of mitotic recombination." <u>Cancer Res</u> 57: 1188-93.
- Gupta, P. K., Shao, C., Zhu, Y., Sahota, A. and Tischfield, J. A. (1997). "Loss of heterozygosity analysis in a human fibrosarcoma cell line." <u>Cytogenet</u> <u>Cell Genet</u> 76: 214-8.
- Gurney, J. G., Severson, R. K., Davis, S. and Robison, L. L. (1995). "Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type." <u>Cancer</u> 75: 2186-95.
- Haenig, B. and Kispert, A. (2004). "Analysis of TBX18 expression in chick embryos." <u>Dev Genes Evol</u> 214: 407-11.
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulous, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Unden, A. B., Gillies, S., Negus, K., Smyth, I., Pressman, C., Leffell, D. J., Gerrard, B., Goldstein, A. M., Dean, M., Toftgard, R., Chenevix-Trench, G., Wainwright, B. and Bale, A. E. (1996). "Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome." <u>Cell</u> 85: 841-51.
- Hahn, H., Wojnowski, L., Miller, G. and Zimmer, A. (1999). "The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models." J Mol Med 77: 459-68.
- Hahn, H., Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Hall, J., Miller, G. and Zimmer, A. (1998). "Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome." <u>Nat Med</u> 4: 619-22.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). "The hallmarks of cancer." <u>Cell</u> 100: 57-70.
- Harvey, L., Gray, T., Beneton, M. N., Douglas, D. L., Kanis, J. A. and Russell, R. G. (1982). "Ultrastructural features of the osteoclasts from Paget's disease of bone in relation to a viral aetiology." J Clin Pathol 35: 771-9.
- Harvey, M., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., Bradley, A. and Donehower, L. A. (1993). "Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice." <u>Nat Genet</u> 5: 225-9.
- Harvey, M., Vogel, H., Lee, E. Y., Bradley, A. and Donehower, L. A. (1995).
 "Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin." <u>Cancer Res</u> 55: 1146-51.
- Harvey, M., Vogel, H., Morris, D., Bradley, A., Bernstein, A. and Donehower, L. A. (1995). "A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice." <u>Nat Genet</u> 9: 305-11.
- Hauben, E. I., Arends, J., Vandenbroucke, J. P., van Asperen, C. J., Van Marck, E. and Hogendoorn, P. C. (2003). "Multiple primary malignancies in

osteosarcoma patients. Incidence and predictive value of osteosarcoma subtype for cancer syndromes related with osteosarcoma.'' <u>Eur J Hum</u> <u>Genet</u> 11: 611-8.

- Hauben, E. I., Weeden, S., Pringle, J., Van Marck, E. A. and Hogendoorn, P. C. (2002). "Does the histological subtype of high-grade central osteosarcoma influence the response to treatment with chemotherapy and does it affect overall survival? A study on 570 patients of two consecutive trials of the European Osteosarcoma Intergroup." <u>Eur J Cancer</u> 38: 1218-25.
- He, M., Wen, L., Campbell, C. E., Wu, J. Y. and Rao, Y. (1999). "Transcription repression by Xenopus ET and its human ortholog TBX3, a gene involved in ulnar-mammary syndrome." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 96: 10212-7.
- Hegi, M. E., Devereux, T. R., Dietrich, W. F., Cochran, C. J., Lander, E. S., Foley, J. F., Maronpot, R. R., Anderson, M. W. and Wiseman, R. W. (1994).
 ''Allelotype analysis of mouse lung carcinomas reveals frequent allelic losses on chromosome 4 and an association between allelic imbalances on chromosome 6 and K-ras activation.'' <u>Cancer Res</u> 54: 6257-64.
- Hegi, M. E., Soderkvist, P., Foley, J. F., Schoonhoven, R., Swenberg, J. A., Kari, F., Maronpot, R., Anderson, M. W. and Wiseman, R. W. (1993).
 "Characterization of p53 mutations in methylene chloride-induced lung tumors from B6C3F1 mice." <u>Carcinogenesis</u> 14: 803-10.
- Herzog, C. R., Devereux, T. R., Pittman, B. and You, M. (2002). "Carcinogenic induction directs the selection of allelic losses in mouse lung tumorigenesis." <u>Cancer Res</u> 62: 6424-9.
- Herzog, C. R., Lubet, R. A. and You, M. (1997). "Genetic alterations in mouse lung tumors: implications for cancer chemoprevention." <u>J Cell Biochem</u> <u>Suppl</u> 28-29: 49-63.
- Hiruma, T. (1991). "[Rabbit osteosarcoma induced by hydroxypropylcellulose mixed beryllium oxide pellet--comparison between implantations into bone marrow cavity and into fracture callus of the femur]." <u>Nippon</u> <u>Seikeigeka Gakkai Zasshi</u> 65: 775-86.
- Ho, W. L., Chang, J. W., Tseng, R. C., Chen, J. T., Chen, C. Y., Jou, Y. S. and Wang, Y. C. (2002). "Loss of heterozygosity at loci of candidate tumor suppressor genes in microdissected primary non-small cell lung cancer." <u>Cancer Detect Prev</u> 26: 343-9.
- Hodgson, G., Hager, J. H., Volik, S., Hariono, S., Wernick, M., Moore, D., Nowak, N., Albertson, D. G., Pinkel, D., Collins, C., Hanahan, D. and Gray, J. W. (2001). "Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas." <u>Nat Genet</u> 29: 459-64.
- Hofbauer, L. C. and Schoppet, M. (2004). "Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases." Jama 292: 490-5.
- Hu, J. Z., Feng, D. Y. and Cheng, R. X. (2001). "[Expressions of p-MAPK, cyclin D1, p53 protein and their relationship in osteosarcoma]." <u>Hunan Yi Ke</u> <u>Da Xue Xue Bao</u> 26: 325-7.
- Hughes, A. E., Ralston, S. H., Marken, J., Bell, C., MacPherson, H., Wallace, R. G., van Hul, W., Whyte, M. P., Nakatsuka, K., Hovy, L. and Anderson, D. M. (2000). "Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis." <u>Nat Genet</u> 24: 45-8.

- Hughes, S., Peel-White, A. L. and Peterson, C. K. (1992). "Paget's disease of bone--current thinking and management." <u>J Manipulative Physiol Ther</u> 15: 242-9.
- Hursting, S. D., Perkins, S. N., Haines, D. C., Ward, J. M. and Phang, J. M. (1995). "Chemoprevention of spontaneous tumorigenesis in p53-knockout mice." <u>Cancer Res</u> 55: 3949-53.
- Hursting, S. D., Perkins, S. N. and Phang, J. M. (1994). "Calorie restriction delays spontaneous tumorigenesis in p53-knockout transgenic mice." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> 91: 7036-40.
- Huvos, A. G., Woodard, H. Q., Cahan, W. G., Higinbotham, N. L., Stewart, F. W., Butler, A. and Bretsky, S. S. (1985). "Postradiation osteogenic sarcoma of bone and soft tissues. A clinicopathologic study of 66 patients." <u>Cancer</u> 55: 1244-55.
- Ishikawa, Y., Miller, R. W., Machinami, R., Sugano, H. and Goto, M. (2000). "Atypical osteosarcomas in Werner Syndrome (adult progeria)." <u>Jpn J</u> <u>Cancer Res</u> 91: 1345-9.
- Jacks, T. (1996). "Tumor suppressor gene mutations in mice." <u>Annu Rev Genet</u> 30: 603-36.
- Jarmalaite, S., Kannio, A., Anttila, S., Lazutka, J. R. and Husgafvel-Pursiainen, K. (2003). "Aberrant p16 promoter methylation in smokers and former smokers with nonsmall cell lung cancer." <u>Int J Cancer</u> 106: 913-8.
- Jemal, A., Tiwari, R. C., Murray, T., Ghafoor, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, E. J. and Thun, M. J. (2004). "Cancer statistics, 2004." <u>CA Cancer J Clin</u> 54: 8-29.
- Jerry, D. J., Butel, J. S., Donehower, L. A., Paulson, E. J., Cochran, C., Wiseman, R. W. and Medina, D. (1994). "Infrequent p53 mutations in 7,12dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors in BALB/c and p53 hemizygous mice." <u>Mol Carcinog</u> 9: 175-83.
- Johnson-Pais, T. L., Nellissery, M. J., Ammerman, D. G., Pathmanathan, D., Bhatia, P., Buller, C. L., Leach, R. J. and Hansen, M. F. (2003). "Determination of a minimal region of loss of heterozygosity on chromosome 18q21.33 in osteosarcoma." <u>Int J Cancer</u> 105: 285-8.
- Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H., Jr. and Scott, M. P. (1996). "Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome." <u>Science</u> 272: 1668-71.
- Kawaguchi, K., Oda, Y., Sakamoto, A., Saito, T., Tamiya, S., Iwamoto, Y. and Tsuneyoshi, M. (2002). "Molecular analysis of p53, MDM2, and H-ras genes in osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma of bone in patients older than 40 years." <u>Mod Pathol</u> 15: 878-88.
- Kimonis, V. E., Goldstein, A. M., Pastakia, B., Yang, M. L., Kase, R., DiGiovanna, J. J., Bale, A. E. and Bale, S. J. (1997). "Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome." <u>Am J Med Genet</u> 69: 299-308.
- Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997). "Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers." <u>Nature</u> 386: 761, 763.
- Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R. W., Smithson, W. A., Lindor, N. M. and Furuichi, Y. (1999). "Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome." <u>Nat Genet</u> 22: 82-4.

- Knudson, A. G., Jr. (1975). "The genetics of childhood cancer." <u>Cancer</u> 35: 1022-6.
- Koshurnikova, N. A., Gilbert, E. S., Sokolnikov, M., Khokhryakov, V. F., Miller, S., Preston, D. L., Romanov, S. A., Shilnikova, N. S., Suslova, K. G. and Vostrotin, V. V. (2000). "Bone cancers in Mayak workers." <u>Radiat Res</u> 154: 237-45.
- Kraus, F., Haenig, B. and Kispert, A. (2001). "Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18." <u>Mech Dev</u> 100: 83-6.
- Lander, J. K. and Fan, H. (1997). "Low-frequency loss of heterozygosity in Moloney murine leukemia virus-induced tumors in BRAKF1/J mice." J Virol 71: 3940-52.
- Lane, D. (2004). "Curing cancer with p53." <u>N Engl J Med</u> 350: 2711-2.
- Lane, D. P. and Fischer, P. M. (2004). "Turning the key on p53." <u>Nature</u> 427: 789-90.
- Lau, C. C., Harris, C. P., Lu, X. Y., Perlaky, L., Gogineni, S., Chintagumpala, M., Hicks, J., Johnson, M. E., Davino, N. A., Huvos, A. G., Meyers, P. A., Healy, J. H., Gorlick, R. and Rao, P. H. (2004). "Frequent amplification and rearrangement of chromosomal bands 6p12-p21 and 17p11.2 in osteosarcoma." Genes Chromosomes Cancer 39: 11-21.
- Laurin, N., Brown, J. P., Morissette, J. and Raymond, V. (2002). "Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone." <u>Am J Hum Genet</u> 70: 1582-8.
- Leach, S. D. (2004). "Mouse models of pancreatic cancer: the fur is finally flying!" <u>Cancer Cell</u> 5: 7-11.
- Lee, E. Y. (2002). "BRCA1 and Chk1 in G2/M checkpoint: a new order of regulation." <u>Cell Cycle</u> 1: 178-80.
- Levinson, S. and Vincent, K. A. (1997). "Multifocal osteosarcoma in a patient with Fanconi anemia." <u>J Pediatr Hematol Oncol</u> 19: 251-3.
- Li, Y. and Chen, Z. (2004). "Molecular cloning and characterization of LCRG1 a novel gene localized to the tumor suppressor locus D17S800-D17S930." <u>Cancer Lett</u> 209: 75-85.
- Liloglou, T., Ross, H., Prime, W., Donnelly, R. J., Spandidos, D. A., Gosney, J. R. and Field, J. K. (1997). "p53 gene aberrations in non-small-cell lung carcinomas from a smoking population." <u>Br J Cancer</u> 75: 1119-24.
- Lindor, N. M., Devries, E. M., Michels, V. V., Schad, C. R., Jalal, S. M., Donovan, K. M., Smithson, W. A., Kvols, L. K., Thibodeau, S. N. and Dewald, G. W. (1996). "Rothmund-Thomson syndrome in siblings: evidence for acquired in vivo mosaicism." <u>Clin Genet</u> 49: 124-9.
- Lipton, J. M., Federman, N., Khabbaze, Y., Schwartz, C. L., Hilliard, L. M., Clark, J. I. and Vlachos, A. (2001). "Osteogenic sarcoma associated with Diamond-Blackfan anemia: a report from the Diamond-Blackfan Anemia Registry." J Pediatr Hematol Oncol 23: 39-44.
- Luz, A., Muller, W. A., Linzner, U., Strauss, P. G., Schmidt, J., Muller, K., Atkinson, M. J., Murray, A. B., Gossner, W., Erfle, V. and et al. (1991).
 "Bone tumor induction after incorporation of short-lived radionuclides." <u>Radiat Environ Biophys</u> 30: 225-7.
- Lynch, H. T., Shaw, T. G. and Lynch, J. F. (2004). "Inherited predisposition to cancer: A historical overview." <u>Am J Med Genet</u> 129C: 5-22.

- Maitra, A., Roberts, H., Weinberg, A. G. and Geradts, J. (2001). "Loss of p16(INK4a) expression correlates with decreased survival in pediatric osteosarcomas." <u>Int J Cancer</u> 95: 34-8.
- Makis, A., Polychronopoulou, S. and Haidas, S. (2004). "Osteosarcoma as a second tumor after treatment for primary non-Hodgkin's lymphoma in a child with ataxia-telangiectasia: presentation of a case and review of possible pathogenetic mechanisms." J Pediatr Hematol Oncol 26: 444-6.
- Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Jr., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Tainsky, M. A. and et al. (1990).
 "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." <u>Science</u> 250: 1233-8.
- Mancuso, M., Pazzaglia, S., Tanori, M., Hahn, H., Merola, P., Rebessi, S., Atkinson, M. J., Di Majo, V., Covelli, V. and Saran, A. (2004). "Basal cell carcinoma and its development: insights from radiation-induced tumors in Ptch1-deficient mice." <u>Cancer Res</u> 64: 934-41.
- Matsunaga, E. (1980). "Hereditary retinoblastoma: host resistance and second primary tumors." <u>J Natl Cancer Inst</u> 65: 47-51.
- Matzinger, S. A., Crist, K. A., Stoner, G. D., Anderson, M. W., Pereira, M. A., Steele, V. E., Kelloff, G. J., Lubet, R. A. and You, M. (1995). "K-ras mutations in lung tumors from A/J and A/J x TSG-p53 F1 mice treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and phenethyl isothiocyanate." <u>Carcinogenesis</u> 16: 2487-92.
- Mazabraud, A. (1975). "[Experimental production of bone sarcomas in the rabbit by a single local injection of beryllium]." <u>Bull Cancer</u> 62: 49-58.
- McDoniels-Silvers, A. L., Herzog, C. R., Tyson, F. L., Malkinson, A. M. and You, M. (2001). "Inactivation of both Rb and p53 pathways in mouse lung epithelial cell lines." <u>Exp Lung Res</u> 27: 297-318.
- McIntyre, J. F., Smith-Sorensen, B., Friend, S. H., Kassell, J., Borresen, A. L., Yan, Y. X., Russo, C., Sato, J., Barbier, N., Miser, J. and et al. (1994). "Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma." <u>J Clin Oncol</u> 12: 925-30.
- McNairn, J. D., Damron, T. A., Landas, S. K., Ambrose, J. L. and Shrimpton, A. E. (2001). "Inheritance of osteosarcoma and Paget's disease of bone: a familial loss of heterozygosity study." <u>J Mol Diagn</u> 3: 171-7.
- Meltzer, P. S., Jankowski, S. A., Dal Cin, P., Sandberg, A. A., Paz, I. B. and Coccia, M. A. (1991). "Identification and cloning of a novel amplified DNA sequence in human malignant fibrous histiocytoma derived from a region of chromosome 12 frequently rearranged in soft tissue tumors." <u>Cell Growth Differ</u> 2: 495-501.
- Michaud, D. S. (2004). "Epidemiology of pancreatic cancer." <u>Minerva Chir</u> 59: 99-111.
- Miller, C. W., Aslo, A., Campbell, M. J., Kawamata, N., Lampkin, B. C. and Koeffler, H. P. (1996). "Alterations of the p15, p16,and p18 genes in osteosarcoma." <u>Cancer Genet Cytogenet</u> 86: 136-42.
- Miller, C. W., Aslo, A., Won, A., Tan, M., Lampkin, B. and Koeffler, H. P. (1996). "Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma." <u>J Cancer</u> <u>Res Clin Oncol</u> 122: 559-65.
- Miller, C. W., Simon, K., Aslo, A., Kok, K., Yokota, J., Buys, C. H., Terada, M. and Koeffler, H. P. (1992). "p53 mutations in human lung tumors." <u>Cancer Res</u> 52: 1695-8.

- Miller, S. C., Lloyd, R. D., Bruenger, F. W., Krahenbuhl, M. P., Polig, E. and Romanov, S. A. (2003). "Comparisons of the skeletal locations of putative plutonium-induced osteosarcomas in humans with those in beagle dogs and with naturally occurring tumors in both species." <u>Radiat Res</u> 160: 517-23.
- Mills, B. G. and Singer, F. R. (1976). "Nuclear inclusions in Paget's disease of bone." <u>Science</u> 194: 201-2.
- Minna, J. D., Kurie, J. M. and Jacks, T. (2003). "A big step in the study of small cell lung cancer." <u>Cancer Cell</u> 4: 163-6.
- Mohaghegh, P. and Hickson, I. D. (2002). "Premature aging in RecQ helicasedeficient human syndromes." <u>Int J Biochem Cell Biol</u> 34: 1496-501.
- Molendini, L., Benassi, M. S., Magagnoli, G., Merli, M., Sollazzo, M. R., Ragazzini, P., Gamberi, G., Ferrari, C., Balladelli, A., Bacchini, P. and Picci, P. (1998). "Prognostic significance of cyclin expression in human osteosarcoma." <u>Int J Oncol</u> 12: 1007-11.
- Monkman, G. R., Orwoll, G. and Ivins, J. C. (1974). "Trauma and oncogenesis." <u>Mayo Clin Proc</u> 49: 157-63.
- Moynahan, M. E. (2002). "The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans." <u>Oncogene</u> 21: 8994-9007.
- Mullis, K., Falloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Ehrlich, H. (1992). "Specific enzymatic aplification in vitro: the polymerase chain reaction. 1986." <u>Biotechnology</u> 24: 17-27.
- Murata, K., Hatamochi, A., Shinkai, H., Ishikawa, Y., Kawaguchi, N. and Goto, M. (1999). "A case of Werner's syndrome associated with osteosarcoma." J Dermatol 26: 682-6.
- Nakashima, H., Nishida, Y., Sugiura, H., Katagiri, H., Yonekawa, M., Yamada, Y., Iwata, H., Nagasaka, T. and Ishiguro, N. (2003). "Telomerase, p53 and PCNA activity in osteosarcoma." <u>Eur J Surg Oncol</u> 29: 564-7.
- Nathrath, M. H., Kuosaite, V., Rosemann, M., Kremer, M., Poremba, C., Wakana, S., Yanagi, M., Nathrath, W. B., Hofler, H., Imai, K. and Atkinson, M. J. (2002). "Two novel tumor suppressor gene loci on chromosome 6q and 15q in human osteosarcoma identified through comparative study of allelic imbalances in mouse and man." <u>Oncogene</u> 21: 5975-80.
- Nellissery, M. J., Padalecki, S. S., Brkanac, Z., Singer, F. R., Roodman, G. D., Unni, K. K., Leach, R. J. and Hansen, M. F. (1998). "Evidence for a novel osteosarcoma tumor-suppressor gene in the chromosome 18 region genetically linked with Paget disease of bone." <u>Am J Hum Genet</u> 63: 817-24.
- Nielsen, G. P., Burns, K. L., Rosenberg, A. E. and Louis, D. N. (1998). "CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcomas that lack RB alterations." <u>Am J Pathol</u> 153: 159-63.
- Nishijo, K., Nakayama, T., Aoyama, T., Okamoto, T., Ishibe, T., Yasura, K., Shima, Y., Shibata, K. R., Tsuboyama, T., Nakamura, T. and Toguchida, J. (2004). "Mutation analysis of the RECQL4 gene in sporadic osteosarcomas." <u>Int J Cancer</u> 111: 367-72.
- Noble-Topham, S. E., Burrow, S. R., Eppert, K., Kandel, R. A., Meltzer, P. S., Bell, R. S. and Andrulis, I. L. (1996). "SAS is amplified predominantly in surface osteosarcoma." <u>J Orthop Res</u> 14: 700-5.

- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila." <u>Nature</u> 287: 795-801.
- Overholtzer, M., Rao, P. H., Favis, R., Lu, X. Y., Elowitz, M. B., Barany, F., Ladanyi, M., Gorlick, R. and Levine, A. J. (2003). "The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 100: 11547-52.
- Ozaki, T., Schaefer, K. L., Wai, D., Buerger, H., Flege, S., Lindner, N., Kevric, M., Diallo, R., Bankfalvi, A., Brinkschmidt, C., Juergens, H., Winkelmann, W., Dockhorn-Dworniczak, B., Bielack, S. S. and Poremba, C. (2002). "Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in osteosarcomas." <u>Int J Cancer</u> 102: 355-65.
- Paget, J. (1877). "On a form of chronic inflammation of bones (osteitis deformans)." <u>Med. Chir. Trans.</u> 60: 37-63.
- Pardo, A. D., Adams, W. H., McCracken, M. D. and Legendre, A. M. (1990). "Primary jejunal osteosarcoma associated with a surgical sponge in a dog." J Am Vet Med Assoc 196: 935-8.
- Park, H. R. and Park, Y. K. (1995). "Expression of p53 protein, PCNA, and Ki-67 in osteosarcomas of bone." <u>J Korean Med Sci</u> 10: 360-7.
- Park, M. (1998). The Genetic Basis of Human Cancer. New York, McGraw Hill.
- Patino-Garcia, A., Pineiro, E. S., Diez, M. Z., Iturriagagoitia, L. G., Klussmann, F. A. and Ariznabarreta, L. S. (2003). "Genetic and epigenetic alterations of the cell cycle regulators and tumor suppressor genes in pediatric osteosarcomas." J Pediatr Hematol Oncol 25: 362-7.
- Pazzaglia, S., Mancuso, M., Tanori, M., Atkinson, M. J., Merola, P., Rebessi, S., Di Majo, V., Covelli, V., Hahn, H. and Saran, A. (2004). "Modulation of patched-associated susceptibility to radiation induced tumorigenesis by genetic background." <u>Cancer Res</u> 64: 3798-806.
- Pazzaglia, S., Tanori, M., Mancuso, M., Rebessi, S., Leonardi, S., Di Majo, V., Covelli, V., Atkinson, M. J., Hahn, H. and Saran, A. (2006). "Linking DNA damage to medulloblastoma tumorigenesis in patched heterozygous knockout mice." <u>Oncogene</u> 25: 1165-73.
- Pellin, A., Boix-Ferrero, J., Carpio, D., Lopez-Terrada, D., Carda, C., Navarro, S., Peydro-Olaya, A., Triche, T. J. and Llombart-Bosch, A. (1997).
 ''Molecular alterations of the RB1, TP53, and MDM2 genes in primary and xenografted human osteosarcomas.'' <u>Diagn Mol Pathol</u> 6: 333-41.
- Petmitr, S., Wongsommart, D., Chaksangchaichot, P., Pakeetoot, T., Sutinont, P., Sirivaidyapong, P. and Karalak, A. (2003). "Mutational analysis of ras gene family in lung cancer in Thai." <u>Oncol Rep</u> 10: 1497-501.
- Ponder, B. A. (2001). "Cancer genetics." <u>Nature</u> 411: 336-41.
- Porter, D. E., Holden, S. T., Steel, C. M., Cohen, B. B., Wallace, M. R. and Reid, R. (1992). "A significant proportion of patients with osteosarcoma may belong to Li-Fraumeni cancer families." <u>J Bone Joint Surg Br</u> 74: 883-6.
- Potten, C. S., Al-Barwari, S. E. and Searle, J. (1978). "Differential radiation response amongst proliferating epithelial cells." <u>Cell Tissue Kinet</u> 11: 149-60.
- Preston, D. L., Pierce, D. A., Shimizu, Y., Ron, E. and Mabuchi, K. (2003). "Dose response and temporal patterns of radiation-associated solid cancer risks." <u>Health Phys</u> 85: 43-6.
- Pritchard DJ, F. M., Reilly CA (1975). "The etiology of osteosarcoma: A review of current considerations." <u>Clin Orthop</u>: 14–22.

- Pujol, L. A., Erickson, R. P., Heidenreich, R. A. and Cunniff, C. (2000). "Variable presentation of Rothmund-Thomson syndrome." <u>Am J Med</u> <u>Genet</u> 95: 204-7.
- Radany, E. H., Hong, K., Kesharvarzi, S., Lander, E. S. and Bishop, J. M. (1997). "Mouse mammary tumor virus/v-Ha-ras transgene-induced mammary tumors exhibit strain-specific allelic loss on mouse chromosome 4." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> 94: 8664-9.
- Radig, K., Schneider-Stock, R., Haeckel, C., Neumann, W. and Roessner, A. (1998). "p53 gene mutations in osteosarcomas of low-grade malignancy." <u>Hum Pathol</u> 29: 1310-6.
- Radig, K., Schneider-Stock, R., Mittler, U., Neumann, H. W. and Roessner, A. (1998). "Genetic instability in osteoblastic tumors of the skeletal system." <u>Pathol Res Pract</u> 194: 669-77.
- Ragazzini, P., Gamberi, G., Benassi, M. S., Orlando, C., Sestini, R., Ferrari, C., Molendini, L., Sollazzo, M. R., Merli, M., Magagnoli, G., Bertoni, F., Bohling, T., Pazzagli, M. and Picci, P. (1999). "Analysis of SAS gene and CDK4 and MDM2 proteins in low-grade osteosarcoma." <u>Cancer Detect</u> <u>Prev</u> 23: 129-36.
- Re, F. C., Manenti, G., Borrello, M. G., Colombo, M. P., Fisher, J. H., Pierotti, M. A., Della Porta, G. and Dragani, T. A. (1992). "Multiple molecular alterations in mouse lung tumors." <u>Mol Carcinog</u> 5: 155-60.
- Renan, M. J. (1993). "How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data." <u>Mol Carcinog</u> 7: 139-46.
- Rosemann, M., Kuosaite, V., Nathrath, M. and Atkinson, M. J. (2002). "The genetics of radiation-induced and sporadic osteosarcoma: a unifying theory?" J Radiol Prot 22: A113-6.
- Rosemann, M., Kuosaite, V., Nathrath, M. and Atkinson, M. J. (2002). "The genetics of radiation-induced osteosarcoma." <u>Radiat Prot Dosimetry</u> 99: 257-9.
- Rosemann, M., Kuosaite, V., Nathrath, M., Strom, T. M., Quintanilla-Martinez, L., Richter, T., Imai, K. and Atkinson, M. J. (2003). "Allelic imbalance at intragenic markers of Tbx18 is a hallmark of murine osteosarcoma." Carcinogenesis 24: 371-6.
- Rosenberg, A. (1999). Paget's disease (Osteitis deformans). <u>Robbins pathologic</u> <u>basis of disease</u>. Cotran, R.S., Kumar, V. and Collins, T., Saunders: 1225-1227.
- Rous P, M. J., Tytler WH (1912). "A filterable agent
- the cause of a second chicken-tumor, an osteochondrosarcoma." <u>JAMA</u> 59: 1973-1794.
- Santarosa, M. and Ashworth, A. (2004). "Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way." <u>Biochim</u> <u>Biophys Acta</u> 1654: 105-22.
- Sarkar, F. H., Li, Y. and Vallyathan, V. (2001). "Molecular analysis of p53 and K-ras in lung carcinomas of coal miners." <u>Int J Mol Med</u> 8: 453-9.
- Sato, K., Nukaga, H., Horikoshi, T. and Iwasaki, I. (1978). "Difference in the induction of osteosarcoma in rabbit bone with single administration of three kinds of chemical carcinogens." <u>Gann</u> 69: 579-83.
- Scholz, R. B., Kabisch, H., Weber, B., Roser, K., Delling, G. and Winkler, K. (1992). "Studies of the RB1 gene and the p53 gene in human osteosarcomas." <u>Pediatr Hematol Oncol</u> 9: 125-37.

- Shi, Y. P., Naik, P., Dietrich, W. F., Gray, J. W., Hanahan, D. and Pinkel, D. (1997). "DNA copy number changes associated with characteristic LOH in islet cell carcinomas of transgenic mice." <u>Genes Chromosomes Cancer</u> 19: 104-11.
- Shigematsu, I. (1994). "[Health effects of atomic bomb radiation]." <u>Rinsho Byori</u> 42: 313-9.
- Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Terry, M. J., Oates, A. J., Miyamoto, Y., Chuu, Y. H., Munakata, M. and Sekiya, T. (2002). "A comprehensive catalog of CpG islands methylated in human lung adenocarcinomas for the identification of tumor suppressor genes." <u>Oncogene</u> 21: 3804-13.
- Sindelar, W. F., Costa, J. and Ketcham, A. S. (1978). "Osteosarcoma associated with Thorotrast administration: report of two cases and literature review." <u>Cancer</u> 42: 2604-9.
- Smith, M. B., Xue, H., Strong, L., Takahashi, H., Jaffe, N., Ried, H., Zietz, H. and Andrassy, R. J. (1993). "Forty-year experience with second malignancies after treatment of childhood cancer: analysis of outcome following the development of the second malignancy." <u>J Pediatr Surg</u> 28: 1342-8; discussion 1348-9.
- Smith, S. H., Weiss, S. W., Jankowski, S. A., Coccia, M. A. and Meltzer, P. S. (1992). "SAS amplification in soft tissue sarcomas." <u>Cancer Res</u> 52: 3746-9.
- Snyder, E. L., Meade, B. R., Saenz, C. C. and Dowdy, S. F. (2004). "Treatment of Terminal Peritoneal Carcinomatosis by a Transducible p53-Activating Peptide." <u>PLoS Biol</u> 2: E36.
- Stock, C., Kager, L., Fink, F. M., Gadner, H. and Ambros, P. F. (2000). "Chromosomal regions involved in the pathogenesis of osteosarcomas." <u>Genes Chromosomes Cancer</u> 28: 329-36.
- Sugio, K., Tsukamoto, S., Ushijima, C., Yamazaki, K., Kase, S., Yamaguchi, M., Ondo, K., Yano, T. and Sugimachi, K. (2001). "Clinical significance of the Rb expression in adenocarcinoma of the lung." <u>Anticancer Res</u> 21: 1931-5.
- Tarkkanen, M., Bohling, T., Gamberi, G., Ragazzini, P., Benassi, M. S., Kivioja, A., Kallio, P., Elomaa, I., Picci, P. and Knuutila, S. (1998). "Comparative genomic hybridization of low-grade central osteosarcoma." <u>Mod Pathol</u> 11: 421-6.
- Tennant, R. W., French, J. E. and Spalding, J. W. (1995). "Identifying chemical carcinogens and assessing potential risk in short-term bioassays using transgenic mouse models." <u>Environ Health Perspect</u> 103: 942-50.
- Toguchida, J., Yamaguchi, T., Ritchie, B., Beauchamp, R. L., Dayton, S. H., Herrera, G. E., Yamamuro, T., Kotoura, Y., Sasaki, M. S., Little, J. B. and et al. (1992). "Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas." <u>Cancer Res</u> 52: 6194-9.
- Tsai, J. Y., Aviv, H., Benevenia, J., Chang, V. T., Patterson, F., Aisner, S. and Hameed, M. (2004). "HER-2/neu and p53 in osteosarcoma: an immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis." <u>Cancer Invest</u> 22: 16-24.
- Tsuchiya, T., Sekine, K., Hinohara, S., Namiki, T., Nobori, T. and Kaneko, Y. (2000). "Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing sarcoma." <u>Cancer Genet Cytogenet</u> 120: 91-8.

- Tsuji, Y., Kusuzaki, K., Kanemitsu, K., Matsumoto, T., Ishikawa, Y. and Hirasawa, Y. (2000). "Calcaneal osteosarcoma associated with Werner syndrome. A case report with mutation analysis." <u>J Bone Joint Surg Am</u> 82: 1308-13.
- Tullis, J. L. (1961). "Radiations and carcinogenesis." J Med Soc N J 58: 590-3.
- Turner, J. E. (2004). "Interaction of ionizing radiation with matter." <u>Health</u> <u>Phys</u> 86: 228-52.
- Unni, K. K. (1998). "Osteosarcoma of bone." J Orthop Sci 3: 287-94.
- Unni, K. K. and Dahlin, D. C. (1984). "Grading of bone tumors." <u>Semin Diagn</u> <u>Pathol</u> 1: 165-72.
- Vahakangas, K. H., Bennett, W. P., Castren, K., Welsh, J. A., Khan, M. A., Blomeke, B., Alavanja, M. C. and Harris, C. C. (2001). "p53 and K-ras mutations in lung cancers from former and never-smoking women." <u>Cancer Res</u> 61: 4350-6.
- van Staa, T. P., Selby, P., Leufkens, H. G., Lyles, K., Sprafka, J. M. and Cooper, C. (2002). "Incidence and natural history of Paget's disease of bone in England and Wales." <u>J Bone Miner Res</u> 17: 465-71.
- Venkatachalam, S., Shi, Y. P., Jones, S. N., Vogel, H., Bradley, A., Pinkel, D. and Donehower, L. A. (1998). "Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation." <u>Embo J</u> 17: 4657-67.
- Wadayama, B., Toguchida, J., Shimizu, T., Ishizaki, K., Sasaki, M. S., Kotoura, Y. and Yamamuro, T. (1994). "Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas." <u>Cancer Res</u> 54: 3042-8.
- Wadayama, B., Toguchida, J., Yamaguchi, T., Sasaki, M. S. and Yamamuro, T. (1993). "p53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas." <u>Br J Cancer</u> 68: 1134-9.
- Wagner, M., Greten, F. R., Weber, C. K., Koschnick, S., Mattfeldt, T., Deppert, W., Kern, H., Adler, G. and Schmid, R. M. (2001). "A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease." <u>Genes Dev</u> 15: 286-93.
- Wallis, D. E. and Muenke, M. (1999). "Molecular mechanisms of holoprosencephaly." <u>Mol Genet Metab</u> 68: 126-38.
- Wang, L. L., Levy, M. L., Lewis, R. A., Chintagumpala, M. M., Lev, D., Rogers, M. and Plon, S. E. (2001). "Clinical manifestations in a cohort of 41 Rothmund-Thomson syndrome patients." <u>Am J Med Genet</u> 102: 11-7.
- Ward, J. M. and Devor-Henneman, D. E. (2004). "Mouse Models of Human Familial Cancer Syndromes." <u>Toxicol Pathol</u> 32: 90-98.
- Watanabe, T. K., Suzuki, M., Omori, Y., Hishigaki, H., Horie, M., Kanemoto, N., Fujiwara, T., Nakamura, Y. and Takahashi, E. (1997). "Cloning and characterization of a novel member of the human Mad gene family (MADH6)." <u>Genomics</u> 42: 446-51.
- Weisstein, J. S., Majeska, R. J., Klein, M. J. and Einhorn, T. A. (2001).
 "Detection of c-fos expression in benign and malignant musculoskeletal lesions." <u>J Orthop Res</u> 19: 339-45.
- Wicking, C., Smyth, I. and Bale, A. (1999). "The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development." <u>Oncogene</u> 18: 7844-51.
- Wiseman, R. W., Cochran, C., Dietrich, W., Lander, E. S. and Soderkvist, P. (1994). "Allelotyping of butadiene-induced lung and mammary adenocarcinomas of B6C3F1 mice: frequent losses of heterozygosity in

regions homologous to human tumor-suppressor genes.'' <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> 91: 3759-63.

- Wu, J. X., Carpenter, P. M., Gresens, C., Keh, R., Niman, H., Morris, J. W. and Mercola, D. (1990). "The proto-oncogene c-fos is over-expressed in the majority of human osteosarcomas." <u>Oncogene</u> 5: 989-1000.
- Wu, Y., Renard, C. A., Apiou, F., Huerre, M., Tiollais, P., Dutrillaux, B. and Buendia, M. A. (2002). "Recurrent allelic deletions at mouse chromosomes 4 and 14 in Myc-induced liver tumors." <u>Oncogene</u> 21: 1518-26.
- Wunder, J. S., Czitrom, A. A., Kandel, R. and Andrulis, I. L. (1991). "Analysis of alterations in the retinoblastoma gene and tumor grade in bone and softtissue sarcomas." <u>J Natl Cancer Inst</u> 83: 194-200.
- Wunder, J. S., Eppert, K., Burrow, S. R., Gokgoz, N., Bell, R. S., Andrulis, I. L. and Gogkoz, N. (1999). "Co-amplification and overexpression of CDK4, SAS and MDM2 occurs frequently in human parosteal osteosarcomas." <u>Oncogene</u> 18: 783-8.
- Yamaguchi, T., Toguchida, J., Yamamuro, T., Kotoura, Y., Takada, N., Kawaguchi, N., Kaneko, Y., Nakamura, Y., Sasaki, M. S. and Ishizaki, K. (1992). "Allelotype analysis in osteosarcomas: frequent allele loss on 3q, 13q, 17p, and 18q." <u>Cancer Res</u> 52: 2419-23.
- Yamamoto, H., Nakayama, T., Murakami, H., Hosaka, T., Nakamata, T., Tsuboyama, T., Oka, M., Nakamura, T. and Toguchida, J. (2000). "High incidence of SV40-like sequences detection in tumour and peripheral blood cells of Japanese osteosarcoma patients." <u>Br J Cancer</u> 82: 1677-81.
- Yi, C. H., Terrett, J. A., Li, Q. Y., Ellington, K., Packham, E. A., Armstrong-Buisseret, L., McClure, P., Slingsby, T. and Brook, J. D. (1999).
 ''Identification, mapping, and phylogenomic analysis of four new human members of the T-box gene family: EOMES, TBX6, TBX18, and TBX19.'' Genomics 55: 10-20.
- Ying, K. L., Oizumi, J. and Curry, C. J. (1990). "Rothmund-Thomson syndrome associated with trisomy 8 mosaicism." J Med Genet 27: 258-60.
- Yokota, J. and Kohno, T. (2004). "Molecular footprints of human lung cancer progression." <u>Cancer Sci</u> 95: 197-204.
- Young, A. P. and Longmore, G. D. (2004). "Differential regulation of apoptotic genes by Rb in human versus mouse cells." <u>Oncogene</u> 23: 2587-99.
- Yu, C. E., Oshima, J., Goddard, K. A., Miki, T., Nakura, J., Ogihara, T., Poot, M., Hoehn, H., Fraccaro, M., Piussan, C. and et al. (1994). "Linkage disequilibrium and haplotype studies of chromosome 8p 11.1-21.1 markers and Werner syndrome." <u>Am J Hum Genet</u> 55: 356-64.
- Zalla, J. A. (1980). "Werner's syndrome." Cutis 25: 275-8.
- Zenklusen, J. C., Oshimura, M., Barrett, J. C. and Conti, C. J. (1995). "Human chromosome 11 inhibits tumorigenicity of a murine squamous cell carcinoma cell line." <u>Genes Chromosomes Cancer</u> 13: 47-53.
- Zhang, L. F., Gao, W. M., Gealy, R., Weissfeld, J., Elder, E., Whiteside, T. L. and Keohavong, P. (2003). "Comparison of K-ras gene mutations in tumour and sputum DNA of patients with lung cancer." <u>Biomarkers</u> 8: 156-61.
- Zhang, Y. and Woloschak, G. E. (1997). "Rb and p53 gene deletions in lung adenocarcinomas from irradiated and control mice." <u>Radiat Res</u> 148: 81-9.

- Zhao, B., Magdaleno, S., Chua, S., Wang, Y. L., Burcin, M., Elberg, D., Finegold, M., Tsai, S. and DeMayo, F. J. (2000). "Transgenic mouse models for lung cancer." <u>Exp Lung Res</u> 26: 567-79.
- Zienolddiny, S., Ryberg, D., Arab, M. O., Skaug, V. and Haugen, A. (2001). "Loss of heterozygosity is related to p53 mutations and smoking in lung cancer." <u>Br J Cancer</u> 84: 226-31.
- Zurawel, R. H., Allen, C., Chiappa, S., Cato, W., Biegel, J., Cogen, P., de Sauvage, F. and Raffel, C. (2000). "Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma." <u>Genes Chromosomes Cancer</u> 27: 44-51.