

**Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

Expression und Funktion des Transkriptionsfaktors KLF-8 in Gliomen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Alexander Romagna

aus Meran

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Ulrich Schüller
Priv. Doz. Dr. med. Stefan Böck
Prof. Dr. med. Claus Belka

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2012

Meinen Eltern und Verwandten

Those who have not been trained in chemistry or medicine, which after all is only applied chemistry, may not realize how difficult the problem of cancer treatment really is. It is almost, not quite, but almost as hard as finding some agent that will dissolve the left ear, yet leave the right ear unharmed.

William H. Woglom (1879-1953)

Ehem. Vorsitzender der *American Association for Cancer Research*
und Mitbegründer der modernen Tumorforschung

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	1
1. Einleitung und Stand der Forschung	3
1.1. Integrine	3
1.2. Das Integrin alpha v beta 3	4
1.3. Signal-Transduktion durch die Tyrosinkinase FAK	5
1.4. Die KLF-8-Proliferations-Kaskade	7
1.5. Aufgabenstellung	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Gewebeproben und Zellkultur	11
2.1.1. Aufbereitung von Gliom-Gewebe	11
2.1.2. Isolation für Primärkultur	11
2.1.3. Zelllinien	12
2.2. Proteinbiochemische und molekularbiologische Methoden	13
2.2.1. Immunhistochemie	13
2.2.2. Immunzytochemie	15
2.2.3. Western Blot	17
2.2.4. PCR	18
2.3. Funktionelle Hemmversuche	18
2.3.1. Knockdown von KLF-8 mit shRNA in U87 MG Zellen	18
2.4. Statistik	19
3. Ergebnisse	20
3.1. Charakterisierung der KLF-8 Proliferations-Kaskade	20

3.1.1. Immunhistochemie der Tumorgewebsproben	20
3.1.2. Immunzytochemie von Zellkulturen aus Zelllinien und primärem Tumorgewebe	30
3.1.3. Western Blot der Tumorgewebsproben	31
3.1.4. PCR der Tumorgewebsproben	33
3.2. Funktionelle Untersuchungen	34
3.2.1. mRNA-Gehalt von KLF-8 nach shRNA Knockdown in U87-MG Zellen	34
3.2.2. Zellzahl von U87 MG nach KLF-8 Knockdown	35
4. Diskussion	36
4.1. Charakterisierung der KLF-8-Signalkaskade	36
4.1.1. Expression von $\alpha_v\beta_3$, pFAK, KLF-8 und Cyclin D1 in Gliomen	36
4.1.2. Unabhängigkeit zwischen der Expression von KLF-8 und der Gliom-Dignität	38
4.1.3. KLF-8 und der Proliferationsmarker Ki67 in Gliomen	39
4.2. Funktionelle Untersuchungen zur KLF-8-Signalkaskade	40
4.2.1. Tumor-Proliferation nach KLF-8 Knockdown	40
4.3. Überlegungen zur Inhibition von KLF-8 und $\alpha_v\beta_3$ und Ausblick	41
5. Zusammenfassung	43
6. Literaturverzeichnis	44

7. Danksagung	57
8. Lebenslauf	58

Vorwort

Gliome sind die häufigsten primären Hirntumore. Sie leiten sich von den Gliazellen ab und werden von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation; WHO) nach histopathologischen Kriterien in die Grade I bis IV eingeteilt (Louis DN et al., 2007; Kleihues P und Ohgaki H, 1999). Gliome der WHO-Grade III und IV sind durch eine hohe Proliferationsrate und eine schlechte Prognose gekennzeichnet. So ist die mediane Lebenserwartung bei Patienten mit Glioblastoma multiforme (WHO°IV) trotz moderner multimodaler Therapie-Konzepte weiterhin auf etwa 15 Monate beschränkt (Hegi ME et al., 2005; Stupp R et al., 2005; Stupp R et al., 2009). Der therapeutische Goldstandard in der Behandlung maligner Gliome ist aktuell die histopathologische Diagnose-Sicherung mittels stereotaktischer Probeentnahme oder, sofern mit einem niedrigen Risiko für ein postoperatives neurologisches Defizit vertretbar, eine möglichst komplette Tumor-Resektion. Darauf folgt die Radiochemotherapie und 6 adjuvante Zyklen Temozolomid. Bei fehlendem Ansprechen auf die Behandlung („Therapierefraktärität“) oder bei sekundärem Progress nach initialem Ansprechen („Tumorrezidiv“) kommen weitere patientenspezifische Verfahren zum Einsatz (Wick A et al., 2009; Jakobsen JN et al., 2011; Schmidt F et al., 2006). Ein Therapieansatz, der bereits bei Tumoren außerhalb des zentralen Nervensystems erfolgreich eingesetzt wird, ist die gezielte Tumorthherapie, die sog. „Targeted Therapy“ (Huang TT et al., 2009; Mischel PS et al., 2003; Lesniak MS und Brem H, 2004). Die spezifische Wirkung eines Medikaments an seinem Wirkort („Target“) soll nicht nur mögliche Nebenwirkungen begrenzen, sondern auch das Tumorwachstum an unterschiedlichen Schlüsselstellen nachhaltig unterbinden. Zurzeit befinden sich in der Gliomtherapie eine Vielzahl tumorspezifischer Moleküle in der klinischen Testung, so auch das „Targeting“ von Rezeptoren aus der Familie der Zelladhäsionsmoleküle, den Integrinen (Reardon DA et al., 2008; Reardon DA et al., 2011). Integrine verstärken den Informationsaustausch benachbarter Tumorzellen und steigern die Zellproliferation und die Zellmigration. Obwohl für maligne Gliome bereits eine wichtige Rolle des Integrins alpha v beta 3 ($\alpha_v\beta_3$) bei der Entstehung neuer Tumorgefäße („Tumor-Neoangiogenese“) sowie der Tumor-Invasivität nachgewiesen werden konnte (Bello

L et al., 2001; Schnell O et al., 2008), sind die hieran beteiligten Signaltransduktionskaskaden weitgehend unbekannt. Die Kenntnis möglicher Signaltransduktionsmoleküle und deren Wirkmechanismen als potentielle Zielstrukturen einer Targeted Therapy ist allerdings von großer Bedeutung: So könnte durch eine Blockierung proliferativ wirksamer Signaltransduktionsmoleküle, die nicht nur dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ sondern auch anderen Integrinen und beispielsweise Wachstumsfaktoren gemeinsam sind, eine effektivere Hemmung des Tumorstwachstums erzielt werden. Ein solcher proliferativ wirksamer Botenstoff ist der „Krüppel-like-Factor-8“ (KLF-8). Obwohl die onkogene Funktion von KLF-8 in Tumoren außerhalb des ZNS belegt ist (Li JC et al., 2010; Wang X und Zhao J, 2007), sind sowohl die Expression als auch die Funktion dieses Transkriptionsfaktors im Gliom bislang kaum untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst die Expression möglicher Integrin-getriggelter Signaltransduktionsmoleküle ($\alpha_v\beta_3$, pFAK, Cyclin D1 und v.a. KLF-8) in Gliomen unterschiedlicher WHO-Grade zu untersuchen. Mit Hilfe von RNA-Interferenz und konsekutiver Reduktion der Genexpression soll durch die gezielte Ausschaltung eines möglicherweise essentiellen Signaltransduktionsmoleküls, des Transkriptionsfaktors KLF-8, die funktionelle Auswirkung auf das Tumorstwachstum untersucht werden.

1. Einleitung und Stand der Forschung

1.1. Integrine

Integrine sind Rezeptormoleküle, die aus zwei unterschiedlichen transmembranären Glykoprotein-Untereinheiten (sog. Heterodimere) alpha und beta bestehen (Xiong JP et al., 2002). Zurzeit sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten und 24 unterschiedliche Rezeptor-Kombinationen bekannt. Sie sind Teil einer großen Familie von Rezeptormolekülen mit breitem Funktionsspektrum. Durch ein sog. „Inside-Out-Signalling“ vermitteln sie adhäsive Interaktionen zwischen dem Zelleninneren und der Extrazellulärmatrix („Extracellular Matrix“, ECM) und werden daher zu den Zelladhäsionsmolekülen („Cell Adhesion Molecules“, CAM) gezählt. Integrine übersetzen allerdings auch das extrazelluläre Signal ins Zytoplasma („Outside-In-Signalling“) und können somit Genexpression, Proliferation/Apoptose und Zelldifferenzierung situationsabhängig steuern (Arnaout MA et al., 2005; Hood JD und Cheresch DA, 2002).

In verschiedenem Ausmaß exprimieren alle eukaryoten Zellen Integrine und sind ontogenetisch an verschiedensten Prozessen der Embryogenese, des Immunsystems, der Hämostase, der Entzündung und insbesondere der Tumorgenese beteiligt (Hynes RO, 1992; Hynes RO, 2002; Brooks PC et al., 1996). So ist die unkontrollierte Proliferation entscheidend von der „Verankerung“ der Tumorzellen mit den Integrinen abhängig („Anchorage Dependence“), da diese die Voraussetzung für die Aktivierung vieler Tumor-Signalkaskaden ist (Ruoslahti E, 1991; Paulus W und Tonn JC, 1994; Brakebush C et al., 1999). Ihren proliferationsfördernden Eigenschaften kommen Integrine auch durch Aktivierung anderer Rezeptoren wie z.B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren („Growth Factor Receptor“, GFR) nach („Integrin-Crosstalk“) und erfahren oft ihrerseits durch GFR eine Wirkungsverstärkung („Rezeptor-Transaktivierung“; Miranti CK und Brugge JS, 2002). Folglich sind Proliferationskaskaden auch in Gliomen als ein komplexes Zusammenspiel vieler aktivierender und hemmender Regulationsmechanismen zu verstehen (Schwartz MA und Assoian RK, 2001; Comoglio PM et al., 2003; Riemenschneider MJ et al., 2005).

1.2. Das Integrin alpha v beta 3

Bei malignen Gliomen wird insbesondere dem Integrin alpha v beta 3 ($\alpha_v\beta_3$), welches an die RGD-(Aminosäure-) Sequenz (Arginin, Glycin und Aspartat) verschiedener Extrazellulärmatrixproteine bindet, eine besondere Bedeutung bei der Adhäsion, Proliferation und Migration von Endothelzellen im Rahmen der Tumorangiogenese sowie der Invasion von Gliomzellen selbst zugeschrieben (Yahalom D et al., 2002; Paulus W und Tonn JC et al., 1994; Tonn JC et al., 1998). Während die Expression und Funktion des Integrins in peripheren Tumoren wie im Mamma-Karzinom oder im malignen Melanom vielfach beschrieben ist (Brooks PC et al., 1995; Cheresh DA und Spiro RC, 1987; Cheresh DA, 1991; Petitclerc E et al., 1999; Goldbrunner RH et al., 1996) gibt es über die Expression von $\alpha_v\beta_3$ in Gliomen unterschiedliche Angaben: 1991 fanden Candace L. Gladson und David Cheresh erstmals eine prominente Expression des ECM-Proteins Vitronectin und seines Rezeptors, dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, in Glioblastomen (GBM) (Gladson CL et al., 1991). Daraufhin beschrieben einige Arbeiten die Expression von $\alpha_v\beta_3$ in Endothelzellen des nicht neoplastischen Gehirns (Gladson CL et al. 1991; Paulus W et al., 1993), während dies bei anderen Arbeiten nicht nachgewiesen werden konnte (Gladson CL et al., 1996.)

In einer Untersuchung zur Expression von $\alpha_v\beta_3$ bei Gliomen verschiedener Malignitätsgrade ließ sich sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene mit steigendem Malignitätsgrad eine Zunahme der $\alpha_v\beta_3$ -Expression belegen (Gladson CL et al., 1996; Lim M et al., 2005.) Die Expression von $\alpha_v\beta_3$ konnte dabei für die Tumorzellen, aber auch für Tumor-Endothelzellen in malignen Gliomen nachgewiesen werden (Gladson CL et al., 1991; Paulus W et al., 1993). Dabei konnte eine deutliche Expressionszunahme des Integrins vom Tumorzentrum in Richtung Tumorperipherie untermauert werden (Bello L et al., 2001). In einer semiquantitativen Studie konnte durch standardisierte, maschinelle Immunhistochemie eine WHO-Grad-abhängige Expression des Integrins in malignen Gliomen festgemacht werden: Hier zeigte sich vor allem, dass die Expression von $\alpha_v\beta_3$ nicht nur Endothelzell-assoziiert, sondern zum sehr großen Teil in den Gliomzellen selbst zu finden ist und diese bis zu 85% der Gesamtexpression ausmacht (Schnell O et al., 2008).

Diese und zusätzliche in vitro Daten zu Inhibitoren des Integrins $\alpha_v\beta_3$ (Bello L et al, 2003; Bello L et al., 2004; Brooks PC et al., 1994; MacDonald TJ et al., 2001; Taga T et al., 2002) führten dazu, dass erste Integrin-Inhibitoren bereits klinisch getestet werden: So konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des Integrins $\alpha_v\beta_3$ klinisch sicher und vielversprechend für einen günstigen Krankheitsverlauf bei Patienten mit GBM ist (Nabors LB et al., 2007; Reardon DA et al., 2011). In einer Phase II-Studie konnte zudem gezeigt werden, dass Patienten mit einer Promotormethylierung des O⁶-Methylguaninmethyltransferase (MGMT)-Gens von einer Kombination aus Strahlen- und Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) sowie Integrin-Inhibition profitieren und eine signifikant längere Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen als herkömmlich behandelte Patienten (nur Radiochemotherapie mit Temozolomid; Stupp R et al., 2010).

Zum Verständnis dieser klinischen Daten ergibt sich die Notwendigkeit einer besseren Aufklärung Integrin-getriggelter proliferativer Mechanismen in malignen Gliomen. Zur Integrin-getriggerten Signaltransduktion ist in Gliomen bisher allerdings wenig bekannt, die „Focal Adhesion Kinase“ (FAK) scheint hierbei ein Schlüsselmolekül zu sein.

1.3. Signal-Transduktion durch die Tyrosinkinase FAK

Eine zentrale Rolle bei der Weiterleitung der Integrin-Rezeptor-Aktivierung wird der Tyrosinkinase FAK zugeschrieben (Cox BD et al., 2006; Reiske HR et al., 2000). Diese zytoplasmatische Tyrosinkinase, welche durch fokale Adhäsion zwischen extrazellulären Matrixproteinen und Integrinen (und z.T. Wachstumsfaktor-Rezeptoren) und darauffolgende Autophosphorylierung aktiviert wird, rekrutiert eine Vielzahl anderer Moleküle, die als Botenstoff-Komplexe das extrazelluläre Signal an das Zytoplasma, das Zytoskelett und den Zellkern weiterleiten: Beispielsweise wird die Migration durch die FAK-abhängige CAS-Signalkaskade mit GTPasen und c-Jun-Kinasen gesteuert (Craven RJ et al., 2003; Natarajan M et al., 2006; Cary LA et al., 1998). Antiapoptotisch wirkt FAK über die PI3-Kinase-Akt Signalkaskade (Franke TF et al., 1997), Proliferation und Zellzyklus steuert FAK durch die Erk und Cyclin

dependent kinase p27^{Kip1} und über die Transkriptionsfaktoren Ets-b und KLF-8, die ihrerseits das Cyclin D1 stimulieren (Ding Q et al., 2005; Zhao J et al., 2001).

Die Beeinflussung des Zellzyklus durch FAK ist insbesondere in der Tumorgenese von Bedeutung (Agochiya M et al., 1999). So hemmt beispielsweise die Deletion des FAK-Gens im Tiermodell die Entstehung maligner Hauttumore (McLean GW et al., 2004) und FAK-Deletion bei Mamma-Karzinom-Zellen hemmt Tumorzellwachstum und Lungenmetastasierung (Van Nimwegen MJ et al., 2005). In malignen Gliomen ist FAK als stark überexprimiertes Protein nachgewiesen worden, einhergehend mit einem erhöhten Cyclin D1-Gehalt (Hecker TP et al., 2002). Hier hatten sich im Unterschied zu nicht-neoplastischem ZNS-Gewebe Splice-Unterschiede des FAK-Proteins sowie als weiteres Unterscheidungsmerkmal eine ausgeprägte Phosphorylierung der Tyrosinkinase in malignen Gliomen gezeigt. Zudem konnten die Autoren der Arbeit erstmalig die Bedeutung von pFAK als proliferationsfördernder (Cyclin D1-Aktivator) und migrationsfördernder Faktor in Gliomen belegen (Cavalla P et al., 1998; Hecker TP et al., 2002).

Viele der zytoplasmatischen Botenstoffe der FAK sind gut untersucht. Dagegen ist das Genexpressions-Profil des Zellkerns nach FAK-Aktivierung bislang wenig erforscht. Eine vermehrte FAK-vermittelte Progression des Zellzyklus von der G₁- („Ordnungsphase“) in die S-Phase („Replikationsphase“) ist ein entscheidender Proliferationsmechanismus in einer malignen Zelle und wird durch zahlreiche Regulationsmechanismen an „Checkpoints“ gesteuert. Diese „Checkpoints“ bremsen oder aktivieren die Progression des Zellzyklus und werden durch „Cyclin Dependent Kinases“ (CDK) reguliert, die ihrerseits von Cyclinen und CDK-Inhibitoren abhängen (Sherr CJ, 1994). So führt eine Anhäufung des Cyclin D1/CDK4/CDK6-Komplexes am Anfang der G₁-Phase zu einer Aktivierung von Kinasen, die das Tumorsuppressorgen Rb inaktivieren und eine Progression des Zellzyklus triggern (Vermeulen K et al., 2003; Abb. 1.2.C). Somit deutet ein erhöhtes Cyclin D1 auf Malignität hin und konnte erstmalig in Tumore der Nebenschilddrüse nachgewiesen werden (Motokura T et al., 1991). Auch in malignen Gliomen konnte beispielsweise eine stärkere Expression von Cyclin D1 als in niedriggradigen Entitäten gefunden werden (Cavalla P et al., 1998; Sallinen SL et al., 1999). Die Kontrolle der Cyclin/CDK/CDK-Inhibitor-Komplexe obliegt der Integrin-vermittelten Zell-Extrazellulär-Matrix Adhäsion (Schwartz MA und Assoian RK, 2001; Abb. 1.2.A). In

einer steuerbaren Fibroblasten-NIH3T3-Zelllinie konnte durch induzierbare FAK-Stimulation die Korrelation zwischen FAK-Aktivität und G₁-S-Progression/Proliferation nachgewiesen werden. Demnach stimuliert FAK die G₁-S-Progression durch Hochregulation des Cyclin D1 über die zwei Transkriptionsfaktoren KLF-8 und Ets-b. Durch direkte Bindung an Genabschnitten vor dem Cyclin D1 Promotor fördern sie die vermehrte Transkription des Cyclin D1-Gens (Zhao JH et al., 1998; Zhao J et al., 2001; Abb.1.2.B).

1.4. Die KLF-8-Proliferations-Kaskade

Als besonders onkogen wirksam gilt KLF-8, ein potenter Transkriptionsfaktor der *Krüppel-Like-Factor-Familie* (KLF-Familie). Diese KLF-Faktoren wirken in Abhängigkeit von ihrem Kontext als Transkriptionsaktivatoren oder als Transkriptionsrepressoren (Kaczynski J et al., 2003). Die Beteiligung von KLF-1 wurde in der Hämatopoese beschrieben (Perkins A, 1999), KLF-4 und KLF-6 gelten als Tumorsuppressorgene beim Prostatakarzinom und bei der familiären Adenomatosis coli (Dang DT et al., 2000; Narla G et al., 2001). Als charakteristisches Motiv dieser Familie enthält auch KLF-8 drei Zinkfinger-Domänen (Abb. 1.1.C) im C-Terminus und davon in 5'-Richtung eine Kernlokalisierungs-Sequenz (Abb. 1.1.B; Van Vliet J et al., 2000; Zhao J et al., 2003). Zhao et al. beobachteten den Zusammenhang zwischen fokaler Adhäsion und KLF-8 bei Versuchen, in denen eine Transfektion von NIH3T3-Zellen mit FAK den KLF-8- und konsekutiv den Cyclin D1-Spiegel deutlich erhöhte (Zhao J et al., 2001). Desweiteren konnte durch Hemmung der FAK-getriggerten Moleküle Src- und PI3-Kinase der Anteil an KLF-8 gesenkt werden. Ebenso konnte in neueren Arbeiten die onkogene Funktion des Transkriptionsfaktors in Zelllinien aus Uterus-, Mamma- und Nierenzellkarzinom mit Western Blot und *Real Time*-PCR gesichert werden (Wang X und Zhao J, 2007). In der vorliegenden Arbeit sollte KLF-8 und diese aus der Literatur bekannte onkogen wirksame Signalkaskade mit seinen Bestandteilen pFAK, KLF-8 und Cyclin D1 erstmalig in Gliomen unterschiedlicher Dignität charakterisiert werden. Verschiedene Regulationsmechanismen der beschriebenen KLF-8 Signalkaskade sind Gegenstand aktueller Forschung (u.a. sind weitere KLF-Familienmitglieder wie der

transkriptionsaktivierende Faktor KLF-17 und der auf die Transkription von KLF-8 hemmend wirkende Faktor KLF-3 Gegenstand aktueller Forschung; Van Vliet J et al., 2006; Eaton SA et al., 2008). Ferner sollte daher exemplarisch die mRNA-Expression des KLF-17 Faktors als Transkriptionsaktivator unklarer Funktion als Ausgangspunkt zukünftiger Untersuchungen bestimmt werden.

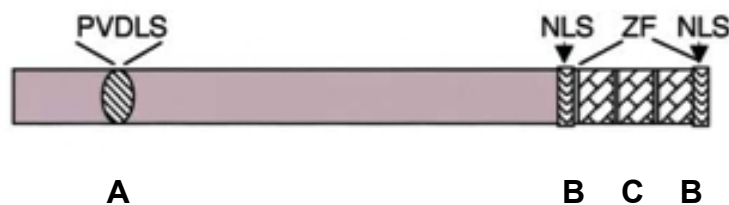


Abbildung 1.1. Aufbau des Transkriptionsfaktors KLF-8 mit dem Aminosäuren (PVDLS)-Motiv, der Kernlokalisierungs (NLS)-Sequenz und den Zinkfinger (ZF)-Domänen (aus Zhao J et al., 2003)

Die charakteristische Aminosäuresequenz Prolin-Valin-Asparagin-Leucin-Serin (A) findet sich am N-Terminus des Transkriptionsfaktors und bindet den Co-Repressor C-terminal binding protein (CtBP) und dient der Hemmung Cyclin D1-inhibitorischer Regulatoren. Die Valin-reiche Kernlokalisierungs-Sequenz NLS (B) dient der Cyclin-D1 Promotor Bindung und findet sich in 5'- und in 3'-Richtung der Zinkfingerdomänen (C). Letztere sind Cystin- und Histidin-reiche „fingerähnlich“ konfigurierte Domänen und gelten als typische Merkmale der KLF-Familie. Sie führen zu einer Cyclin-D1 Promotor Bindung und Aktivierung, möglicherweise durch eine hohe Affinität zur Nukleotid-Sequenz GT-Box A (5'-GTCCGCCCGT GGGTGCCCTC GTGGC-3'; nach Zhao J et al., 2003 und Van Vliet J et al., 2000).

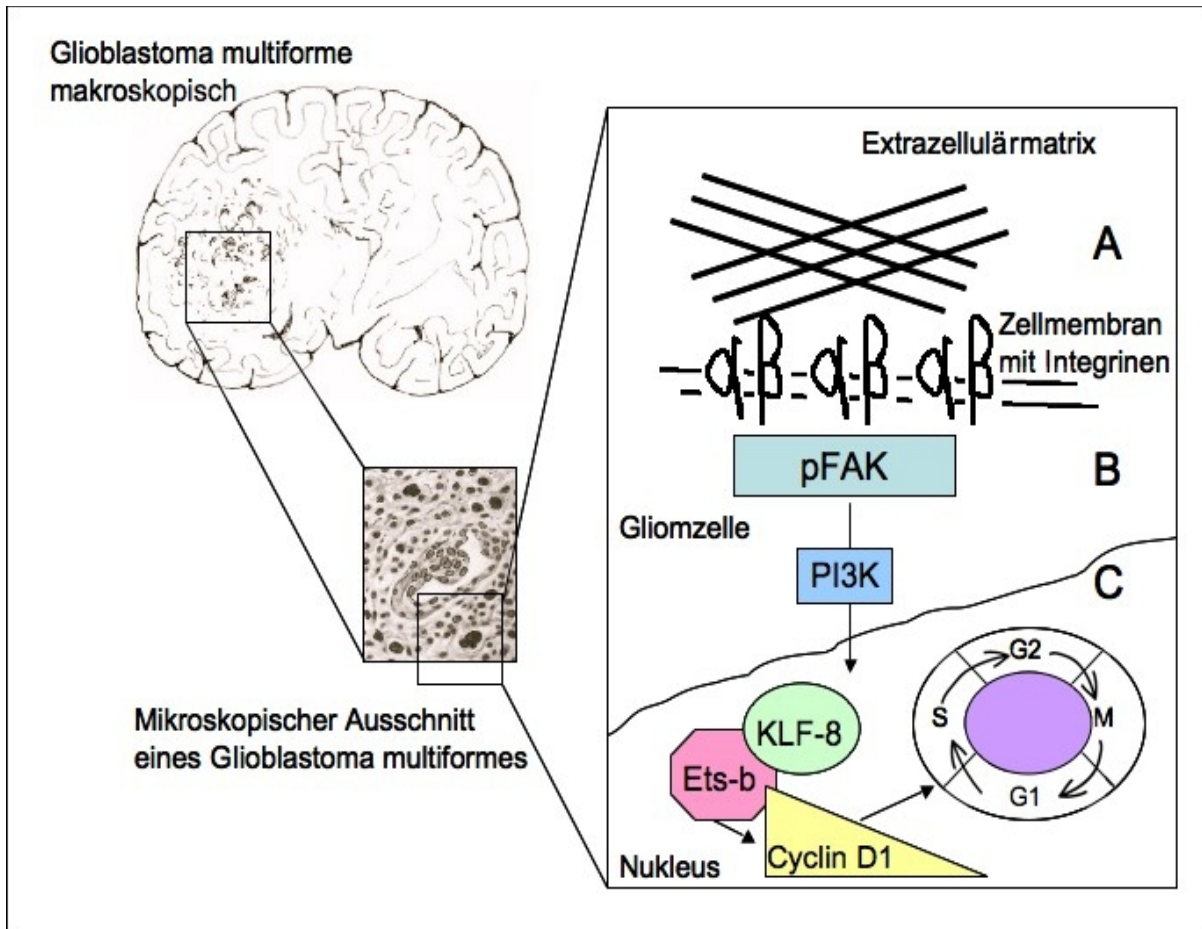


Abbildung 1.2. Fokale Adhäsion und KLF-8 Signalkaskade

Nach der fokalen Adhäsion (A) eines Integrins oder eines Wachstumsfaktors und eines entsprechenden Extrazellulärmatrix-Proteins (ECM) kommt es zu einer Phosphorylierung der Tyrosinkinase focal adhesion kinase (FAK; B). Hierdurch werden sämtliche Signalkaskaden initiiert. U.a. aktiviert pFAK über die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) den nukleären Transkriptionsfaktor KLF-8, der mit dem Transkriptionsfaktor Ets-b zu einer vermehrten Cyclin D1-Expression führt. Eine Anhäufung des Cyclin D1/CDK4/CDK6-Komplexes in der Mitte der G₁-Phase (Ordnungsphase) führt zur Aktivierung von Kinasen, die den Übergang zwischen der G₁- und der S-Phase (Replikationsphase) beschleunigen (C). Es kommt dadurch zur Enthemmung des Zellzyklus und zu einer verstärkten Proliferation (nach Zhao J et al., 2003; Walker JL und Assoian RK 2005; Vermeulen K et al., 2003).

1.5. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, den aus der Literatur als möglichen Integrin-getriggerten und proliferativ wirksamen Transkriptionsfaktor KLF-8 in Gliomen unterschiedlicher WHO-Grade näher zu charakterisieren. In einem ersten Schritt sollte daher die Expression von KLF-8 genauer untersucht werden (Teil 1) bevor in einem zweiten Schritt dann durch selektive Hemmung neue Erkenntnisse über die Funktion von KLF-8 in Gliomen gewonnen werden sollten (Teil 2). Hierzu wurden im Einzelnen folgende Untersuchungen durchgeführt:

A) Expression:

- Qualitativer und topographischer Nachweis von KLF-8 und den Signalkaskadenmolekülen $\alpha_v\beta_3$, pFAK, Cyclin D1 (Immunhistochemie, Immunzytochemie)
- Weiterführende semiquantitative Charakterisierung des Transkriptionsfaktors KLF-8 (Immunhistochemie, Western Blot, qtPCR)

B) Funktion:

- Inhibition des Transkriptionsfaktors KLF-8 (shRNA) und Bestimmung der Zellzahl (durch Auszählung)

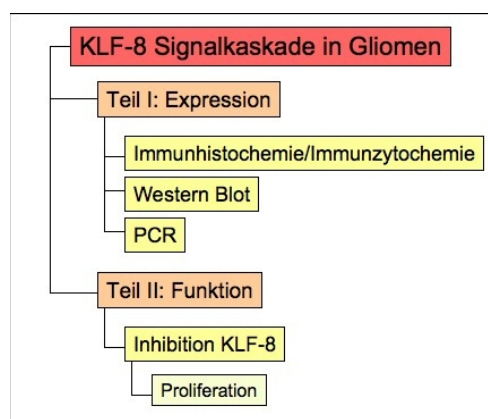


Abbildung 2. Versuchsplanung und Methodik

2. Material und Methoden

2.1. Gewebeproben und Zellkultur

2.1.1. Aufbereitung von Gliom-Gewebe

Alle Gewebeproben stammten von Patienten aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern. Die histopathologische Diagnose wurde an Gewebsschnitten gemäß Kriterien der WHO-Tumorklassifikation (Louis DN et al., 2007) durchgeführt. Nur histologisch gesicherte Gliome vom WHO Grad IV, WHO Grad III und Gliome vom WHO Grad II wurden untersucht. Von allen Patienten wurde die schriftliche Einwilligung zur Nutzung der Tumorpoben und Daten zum Zwecke der medizinischen Forschung geholt. Dieses Vorgehen hatte keinen Einfluss auf die Therapiemodalität. Die Resektate wurden auf Eis in einem sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen in das Tumorbiologische Labor transportiert und dort sofort verarbeitet. Ein Teil der Gewebeproben wurde für die Primärzellkultur aufgearbeitet, ein anderer Teil in die laboreigene „Tumorbank“ zur späteren Nutzung für Immunhistochemie, Western Blot und PCR einsortiert.

2.1.2. Isolation für Primärkultur

Die Zellen aus der Primärkultur für die Immunzytofluoreszenz für KLF-8 stammten aus frischen Gliom-Resektaten, welche unter sterilen Bedingungen aufgearbeitet wurden (mod. nach Miebach S et al., 2006). Zunächst erfolgte eine Präparation und Homogenisierung des Gewebes in einer Petrischale mit kaltem Isolationsmedium. Das Gemisch aus zerkleinertem Gewebe und Isolationsmedium wurde dann in einem Glashomogenisator zu einer milchigen Suspension zermahlen. Nach Zentrifugation wurde die Suspension mit einer 15%igen Dextranlösung zur Myelinseparation durchmischt und erneut abzentrifugiert. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten, nach Abgießen des Zellüberstandes und Resuspension mit Kollagenase/Dispase in filtriertem Isolations-Medium (470ml DMEM, Biochrom AG; 25ml FBS, Biochrom AG; 5ml Penicillin, Streptomycin, Glutamin von Invitrogen GmbH) konnte die

Zellsuspension schließlich in eine Kulturflasche gegeben und im Brutschrank inkubiert werden.

2.1.3. Zelllinien

Für die Zellkulturversuche wurde die Zelllinie U87-MG verwendet (käuflich erworben von der Zellkulturbank „American Type Culture Collection“-ATCC). Diese U87-MG-Zelllinie war 1968 von Ponten und Macintyre erstmalig als Glioblastom-Zelllinie beschrieben worden und ist eine sehr etablierte, in über 1700 Publikationen verwendete Zelllinie, deren Genom erstmals im Jahr 2010 vollständig entschlüsselt werden konnte (Ponten J und Macintyre EH, 1968; Clark MJ et al., 2010). Gemeinsam mit den mit shRNA gegen KLF-8 behandelten U87-MG Zellen („Q-tech KLF-8“) wurden die U87-MG Zellen im Brutschrank bei +36°C, 5% CO₂ aufbewahrt und mit „Dulbecco’s modified Eagles Medium“ (DMEM, Biochrom AG) kultiviert. Dieses Medium enthielt „Minimum Essential Medium“ (MEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit nichtessentiellen Aminosäuren (NEAA, Invitrogen GmbH), 10% Hitzeinaktiviertes fetales Rinderserum (FBS, Biochrom AG) und weitere Zusätze (Penicillin, Streptomycin, Glutamin von Invitrogen GmbH). Im 2 bis 3-Tagesrhythmus fanden Mediumwechsel statt, die Zellen wurden bei Erreichen von etwa 70% Konfluenz mittels Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gesplittet. Zur Aktivierung der Integrin-Signalkaskade im Sinne der „fokalen Adhäsion“ wurden alle benutzten Zellkultur-Flaschen und Well-Platten mit dem für $\alpha_v\beta_3$ spezifischen Extrazellulärmatrixprotein Vitronektin und einer Aqua dest.-Lösung (Vitronektinkonzentration 0.5 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) über 1-2h bei 37°C beschichtet.

2.2. Proteinbiochemische und molekularbiologische Methoden

2.2.1. Immunhistochemie

Die Expression proliferativ wirksamer Signaltransduktionsmoleküle der beschriebenen KLF-8 Signalkaskade ist in Gliomen weitgehend unbekannt. Die vorliegenden immunhistochemischen Versuche sollten qualitative, topographische und semiquantitative Aussagen zur Expression von $\alpha_v\beta_3$, pFAK, Cyclin D1 und insbesondere KLF-8 in Gliomen liefern. Zunächst wurde das Verteilungsmuster der besagten Kaskadenmoleküle in WHO°II-, WHO°III- und WHO°IV-Tumore (n=4 Proben je Tumor) manuell untersucht. Daraufhin wurde die Expression des Transkriptionsfaktors KLF-8 zur weiterführenden semiquantitativen Analyse in unterschiedlichen Tumordignitäten in enger Zusammenarbeit mit dem „Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung“ (ZNP, Feodor-Lynen-Str. 23, 81377 München) maschinell bestimmt (n=10 WHO°II-Gliome, n=10 WHO°III-Gliome, n=12 WHO°IV-Gliome, je n=3 Proben für Metastasen eines Mammakarzinoms, Meningeome, und nichtneoplastisches ZNS-Gewebe). Zur Korrelation hierzu wurde der als Proliferations-Marker bekannte Faktor Ki67 in denselben Proben bestimmt.

Immunhistochemische Färbungen wurden sowohl an mit HOPE-Medium (Hepes-glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect; DCS-Diagnostics GmbH) fixiertem Gewebe, als auch an kryokonserviertem Gewebe und an paraffinisiertem Gewebe durchgeführt.

Die mit HOPE behandelten Glioblastom-Resektate (Fixierung nach Olert J et al., 2001) wurden in der manuellen Immunhistochemie hinsichtlich ihrer Expression der Signalkaskadenmoleküle $\alpha_v\beta_3$, pFAK, KLF-8 und Cyclin D1 (je n=4) untersucht. Die vorgekühlten HOPE-Blöcke wurden im Mikrotom auf eine Dicke von 10 μm geschnitten und auf silanisierte SuperFrost®-Objektträger (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH) aufgelegt. Abschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 37°C getrocknet. Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten mit dem LSAB 2 Kit (Dako Deutschland GmbH; s. Abb. 3). Die fixierten Schnitte wurden nach Entparaffinierung mit Isopropanol (60°C, 20 min), Dehydratation mit kaltem Aceton

(70%, 10 min) und destilliertem Wasser (10 min) zunächst für 12 Stunden bei 4°C mit dem Primärantikörper (Konzentrationen siehe Tabelle 1) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper aus dem LSAB 2 Kit (goat anti-mouse für pFAK und Cyclin D1, rabbit anti-goat für KLF-8), gefolgt vom Horseradish Peroxidase (HRP)-konjugierten Streptavidin (jeweils für 1 h bei Raumtemperatur). Schließlich erfolgte die Visualisierung mittels 3,3-Diaminobenzidin (DAB) und Gegenfärbung mit Hämatoxylin (4 min; VWR International GmbH). Nach Dehydratation in der Ethanol-Reihe (70%, 96%, 100%) und Xylol wurden die Objektträger mit Histokit und einem Deckgläschen eingebettet.

Die Anfertigung kryokonservierter Gewebeproben erfolgte durch Schockfrierung der Tumorsektate in flüssigem Stickstoff. Nach Aufbewahrung bei -80°C wurden die Proben bei -25°C im Kryostaten auf eine Dicke von 10 µm geschnitten. Nach Auftauen (10 min bei Raumtemperatur) erfolgte eine Fixationsreihe (2 min bei 50% Aceton, 2 min bei 100% Aceton, 2 min 50% Aceton, 2 min Wasser, 2 min PBS-Puffer) sowie die immunhistochemischen Versuche auf Basis der Avidin-Biotin-Methode (s. Abb. 3).

Die mit Paraffin behandelten Proben (12 WHO°IV-, 11 WHO°III-, 10 WHO°II-Gliome sowie jeweils n=3 Proben für Metastasen eines Mammakarzinoms, Meningeome, und nichtneoplastisches ZNS-Gewebe) wurden maschinell immunhistochemisch auf ihre KLF-8 Expression untersucht. Sie wurden ≥ 24 h in Paraformaldehyd 4% fixiert, in der Ethanol-Reihe (s. oben) und Xylol dehydriert und in heißem Paraffin eingebettet. Das Zuschneiden, die Entparaffinierung und Dehydratation erfolgte analog zu den HOPE-Proben. Die Schnitte wurden daraufhin maschinell (simultan und automatisiert) immunhistochemisch gefärbt (BenchMark® und NexES v9.20 Software, Ventana Medical Systems). Die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörper gegen KLF-8, Ki-67 und GFAP (s. Tabelle 1) erfolgte über 32 Minuten bei 37°C (Software-Modalität „Option 1 per hand“). Auf Basis der Avidin-Biotin-Methode (s. Abb. 3) erfolgte die Inkubation mit den polyklonalen sekundären Antikörper ebenso über 32 Minuten bei 37°C in der Modalität „Option 2 by dispenser“. Nach Koppelung mit Alkaline-Phosphatase-konjugiertem Streptavidin (SA-AP; Ventana Medical Systems) erfolgte die Visualisierung mit DAB. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin und Dehydratation in der Alkoholreihe erfolgte die Einbettung (s. oben).

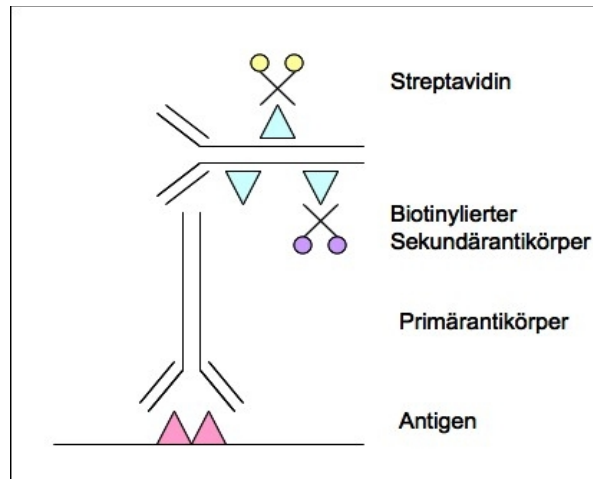


Abbildung 3. Schematische Darstellung immunhistochemischer Färbungen nach der Biotin-Streptavidin Methode

2.2.2. Immunzytochemie

Für die immunzytochemischen Färbungen wurde die auf Subkonfluenz gewachsene Gliomzelllinie U87-MG und Primärkulturen aus malignen Gliomen verwendet. Nach Fixation mit 4% Paraformaldehyd (15 min, Raumtemperatur) in CulturSlides (Becton Dickinson Labware) erfolgte für die intrazellulären Marker (KLF-8 und Cyclin D1) die Permeabilisierung mit Methanol (-20°C, 20 sec) oder mit Triton 5% (4°C, 5min). Nach Blockierung unspezifischer Hintergrundsignale mittels Horseradish Peroxidase-/Alkaline Phosphatase-Blocking Reagenz erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Konzentrationen siehe Abb. 3). Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (1:750) für 15 min gefolgt von einer Inkubation mit Alkaline Phosphatase-konjugiertem Streptavidin (1:1000). Die Visualisierung erfolgte mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat p-Tolidinsalz und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (BCIP/NBT, Vector Laboratories), die Gegenfärbung erfolgte mit Eosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Nach abschließender Dehydratation mit Ethanol (70%, 96%, 100%) und Histol erfolgte die Einbettung. Die immunzytochemischen Färbungen erfolgten auf Basis der oben beschriebenen Methode (Biotin-Streptavidin-Protokoll mit Visualisierung durch DAB-Chromogen oder BCIP/NBT) oder im Falle der Primärkulturen mit dem fluoreszenzkonjugierten Sekundär-Antikörper (FITC-conjugated rabbit-anti goat; Dako Diagnostika GmbH; oder Texas Red goat anti mouse; Vector; Inkubation 4°C über 12 Stunden).

Sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Immunzytochemie wurde zwischen allen Schritten jeweils 3-mal mit PBS gewaschen. Die Photodokumentation und Auswertung erfolgte mit einem Zeiss Axiovert und Axioscop-2-Mikroskop.

Primärantikörper	Herkunft und Art	Verdünnung	Anwendung
Anti-Integrin $\alpha_v\beta_3$ Klon LM609	Monoklonal Maus Chemicon	1:100	IHC/HOPE-Schnitte, Kryogewebe und ICC
PFAK (py397) Klon 611722	Monoklonal Maus Becton Dickinson GmbH	1:100	IHC/HOPE-Schnitte, Kryogewebe und ICC
KLF-8 1.) Klone NB100-1050 2.) Klon H00011279-B01	1.) Polyklonal Ziege Novus Biologicals 2.) Polyklonal Maus Novus Biologicals	je 1:100	IHC/HOPE-Schnitte und ICC
Cyclin D1 Klon CC12	Monoklonal Maus Calbiochem/Merck,	1:100	(IHC/HOPE-Schnitte, Kryogewebe und ICC
Ki67 Klon MIB-1	Monoklonal Maus Dako, Glostrup, Dänemark	1:100	IHC/Paraffin-Schnitte
GFAP Klon 6F2	Monoklonal Maus Dako, Glostrup, Dänemark	1:100	(IHC/Paraffin-Schnitte)

Tabelle 1. Primärantikörper für die immunhistochemischen und immunzytochemischen Versuche

2.2.3. Western Blot

Die im Folgenden beschriebenen Western Blot Protokolle stehen im Zeichen der sich stets entwickelnden und verbessernden proteinbiochemischen Methoden im Tumorbiologischen Labor zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung. So konnten initiale methodische Hürden gezielt überwunden und standardisierte Vorgehensweisen etabliert werden.

Für den Western Blot vorgesehene Tumorproben wurden in einer auf Eis gelagerten Petri-Schale homogenisiert. Auf ca. 5 mg Gewebe wurden ca. 350 µl Nonidet P-40 Lysepuffer pipettiert und das Lysat mehrmals mit einer 1ml Spritze aufgezogen. Die Messung der Proteinlösung erfolgte in einem Eppendorf Biophotometer nach dem Bradford-Assay. Proteine aus dem Tumorgewebe und aus den Zelllinien wurden auf die jeweils gleiche Menge von 30 µg eingestellt und mit Laemmli-Puffer vermischt (Laemmli UK, 1970). Danach erfolgte die Auftrennung mittels SDS-Page (10%) in Elektrophoresepuffer (20 % Methanol, 192 mMol Glycin, 25 mMol Tris-base, pH 8.3) und die Übertragung der Proteine auf eine zuvor mit 98% Methanol aktivierten PVDF Membran mittels eines Nass-Blot-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH) nach Towbin H et al., 1979. Nach dem Blotvorgang unter Eiskühlung und ständigem Rühren in Running Buffer (55 min, 110 V) erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen. Hier wurde in den initialen Versuchen eine 5%ige Milchpulverlösung benutzt, die sich jedoch gegenüber einer sechsständigen Inkubation mit einer Roti-Block-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG) hinsichtlich unspezifischer Antikörperbindungen deutlich unterlegen zeigte. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Hier zeigte sich der initial verwendete und initial einzig auf dem Markt verfügbare Antikörper gegen KLF-8 (Klon NB100-1050, Novus Biologicals) dem im Verlauf benutzten Antikörper (SAB2101277, Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 1:1000 jeweils verdünnt in 1 x Roti-Block) bezüglich spezifischer Antigen-Bindungen deutlich unterlegen, sodass der zweitgenannte Antikörper verwendet wurde. Nach TTBS-Waschschritten wurde mit dem Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (Goat Anti-Rabbit IgG 170-5046, Bio-Rad Laboratories GmbH) für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen und 5 min Inkubation mit dem Chemoluminiszenz-Reagenz-System (Pierce ECL Western Blotting

Substrate #32209, Thermo Fisher Scientific) wurden die Signale visualisiert und auf „Fuji Medical Xray“ Filmen dokumentiert.

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Versuche erfolgte mit dem elektronischen Bildverarbeitungsprogramm „J-Image“, es wurde auf das „House Keeping Gene“ β -Aktin geeicht (Antikörper gegen Aktin: sc-47778, Santa Cruz Biotechnology Inc; 1:1000).

2.2.4. PCR

Sowohl die Gliom-Gewebeproben als auch die mit shRNA gegen KLF-8 und mit scrambled shRNA behandelten U87-MG Zellen wurden in der semiquantitativen Real-Time PCR mit dem LightCycler System (Roche Diagnostics) gemäß Herstellerprotokoll mit dem QuantiFast SYBR[®] Green PCR Kit (QIAGEN GmbH) untersucht. Zur Amplifikation wurden 2 μ l cDNA in einem Gesamtvolumen von 20 μ l pro Kapillare benutzt. Folgendes Primer-Paar kam in der semiquantitativen PCR zum Einsatz: KLF-8: 5'-TGG AAC CAG TGG ACC TCT CC-3' („forward“-Primer); 5'-ATC TGC TGG CTA CCA GTG CT-3' („reverse“-Primer). Das Signal für KLF-8 wurde im Gewebe auf das „House Keeping Gene“ HPRT1 (QuantiTect[®] Primer Assays, QIAGEN; QT00059066) geeicht, das KLF-8-Signal in den U87-MG Zellen wurde auf das Topoisomerase I-Gen geeicht („forward“-Primer 5'-CCA GAC GGA AGC TCG GAA AC-3' und „reverse“-Primer 5'-GTC CAG GAG GCT CCA TCC TGA-3'). Ein DNase-Verdau wurde mittels „gDNA Wipeout Buffer“ durchgeführt, sodass einer akzidentellen DNA-Amplifikation vorgebeugt werden konnte.

2.3. Funktionelle Hemmversuche

2.3.1. Knockdown von KLF-8 mit shRNA in U87-MG Zellen

Um den Effekt einer Inhibition der KLF-8-vermittelten tumoralen Proliferation zu analysieren, wurde ein shRNA-vermittelter Knockdown des Transkriptionsfaktors KLF-8 durchgeführt.

Einzelne Transfektions-Vorversuche mit Lipofektamin (nach Harborth J et al., 2001) scheiterten an einem eingeschränkten Transfektionserfolg, worauf mit der Firma Sirion Biotech Kontakt aufgenommen wurde, welche nach einem dort standardisierten Verfahren eine adenovirale Transfektion mit shRNA durchführte: Die KLF-8 shRNA wurde über einen adenoviralen Vektor nach intrazellulär eingeschleust und dort konstitutionell exprimiert (McAnuff MA et al., 2007). Dies erfolgte durch die *Q-tech* Methode (Sirion Biotech): Zunächst wurden doppelstrangige Oligonukleotid-Kassetten unter der Kontrolle des humanen U6-Promotors in das Plasmid A geklont. Die U6-shDNA wurde dann in einen nicht replikationsfähigen adenoviralen Vektor mit E1/E2 Deletion transferiert, welcher Bestandteil vom Plasmid B war. Die Virus-Produktion fand dann in HEK 293 Zellen statt, die Viruspurifikation erfolgte mittels Chromatographie mit kommerziell erwerbbaaren Purifikationskits für Adenoviren. Nach Transfektion und Abbau der charakteristischen „Hairpin“-Strukturen entstand aus der shRNA eine gegen KLF-8 gerichtete siRNA, welche über den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) KLF-8 mRNA binden und abbauen sollte. Durch Messung des mRNA-Gehaltes von KLF-8 mittels PCR wurde der Knockdown Erfolg in den behandelten U87 MG- Zellen quantifiziert.

2.4. Statistik

Die statistische Signifikanz der Proteinexpression in Western Blot-Versuchen wurde mittels Students t-Test bestimmt. Die Ergebnisse der Proliferationsassays wurden mittels Varianzanalyse verglichen (mehrfaktorielle ANOVA-Testung). Dieses Verfahren trennt die Stichproben-Varianz in den Messdaten auf in die Varianz, die durch das Experiment zu erklären ist sowie solche die durch das geteste Modell nicht erklärbar sind. So beträgt bei einem Signifikanzniveau von 0,05 die Wahrscheinlichkeit 95%, dass die erhobenen Daten zwischen den Gruppen im U87 MG Proliferationsversuch tatsächlich vorhanden und nicht nur durch Zufall entstanden sind.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der KLF-8-Expression

3.1.1. Immunhistochemie der Tumorgewebsproben

Qualitativ konnte neben der aus der Literatur bekannten Expression von $\alpha_v\beta_3$ (Abb. 4A), pFAK (Abb. 4B) und Cyclin D1 (Abb. 4D) erstmals die Expression des Transkriptionsfaktors KLF-8 (Abb. 4C) in allen untersuchten Tumorproben in unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden. Die Färbe-Intensität wurde in die Grade schwach ($\leq 1/3$), mittelgradig ($>1/3, <2/3$) und stark ($\geq 2/3$) eingeteilt.

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ fand sich in 3/4 WHO°IV-Gliomen stark exprimiert und in 1/4 Gliomen mittelgradig exprimiert (Abb. 4A), wogegen sich die Tyrosinkinase pFAK in 1/4 WHO°IV-Gliomen stark exprimiert (Abb. 4B), in 1/4 mittelgradig und in 2/4 leichtgradig exprimiert fand. Bezüglich der Expressionstopographie zeigte sich $\alpha_v\beta_3$ in Endothelzellen und Gefäßanschnitten (Abb. 4A), war aber -wie pFAK- auch in zellreichen Tumorarealen exprimiert. Der Transkriptionsfaktor KLF-8 fand sich in 2/4 WHO°IV-Gliomen stark exprimiert (Abb. 4C), in 1/4 mittelgradig und in 1/4 leichtgradig exprimiert. Hinsichtlich der topographischen Verteilung zeigte sich KLF-8 ebenso vornehmlich (aber nicht ausschließlich) in astrozytären Tumorzellen.

Das Cyclin D1 fand sich in 3/4 WHO°IV-Gliomen stark exprimiert (Abb. 4D) und in 1/4 leichtgradig exprimiert, hier zeigte sich ebenso eine tumorzell-assoziierte Expression. In Bezug auf die Expressionsintensität in WHO°III-Tumore fanden sich das Integrin $\alpha_v\beta_3$, die Tyrosinkinase pFAK und das Cyclin D1 gegenüber dem Transkriptionsfaktor KLF-8 häufiger mittelgradig als schwach (Abb. 5 A-D).

In WHO°II Tumoren zeigten sich das Integrin $\alpha_v\beta_3$, die Tyrosinkinase pFAK und das Cyclin D1 gegenüber dem Transkriptionsfaktor KLF-8 häufiger schwach bis nicht exprimiert (KLF-8 hingegen in 3/4 WHO°II-Proben mittelgradig und in 1/4 Proben nicht exprimiert; Abb. 6 A-D).

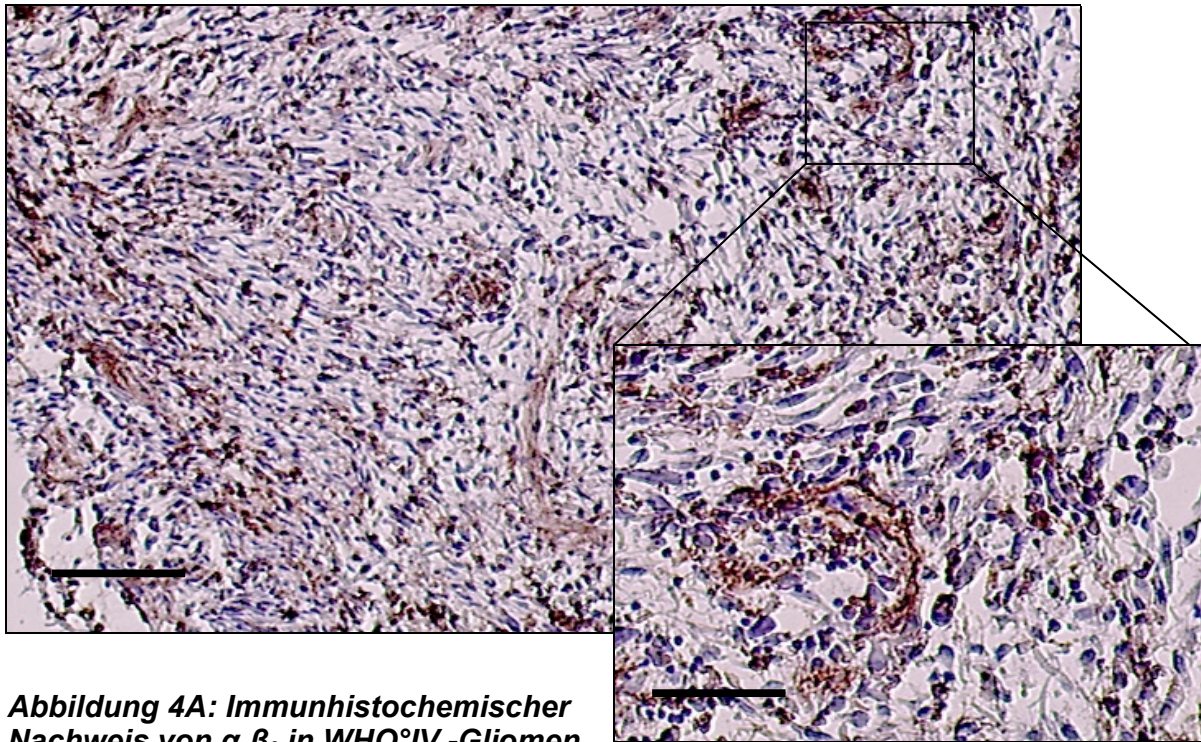


Abbildung 4A: Immunhistochemischer Nachweis von $\alpha_v\beta_3$ in WHO[°]IV -Gliomen

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist in 3/4 WHO[°]IV-Gliomen stark exprimiert (s. Bild), in 1/4 Tumorproben zeigt sich eine mittelgradige Expression. 1. Skalierung 100 μ m, 2. Skalierung 50 μ m

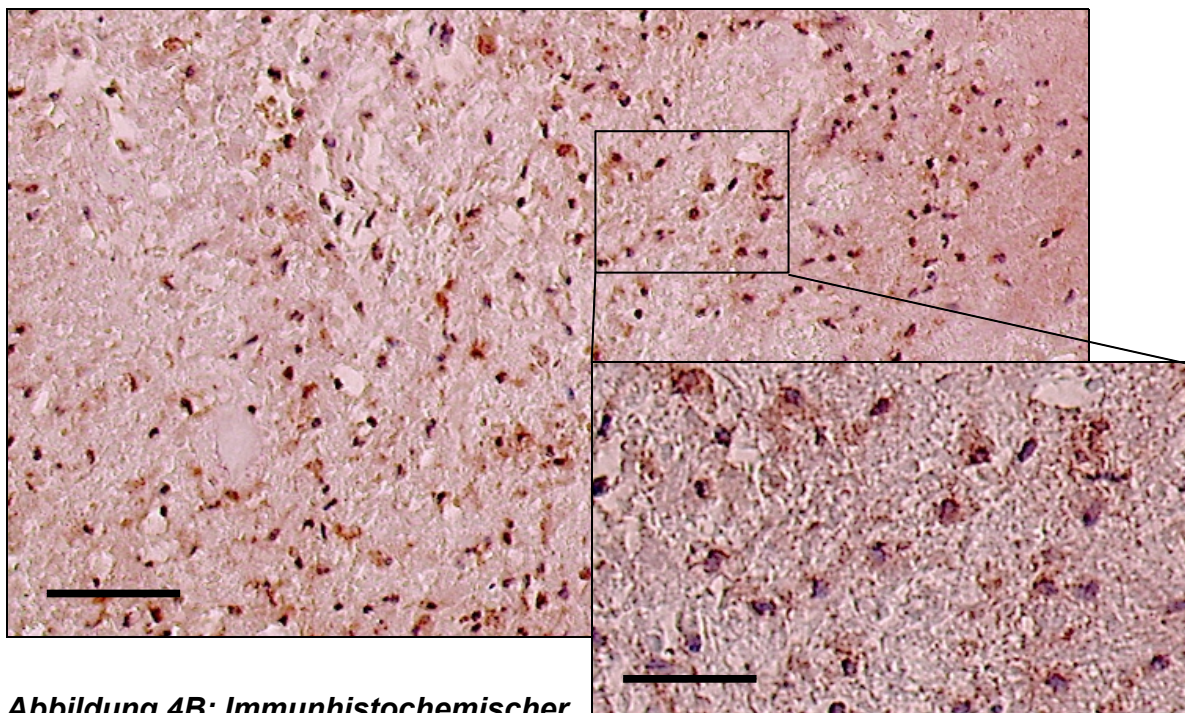


Abbildung 4B: Immunhistochemischer Nachweis von pFAK in WHO[°]IV -Gliomen

Die Tyrosinkinase pFAK findet sich in allen untersuchten Proben. In 1/4 WHO[°]IV-Gliomen zeigt sich eine starke Expression (s. Bild), in 1/4 Gliomen eine mittelgradige und in 2/4 eine leichtgradige Expression. 1. Skalierung 100 μ m, 2. Skalierung 50 μ m

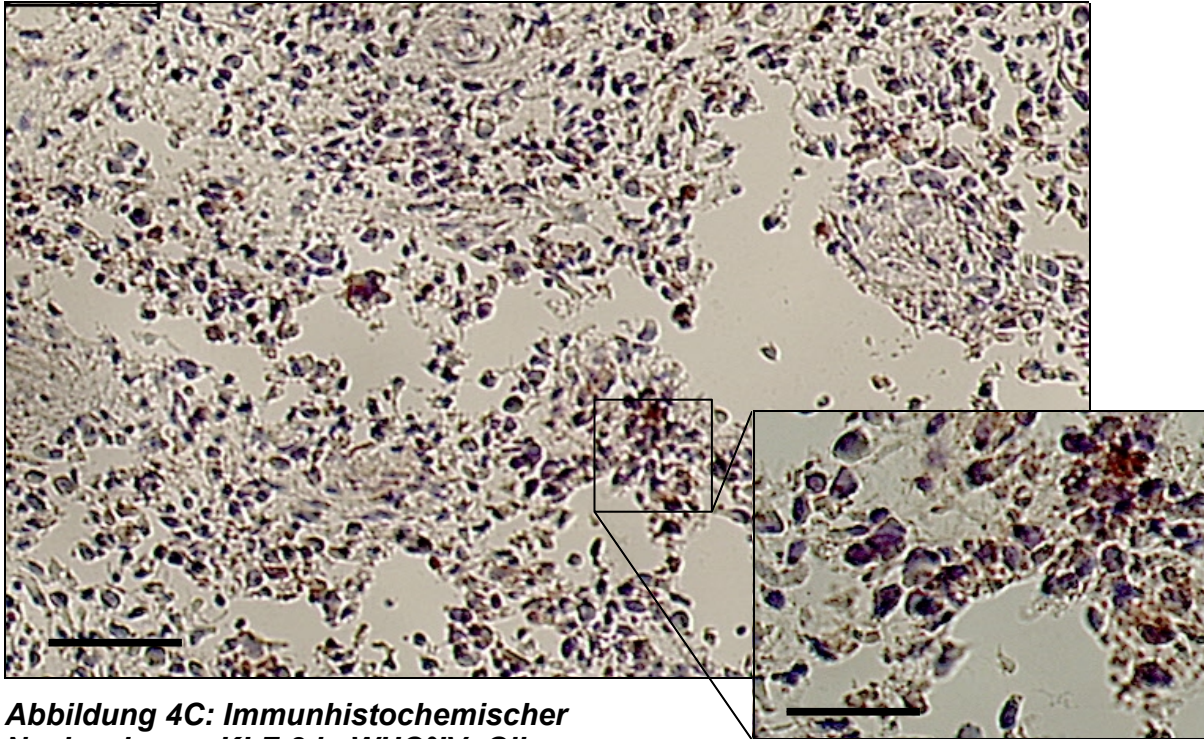


Abbildung 4C: Immunhistochemischer Nachweis von KLF-8 in WHO°IV -Gliomen

Der Transkriptionsfaktor KLF-8 findet sich ebenso in allen untersuchten Proben. In 2/4 WHO°IV-Gliomen zeigt sich eine starke Expression (s. Bild), in 1/4 Gliomen eine mittelgradige und in 1/4 eine leichtgradige Expression. 1. Skalierung 100µm, 2. Skalierung 50µm

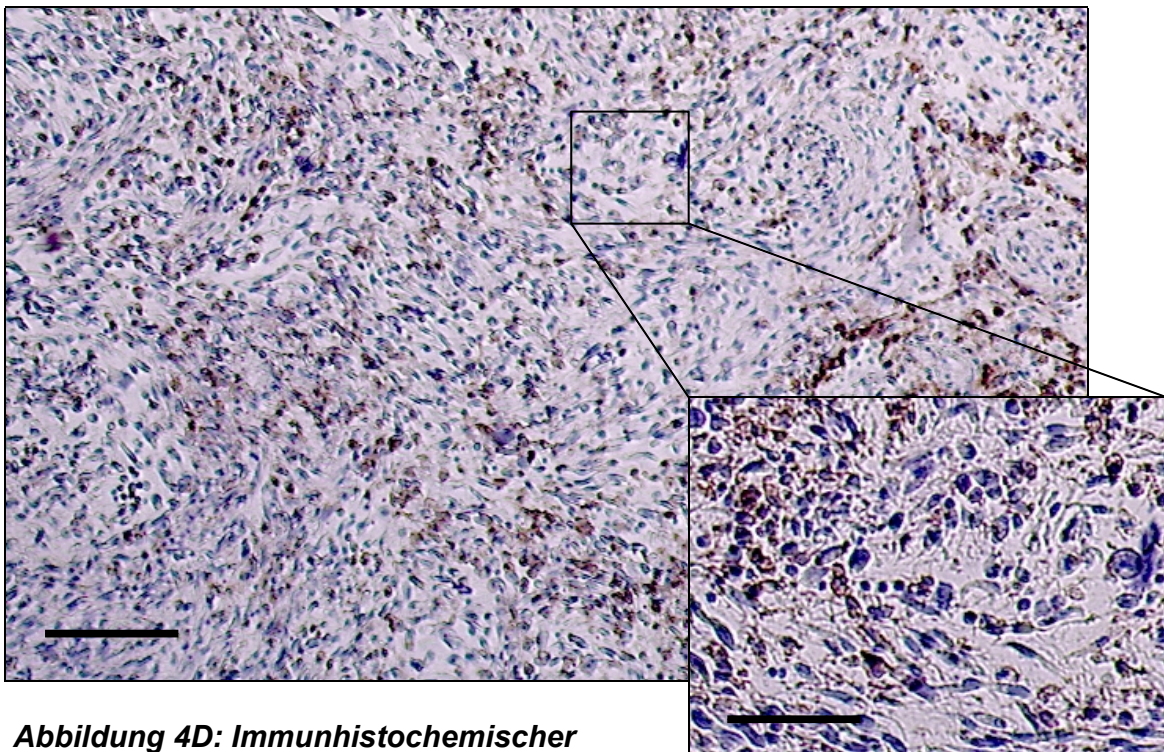


Abbildung 4D: Immunhistochemischer Nachweis von Cyclin D1 in WHO°IV -Gliomen

Das Cyclin D1 findet sich ebenfalls in allen untersuchten Proben, in 3/4 WHO°IV Gliomen stark (s. Bild) und in 1/4 leichtgradig exprimiert. 1. Skalierung 100µm, 2. Skalierung 50µm

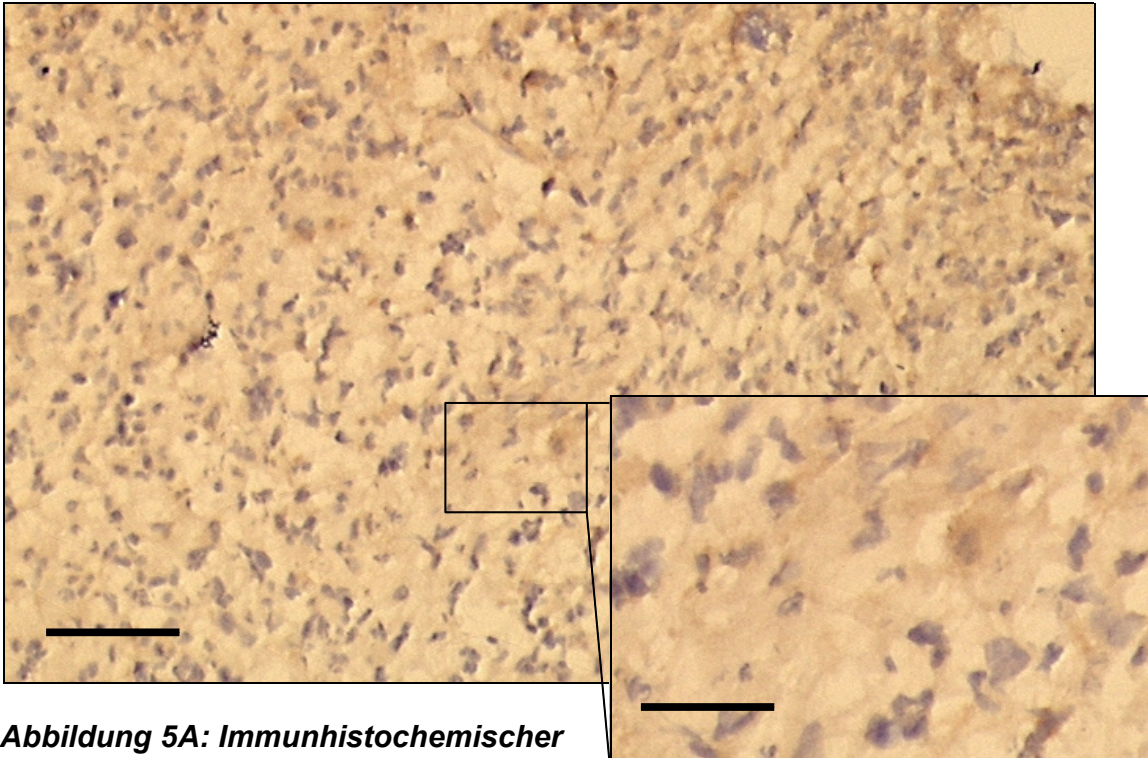


Abbildung 5A: Immunhistochemischer Nachweis von $\alpha_v\beta_3$ in WHO[°]III-Gliomen

Hinsichtlich der Expressionsintensität in WHO[°]III-Tumoren fand sich das Integrin $\alpha_v\beta_3$ in 2/4 WHO[°]III-Gliomen mittelgradig (s. Bild), in 1/4 WHO[°]III-Gliomen schwach und in 1/4 Gliomen nicht exprimiert.

1. Skalierung 100 μ m, 2. Skalierung 50 μ m

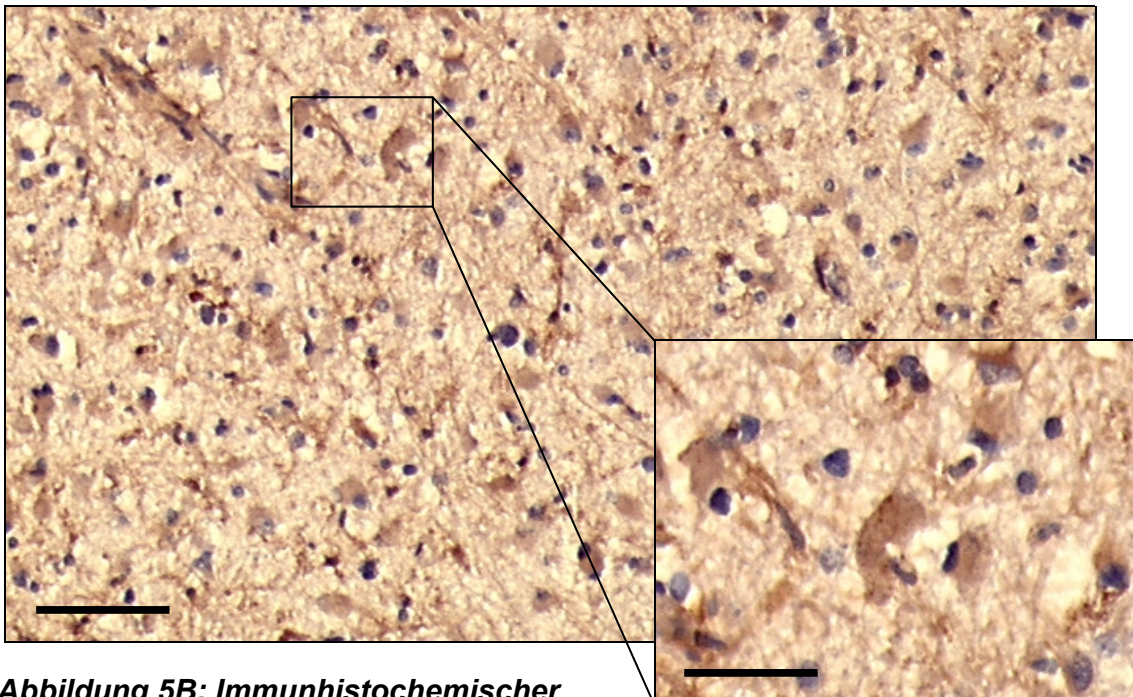


Abbildung 5B: Immunhistochemischer Nachweis von pFAK in WHO[°]III-Gliomen

Die Tyrosinkinase pFAK fand sich in 3/4 WHO[°]III-Tumoren mittelgradig (s. Bild) und in 1/4 WHO[°]III-Tumoren schwach exprimiert. 1. Skalierung 100 μ m, 2. Skalierung 50 μ m

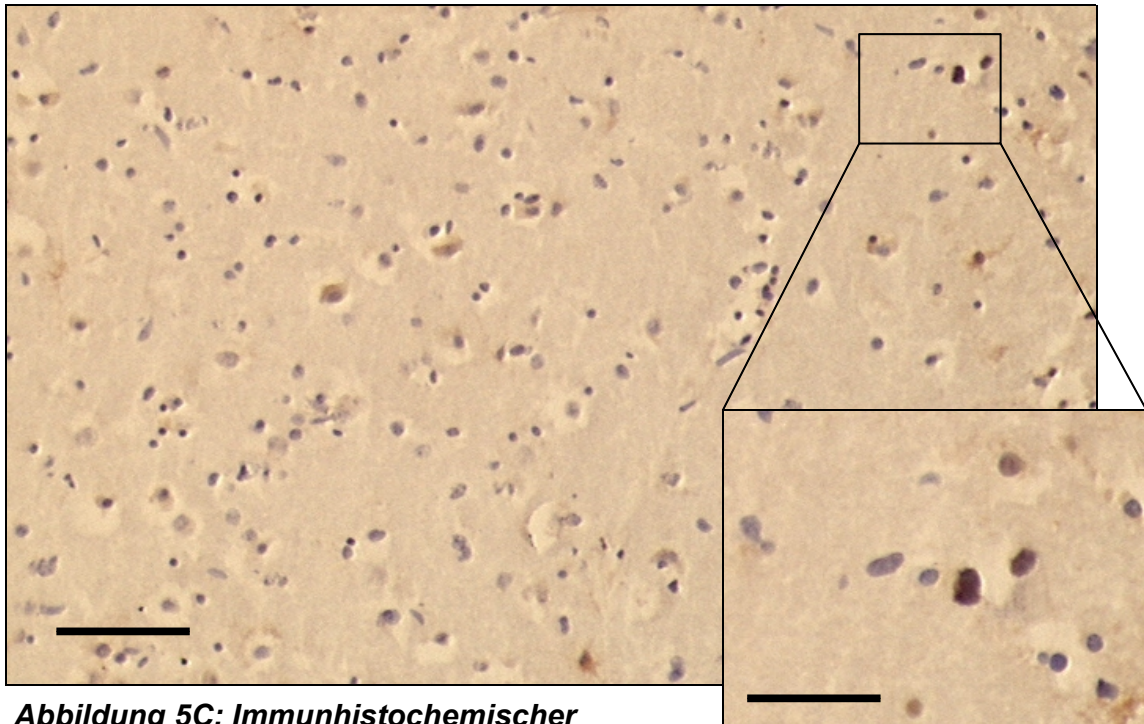


Abbildung 5C: Immunhistochemischer Nachweis von KLF-8 in WHO°III-Gliomen

KLF-8 war in 2/4 WHO°III-Proben mittelgradig (s. Bild) und in 2/4 Proben nicht exprimiert. 1. Skalierung 100µm, 2. Skalierung 50µm

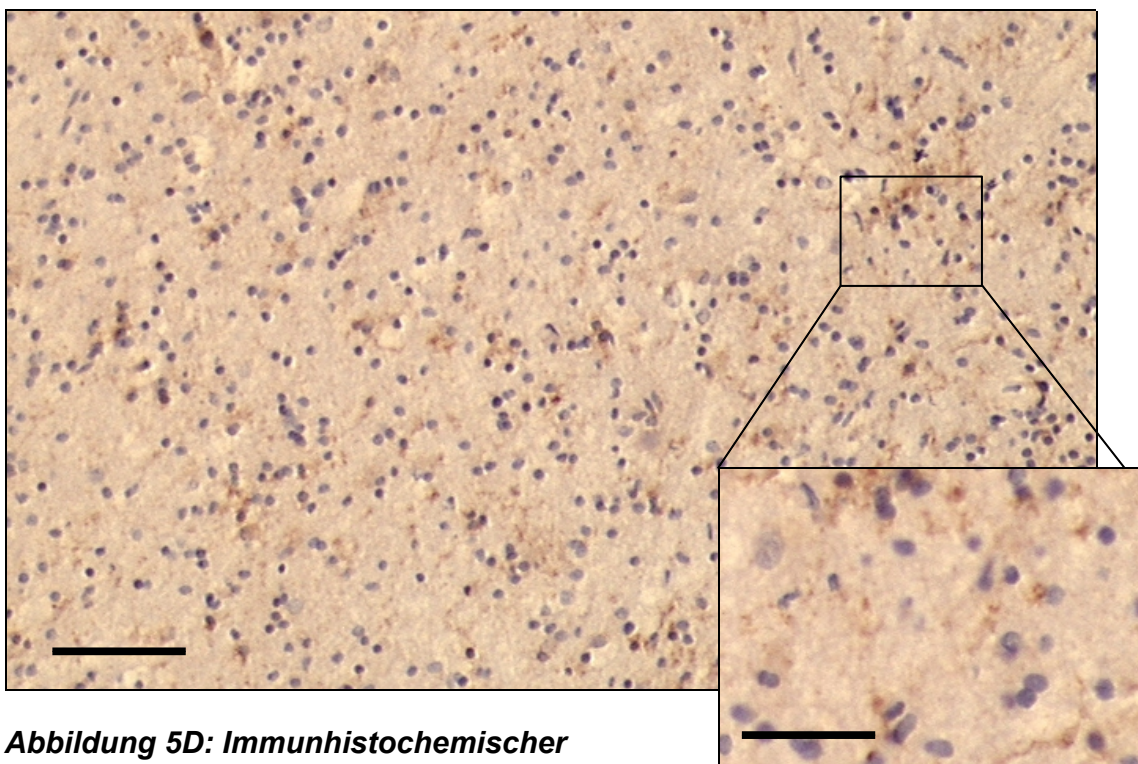


Abbildung 5D: Immunhistochemischer Nachweis von Cyclin D1 in WHO°III-Gliomen

Das Cyclin D1 war in 1/4 WHO°III Tumoren stark, in 2/4 mittelgradig (s. Bild) und in 1/4 schwach exprimiert. 1. Skalierung 100µm, 2. Skalierung 50µm

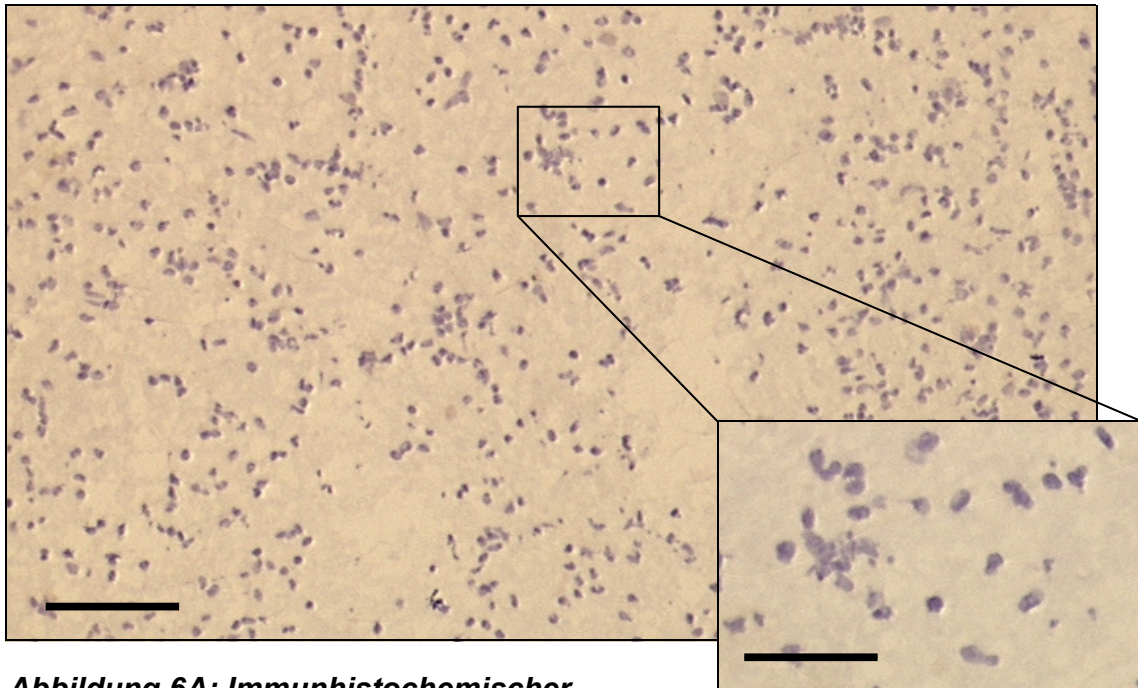


Abbildung 6A: Immunhistochemischer Nachweis von $\alpha_v\beta_3$ in WHO°II-Gliomen

In WHO°II Tumoren zeigte sich das Integrin $\alpha_v\beta_3$ in 1/4 Gliomproben schwach und in 3/4 Gliomen nicht exprimiert (s. Bild). 1. Skalierung 100 μ m, 2. Skalierung 50 μ m

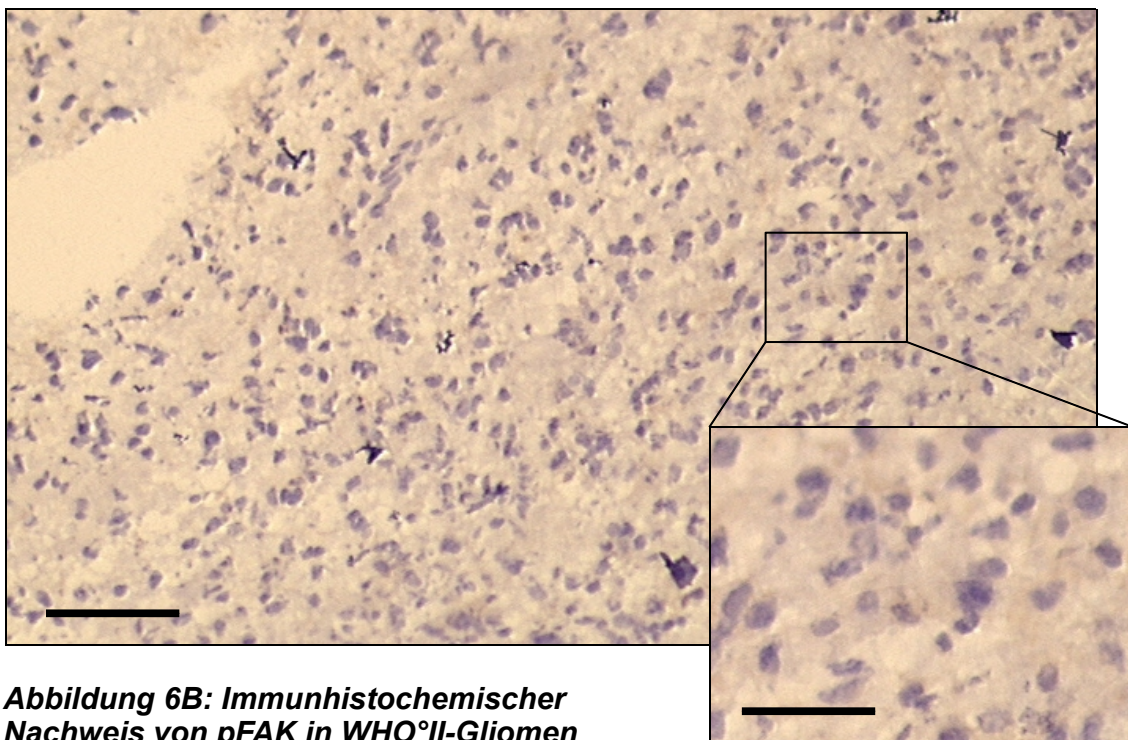


Abbildung 6B: Immunhistochemischer Nachweis von pFAK in WHO°II-Gliomen

Die Tyrosinkinase pFAK fand sich in 1/4 WHO°II-Tumoren mittelgradig, in 1/4 WHO°II-Tumore schwach und in 2/4 WHO°II Gliomen nicht exprimiert (s. Bild). 1. Skalierung 100 μ m, 2. Skalierung 50 μ m

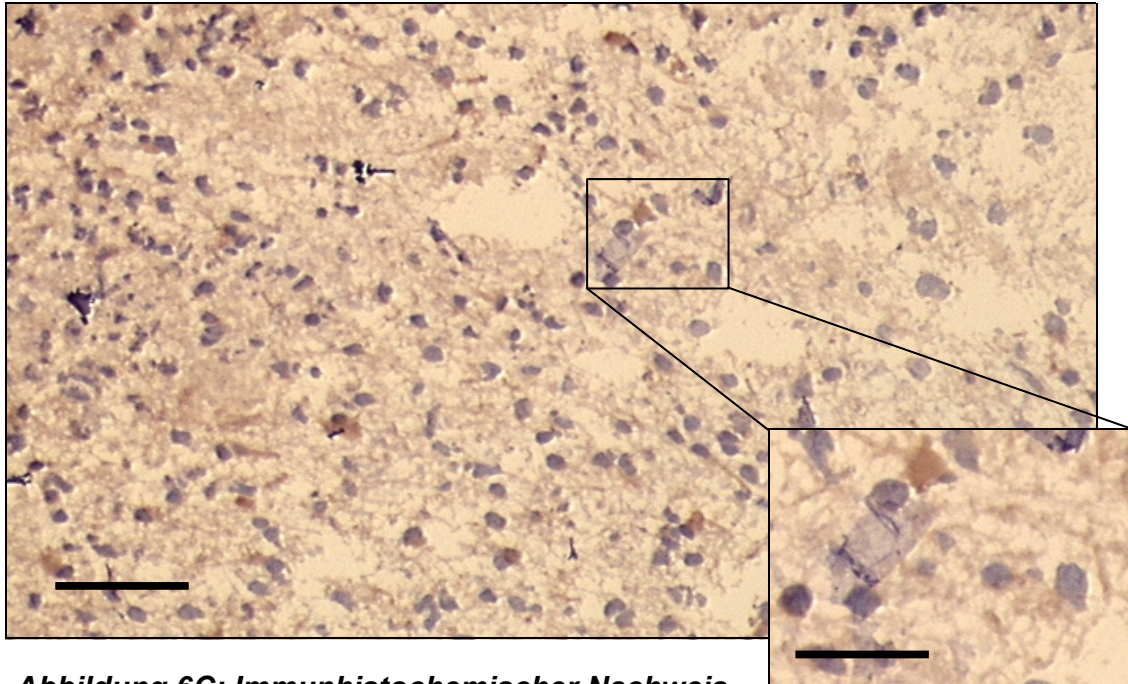


Abbildung 6C: Immunhistochemischer Nachweis von KLF-8 in WHO°II-Gliomen

KLF-8 war in 3/4 WHO°II-Proben mittelgradig (s. Bild) und in 1/4 Proben nicht exprimiert. 1. Skalierung 100µm, 2. Skalierung 50µm

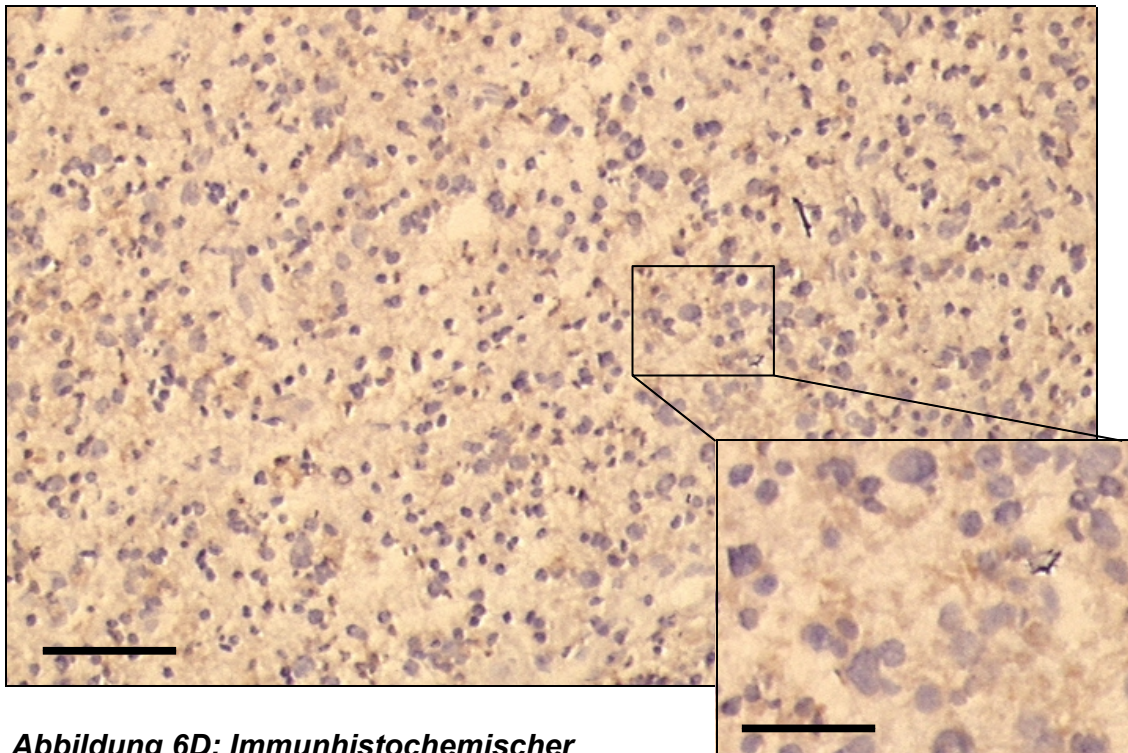


Abbildung 6D: Immunhistochemischer Nachweis von Cyclin D1 in WHO°II-Gliomen

Das Cyclin D1 war in 3/4 WHO°II Tumoren schwach (s. Bild) und in 1/4 Proben nicht exprimiert. 1. Skalierung 100µm, 2. Skalierung 50µm

In einer weiterführenden semiquantitativen Analyse des Transkriptionsfaktors wurde die Anzahl der KLF-8 immunopositiven Zellen in das Verhältnis mit allen Zellen des ausgewerteten Tumorareals gesetzt. Hier zeigte sich im Anteil KLF-8-positiver Zellen zwischen WHO°IV-Tumore (89%; $\pm 27\%$), WHO°III-Tumore (80%; $\pm 16\%$) und WHO°II-Tumore (87%; $\pm 16\%$) kein wesentlicher Unterschied (s. Abb. 7: A, D, G). Zur Korrelation mit dem als proliferationsfördernden Faktor beschriebenen KLF-8 wurde in Proben aus benachbarten Tumorarealen die Expression des als Proliferationsindex beschriebenen Markers Ki67 bestimmt. Hier zeigten sich quantitative Expressionsunterschiede zwischen hoch- und niedriggradigen Tumor-Dignitäten (WHO°IV- und WHO°II-Proben), jedoch keine Signifikanz zwischen WHO°IV- und WHO°III-Tumore. Die Ki67 Expression betrug 15% ($\pm 4\%$) in den WHO°IV-Gliomen, 6% ($\pm 4\%$) in den WHO°III-Gliomen und 9% ($\pm 14\%$) in den WHO°II-Gliomen (s. Abb. 7: B, E, H). Zusätzlich wurde die KLF-Expression in nicht-neoplastischem ZNS-Gewebe, Meningeomen unterschiedlichen WHO Grades und Mammakarzinom-Metastasen untersucht. In allen untersuchten Proben zeigte sich eine ubiquitäre Expression des Transkriptionsfaktors (s. Abb. 9).

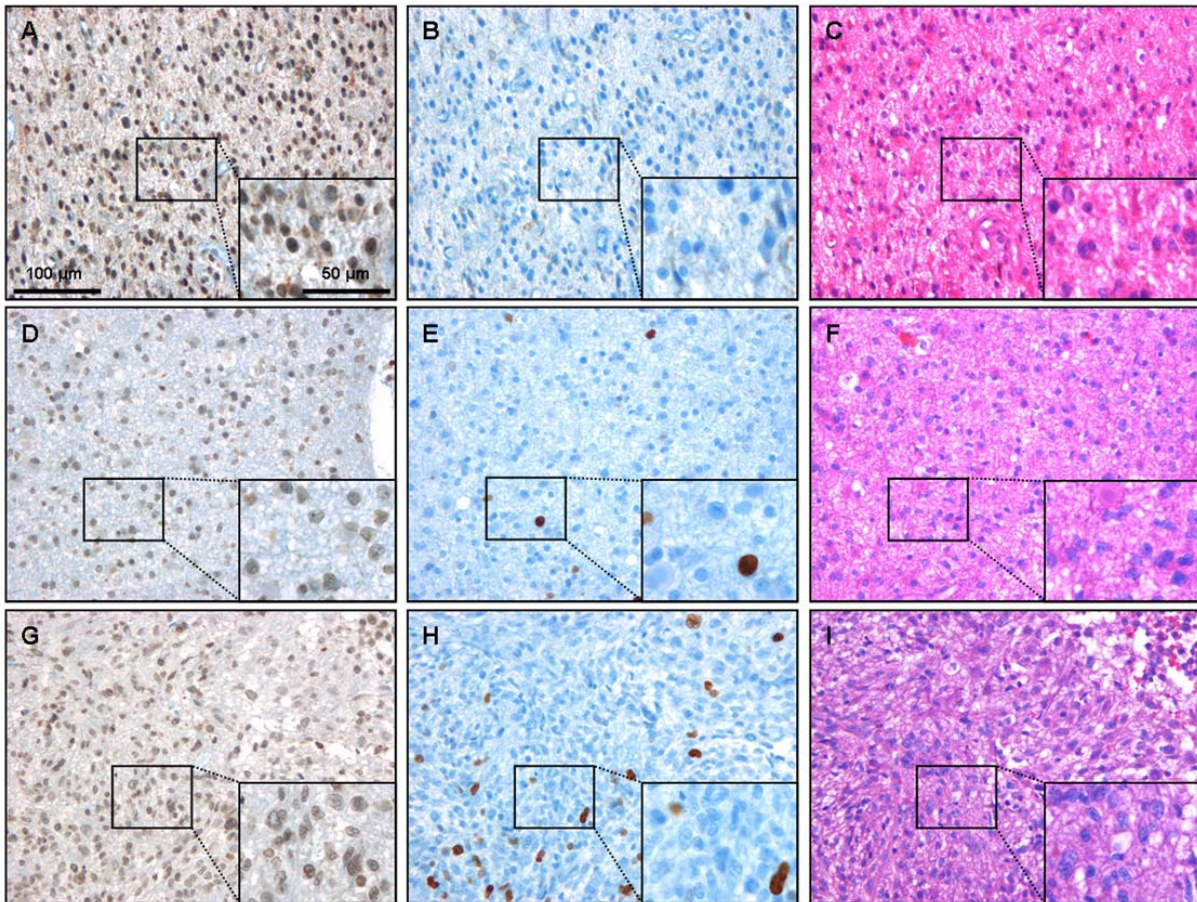


Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von KLF-8 (A) und Ki67 (B) in WHO°IV-Gliomen, WHO°III-Gliomen (KLF-8 D; Ki67 E) und WHO°II-Gliomen (KLF-8 G; Ki67 H sowie HE-Proben C,F,I)

Der Transkriptionsfaktor KLF-8 findet sich in WHO°IV-Gliomen stark exprimiert (A), der Hauptanteil der Expression findet sich in zellreichen Arealen, vaskuläre Strukturen erscheinen weniger immunopositiv, in WHO°III-Gliomen (D) und in WHO°II-Gliomen (G) findet sich ebenfalls eine ausgeprägte KLF-8-Expression. Es lässt sich keine klare Abhängigkeit zwischen der relativen Expression des Transkriptionsfaktors KLF-8 und der Tumor-Dignität nachweisen.

Der Proliferationsmarker Ki67 zeigt in WHO°IV-Gliomen (B) eine stärkere Expression als in WHO°II-Gliomen (E) in der Auszählung jedoch nicht als WHO°III-Gliome (D).

In Zusammenschau aller Proben unterschiedlichen WHO Grades zeigt Ki67 ein deutlich niedrigeres Expressiosprofil als KLF-8.

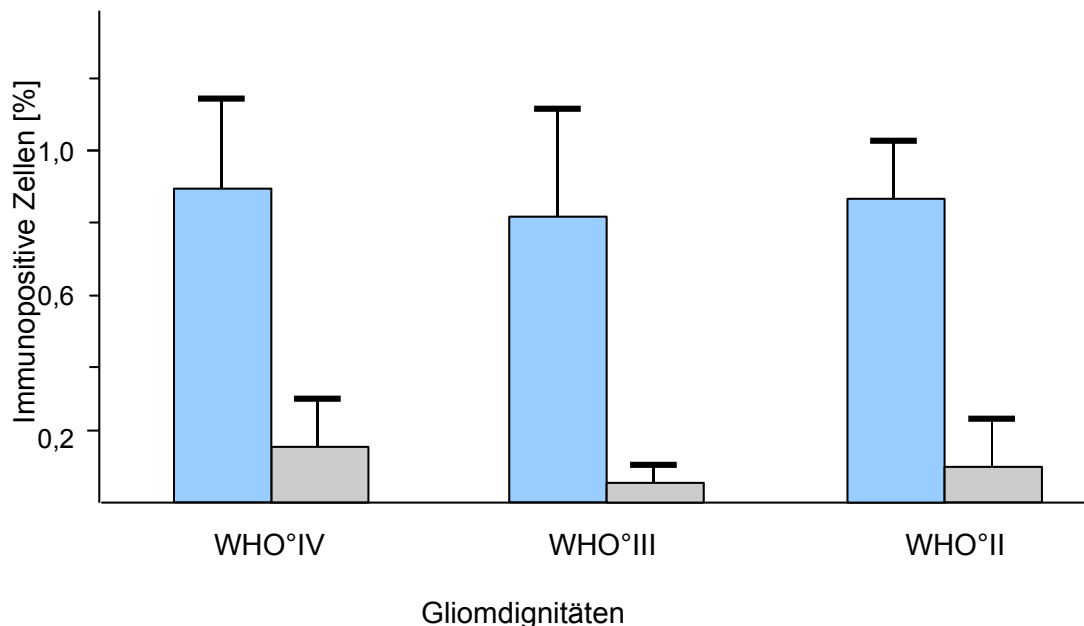


Abbildung 8: Relative Quantifizierung der KLF-8-Expression (blau) und der Ki67-Expression (grau) in Gliomen unterschiedlichen WHO Grades.

KLF-8 zeigt im Vergleich zu Ki67 eine stärkere Expression in allen untersuchten Proben: 89% ($\pm 27\%$) in WHO°IV-Gliomen, 80% ($\pm 31\%$) in WHO°III-Gliomen, 87% ($\pm 16\%$) in WHO°II-Gliomen.

Ki67 zeigt eine deutlich niedrigere Expression: in WHO°IV-Gliomen 15%; $\pm 14\%$, in WHO°III-Gliomen 6%; $\pm 4\%$ und in WHO°II-Gliomen 9%; $\pm 14\%$.

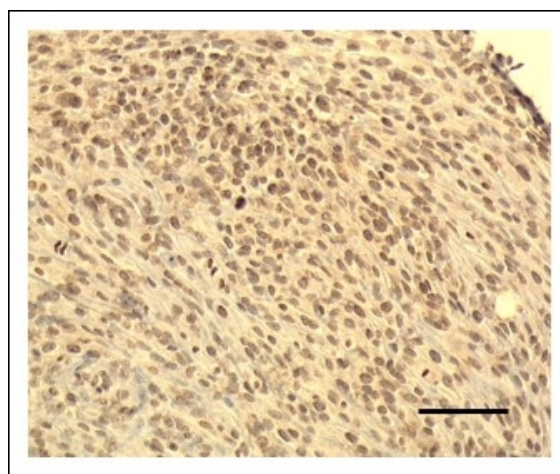


Abbildung 9: Nachweis der KLF-8 Expression in nicht-glialem ZNS-Gewebe neoplastischen und nicht-neoplastischen Ursprungs (hier Meningeom-Probe)

KLF-8 zeigt sich in den getesteten Proben (jeweils 3 Proben für Metastasen eines Mammakarzinoms, Meningeome, nichtneoplastisches ZNS-Gewebe) unabhängig von der Tumor-Dignität ubiquitär exprimiert. Skalierung: 100 μ m

3.1.2. Immunzytochemie von Zellkulturen aus Zelllinien und primärem Tumorgewebe

In der Immunzytochemie fand sich KLF-8 in der U87-MG Zelllinie und in der Primärkultur exprimiert. Die gefärbten Signalkaskadenmoleküle zeigten folgendes Verteilungsmuster: Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ und die Tyrosinkinase pFAK zeigten sich membranständig, während der Transkriptionsfaktor und das Cyclin D1 vor allem im Zellkern lokalisiert war.

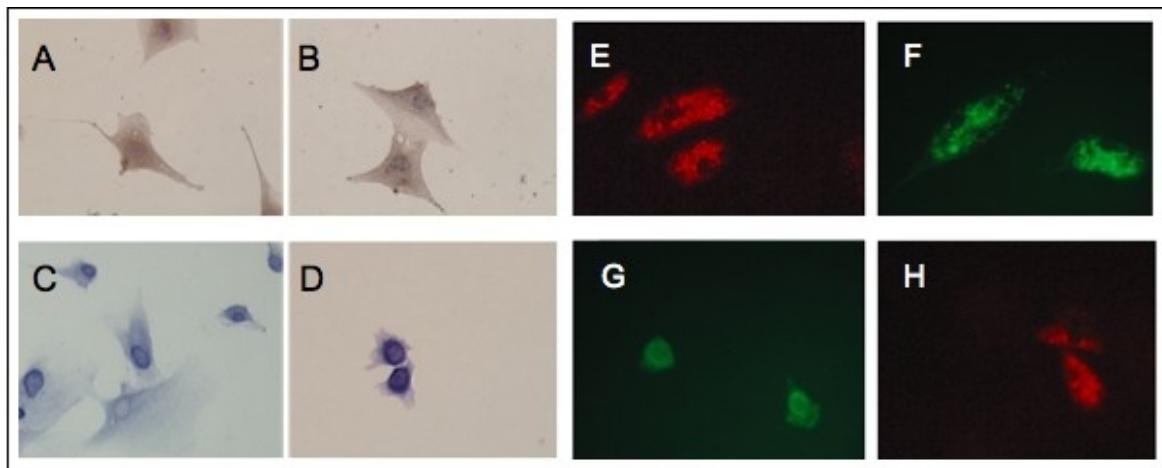


Abbildung 10: Immunzytochemie für die Signalkaskadenmoleküle in U87-MG (A-D) und in der Primärzellkultur (E-H)

U87-MG-Zellen zeigen in der Immunzytochemie für $\alpha_v\beta_3$ (A) und pFAK (B) ein Membran-assoziiertes Expressionsmuster, wogegen KLF-8 (C) und Cyclin D1 (D) Zellkern-assoziiert nachweisbar sind. Ein analoges Verteilungsmuster findet sich auch im Glioblastom-Primärisolat (in der Zellmembran $\alpha_v\beta_3$ [E] und pFAK [F] und Zellkern-assoziiert KLF-8 [G] und Cyclin D1 [H]). A und B Visualisierung mit DAB, C und D Visualisierung mit BCIP/NBT, E-H Visualisierung mit fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörpern.

3.1.3. Western Blot der Tumorgewebsproben

Der Western Blot diente sowohl der Erhärtung der immunhistochemischen Ergebnisse als auch der Expressionsquantifizierung des Proteins KLF-8 in 10 Gliomen vom WHO Grad IV und in 10 Gliomen vom WHO Grad II.

Wie in 2.2.3 erläutert, waren die initialen Western Blot-Versuche von unspezifischen Antikörper-Bindungen hinsichtlich des KLF-8 Proteins charakterisiert:

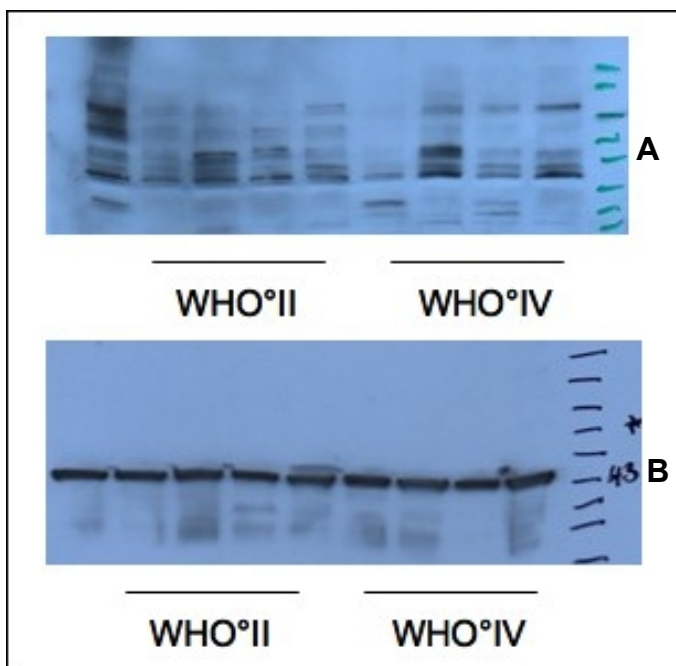


Abbildung 11: Western Blot Vorversuche (A: KLF-8; B: beta-Aktin)

In den untersuchten Proben (4 WHO°IV Tumore und 4 WHO°II Tumore) zeigen sich in der KLF-8 Färbung (A) multiple unspezifische Antikörper-Bindungen mit dem initial verwendeten Antikörper, bei gutem Signal des house keeping genes beta-Aktin (B).

In dem daraufhin entwickelten Protokoll (mod. Antikörper und Blockierungsreagenz, siehe 2.2.3.) zeigte sich KLF-8 wie in den immunhistochemischen Untersuchungen in den GBM-Proben bei 36,89 kDa in GBM ($1,06 \pm 0,52$) nicht signifikant stärker exprimiert als in niedriggradigen Astrozytomen ($0,93 \pm 0,72$). Somit bestätigte sich die KLF-8-Expression als ubiquitär und unabhängig von Tumordignität sowie Proliferationsrate (s. Abb. 12).

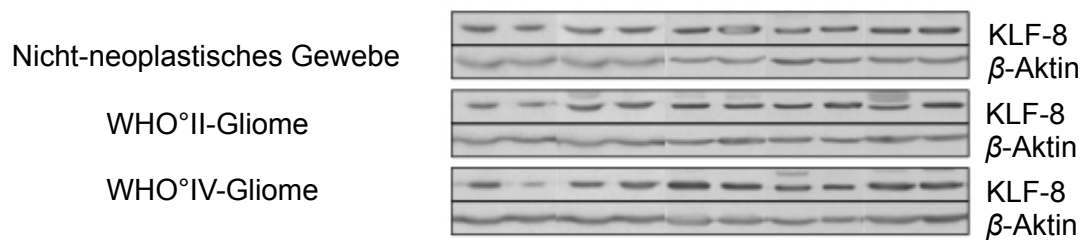


Abbildung 12. Western Blot für KLF-8 für Gliome vom WHO Grad IV und vom WHO Grad II

In der Western Blot Untersuchung bestätigen sich die immunhistochemischen Ergebnisse. KLF-8 zeigt sich in WHO°IV-Tumore nicht höher exprimiert als in WHO°II-Tumore. In der statistischen Auswertung mittels t-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,005$). Die Expression von KLF-8 in WHO°IV-Tumore beträgt 106%, die Expression in WHO°II-Tumore beträgt 93% (Normierung auf beta-Aktin als 100%).

3.1.4. PCR der Tumorgewebsproben

Zur semiquantitativen Analyse wurde der mRNA-Gehalt von KLF-8 in den Gliomproben weiterführend mittels qPCR untersucht: Hierbei zeigte sich in den höhergradigen Gliomen (10 WHO°IV-Tumore) ein mRNA Gehalt von 99,11%, niedriggradige Gliome (10 WHO°II-Tumore) wiesen einen mRNA Gehalt von 101,7% auf. Hiermit fand sich auch kein offensichtlicher quantitativer Unterschied in der KLF-8 Expression auf mRNA-Ebene.

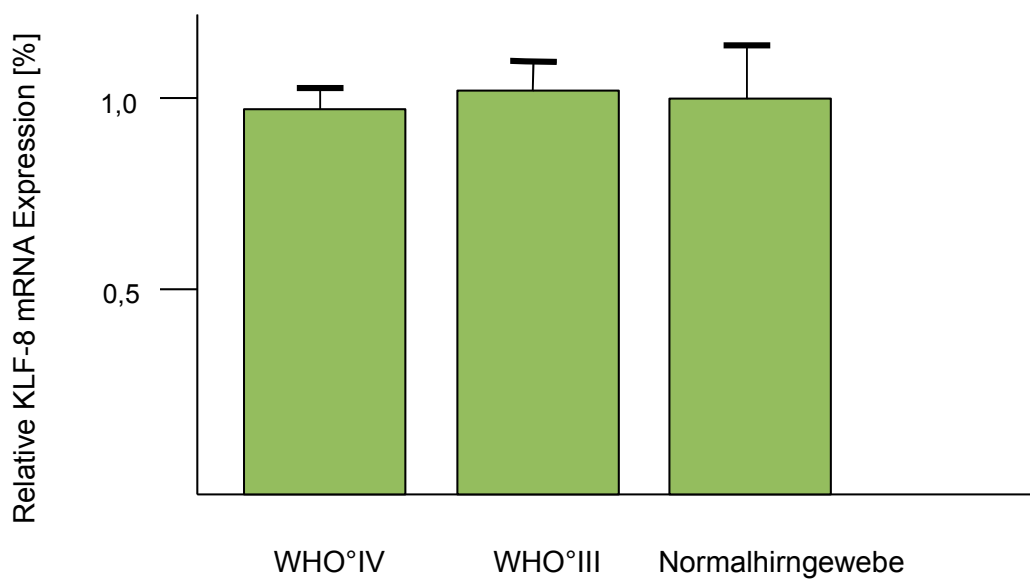


Abbildung 13. KLF-8 mRNA-Gehalt Gliome unterschiedlicher Dignität sowie Normalhirngewebe

In der semiquantitativen PCR lässt sich kein quantitativer Unterschied in der Expression in WHO°IV-Gliome (99,11%) vs. WHO°II-Gliome (101,7%) feststellen (Normalhirngewebe 100%).

3.2. Funktionelle Untersuchungen

3.2.1. mRNA-Gehalt von KLF-8 nach shRNA Knockdown in U87 MG Zellen

In der semiquantitativen Bestimmung des KLF-8 mRNA Gehaltes nach shRNA Knockdown mittels PCR fand sich in der semiquantitativen RT-PCR 48h nach shRNA Transfektion (Tag 0) ein KLF-8 mRNA-Gehalt von 37,28% ($\pm 23,08\%$), 72h nach Transfektion (Tag 1) ein KLF-8 mRNA-Gehalt von 22,02% ($\pm 14,23\%$) und 96h nach Transfektion (Tag 2) der niedrigste mRNA-Gehalt von 10,07% ($\pm 6,6\%$).

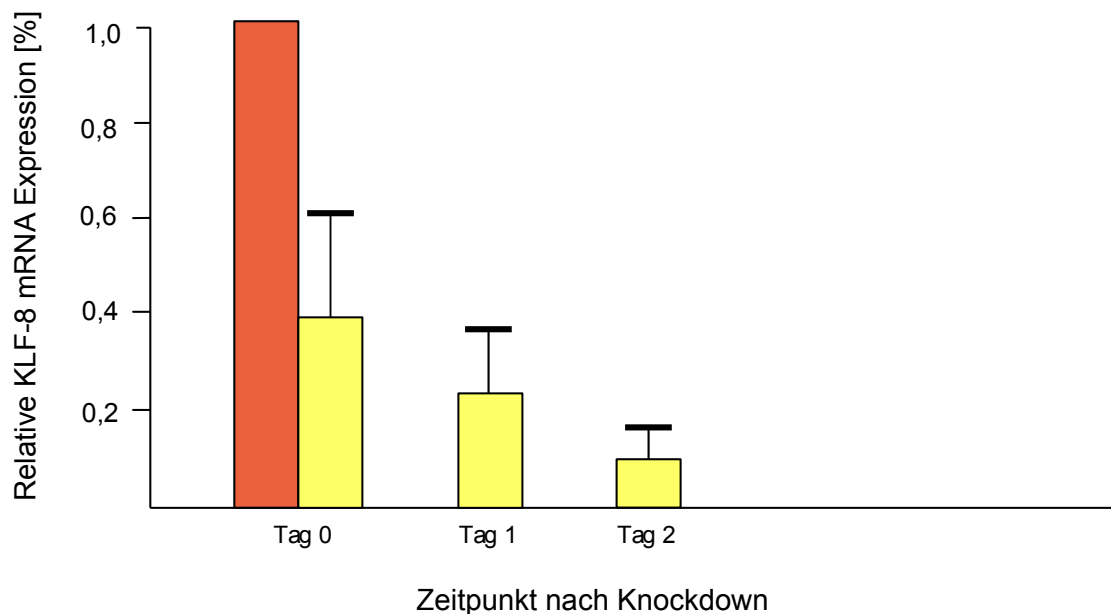


Abbildung 14. Relativer KLF-8 mRNA-Gehalt in U87 MG Zellen nach Knockdown mit shRNA

Die U87 MG Gliomzellen weisen nach Knockdown mit KLF-8 shRNA (gelb) eine erniedrigte Transkription der KLF-8 mRNA gegenüber den mit scrambled shRNA (scr; rot) behandelten Zellen auf, schon 48 Stunden nach Aussaat zeigte sich ein deutlicher Knockdown-Erfolg (Ergebnisse wurden auf das house keeping gene TBP normalisiert).

3.2.2. Zellzahl von U87 MG nach KLF-8 Knockdown

Zur Beurteilung der Zellzahl nach Inhibition von KLF-8 wurden die glialen Tumorzelllinien U87-MG mit shRNA gegen KLF-8 transfiziert und von Tag 0 bis Tag 3 nach Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die mit shRNA gegen KLF-8 behandelte Zellpopulation zeigte im untersuchten Zeitrahmen im Vergleich zur mit scrambled shRNA transfizierten Gruppe eine signifikante Zellzahl-Verringerung. Im Vergleich zur scramble shRNA Kontrolle zeigte die mit KLF-8 shRNA transfizierte U87 MG Gruppe eine statistisch signifikante Einschränkung der Zellzahl ($p < 0,001$ in der ANOVA-Testung; s. Abb. 15). Als zytomorphologischer Korrelat zeigten sich ferner sowohl adhärenente Zellen mit Ausläufern als auch pyknotische Zellstrukturen.

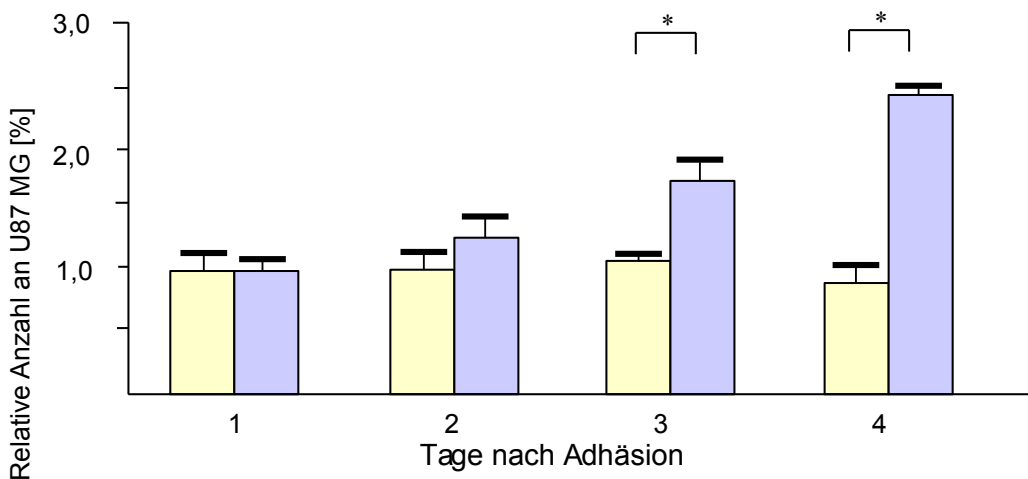


Abbildung 15. Zahl der U87 MG Zellen nach KLF8 shRNA Knockdown (gelb) im Vergleich zu einer Behandlung mit scramble shRNA (blau)

Die Knockdown-Gruppe (gelb) zeigt eine ausgeprägte Verringerung der Zellzahl im Vergleich zur scramble Kontrolle (blau). Im Gegensatz zur scramble Kontrolle lässt sich eine stete Abnahme der Zellzahl der Probe beobachten (Ausgangswert aller Gruppen ist 40 000 - 43 000 Zellen, Tag 0 wird als 100% gewertet.)

4. Diskussion

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die KLF-8 vermittelte Signaltransduktionskaskade im primären Gliom-Gewebe proteinbiochemisch charakterisiert. Mit Immunhistochemie, Immunzytochemie, Western Blot und PCR konnte die Expression der Signalkaskadenmoleküle und KLF-8 in primären Tumorproben gezeigt und quantifiziert werden (1). Desweiteren ließ sich nachweisen, dass das relative Expressions-Ausmaß von KLF-8 nicht vom WHO Grad des Glioms abhängig war (2) und nicht mit dem als Proliferationsmarker bekannten Faktor Ki67 korrelierte (3).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die funktionelle Bedeutung eines Knockdowns des Transkriptionsfaktors KLF-8 in Hinblick auf die Gliomzell-Proliferation untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Proliferationshemmung der mit shRNA behandelten U87-MG Gliomzellen ohne relevanten Adhäsionsverlust (5).

4.1. Charakterisierung der KLF-8 Signalkaskaden-Moleküle

4.1.1. Expression von $\alpha_v\beta_3$, pFAK, KLF-8 und Cyclin D1 in Gliomen

Bisherige Daten zu der KLF-8-Signalkaskade stammen aus in vitro Modellen zur Untersuchung funktioneller Zusammenhänge. So bedienten sich Zhao und Mitarbeiter einer FAK-überexprimierenden NIH3T3 Fibroblasten-Zelllinie (*Tet-off NIH3T3*), Ding und Mitarbeiter bedienten sich der etablierten U251MG Gliom-Zelllinie (Zhao J et al., 2003; Ding Q et al., 2005). Im Wesentlichen gelang es Zhao mit seinem Modell den Zusammenhang zwischen FAK und KLF-8 erstmalig zu beschreiben: Das NIH3T3-Fibroblasten-Konstrukt exprimierte keinen Transkriptionsfaktor KLF-8, sobald es in Tetracyclin-haltigem Medium gezüchtet wurde. Tetrazyklin-Entzug führte zu einer Expressionsinduktion von KLF-8, einer verstärkten Bildung von Cyclin D1, überschießendem Zellwachstum und zu

zellmorphologischen Veränderungen im Sinne einer neoplastischen Phänotypisierung der Zellen. Ding und Mitarbeiter zeigten erstmalig in ihrem U251MG-Modell, wie eine FAK-Hochregulation durch Wildtyp FAK in den Gliomzellen ebenso zu einer Hochregulation von KLF-8, Cyclin D1 und zu einer massiven Zellzyklusprogression führte. Im Gegensatz zu diesen Modellen war das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit der erstmalige Nachweis der besagten Kaskadenbestandteile am primären Gliom-Gewebe. Dabei waren die wesentlichen Fragestellungen der semiquantitative Expressions-Nachweis und die Expressions-Topographie.

Immunhistochemisch konnten die einzelnen Kaskaden-Moleküle ($\alpha_v\beta_3$, FAK, KLF-8 und Cyclin D1) in allen untersuchten Gliom-Proben nachgewiesen werden. Bei vorbeschriebener Expression von $\alpha_v\beta_3$, pFAK und Cyclin D1 in malignen Gliomen (Gladson CL et al., 1996; Hecker TP et al., 2002; Sallinen SL et al., 1999) ist dies der erste Nachweis vom Transkriptionsfaktor KLF-8 in primären glialen Tumor-Proben. Somit scheint eine Beteiligung des Faktors auch am Wachstum glialer Tumorzellen -wie aus der Literatur bereits für periphere Tumoren bekannt- prinzipiell möglich (Fu WJ et al., 2010; Li JC et al., 2010).

Hinsichtlich der Expressions-Topographie ist zu erwähnen, dass die Endothelzell-assoziierte Expression der Faktoren $\alpha_v\beta_3$ mehrfach belegt ist (Gladson CL et al., 1996; Bello L et al., 2001; Schnell O et al., 2008). Ebenso ist eine Zellkern-nahe Expression von Cyclin D1 in Gliomen bekannt (Cavalla P et al., 1998). In Hinblick auf die in dieser Arbeit nachgewiesene ubiquitäre Verteilung der KLF-8 immunpositiven Zellen sind Rückschlüsse zu präferentiellen Expressionsmuster des Faktors schwierig. Letztendlich kann auf dem Boden der vorliegenden Daten auch eine vaskuläre Beteiligung des KL-Faktors nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. In diesem Kontext ist auch eine Beteiligung vieler Transkriptionsfaktoren aus der KLF-Familie (KLF-1, KLF-2, KLF-4, KLF-5, KLF-6) an der Vaskulogenese und Hämatopoese erwähnenswert.

Aussagen zu einer möglichen Häufung des Transkriptionsfaktors an der Tumorperipherie oder Tumor-Infiltrationszone lassen sich anhand der vorliegenden Daten nicht treffen (im Sinne eines „Invading edge of the glioma“-Konzeptes wie in der Literatur u.a. für $\alpha_v\beta_3$ postuliert; Bello L et al., 2001), da die KLF-8 Expression in den untersuchten Tumorproben ein ubiquitäres Verteilungsmuster aufwies.

In den immunzytochemischen Untersuchungen der U87-MG Zelllinie sollte die topographische Verteilung der Kaskadenmoleküle auf Zellebene betrachtet werden: $\alpha_v\beta_3$ und pFAK waren vor allem membranständig zu finden, wogegen KLF-8 und Cyclin D1 im Zellkern lokalisiert waren. Dieses nachgewiesene Expressionsverteilungsmuster auf Zellebene ist für $\alpha_v\beta_3$, pFAK und Cyclin D1 aus der Literatur in Gliomen bekannt (Riemenschneider MJ et al., 2005). Es handelt sich hierbei um zytochemische Daten, Aussagen zu möglichen synergistischen Funktionen von kolokalisierten Faktoren sind somit spekulativ und bedürfen weiterführender funktioneller Untersuchungen. Abschließend fanden sich KLF-8-immunopositive Zellkerne auch an einem Primärisolat eines Glioblastoms, was die immunhistochemischen Ergebnisse einer Zellkern-assoziierten Expression (soweit einschränkend an einem einzelnen exemplarisch untersuchten Isolat beurteilbar) ergänzte.

In diesem Zusammenhang soll nicht nur in Hinblick auf zukünftige Untersuchungen des zellulären Verteilungsmusters von KLF-8 darauf hingewiesen werden, dass gezielte topographische Informationen für die Galenik der „Targeted Therapy“ große klinische Relevanz haben. So kann beispielsweise bei einem vornehmlich vaskulär exprimierten Molekül von einer vornehmlich Endothelzell-assoziierten Medikamentenverteilung bei intravenöser Applikation ausgegangen werden (Schnell O et al., 2008).

4.1.2. Unabhängigkeit zwischen der Expression von KLF-8 und der Gliom-Dignität

Aus der Literatur ist eine Korrelation des Expressionsausmaßes der Kaskaden-Moleküle $\alpha_v\beta_3$, pFAK, Cyclin D1 und dem WHO Grad des untersuchten Glioms bekannt: In malignen Tumoren fand sich eine höhere Expression im Vergleich zu niedriggradigen Tumoren (zu $\alpha_v\beta_3$: Schnell O et al., 2008; zu pFAK: Hecker TP et al., 2002 und zu Cyclin D1: Sallinen SL et al., 1999). Im Unterschied zu Untersuchungen aus der Literatur über eine vermehrte Expression des KLF-8 Faktors in peripheren Tumoren (hepatozelluläres Karzinom, Nierenzellkarzinom) konnte in der vorliegenden Arbeit weder immunhistochemisch noch in der Western Blot Analyse

eine Korrelation zwischen Gliom-Dignität und relativer KLF-8 Expression nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür könnte der mesenchymale Ursprung der in der Literatur untersuchten Tumorentitäten sein, da dem KLF-Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der tumorösen Transition von epithelial zu mesenchymal obliegt (Fu WJ et al., 2010; Li JC et al., 2010). Letztlich muss -wie bereits im Jahr 2000 in der Erstbeschreibung des Faktors angedeutet- von einer ubiquitären Expression von KLF-8 ausgegangen werden (Van Vliet J et al., 2000). Die Frage nach möglichen Regulationsmechanismen dieser ubiquitären KLF-8-Expression war kein Ziel dieser Arbeit, ist jedoch Gegenstand akuteller Forschung. Eine Vielzahl posttranskriptioneller Modifizierungen wird hierbei intensiv untersucht. So wurde im NIH3T3-Modell die sog. „Sumoylierung“ beschrieben (Wei H et al., 2006). Es handelt sich dabei um eine besondere Form von posttranskriptioneller Modifizierung, welche eine sehr rasche Konformations- und Funktionsänderung des KLF-8-Proteins erlaubt. Dabei werden 3 kleine Ubiquitin-ähnliche Proteine („Small Ubiquitin like Modifier“, SUMOs) an das Akzeptorprotein gebunden, daraus resultieren eine Expressions- und somit Funktionshemmung (d.h. möglicherweise eine Proliferationshemmung.) Weitere Formen der posttranskriptionellen Modifizierung, wie etwa die Acetylierung oder Interaktion mit der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP-1) werden ebenso untersucht (Lu H et al., 2011; Urvalek AM et al., 2011; Eaton SA et al., 2008). Auch Interaktionen mit anderen Mitglieder der KLF-Familie werden diskutiert: An einem in vivo Modell konnte beispielsweise die Interaktion (hemmende Funktion) des Krüppel-like-Faktors 3 (KLF-3) mit KLF-8 analysiert werden (Eaton SA et al., 2008).

4.1.3. KLF-8 und der Proliferationsmarker Ki67 in Gliomen

Zur besseren Charakterisierung einer etwaigen proliferativen Funktion des Transkriptionsfaktors KLF-8 im malignen Gliom wurden zusätzlich konsekutive Schnitte auf den als Proliferationsmarker bekannten Faktor Ki67 gefärbt (Johannessen AL und Torp, SH, 2006). Bei einer deutlich höheren Expressionsrate des Transkriptionsfaktors KLF-8 konnte keine Korrelation zur Expression von Ki67 gefunden werden. Ferner zeigte sich zwischen hoch- und niedriggradigen Tumoren

(WHO°IV und WHO°II) eine Tendenz zur gradabhängigen Expression bei einem höheren Ki67 Proliferationsindex in hochgradigen Tumoren. Dies ließ sich zwischen WHO°IV- und WHO°III-Gliomen nicht reproduzieren. Letztere zeigten eine z.T. höhere Expression als WHO°IV-Gliome. Auch in der Literatur finden sich mehrfach Inkonsistenzen zwischen histologischem Tumorgrad und dem Ki67 Proliferationsindex (Torp SH, 2002; Hsu DW et al., 1997) obwohl er als etablierter Marker im klinischen Kontext auch zur Therapieentscheidung zu Rate gezogen wird. Zusammenfassend besteht keine Korrelation zwischen der relativen Expression von KLF-8 und Ki67. Zudem bekräftigen diese Untersuchungen Daten aus der Literatur, wonach ein Ki67 Proliferationsindex im klinischen Rahmen genau geprüft werden muss und nicht die alleinige Basis einer Therapieentscheidung darstellen kann (Johannessen AL und Torp, SH, 2006; Quiñones-Hinojosa A et al; 2005).

4.2. Funktionelle Untersuchungen zur KLF-8-Signalkaskade

4.2.1. Tumor-Proliferation nach KLF-8 Knockdown

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die funktionelle Bedeutung eines Knockdowns des Transkriptionsfaktors KLF-8 in Gliomzellen erörtert werden. Die entscheidende Fragestellung hierbei war, wie sich die Hemmung eines aus der Literatur als proliferationsfördernd vorbeschriebenen Faktors auf das gliale Tumorzell-Wachstum auswirken würde. Klinischer Hintergrund hierfür waren erste vielversprechende Ergebnisse von Studien zum Integrin-Targeting in malignen Gliomen (Nabors LB et al 2007; Reardon DA et al 2008): Es stellte sich somit die Frage, ob die Hemmung eines vom Integrin stromabwärts gelegenen gemeinsamen Faktors mehrerer Kaskaden eine effektivere Wachstumshemmung der malignen Zellpopulation oder sogar einen signifikanten zytoreduktiven Effekt erzielen könnte. Mit diesem Hintergrund wurde im zweiten Teil der Arbeit die Hemmung von KLF-8 als mögliches gemeinsames Zielmolekül verschiedener Signalkaskaden untersucht. In der U87-MG-Zelllinie erfolgte mittels RNA-Interferenz durch shRNA ein Knockdown von KLF-8. Hierbei zeigte sich eine signifikante Proliferationshemmung. Diese

beobachtete Proliferationshemmung zeigte sich jeweils im Vergleich von der KLF-8-Knockdown-Gruppe zu den mit scrambled shRNA behandelten Zellen signifikant (Abb. 14). Ein Erklärungsansatz für diese beobachtete Proliferationshemmung könnte eine verminderte G₁/S-Progression (=„Replikation“) sein. Dennoch ist die FAK-getriggerte Cyclin D1 Aktivierung nicht allein als KLF-8 vermittelt beschrieben. Synergistisch zu KLF-8 aktiviert etwa auch der Transkriptionsfaktor Ets-b das Cyclin D1 und den CDK4/CDK6-Komplex (Cox BD et al., 2006; Zhao J et al., 2003). Ob es durch diese KLF-8 Hemmung zu einer reaktiv vermehrten Ets-b Expression kommt, ist ungewiss. Offensichtlich kann aber dadurch die Hemmung der KLF-8 geförderten Proliferaton nicht genügend kompensiert werden, was sich in einer reduzierten Zellteilung zeigt. Zellmorphologisch konnte zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung der adhäsiven Eigenschaften durch den KLF-8 Knockdown beobachtet werden. Hinsichtlich einer möglichen Apoptose-Induktion nach Knockdown ist erwähnenswert, dass in der Literatur sowohl im NIH3T3-Modell als auch in den U251MG Zellen nach KLF-8-Hemmung hauptsächlich ein Zellzyklus-Arrest beschrieben wird. Mögliche damit assoziierte apoptotische Mechanismen werden nicht erörtert (Zhao J et al., 2003). Anhand der vorliegenden Untersuchungen kann eine nach KLF-8 Hemmung induzierte Seneszenz vs. Apoptose bzw. mögliche damit verbundene Feedbackmechanismen (z.B. pro-apoptotische und anti-apoptotische duale Funktion der Tyrosinkinase FAK) in Gliomen letztlich nicht geklärt werden. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ein Knockdown von KLF-8 in U87 MG Gliomzellen zu einer deutlichen Verringerung der Zellzahl führt. Damit möglicherweise getriggerte Apoptosemechanismen und Feedback-Mechanismen innerhalb der KLF-8 Kaskade sind zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt und sollten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.3. Überlegungen zur Inhibition von KLF-8 und $\alpha_v\beta_3$ und Ausblick

Eine in 4.2.1. weiterführende Fragestellung dieser Arbeit war, ob die Inhibition eines vom Integrin $\alpha_v\beta_3$ stromabwärts gelegenen gemeinsamen Faktors mehrerer Kaskaden eine effektivere Wachstumshemmung der malignen Zellpopulation oder

sogar einen signifikanten zytoreduktiven Effekt im Vergleich zur direkten Integrin-Hemmung erzielen könnte. So hat sich ein derartiges Targeting stromabwärts gelegener Schlüsselmoleküle mehrerer Signalkaskaden bereits in einigen peripheren Tumoren bewährt (z.B. in der Therapie der chronisch-myeloischer Leukämie; Druker BJ et al., 2006; Krause DS und Van Etten RA, 2005).

Der KLF-8 Knockdown hat in der vorliegenden Arbeit zu einer nachhaltigen Proliferationsbeeinträchtigung geführt. Eine zukünftige in vivo Anwendbarkeit erscheint allerdings momentan -auf dem Boden der morphologischen Ergebnisse (weitgehend ubiquitäre Expression)- durch eine möglicherweise damit verbundene Toxizität beschränkt. Im Gegensatz dazu sind aus der Literatur Daten bekannt, wonach eine Hemmung von $\alpha_v\beta_3$ vornehmlich zu einer Beeinträchtigung der adhäsiven Eigenschaften u.a. von Tumorendothelzellen sowie von Tumorzellen selbst führt. Dieser Adhäsionsverlust ist 2009 in einer Arbeit von Maurer GD et al. vorbeschrieben. Hier wiesen sämtliche Gliomzell-Linien (U87-MG, LN-308, LN-18, T98G, LNT-229) sowie 3 von 5 primäre Gliom-Zellkulturen (Daten in der Originalarbeit nicht gezeigt) einen ausgeprägten Adhäsionsverlust nach Behandlung mit Cilengitide auf. Mögliche durch diesen induzierten Adhäsionsverlust bedingte Apoptosemechanismen wurden beleuchtet: Ein Zusammenhang mit klassischen mitochondrialen Apoptose-Markern (Bcl-XL) konnte in den mit Cilengitide behandelten Gliomzellen nicht nachgewiesen werden dagegen ist aus älteren Untersuchungen in Endothelzellen die Initiierung des programmierten Zelltodes („Anoikis“-Apoptose) nach Behandlung mit Cilengitide sehr wohl bekannt (Maubant S et al., 2006).

Ein qualitativer Vergleich der beiden Hemmansätze bedarf somit weiterführender Untersuchungen: Bezüglich der KLF-8 Hemmung gilt es, Regulationsmechanismen zu identifizieren und im Targeting einzubeziehen, sodass eine mögliche in vivo Inhibition selektiver wird. Bezüglich der $\alpha_v\beta_3$ -Hemmung gilt es, die behandelten, inadhärenten Gliomzellen weitergehend zu charakterisieren (beispielsweise Klärung initiiertes Apoptose-Induktion vs. einer erhaltenen Vitalität der Tumorzellen).

5. Zusammenfassung

Die onkogene Funktion des Transkriptionsfaktors KLF-8 konnte in der Literatur mehrfach belegt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde KLF-8 zum ersten Mal in Gliomen sowohl morphologisch als auch in seinen funktionellen Grundzügen charakterisiert. Immunhistochemisch fand sich KLF-8 und die mit dem Transkriptionsfaktor assoziierten Signalkaskadenmoleküle $\alpha_v\beta_3$, pFAK und Cyclin D1 in malignen Gliomen exprimiert. KLF-8 selbst wurde weitergehend untersucht: Hierbei zeigte sich kein signifikanter Einfluss des WHO-Grades auf die KLF-8 Expression. Ebenso konnte keine Korrelation zum als Proliferationsindex bekannten Marker Ki67 gefunden werden. Dieser war in geringerem Ausmaß als KLF-8 exprimiert, zudem korrelierte eine vermehrte Expression des Faktors in der vorliegenden Serie nicht immer mit dem WHO Grad. Dies bekräftigt ähnliche Daten aus der Literatur, wonach Ki67 in der klinischen Therapie-Entscheidung nur im Kontext mit anderen Parametern (z.B. Molekulargenetik) zu werten ist. Zur Erörterung einer funktionellen Bedeutung des Transkriptionsfaktors KLF-8 in Hinblick auf die Tumor-Proliferation wurde der Faktor mittels shRNA gehemmt. Dies führte zu einer signifikanten Proliferationshemmung der untersuchten U87-MG Zellpopulation im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Frage, ob die Inhibition eines vom Integrin stromabwärts gelegenen gemeinsamen Faktors mehrerer Kaskaden eine effektivere Wachstumshemmung maligner Gliomzellen im Vergleich zur direkten Integrin-Hemmung darstellt, muss weitergehend untersucht werden. Hier sollten v.a. Regulationsmechanismen der KLF-8 Expression und die Vitalität der mit Cilengitide behandelten Gliom-Zellen analysiert werden.

In der modernen Gliomtherapie stehen einer immer präziser werdenden Diagnostik weiterhin großteils unbefriedigende Therapieergebnisse gegenüber. Erklärtes und vordringlichstes Ziel ist die Optimierung des Verhältnisses von Wirkung und Nebenwirkung eines Medikamentes, wofür das Targeting neuer tumorspezifischer Zielmoleküle als großer Hoffnungsträger gilt. Grundvoraussetzung bleibt die Erforschung der Biologie maligner Gliome inklusive ihrer Signalkaskaden: Die vorliegende Arbeit versteht sich durch eine Expressions- und Funktions-Analyse des Transkriptionsfaktors KLF-8 als Beitrag in diese Richtung.

6. Literaturverzeichnis

- Agochiya M, Brunton VG, Owens DW, Parkinson EK, Paraskeva C, Keith WN, Frame MC (1999) Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene* 18: 5646-5653.
- Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP (2005) Integrin structure, allostery and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 381–410.
- Bello L, Francolini M, Marthyn P, Zhang J, Carroll RS, Nikas DC, Strasser JF, Villani R, Cheresch DA, Black PM (2001) Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery* 49: 380-389.
- Bello L, Lucini V, Giussani C, Carrabba G, Pluderi M, Scaglione F, Tomei G, Villani R, Black PM, Bikfalvi A, Carroll RS (2003) IS201, a specific alphavbeta3 integrin inhibitor, reduces glioma growth in vivo. *Neurosurgery* 52: 177-185.
- Bello L, Lucini V, Costa F, Pluderi M, Giussani C, Acerbi F, Carrabba G, Pannacci M, Caronzolo D, Grosso S, Shinkaruk S, Colleoni F, Cannon X, Tomei G, Deleris G, Bikfalvi A (2004) Combinatorial administration of molecules that simultaneously inhibit angiogenesis and invasion leads to increased therapeutic efficacy in mouse models of malignant glioma. *Clin Cancer Res* 10: 4527-4537.
- Brakebush C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fässler R (1999) Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* 109: 999–1006.
- Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA (1994) Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79: 1157-1164.

- Brooks PC, Stromblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA (1995) Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 96: 1815-1822.
- Brooks PC: Role of integrins in angiogenesis (1996) *Eur J Cancer* 32A: 2423–2429.
- Cary LA, Han DC, Polte TR, Hanks SK, Guan JL (1998) Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol* 140: 211–221.
- Cavalla P, Dutto A, Piva R, Richiardi P, Grosso R, et al. (1998) Cyclin D1 expression in gliomas. *Acta Neuropathol* 95: 131-135.
- Cheresh DA, Spiro RC (1987) Biosynthetic and functional properties of an Arg-Gly-Asp-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor. *J Biol Chem* 262: 17703-17711.
- Cheresh DA (1991) Structure, function and biological properties of integrin alpha v beta 3 on human melanoma cells. *Cancer Metastasis Rev* 10: 3-10.
- Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, Merriman B, Nelson SF (2010) U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet.* 6:e1000832.
- Comoglio PM, Boccaccio C, Trusolino L (2003) Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr Opin Cell Biol* 15: 565–571.
- Cox BD, Natarajan M, Stettner MR, Gladson CL (2006) New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J Cell Biochem* 99: 35-52.

- Craven RJ, Lightfoot H, Cance WG (2003) A decade of tyrosine kinases: from gene discovery to therapeutics. *Surg Oncol* 12: 39-49.
- Dang DT, Bachman KE, Mahatan CS, Dang LH, Giardiello FM, Yang VW (2000) Decreased expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene in intestinal adenomas of multiple intestinal neoplasia mice and in colonic adenomas of familial adeno-matous polyposis patients. *FEBS Lett* 476: 203–207.
- Ding Q, Grammer JR, Nelson MA, Guan JL, Stewart JE Jr., Gladson CL (2005) p27(Kip1) and cyclin D1 are necessary for focal adhesion kinase (FAK) regulation of cell cycle progression in glioblastoma cells propagated in vitro and in vivo in the scid mouse brain. *J Biol Chem* 280: 6802-6815.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA (2006) Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355: 2408-2417.
- Eaton SA, Funnell AP, Sue N, Nicholas H, Pearson RC, Crossley M (2008) A network of Kruppel-like Factors (Klfs). Klf8 is repressed by Klf3 and activated by Klf1 in vivo. *J Biol Chem* 283: 26937-26947.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC (1997): PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88: 435-437
- Fu WJ, Li JC, Wu XY, Yang ZB, Mo ZN, Huang JW, Xia GW, Ding Q, Liu KD, Zhu HG. (2010) Small interference RNA targeting Kruppel-like factor 8 inhibits the renal carcinoma 786-0 cells growth in vitro and in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1255-1265.

- Gladson CL, Cheresch DA (1991) Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest* 88: 1924-1932.
- Gladson CL (1996) Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1143-1149.
- Goldbrunner RH, Haugland HK, Klein CE, Kerkau S, Roosen K, Tonn JC (1996) ECM dependent and integrin mediated tumor cell migration of human glioma and melanoma cell lines under serum-free conditions. *Anticancer Res* 16: 3679-3687.
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114: 4557-4565.
- Hecker TP, Grammer JR, Gillespie GY, Stewart J, Jr., Gladson CL (2002) Focal adhesion kinase enhances signaling through the Shc/extracellular signal-regulated kinase pathway in anaplastic astrocytoma tumor biopsy samples. *Cancer Res* 62: 2699-2707.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 997-1003.
- Hood JD, Cheresch DA (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2: 91-100.
- Hsu DW, Louis DN, Efird JT, Hedley-Whyte ET (1997) Use of MIB-1 (Ki-67) immunoreactivity in differentiating grade II and grade III gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 857-865.

- Huang TT, Sarkaria SM, Cloughesy TF, Mischel PS (2009) Targeted therapy for malignant glioma patients: lessons learned and the road ahead. *Neurotherapeutics* 6: 500-512.
- Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25.
- Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687.
- Jakobsen JN, Hasselbalch B, Stockhausen MT, Lassen U, Poulsen HS (2011) Irinotecan and bevacizumab in recurrent glioblastoma multiforme. *Expert Opin Pharmacother.* 12: 825-833.
- Johannessen AL, Torp SH (2006) The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res* 12: 143-147.
- Kaczynski J, Cook T, Urrutia R (2003) Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biol* 4: 206.
- Kleihues P, Ohgaki H (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 1: 44-51.
- Krause DS, Van Etten RA (2005) Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 353: 172-187.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lesniak MS, Brem H (2004) Targeted therapy for brain tumours. *Nat Rev Drug Discov* 3: 499-508.

- Li JC, Yang XR, Sun HX, Xu Y, Zhou J, Qiu SJ, Ke AW, Cui YH, Wang ZJ, Wang WM, Liu KD, Fan J (2010) Up-regulation of Kruppel-like factor 8 promotes tumor invasion and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 139: 2146-2157.
- Lim M, Guccione S, Haddix T, Sims L, Cheshier S, Chu P, Vogel H, Harsh G (2005) alpha(v)beta(3) Integrin in central nervous system tumors. *Hum Pathol* 36: 665-669.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109.
- Lu H, Wang X, Li T, Urvalek AM, Yu L, Li J, Zhu J, Lin Q, Peng X, Zhao J (2011) Identification of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) as a novel Kruppel-like factor 8-interacting and -regulating protein. *J Biol Chem* 286: 20335-20344.
- MacDonald TJ, Taga T, Shimada H, Tabrizi P, Zlokovic BV, Cheresch DA, Laug WE (2001) Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha(v) integrin antagonist. *Neurosurgery* 48: 151-157.
- Maubant S, Saint-Dizier D, Boutillon M, Perron-Sierra F, Casara PJ, Hickman JA, Tucker GC, Van Obberghen-Schilling E (2006) Blockade of alpha v beta3 and alpha v beta5 integrins by RGD mimetics induces anoikis and not integrin-mediated death in human endothelial cells. *Blood* 108: 3035-3044.
- Maurer GD, Tritschler I, Adams B, Tabatabai G, Wick W, Stupp R, Weller M (2009) Cilengitide modulates attachment and viability of human glioma cells, but not sensitivity to irradiation or temozolomide in vitro. *Neuro Oncol.* 11: 747-756.

- McAnuff MA, Rettig GR, Rice KG (2007) Potency of siRNA versus shRNA mediated knockdown in vivo. *J Pharm Sci* 96: 2922-2930.
- McLean GW, Komiyama NH, Serrels B, Asano H, Reynolds L, Conti F, Hodivala-Dilke K, Metzger D, Chambon P, Grant SG, Frame MC (2004) Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression. *Genes Dev* 18: 2998-3003.
- Mischel PS, Cloughesy TF (2003) Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathol* 1: 52-61.
- Miebach S, Grau S, Hummel V, Rieckmann P, Tonn JC, Goldbrunner RH (2006) Isolation and culture of microvascular endothelial cells from gliomas of different WHO grades. *J Neurooncol* 76: 39-48.
- Miranti CK, Brugge JS (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4: E83–E90.
- Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A (1991) A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 350: 512-515.
- Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, Hochberg F, Akella NS, Fisher JD, Cloud GA, Zhang Y, Carson K, Wittemer SM, Colevas AD, Grossman SA (2007) Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 25: 1651-1657.
- Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL (2001) KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 294: 2563–2566.

- Natarajan M, Stewart JE, Golemis EA, Pugacheva EN, Alexandropoulos K, Cox BD, Wang W, Grammer JR, Gladson CL (2006) HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene* 25: 1721–1732.
- Olert J, Wiedorn KH, Goldmann T, Kühl H, Mehraein Y, Scherthan H, Niketeghad F, Vollmer E, Müller AM, Müller-Navia J (2001) HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract* 197: 823-826.
- Oliveira-Ferrer L, Hauschild J, Fiedler W, Bokemeyer C, Nippgen J, Celik I, Schuch G. (2008) Cilengitide induces cellular detachment and apoptosis in endothelial and glioma cells mediated by inhibition of FAK/src/AKT pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 27:86.
- Paulus W, Baur I, Schuppan D, Roggendorf W (1993) Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *Am J Pathol* 143: 154-163.
- Paulus W, Huettner C, Tonn JC (1994) Collagens, integrins and mesenchymal drift in glioblastomas: a comparison of biopsy specimens, spheroid and early monolayer cultures. *Int J Cancer* 58: 841-846.
- Paulus W, Tonn JC (1994) Basement membrane invasion of glioma cells mediated by integrin receptors. *J Neurosurg* 80: 515-519.
- Perkins, A (1999) Erythroid Kruppel like factor: from fishing expedition to gourmet meal. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 1175-1192.
- Petitclerc E, Strömblad S, von Schalscha TL, Mitjans F, Piulats J, Montgomery AM, Cheresh DA, Brooks PC (1999) Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res* 59: 2724-2730.

- Pontén J, Macintyre EH (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 74:465-486.
- Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Smith JS, McDermott MW (2005) Techniques to assess the proliferative potential of brain tumors. *J Neurooncol.* 74: 19-30.
- Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T, Cloughesy TF, O'Neill A, Plotkin S, Glantz M, Ravin P, Raizer JJ, Rich KM, Schiff D, Shapiro WR, Burdette-Radoux S, Dropcho EJ, Wittemer SM, Nippgen J, Picard M, Nabors LB (2008) Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 26: 5610-5617.
- Reardon DA, Neyns B, Weller M, Tonn JC, Nabors LB, Stupp R (2011) Cilengitide: an RGD pentapeptide $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrin inhibitor in development for glioblastoma and other malignancies. *Future Oncol* 7: 339-354.
- Reiske HR, Zhao J, Han DC, Cooper LA, Guan JL (2000) Analysis of FAK-associated signaling pathways in the regulation of cell cycle progression. *FEBS Lett* 486: 275-280.
- Riemenschneider MJ, Mueller W, Betensky RA, Mohapatra G, Louis DN (2005) In situ analysis of integrin and growth factor receptor signaling pathways in human glioblastomas suggests overlapping relationships with focal adhesion kinase activation. *Am J Pathol* 167: 1379-1387.
- Ruoslahti E (1991) Integrins. *J Clin Invest* 87: 1-5.
- Sallinen SL, Sallinen PK, Kononen JT, Syrjäkoski KM, Nupponen NN, Rantala IS, Helén PT, Helin HJ, Haapasalo HK (1999) Cyclin D1 expression in astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis. *J Pathol* 188: 289-293.

- Schmidt F, Fischer J, Herrlinger U, Dietz K, Dichgans J, Weller M (2006) PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma. *Neurology* 66: 587-589.
- Schnell O, Krebs B, Wagner E, Romagna A, Beer AJ, Grau SJ, Thon N, Goetz C, Kretzschmar HA, Tonn JC, Goldbrunner RH (2008) Expression of integrin α v β 3 in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. *Brain Pathol* 18: 378-386.
- Schwartz MA, Assoian RK (2001) Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 114: 2553-2560.
- Sherr CJ (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79: 551-555.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10:459-466.

- Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PM, Grabenbauer GG, Ochsenbein AF, Simon M, Dietrich PY, Pietsch T, Hicking C, Tonn JC, Diserens AC, Pica A, Hermisson M, Krueger S, Picard M, Weller M (2010) Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Onco* 28: 2712-2718.
- Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Nagai R (2005) Vascular implications of the Krüppel-Like family of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1135-1141.
- Taga T, Suzuki A, Gonzalez-Gomez I, Gilles FH, Stins M, Shimada H, Barsky L, Weinberg KI, Laug WE (2002) alpha v-Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int J Cancer* 98: 690-697.
- Tonn JC, Wunderlich S, Kerkau S, Klein CE, Roosen K (1998) Invasive behaviour of human gliomas is mediated by interindividually different integrin patterns. *Anticancer Res* 18: 2599-2605.
- Torp SH (2002) Diagnostic and prognostic role of Ki67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies. *Clin Neuropathol* 21: 252-257.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Urvalek AM, Lu H, Wang X, Li T, Yu L, Zhu J, Lin Q, Zhao J (2011) Regulation of the oncoprotein KLF8 by a switch between acetylation and sumoylation. *Am J Transl Res* 3: 121-132.

- Van Nimwegen MJ, Verkoeijen S, van Buren L, Burg D, van de Water B (2005) Requirement for focal adhesion kinase in the early phase of mammary adenocarcinoma lung metastasis formation. *Cancer Res* 65: 4698–4706.
- Van Vliet J, Turner J, Crossley M (2000) Human Kruppel-like factor 8: a CACCC-box binding protein that associates with CtBP and represses transcription. *Nucleic Acids Res* 28: 1955-1962.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36: 131-149.
- Walker JL, Assoian RK (2005) Integrin-dependent signal transduction regulating cyclin D1 expression and G1 phase cell cycle progression. *Cancer Metastasis Rev* 24: 383-393.
- Wang X, Zhao J (2007) KLF8 transcription factor participates in oncogenic transformation. *Oncogene* 26: 456-461.
- Wei H, Wang X, Gan B, Urvalek AM, Melkounian ZK, Guan JL, Zhao J (2006) Sumoylation delimits KLF8 transcriptional activity associated with the cell cycle regulation. *J Biol Chem* 281:16664-16671.
- Wick A, Pascher C, Wick W, Jauch T, Weller M, Bogdahn U, Hau P (2009) Rechallenge with temozolomide in patients with recurrent gliomas. *J Neurol* 256: 734-741.
- Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, Arnaout MA (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296: 151-155.
- Yahalom D, Wittelsberger A, Mierke DF, Rosenblatt M, Alexander JM, Chorev M (2002) Identification of the principal binding site for RGD-containing ligands

in the alpha(V)beta(3) integrin: a photoaffinity cross-linking study. *Biochemistry* 41: 8321-8331.

- Zhao JH, Reiske H, Guan JL (1998) Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 143: 1997–2008.
- Zhao J, Pestell R, Guan JL (2001) Transcriptional activation of cyclin D1 promoter by FAK contributes to cell cycle progression. *Mol Biol Cell* 12: 4066-4077.
- Zhao J, Bian ZC, Yee K, Chen BP, Chien S, Guan JL (2003) Identification of transcription factor KLF8 as a downstream target of focal adhesion kinase in its regulation of cyclin D1 and cell cycle progression. *Mol Cell* 11: 1503-1515.

7. Danksagung

An Herrn Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn für die freundliche Aufnahme in das Tumorbioologische Labor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik in Großhadern sowie für die Vielzahl hilfreicher Anregungen und Denkanstöße.

An Herrn Dr. med. Christian Schichor für sein stetes Interesse am Projekt, für die vielen fruchtbaren Projektbesprechungen und für seine wegweisenden Kurskorrekturen.

An Herrn Dr. med. Oliver Schnell für die beste Promotionsbetreuung, die man sich wünschen kann. Die vielen fächerübergreifenden Besprechungen waren meine Feuuertaufe für die Welt wissenschaftlichen Denkens und Handelns.

An Herrn Prof. Dr. med. Roland Goldbrunner für die Hilfe bei der Projektplanung und Tipps zur Promotion.

An Frau Dr. rer. nat. Valerie Albrecht für die Hilfestellungen bei PCR und ihr stets offenes Ohr in allen Belangen.

An Frau Dr. rer. nat. Irene Jaehnert und Anja Niedermeier für die immerwährende Hilfe bei Western Blot und Zellkultur.

An Frau Dr. med. Sabina Eigenbrod für die Kooperation und Unterstützung in der immunhistochemischen Untersuchung von KLF-8.

An Frau MTA Stefanie Lange für die Einweisung in Welt des ordentlichen wissenschaftlichen Arbeitens.

An meine Freunde für Verständnis, Unterstützung und Ablenkung.

An meine Eltern, Großeltern und Verwandten, weil sie immer für mich da waren und sind.