

Aus dem medizinischen Zentrum für operative Medizin
Klinik für Neurochirurgie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. C. Nimsky
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Expressionsunterschiede von Wif1 und Rab34 bei Gliomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Julia Henzgen

aus Berlin

Köln, Dezember 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 10.12.2009
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. H. Bertalanffy

1. Korreferent: Prof. Dr. J. Rüschoff

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary.....	3
3. Einleitung	5
3.1 Einführung in die Thematik und Fragestellung.....	5
3.2 Literaturübersicht.....	7
3.2.1 Tumoren	7
3.2.2 Tumoren des Nervensystems.....	8
3.2.3 Astrozytäre Tumoren (Gliome)	10
3.2.4 Niedriggradiges Astrozytom (WHO-Grad II)	11
3.2.5 Anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III).....	14
3.2.6 Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV).....	16
3.3 Genetische Aspekte von Wif1 und Rab34.....	21
3.3.1 Das Onkogen Wif1	21
3.3.1.1 Der Wnt-Pathway	21
3.3.1.2 Extrazelluläre Antagonisten des Wnt-Pathways	22
3.3.1.3 Struktur von Wif1	23
3.3.1.4 Expressionsverhalten von Wif1	25
3.3.2 Das Onkogen Rab34.....	29
3.3.2.1 Übersicht.....	29
3.3.2.2 Rab-Proteine	30
3.3.2.3 Struktur von Rab34/Ras-related protein	31
3.3.2.4 Rab39.....	32
3.3.2.5 Rab34 und seine Interaktion mit dem Golgi-Apparat	33
3.3.2.6 Rab34 und RILP (Rab-interacting lysosomal protein).....	35
3.3.2.7 LDR (low dose radiation)-Abhängigkeit von Rab34	35
4. Material.....	37
4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	37
4.2 Geräte.....	37
4.3 Kits	38
4.4 Primer	39
4.5 Medien und Puffer	40
5. Methoden	41
5.1 Probenpräparation für die PCR	41
5.1.1 Materialgewinnung.....	41
5.1.2 Probenpräparation/RNA-Isolierung anhand der „single step“ Methode	42
5.1.3 Homogenisierung	42
5.1.4 Phasentrennung.....	43
5.1.5 RNA-Aufreinigung.....	43
5.1.6 Messung der Optischen Dichte (OD-Messung)	44
5.2 Die Standard-PCR	44
5.2.1 Probenvorbereitung für die PCR	46
5.2.2 Transkription der RNA in cDNA	47
5.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
5.2.4 DNA-Agarosegel zur elektrophoretischen DNA-Auftrennung.....	48
5.3 Das Prinzip der Real-Time PCR.....	49
5.3.1 Etablierung der Standardkurve	52
5.3.2 Etablierung und Auswertung der Schmelzkurve	53
5.3.3 Auswertung der Standardkurve	54
5.3.4 Messung der Proben	56

5.3.5 Auswertung der Proben	57
5.4. Auswertung mittels U-Test/Mann-Whitney-U-Test.....	57
6. Ergebnisse.....	60
6.1 Ergebnisse der PCR.....	60
6.2 Ergebnisse der Real-Time-PCR.....	61
6.2.1 Ergebnisse für Wif1	61
6.2.2 Ergebnisse für Rab34	62
6.3. Auswertung mittels U-Test/Mann-Whitney-Test.....	64
7. Diskussion	65
7.1. Einleitung	65
7.1.1. Allgemeine Probleme der histologischen Einteilung	65
7.1.2. Allgemeine Probleme des Versuchsaufbaus	68
7.1.3. Allgemeine Probleme der statistischen Auswertung.....	68
7.2. Diskussion für Wif1	69
7.3. Diskussion für Rab34	73
8. Literatur	79
9. Abkürzungen, Kurzzeichen	87
10. Tabellenanhang.....	91
Tabelle 10	91
Tabelle 11	93
Tabelle 13	96
11. Lebenslauf	101
12. Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	103
13. Danksagung	104
14. Ehrenwörtliche Erklärung.....	105

1. Zusammenfassung

Onkologische Reaktionswege, bei denen unter anderem die Wnt-Protein-Familie und die Ras-Gene eine bedeutende Rolle spielen, stehen im Interesse der derzeitigen medizinischen Forschung. Sowohl das Gen Wif1 als auch Rab34 könnten möglicherweise auch als wichtige Schaltpunkte innerhalb der Gliomgenese dienen.

Wif1 ist ein extrazellulär lokalisierter Antagonist des Wnt und wirkt über eine direkte Bindung an Wnt-Liganden. Über eine intrazelluläre Herunterregulation von β -Catenin kommt es zu einer verminderten Ausbildung von Onkogenen. Im Gegensatz dazu geht eine Abnahme von Wif1 mit einem Expressionsanstieg von Wnt einher, so dass es über die β -Catenin-Kaskade zu einer gesteigerten Transkriptionsaktivität kommt.

Rab34 gehört zu der Gruppe der Ras-Gene und ist in verschiedenste Stufen der Endo- und Exozytose involviert. Die Rab-Proteine regulieren Transportwege durch die Membran, indem sie als molekulare Schalter zwischen der aktiven und der inaktiven Form agieren. Im aktiven Status erfüllen Rab-Proteine ihre Funktion bei der Vesikelformation und bei der Bewegung von Organellen sowie Membranspaltung/-fusionen durch die Rekrutierung von Effektor-Proteinen.

Basierend auf vorausgegangenen Microarray-Analysen, in denen ein signifikanter Unterschied in der Gen-Expression von Rab34 und Wif1 in Astrozytomen Grad III und Glioblastomen nachgewiesen werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit mittels semiquantitativer Real-Time-PCR das unterschiedliche Expressionsmuster von Rab34 und Wif1 in Astrozytomen Grad II, Grad III, in Glioblastomen und Glioblastom-Rezidiven untersucht. Die Patienten mit Glioblastom-Rezidiven waren mit gleicher Radio-Chemo-Therapie einmalig vorbehandelt worden. Die Gesamtzahl von 51 Tumorproben wurde mittels eines ABI™ Sequence Detection Systems ABI PRISM® 7700 and Qiagen™ QuantiTect® SYBR® Green PCR Kits experimentell untersucht. Die statistische Überprüfung erfolgte mittels U-Test.

Für das Gen Wif1 konnten signifikante Expressionsunterschiede im Vergleich zwischen Astrozytomen Grad III und der Gruppe der Rezidive sowie zwischen Glioblastomen und den Rezidiven festgestellt werden.

Beim Vergleich der Expressionsstärke von Rab34 zwischen den Glioblastom-Gruppen zeigte sich eine Verdoppelung der Werte vom Glioblastom verglichen mit seinen Rezidiven. Im U-Test/Mann-Whitney-Test war dieser Expressionsunterschied statistisch signifikant.

Eine veränderte Aktivierung des Wnt-Reaktionsweges bzw. ein Ungleichgewicht der Über- und Unterexpression von Wif1 scheint eine zentrale Rolle bei der Tumorgenese von Astrozytomen zu spielen. Es scheint aber keine Korrelation zwischen dem Malignitätsgrad des Tumors und der Expression von Wif1 zu geben. In einigen Tumoren wie Blasen- oder Prostata-Karzinom korreliert die Wif1-Expression mit dem Tumorgrad. In der vorliegenden Arbeit bestätigt sich dieser Zusammenhang für Astrozytome nicht. Ein Expressionsanstieg kann sowohl eine anti-apoptotische Aktivität als auch eine potenzierte Malignität bedeuten.

Für das zweite untersuchte Gen Rab34 konnte mit den vorliegenden Versuchen die Vermutung einer Assoziation zwischen der Gen-Expression und dem Tumor-Grad bestätigt werden. Aus den signifikanten Expressionsunterschieden zwischen Glioblastomen und den mit Radio- und Chemo-Therapie behandelten Rezidiven geht ferner hervor, dass hier möglicherweise ein sehr sensibler Schritt innerhalb des Rab34-Pathways (Reaktionsweges) zugrunde liegt. Hier sei auf die zentrale Rolle von Rab34 innerhalb des Organellen-Transportes im Axoplasma, auf Mikrotubulus-abhängige Effekte und die Regulation der Antigen-Präsentation verwiesen.

2. Summary

Major oncologic pathways, such as the Wnt protein family and the Ras genes belong to oncogenes that play a significant role in tumor genesis pathways. Wif1 and Rab34 have been implicated to be involved in glioma genesis.

Wif1 is a secreted antagonist of Wnt signalling and functions by direct binding to Wnt ligands in the extracellular space. There is evidence that intracellular down-regulation of β -catenin correlates with reduced expression of oncogenes. On the other hand down-regulation of Wif1 results in a higher expression level of Wnt, which causes higher transcription activity through the β -catenin pathway.

Rab34 belongs to the group of Ras genes and is involved in various steps along the exocytic and endocytic pathways. By changing between the active and inactive form, Rab-proteins are considered key regulatory factors for membrane traffic. This biological activity causes vesicular formation, movement of organelles and membrane traffic by recruitment of effector proteins.

Previous microarray analysis showed a significant incidence of different gene expressions of Rab34 and Wif1 in astrocytomas of WHO-grade III and glioblastomas. The current study analysed the incidence of Wif1 and Rab34 expression in a larger number of tissue samples from astrocytomas of WHO-grades II, III, glioblastomas and first-time recurrent glioblastomas. Last-mentioned were treated by radiation and chemo-therapy.

To study possible differences in their expression, semiquantitative two-step RT Real-Time PCR examinations on a total of 51 tissue samples of astrocytomas WHO-grade II, III, glioblastomas and first-time recurrent glioblastomas were performed. Analysis were conducted using the ABITM Sequence Detection System ABI PRISM[®] 7700 and QiagenTM QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kits. According to the histological grading the arithmetic mean was calculated and compared by using the U-test.

There is an immense uptake of Wif1 in astrocytomas from grade II to grade III. Strong reduction of Wif1 expression was present in glioblastomas compared to astrocytomas grade III. The expression level of astrocytomas grade II was nearly equivalent to the group of glioblastomas. Another up-regulation of Wif1-expression

was seen in recurrent compared to primary glioblastomas. By using the U-test, there was a significant difference in expression level between astrocytomas grade III and recurrent glioblastomas as well as recurrent compared to primary glioblastomas.

Rab34 showed the highest expression in astrocytomas grade III and displayed a strong reduction compared to the benign astrocytomas grade II. Moreover, Rab34-expression showed a down-regulation of astrocytomas grade III compared to primary glioblastomas. Expression level of Rab34 in glioblastomas showed a double increase from primary to recurrent glioblastomas. By using the U-test there was a significant difference in expression levels between recurrent when compared to primary glioblastomas.

Both pathways may be operative in early glioma tumor genesis. Aberrant activation of the Wnt pathway indicates that loss of Wif1 expression may be an early event in tumor genesis as demonstrated by other groups for higher tumor stages like urinary bladder or prostate cancer. The data indicates that there is no correlation between tumor grade and expression level of Wif1, but this probably demonstrates tissue-specific or tumor-specific expression. There is evidence for anti-apoptotic activity and potentiated malignity.

Overexpression of Rab GTPases is detected in various kinds of cancer. The increasing expression of Rab34 in all glioma grades supports the previously suggested role of tumor genesis for astrocytomas. There is significant correlation between tumor stage and tumor-grade. Because of the uptake in expression level between recurrent when compared to primary glioblastomas, the Rab34 pathway might play an important role. On the basis of this result, membrane traffic in the axoplasma, microtubules- or actin-based motor complexes and regulation within the antigenic presentation may yield additional understanding.

3. Einleitung

3.1 Einführung in die Thematik und Fragestellung

Die Zellen eines jeden Lebewesens sind durch ein exakt geregeltes homöostatisches Gleichgewicht von Proliferation (Wachstum), Differenzierung (zelluläre Spezialisierung) und Apoptose bzw. Nekrose (Zelltod) gekennzeichnet. Das Wachstumsverhalten von Zellen und der genaue genetische Ablauf des Zellzyklus (Zellteilung) werden durch definierte genetische Instruktionen gesteuert. Derartige genetische Programme werden wesentlich durch extrazelluläre Signale beeinflusst, die die Aktivität der Gene einer Zelle bestimmen (Schmoll et al. 2005).

Bei der Genese maligner Tumorerkrankungen spielen Imbalancen im fein eingestellten Gleichgewicht intrazellulärer Signaltransduktionsketten, der Regulationsmechanismen des Zellzyklus' sowie der Zelldifferenzierung und anderer wesentlicher Punkte im Stoffwechsel der Zelle eine wichtige Rolle (Böcker et al. 2001). Aufgrund von Schädigungen des DNA-Erbmaterials kommt es innerhalb der Zellen zu einer fehlregulierten Genaktivität.

Jeder Mechanismus, der das Überleben DNA-geschädigter Zellen erhöht, z.B. durch Verhinderung des apoptotischen Todes solcher Zellen, trägt zum karzinogenen Prozess bei (Hanahan u. Weinberg 2000, Schmoll et al. 2005). Als Ursache jeder Tumorerkrankung sind somit Veränderungen, wie beispielsweise Mutationen und Virusinfektionen, im Erbmaterial der primären Tumorzelle zu sehen.

Der größte Teil tumorinduzierender Mutationen entsteht in Somazellen (Körperzellen, die sich nur in Zellen gleichartigen Typs differenzieren können), es spielen jedoch auch vererbte genetische Defekte im Genom von Keimzellen eine wesentliche Rolle für die Tumorgefährdung eines Individuums. Ein extremes Beispiel einer derartigen genetischen Prädisposition liegt beim Li-Fraumeni-Syndrom vor, das auf der Existenz eines defekten Allels jenes Gens beruht, welches für das Tumorsuppressorprotein p53 kodiert (Srivastava et al. 1990, Schmoll et al. 2005).

Aufgrund der außerordentlichen Komplexität der molekularen Mechanismen der Genregulation ist ein zunehmendes Verständnis dieser Prozesse die Voraussetzung für weitere Einblicke in die Ursachen der Tumorentstehung. Durch die molekulare Identifizierung mutierter genetischer Loci (Orte) eröffnen sich im Zusammenhang mit der Tumorprogression neue Möglichkeiten für die DNA-Diagnostik. Die

prognostische Abschätzung von individuellem Risiko und die damit verbundene Prädisposition für familiär bedingte, keimbahnvererbte Mutationen rücken neben potentiellen Therapien des fehlregulierten zellulären Wachstums in den Vordergrund. Des weiteren eröffnen sie die Möglichkeiten zu Vorhersagen über die Gefahr einer malignen Progression nach Früherkennung prämaligener Vorstufen von Tumoren und gestatten eine frühzeitige Erkennung von Mikrometastasen, da mit Hilfe der PCR (polymerase chain reaction; Polymerase Ketten Reaktion) spezifische tumorassoziierte Genom-Polymorphismen in kleinsten Zellpopulationen nachweisbar geworden sind (Schmoll et al. 2005).

Der Schwerpunkt der hier vorliegenden, experimentellen Doktorarbeit liegt in der Quantifizierung der Genexpression von Wif1 und Rab34.

Wif1 ist ein extrazellulärer Antagonist des Wnt-Pathways, während Rab34 als Mitglied der Ras-Gene im Rahmen exo- und endozytischer Pathways eine Rolle spielt. Für andere Organe bzw. Gewebe sind in der Literatur zu diesen Genen bereits Pathways, Expressionsmuster und molekulargenetische Erkenntnisse beschrieben worden.

In vorangegangenen Microarray-Analysen mit Tumorproben von semimaligen Astrozytomen Grad III und malignen Glioblastomen konnte bereits ein signifikantes Auftreten verschiedener Genexpressionen von Wif1 und Rab34 nachgewiesen werden (Köhler 2007, Bozinov et al. 2008). Der Schwerpunkt der hier vorliegenden Arbeit liegt im Bereich der Genexpressionsanalyse von Wif1 und Rab34, welche anhand von 51 Tumorproben untersucht werden sollte. Diese 51 Proben umfassten 5 Astrozytome Grad II, 12 Astrozytome Grad III, 23 Glioblastome und 11 Glioblastom-Rezidive.

Um mögliche Expressionunterschiede zu zeigen, wurde die Methode der Real-Time-PCR gewählt. Diese Methode zeichnet sich durch hohe Spezifität, hohe Empfindlichkeit, schnelle Ergebnisse und eine genaue Quantifizierung aus.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit soll letztendlich ein weiterer Beitrag im Verständnis der Gliomgenese geleistet werden. Durch Einsichten in das Expressionsverhalten dieser Gene sollen molekularbiologische Prozesse besser verstanden und somit möglicherweise neue Behandlungsoptionen diskutiert werden.

3.2 Literaturübersicht

3.2.1 Tumoren

Als Tumor bezeichnet man eine Neubildung von Körpergewebe im Sinne einer abnormen Gewebsmasse, die durch Fehlregulationen des Zellwachstums entsteht. Diese Vermehrung von körpereigenen entarteten Zellen (transformierte Zellen, Tumorzellen) ist vor allem das Ergebnis von Regulationsstörungen im Rahmen von Zellteilung (Proliferation) und Zellverlust (Apoptose) transformierter Zellen (Böcker et al. 2001).

Neoplasien können jegliche Art von Gewebe betreffen. Je nach Lokalisation und Funktion des durch tumorartiges Wachstum geschädigten Gewebes kann es zu einer Fehlfunktion von Organen mit Beeinträchtigung des Gesamtorganismus bis zum Tod kommen. Klinisch unterscheidet man als wichtigstes Einteilungsprinzip einer Tumorerkrankung gutartige (benigne) von bösartigen (malignen) Tumoren, Sonderformen bilden die semibenigen und semimaligen Tumoren.

Ein gutartiges Neoplasma ist im Allgemeinen durch langsames Wachstum gekennzeichnet, das sich vor allem expansiv, verdrängend verhält. Des Weiteren findet man in der Regel keine Metastasierung, benigne Tumoren rezidivieren selten, wenn sie komplett entfernt wurden.

Die durch das Zellwachstum entstehende zusammenhängende Tumormasse führt zur Verdrängung, Kompression und Druckatrophie des angrenzenden normalen Gewebes. Benigne Tumoren haben in der Regel geringe, meist nur mechanische Rückwirkung auf den Allgemeinzustand des betroffenen Menschen, sie wachsen häufig über Monate und Jahre. Gelegentlich verursachen sie aber schwerwiegende lokale Komplikationen wie zum Beispiel bei benignen Tumoren des Gehirns oder der Meningen. Hier kann es zu unmittelbarer Druckeinwirkung auf lebenswichtige Zentren des Gehirns und damit durchaus zum Tod des Tumorträgers kommen (Kleihues u. Cavenee 2000).

Im Gegensatz dazu ist bösartiges Neoplasma mit weitgehender Unreife (Atypie, Anaplasie) der Zellen durch ein eventuell sehr rasches, autonom infiltrierendes Wachstum gekennzeichnet, das sich invasiv (Invasion) und zerstörend (Destruktion) verhält. Makroskopisch findet man dementsprechend eine tumoröse Durchsetzung des normalen Gewebes und demzufolge meist eine unscharfe Begrenzung, die bei

inadäquater chirurgischer Entfernung, ausgehend von den verbleibenden Tumorzellen, zu einem Weiterwachsen und Wiederauftreten des Tumors (Tumorrezidiv) führt.

Maligne Tumoren zeichnen sich ferner durch die Fähigkeit zur Verschleppung und Absiedlung von Zellen in andere Gewebe und/oder Organe (Metastasierung) aus, dies geschieht über Zell-Einbrüche in Lymph- und Blutgefäße. Im fortgeschrittenen Stadium ist eine erhebliche Rückwirkung auf den Allgemeinzustand des Patienten möglich (Anämie, Kachexie). Bösartige Tumoren sind nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern (Böcker et al. 2001).

3.2.2 Tumoren des Nervensystems

Obwohl Tumoren des Nervensystems nur etwa 2 % aller menschlichen Tumoren ausmachen, spielen sie klinisch eine wichtige Rolle, nicht zuletzt, weil alle Altersstufen, insbesondere auch Kinder betroffen sind (Böcker et al. 2001). Im pädiatrischen Bereich stehen diese Neoplasien neben Leukämien und Lymphomen an oberster Stelle (Nakamura et al. 2007), sie schließen Retinoblastome und Neuroblastome des sympathischen Nervensystems ein.

Neoplasien können sich prinzipiell in allen Abschnitten des Nervensystems und mit Ausnahme der Mikroglia aus jedem Zelltyp entwickeln. Am häufigsten sind jedoch Gliome des zentralen Nervensystems (ZNS), insbesondere des Großhirns (Holland 2001).

Tumoren des Nervensystems werden nach histologischen Kriterien eingeteilt, d.h. nach dem Zelltyp, aus dem sich der Tumortyp entwickelt hat. Die WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems geht zurück auf grundlegende histologische Erkenntnisse sowie Beobachtungen von tumorspezifischen Wachstumsmodalitäten durch Bailey und Cushing. Auf deren 1926 publizierter Arbeit basiert die erste WHO-Klassifikation von Zülch und Wechsler 1986, welche zuletzt 2007 von der *Editorial and Consensus Conference Working Group* der WHO aktualisiert wurde (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1 (englisch): Auszug aus *Tumours of Neuroepithelial Tissue* (nach WHO 2007, Fuller u. Scheithauer 2007)

Astrocytic tumours	<ul style="list-style-type: none"> Pilocytic astrocytoma Pilomyxoid astrocytoma Subependymal giant cell astrocytoma Pleomorphic xanthoastrocytoma Diffuse astrocytoma Fibrillary astrocytoma Protoplasmic astrocytoma Gemistocytic astrocytoma Anaplastic astrocytoma Glioblastoma Giant cell glioblastoma Gliosarcoma Gliomatosis cerebri
Oligodendroglial tumours	<ul style="list-style-type: none"> Oligodendroglioma Anaplastic oligodendroglioma
Oligoastrocytic tumours	<ul style="list-style-type: none"> Oligoastrocytoma Anaplastic oligoastrocytoma
Ependymal tumours	<ul style="list-style-type: none"> Subependymoma Myxopapillary ependymoma Ependymoma Cellular Papillary Clear cell Tanycytic Anaplastic ependymoma

Die Inzidenz intrakranieller Tumoren liegt in Europa bei 7-10 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner und Jahr und ist weitgehend konstant, mit Ausnahme einer deutlichen Zunahme der primären malignen ZNS-Lymphome während der vergangenen 10-15 Jahre. Männer sind insgesamt etwas häufiger betroffen (Männer:Frauen = 1,35:1). Eine Ausnahme stellen die Meningeome dar, die gehäuft bei Frauen auftreten (Böcker et al. 2001).

Obwohl es in der Vergangenheit ausgedehnte epidemiologische Studien gab, ist es bisher nicht gelungen, Umweltfaktoren zu identifizieren, die für die Entstehung von Hirntumoren verantwortlich sind. Als gesichert gilt die gelegentliche Induktion von Hirntumoren durch therapeutische Dosen ionisierender Strahlen, welche insbesondere bei Kindern zu beobachten ist. Ungewöhnlich häufig treten hingegen Tumoren des Nervensystems im Rahmen erblicher Tumorsyndrome auf (DeVita et al. 2004).

Klinisch und prognostisch unterscheiden sich Tumoren des ZNS in einigen Aspekten von denen anderer Organe. Da das Hirn in den knöchernen Schädel eingeschlossen ist, führen alle, also auch gutartige (z.B. Meningeome), raumfordernde Prozesse früher oder später zu Hirndrucksteigerung mit lebensbedrohlichen intrakraniellen Massenverschiebungen (DeVita et al. 2004).

Aufgrund dieser Korrelation gelten die klassischen Merkmale der Malignität (infiltrativ-destruierendes Wachstum und Metastasierung) nur eingeschränkt.

In der Regel bleibt die Tumordinfiltration auf das Hirnparenchym beschränkt, nur selten findet ein Übergreifen auf benachbarte Strukturen (Dura, Knochen) statt. Auch eine hämatogene Streuung in andere Organe ist sehr selten und klinisch meist ohne bestimmten Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Einige Hirntumoren, wie z.B. die Medulloblastome neigen allerdings zur Metastasierung über den Liquor cerebrospinalis.

Charakteristisch für Tumoren des Nervensystems ist die häufig ausgeprägte Bevorzugung bestimmter Lokalisationen und Altersgruppen. Oft lässt sich aus der Kombination beider Angaben bereits eine Verdachtsdiagnose stellen (Kleihues u. Cavenee 2000).

3.2.3 Astrozytäre Tumoren (Gliome)

Astrozytäre Tumoren sind in jedem Lebensalter und in allen anatomischen Lokalisationen anzutreffen und machen ca. 25% aller intrakraniellen Gliome aus (Berlit 1999). Sie wachsen entlang der Marklagerbahnen und infiltrieren weit vom Tumorzentrum entfernt gelegene Hirnareale. Bevorzugte Lokalisationen sind Frontal- und Temporallappen, aber auch im Okzipital- und Parietallappen, im Thalamus, im Hypothalamus, im Mittelhirn, in dem Pons und im Nervus Optikus treten Astrozytome auf.

Im Wesentlichen werden zwei Formen unterschieden, das pilozytische Astrozytom des Kindes- und Jugendalters und die diffus infiltrierenden Astrozytome bei Erwachsenen. Entsprechend ihres Malignitätsgrades und ihres bevorzugten Auftretens verhalten sie sich unterschiedlich, so dass in der Therapie große Unterschiede bestehen.

Anhand der histologischen Klassifikation werden die Hirntumoren nach Empfehlungen der WHO in vier Malignitätsgrade eingeteilt, die einen Schätzwert für ihr biologisches Verhalten angeben (siehe Tabelle 2; Poeck u. Hacke 2001).

Tabelle 2: Histologische Kriterien der Hirntumoren (Poeck u. Hacke 2001)

WHO Grad	Dignität	Histologische Charakteristika	Beispiele	Überlebenszeit (Ca.-Angaben)
I	Benigne	Gut differenzierte Gewebe, keine Metastasen	Pilozytisches Astrozytom, Meningeom, Neurinom,	≥ 5 (-50) Jahre

			Hypophysen-Adenom	
II	Semibenigne	Einzelne atypische Zellen, noch gut differenziertes Gewebe, Kernatypien, keine/kaum Metastasen	Astrozytom II, Oligodendrogliom, Ependymom, Pineozytom	3-5 Jahre
III	Semimaligne	Viele atypische Zellen, Mitosen, Ursprungsgewebe noch erkennbar, jedoch bereits entdifferenziert	Anaplastisches Astrozytom, anaplastisches Oligodendrogliom, Plexuskarzinom	2-3 Jahre
IV	Maligne	Entdifferenziertes Gewebe, viele Mitosen, Nekrosen, Endothelproliferation, Metastasen	Glioblastom, Medulloblastom, Meningosarkom, Glioblastom, malignes Lymphom	6 Monate (bis 2 Jahre)

Folgende histologische Kriterien werden zur Beurteilung herangezogen: Kernatypien, Mitosen, Endothelproliferation, Nekrosen.

Wenn keines der Kriterien erfüllt ist	Grad I
1 Kriterium erfüllt	Grad II
2 Kriterien vorhanden	Grad III
3 oder 4 Kriterien erfüllt	Grad IV

Der Malignitätsgrad dient der Verdeutlichung der Klassifizierung. Als benigne oder niedriggradig („low grade“) werden die Gliome der Grade I und II bezeichnet, dies trifft für die Grad-I-Tumoren klinisch-biologisch zu, die Grad-II-Tumoren können jedoch wegen ihrer diffusen Infiltration praktisch nie komplett reseziert werden und gehen meist in maligne Gliome über (Peiffer et al. 2002). Als maligne oder höhergradige („high grade“) Gliome werden die Tumoren Grad III (anaplastische Gliome) und die Glioblastome (Gliome Grad IV) zusammengefasst. Da in der hier vorliegend durchgeführten Studie Astrozytome Grad II, III und Glioblastome untersucht worden sind, werden lediglich diese Tumorformen detailliert dargestellt.

3.2.4 Niedriggradiges Astrozytom (WHO-Grad II)

Häufigkeit, Vorkommen und Klinik

Die diffus infiltrierenden, niedriggradigen Astrozytome wachsen langsam und manifestieren sich bevorzugt bei jüngeren Erwachsenen. Der Erkrankungsgipfel liegt in der 3. bis 4. Lebensdekade. Das Astrozytom Grad II manifestiert sich bei 70% der Patienten durch epileptische Anfälle (Berlit 1999) und tritt vor allem in den Großhirnhemisphären auf, wobei es selten die großen Sulci überschreitet. In absteigender Häufigkeit sind der Frontallappen (42%), der Temporallappen (41%), der Parietallappen (15%) und der Okzipitallappen (8%) betroffen (Berlit 1999).

Obwohl die Wachstumstendenz gering ist, infiltrieren sie diffus in benachbarte Strukturen, so dass eine vollständige chirurgische Resektion nicht gelingt. Im

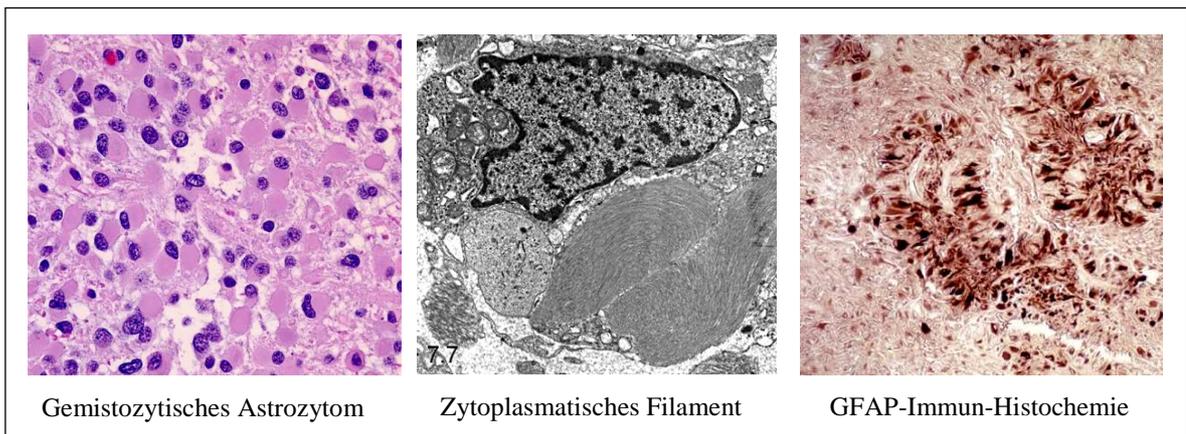
Verlauf der typischerweise auftretenden Rezidive beobachtet man histologisch eine zunehmende Zellteilungsaktivität und Anaplasie, d.h. eine Progression zum anaplastischen Astrozytom oder Glioblastom (Kleihues u. Cavenee 2000).

Morphologie

Makroskopisch findet man einen unscharf begrenzten, infiltrativ wachsenden Tumor mit glasiger Schnittfläche, der wegen seines infiltrativen, jedoch nicht destruierenden Wachstums zu einer Auftreibung des betroffenen Hirnareals führt. Häufig beobachtet man glattwandige Zysten mit wasserheller Flüssigkeit. Blutungen kommen praktisch nicht vor und Verkalkungen sind wesentlich seltener als beim Oligodendrogliom (Kleihues u. Cavenee 2000).

Mikroskopisch unterscheiden sich fibrilläre von protoplasmatischen, gemistozytischen und gemischten Varianten. Einen wichtigen immunhistochemischen Marker der astrozytären Histogenese, den alle Zellen zeigen, stellt das gliafibrilläre saure Protein (GFAP) als ein Baustein der glialen Intermediärfilamente dar (siehe Abbildung 1). Dieser Marker vereinfacht die Klassifikation. Das Astrozytom Grad II unterscheidet sich vom anaplastischen Astrozytom (Grad III) oft nur durch die niedrigere mitotische Aktivität und die geringere Zellatypie (Kaji et al. 2006).

Abbildung 1: GFAP-Bild eines niedriggradigen Astrozytoms (Aus Agamanolis 2006)



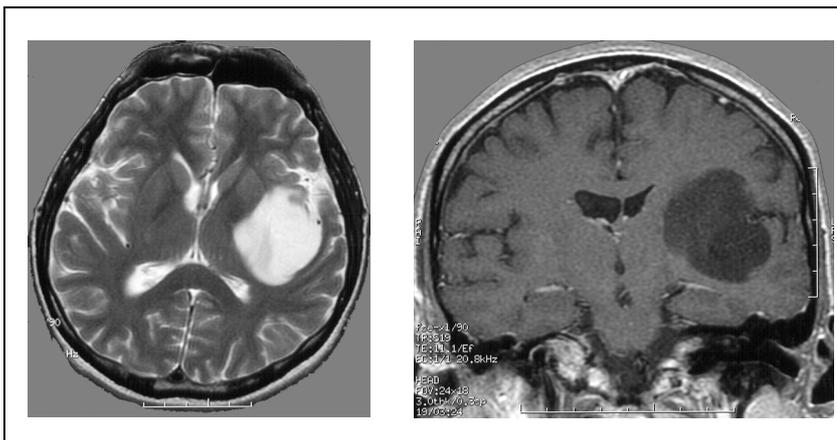
Histologisch ähneln die Tumorzellen normalen oder reaktionsfähigen Astrozyten. Sie können sternförmig sein, spindelförmig mit Faser-ähnlichen Prozessen, oder komplett aus einer großen eosinophilen Masse bestehen (gemistozytisches Astrozytom). Sie enthalten intermediäre zytoplasmatische Filamente, welche denen von nicht-neoplastischen Astrozyten ähneln. Das Protein dieser Filamente, das sog. gliafibrilläre saure Protein (glial fibrillary acidic protein = GFAP), kann mittels Immunhistochemie detektiert werden.

Bei etwa 50% der Astrozytome Grad II wird eine Chromosomenaberration mit Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 beobachtet, die zum Verlust des Tumorsuppressorgens p53 führt (Berlit 1999).

Diagnostik

Oft stellt sich das Astrozytom im CT und MRT als homogene Markveränderung dar. Es ist im CT als Zone verminderter Dichte erkennbar, in der sich Tumor- und Ödemanteil selbst nach Kontrastmittelgabe in der Regel nicht differenzieren lassen. Im MRT erscheint das Tumorgewebe als überwiegend in der weißen Substanz lokalisierte Läsion mit mäßigem raumforderndem Effekt. Es kommt im T1-gewichteten Bild leicht hypointens und im T2-Bild deutlich hyperintens und in ihrer Struktur homogen zur Darstellung (siehe Abbildung 2; Weller 2004).

Abbildung 2: Niedriggradiges Astrozytom



MRT-Bilder eines Patienten mit einem niedriggradigen Astrozytom. Links: Das MRT zeigt in T2-Wichtung und in der axialen Ebene eine große, homogen hyperintense Läsion, die bis in die Stammganglien reicht; Rechts: In T1-Wichtung stellt sich der Tumor glatt begrenzt, hypointens dar (Frontalebene) (Aus dem Universitätsklinikum Marburg, Abteilung für Neurochirurgie).

Genetische Aspekte

Zu den häufigen molekulargenetischen Veränderungen gehören Mutationen im TP53-Tumorsuppressorgen (35%) (Peiffer et al. 2002).

Therapie und Prognose

Eine komplette operative Tumorentfernung ist aufgrund des schlecht begrenzten Wachstums dieser Tumoren meist unmöglich. Eine weitgehende Tumorsektion erscheint jedoch sinnvoll. Bei primär inoperablen Tumoren kommt eine lokale interstitielle Bestrahlung in Frage (Brachytherapie) (Weller 2004). Die

konventionelle Strahlentherapie reduziert in begrenztem Ausmaß das Risiko eines Rückfalls. Sie wird oft erst bei einem weiteren Tumorwachstum nach der Operation eingesetzt (Weller 2004). Wenn der Tumor nach Operation und Strahlentherapie weiteres Wachstum zeigt, kann auch der Versuch einer Chemotherapie unternommen werden. Die durchschnittliche Überlebensprognose nach WHO beträgt nach der Diagnosestellung statistisch 5 bis 10 Jahre (Weller 2004).

3.2.5 Anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III)

Häufigkeit, Vorkommen und Klinik

Dieser histologisch maligne Tumor entwickelt sich häufig aus einem niedriggradigen Astrozytom und wächst fast immer infiltrierend. Die malignen Astrozytome machen die Mehrzahl der primären Hirntumoren aus (Anteil an allen Astrozytomen 35%; Peiffer et al. 2002), sie treten multilokulär überall im ZNS auf, vor allem jedoch in den Großhirnhemisphären. Die Mehrzahl der Patienten mit einem anaplastischen Astrozytom sind zwischen 40 und 60 Jahre alt, männliche Patienten sind häufiger betroffen als weibliche (2:1) (Berlit 1999).

Innerhalb von ca. 3-5 Monaten entwickeln sich klinische Symptome wie epileptische Anfälle (38%), Kopfschmerzen (35%) und psychische Veränderungen (16%). Zusätzlich kommen Übelkeit, Erbrechen und Papillenödem vor, die auf einen erhöhten Hirndruck aufgrund des raumfordernden Effekts des Tumors und eine konsekutive Liquorzirkulationsstörung zurückgeführt werden können (Berlit 1999).

Morphologie

Morphologisch unterscheidet sich das anaplastische Astrozytom von einem niedriggradigen Tumor im Wesentlichen durch eine größere Zellteilungsaktivität, die sich klinisch durch ein rascheres Auftreten von Rezidiven manifestiert. Es zeigt Malignitätszeichen, aber noch nicht das Vollbild des weiter entdifferenzierten Glioblastoms.

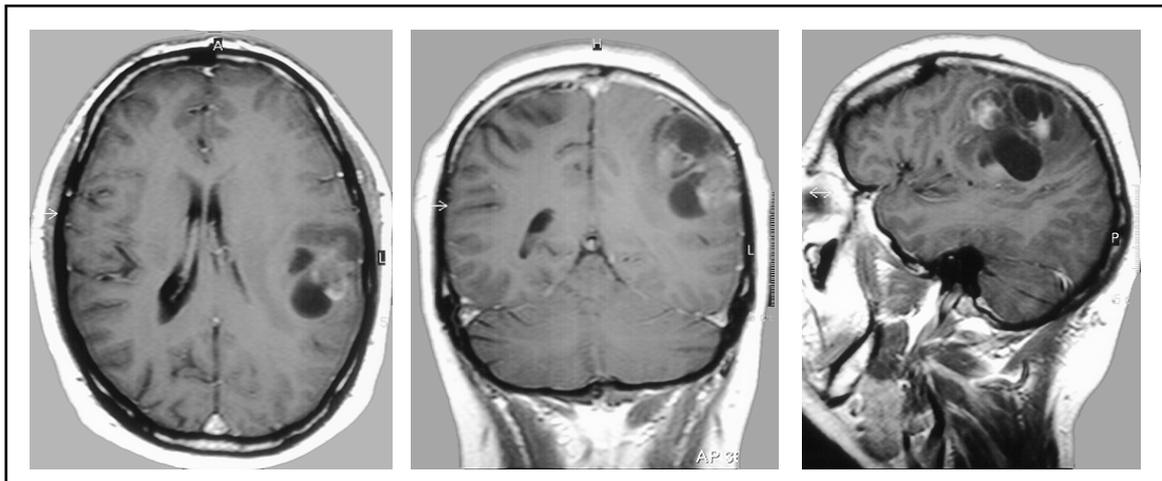
Astrozytome Grad III wachsen sehr rasch, sind gefäßreich und sind von einem erheblichen Begleitödem umgeben (Kleihues u. Cavenee 2000).

Diagnostik

Anaplastische Astrozytome sind in CT- und MRT-Bildern durch kontrastmittelanreichernde Tumoranteile, Zysten oder häufig auch ein umgebendes Ödem gekennzeichnet. Das anaplastische Astrozytom ist sowohl histologisch als auch im CT und MRT nur schwer vom Glioblastoma multiforme abzugrenzen (siehe Abbildung 3, Weller 2004).

Von diagnostischer und prognostischer Bedeutung ist histologisch neben gesteigerter Zelldichte und Kernpolymorphie vor allem die erhöhte Mitoserate. Ein wichtiger Marker ist weiterhin der Ki-67/MIB1-Proliferationsindex, er liegt typischerweise zwischen 5% und 10% (Peiffer et al. 2002, Nafe et al. 2005).

Abbildung 3: Anaplastisches Astrozytom



MRT-Bild eines Patienten mit einem anaplastischen Astrozytom. Zu sehen sind inhomogene Strukturen in der Kontrastmittelaufnahme. Axial, coronar, sagittal und intracerebral befinden sich Raumforderungen, weiterhin Zysten und Kontrastmittelanreicherungen (Aus dem Universitätsklinikum Marburg, Abteilung für Neurochirurgie).

Genetische Aspekte

Auch genetisch ist das anaplastische Astrozytom zwischen Grad-II-Astrozytom und Glioblastom anzusiedeln. Zu den TP53-Mutationen, die in etwa gleicher Häufigkeit wie bei Grad-II-Astrozytomen vorliegen (35%), kommen Aberrationen von Genen für zellzyklusregulierende Proteine wie CDKN2A/p16-Deletion (30%), Inaktivierung des Retinoblastom-(RB-) Tumorsuppressorgens (25%), p19^{ARF}-Deletion (15%) und CDK4-Amplifikation (10%). Inaktivierungen bisher nicht identifizierter Tumorsuppressorgene auf den Chromosomen 19q und 22q, detektiert durch einen Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH), findet man in

40% bzw. 30% der Fälle. EGFR-Amplifikationen treten in weniger als 10% der Fälle auf (Peiffer et al. 2002, Kleihues u. Ohgaki 2000).

Therapie und Prognose

Die Therapie der Wahl besteht in einer möglichst radikalen Resektion. Eine komplette Resektion dieser Tumoren ist aufgrund ihres infiltrierenden Wachstums aber ebenfalls oft nicht möglich. Nahezu immer treten Rezidive auf. Therapeutisch wird nach bestmöglicher Tumorverkleinerung eine Strahlentherapie mit 60 Gy in Dosen von 1,8-2,0 Gy angeschlossen. Das vasogene Ödem spricht gut auf die Behandlung mit Steroiden an. Aufgrund der schlechten Prognose kann eine adjuvante Chemotherapie versucht werden. Bei Patienten mit anaplastischen Astrozytomen liegt die Einjahresüberlebensrate bei 60-70%, die 2- und 5-Jahres-Überlebensraten betragen 38-60% bzw. 15-25% (Peiffer et al. 2002).

3.2.6 Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV)

Häufigkeit, Vorkommen und Klinik

Das Glioblastoma multiforme ist ein hochmaligner glialer Tumor astrozytären Ursprungs, der sich bevorzugt im höheren Erwachsenenalter (50.-60. Lebensjahr) manifestiert. Glioblastome umfassen etwa 40% der Gliome und machen mit 15-20% den häufigsten aller Hirntumoren aus (Peiffer et al. 2002). Männer sind im Verhältnis 3:2 häufiger als Frauen betroffen (Ohgaki u. Kleihues 2007). Das Glioblastom kann sich aus einem niedriggradigen Astrozytom entwickeln oder, mit sehr kurzer klinischer Anamnese, de novo entstehen. Man findet Glioblastome vornehmlich in den Großhirnhemisphären, sie wachsen von der weißen Substanz aus und verhalten sich infiltrierend (meist subkortikal). Sie können in allen Hirnlappen lokalisiert sein. Im Kleinhirn kommen sie nicht vor (Ohgaki u. Kleihues 2007).

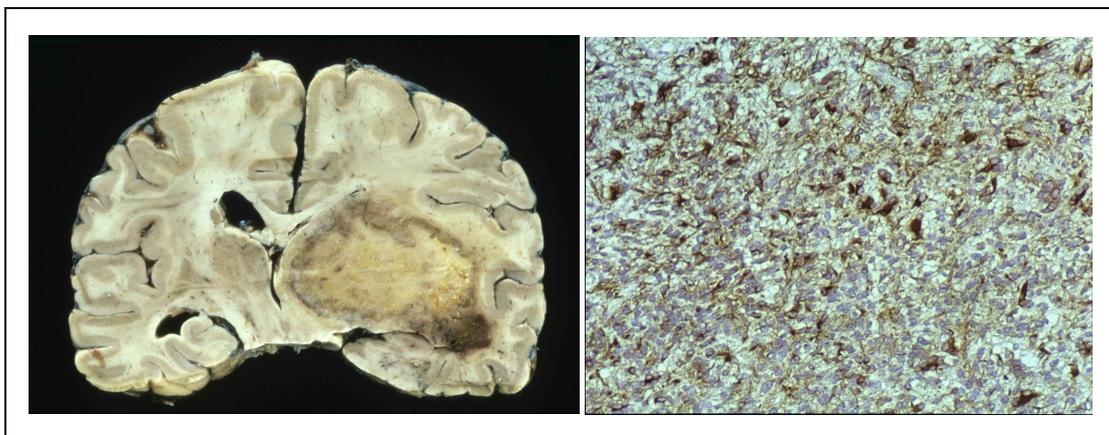
Klinisch sind das frühe Einsetzen von Kopfschmerzen und Hirndruckzeichen charakteristisch. Anfälle sind eher selten, dafür sind wegen der großen Ausdehnung des Tumors und dem begleitenden Hirnödem, welches oft zu einer Schwellung der ganzen Hemisphäre führen kann, Lähmungen häufig (Weller 2004). Aufgrund des raschen Wachstums des Tumors kommt es zu einer überstürzten Bildung von pathologischen Gefäßen mit arteriovenösen Anastomosen (Weller 2004).

Morphologie

Makroskopisch weisen Glioblastome eine charakteristische „bunte“ Schnittfläche auf, die bedingt ist durch das Nebeneinander von gelblichen Nekrosebereichen, grünlich verflüssigten Nekrosen („Gallertzysten“), rot oder schwärzlich erscheinenden Blutungen und grau-weißem soliden Tumorgewebe (Kleihues u. Cavenee 2000).

Histologisch handelt es sich um zellreiche, meist polymorphe Tumoren mit sehr hoher Mitoserate (Wachstumsfraktion: 8-25%) (Böcker et al. 2001). Typisch, aber nicht obligat, sind hyperchromatische, unregelmäßig geformte Kerne mit mehrkernigen Riesenzellen (multiformes Glioblastom) (Weller 2004). Daneben gibt es Tumoren, in denen spindelige oder kleine rundlich-polymorphe Zellen überwiegen (fusiforme und globuliforme Glioblastome) (Weller 2004). Praktisch immer nachweisbar sind Mitosen in variabler Zahl (siehe Abbildung 4; Kleihues u. Cavenee 2000).

Abbildung 4: Glioblastoma multiforme



Links: Pathologischer Befund im Frontalschnitt: Bunt, polymorphes, zystisch-hämorrhagisches Tumorgewebe in den Stammganglien und in der Inselregion; Massenverschiebung nach links. Rechts: GFAP-Immun-Histochemie: Die fibrilläre Matrix ist hier besonders gut sichtbar; zudem findet man Bereiche mit gemistozytären Tumorzellen (breites, plumpes, eosinophiles Zytoplasma mit randständigem abgeflachten Zellkern); kennzeichnend ist auch der Mitosenreichtum (Aus dem Universitätsklinikum Marburg, Abteilung für Neurochirurgie).

Für die Diagnose entscheidend ist neben flächenhaften und strichförmigen Nekrosen, um die sich die Tumorzellkerne radiär anordnen (Palisadenstellung der Kerne), das Vorkommen höhergradig-pathologischer Blutgefäße im Sinne einer Hyperplasie und Hypertrophie der Endothelien (DeVita et al. 2004). Diese Gefäßproliferationen werden durch ein von den Gliomzellen sezerniertes angiogenetisches Protein (vascular endothelial growth factor, VEGF) induziert

(Omuro et al. 2007). Immunhistochemisch lässt sich trotz fortgeschrittener Entdifferenzierung zumeist in einem Teil der Tumorzellen GFAP nachweisen.

Diagnostik

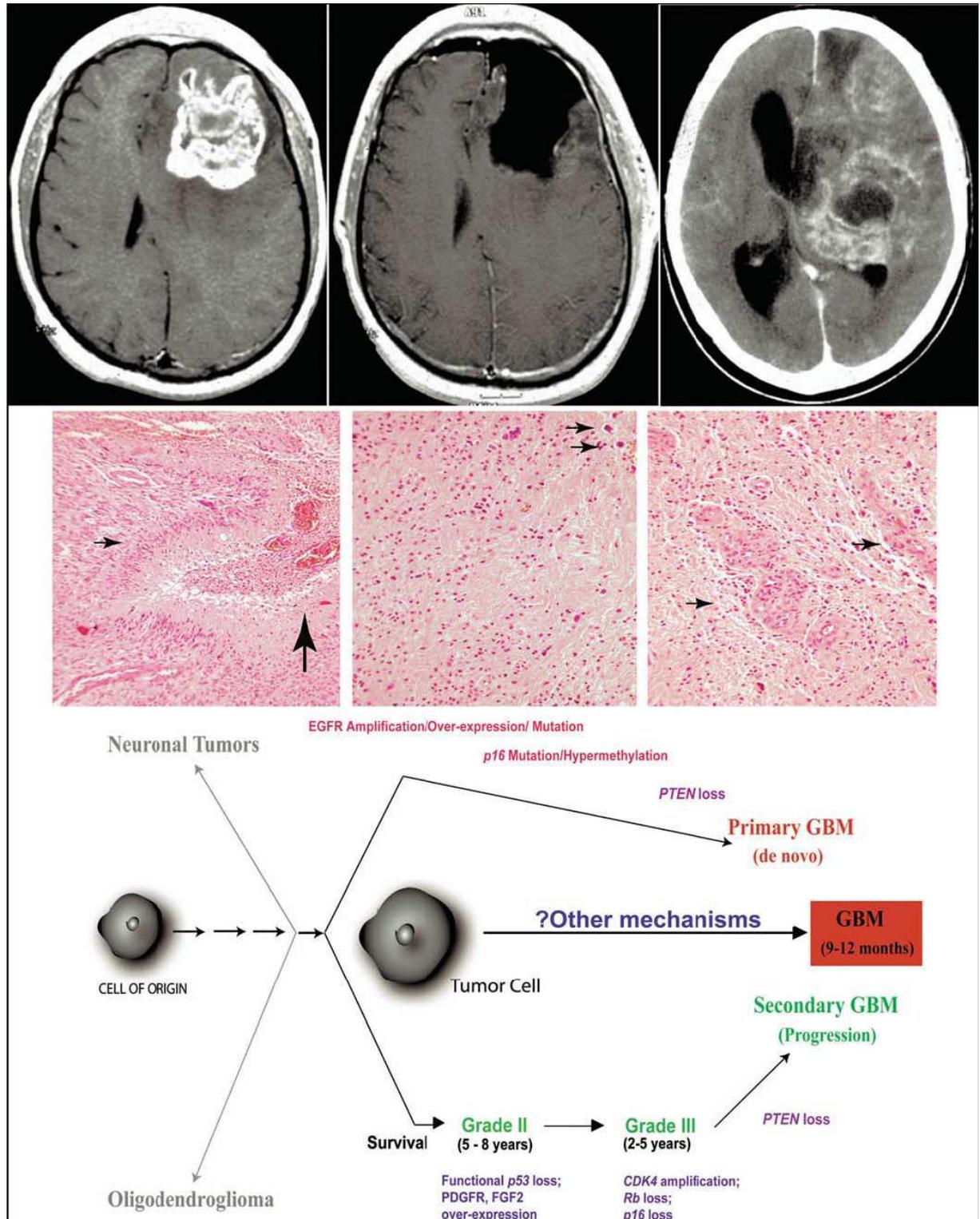
Im CT sind Glioblastome durch eine unterschiedliche Dichte, eine unscharfe Tumorbegrenzung sowie ein großes, begleitendes Marklagerödem gekennzeichnet. Vor allem in der Tumorrandzone kommt es nach Kontrastmittelgabe zu einer inhomogenen Anreicherung. Typisch für T2-Bilder im MRT sind eine starke Anreicherung von Kontrastmittel in soliden Tumoranteilen, Zysten, Blutungsreste und ein ausgedehntes, fingerförmiges Ödem. Differentialdiagnostisch sollte immer an eine große, nekrotische Hirnmetastase oder an einen Abszeß gedacht werden (Weller 2004).

Die Angiographie lässt in 60-70% eine Kontrastmittelanreicherung mit pathologischen Gefäßen erkennen. (Poeck u. Hacke 2001).

Genetische Aspekte

Mit Ausnahme des Li-Fraumeni-Syndroms ist die Ätiologie der Glioblastome unbekannt. Dennoch gibt es eine Assoziation zu genetischen Daten, die sich, je nachdem, ob das Glioblastom sekundär aus einem Grad-II- oder Grad-III-Astrozytom entsteht oder ob es sich primär entwickelt, unterschiedlich äußern. Primäre Glioblastome manifestieren sich eher bei älteren Patienten nach kurzer Anamnese de novo und sind genetisch charakterisiert durch EGFR (epidermal growth factor receptor, epidermaler Wachstums-Faktor-Rezeptor)-Amplifikation (40%) und -Überexpression (60%), MDM2 (murine double minute, Murin doppelte Minute [p53 bindendes Protein])-Amplifikation (<10%) und -Überexpression (50%), CDKN2A/p16 (cyclin - dependent kinase inhibitor 2A/p16, Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor)-Deletion (30-40%) und PTEN (phosphatase and tensin homolog, Phosphatase und Tensin Homologes)-Mutation (30%) (Ohgaki u. Kleihues 2007, Kleihues u. Ohgaki 2000). Das sekundäre Glioblastom entwickelt sich durch Tumorprogression aus einem niedriggradigen oder anaplastischen Astrozytom und tritt bei jüngeren Patienten auf. Hier sind TP53-Mutationen (>65%) häufiger (siehe Abbildung 5; Peiffer et al. 2002, Kleihues u. Ohgaki 2000, Böcker et al. 2001).

Abbildung 5: Representative klinische, pathologische und molekulargenetische Charakteristika von Glioblastoma Multiforme (Aus Weil 2006)



Die Abbildungen in der oberen Reihe veranschaulichen MR-Bilder eines Patienten mit Glioblastoma multiforme (GBM). Auf der linken Seite und in der Mitte sind Gadolinium-verstärkte T1-gewichtete axiale MR-Bilder vom Tag vor und dem Tag nach der Resektion eines großen, links-frontalen GBM's zu sehen. Der Patient war postoperativ mit Chemotherapie und Radiatio behandelt worden. 11 Monate nach der ersten Operation stellte sich der Patient mit Stupor und verstärkten Kontrastmittelaufnahmen im CT (Bild oben rechts) erneut vor. Hier zeigte sich ein massives Wiederauftreten des GBM.

Die mittlere Abbildungsreihe zeigt histopathologische Beispiele vom Tumor dieses Patienten. Das linke Bild ist durch Hyperzellularität, Pseudopallisaden um eine Nekrose (kleiner Pfeil) und vaskuläre Proliferation mit Hämorrhagie (großer Pfeil) gekennzeichnet. Im mittleren Bild ist eine Hyperzellularität mit intermittierenden mitotischen Formen (kleine Pfeile) zu sehen, während man in der rechten Abbildung verschiedene Areale mit endothelialer Proliferation (kleine Pfeile) erkennen kann.

Die untere Abbildung zeigt ein schematisches Modell der Astrozytom-Entwicklung und Progression. Die wichtigsten genetischen Veränderungen sind bei jedem Pathway angezeichnet. Auch die durchschnittliche Überlebenszeit ist für jeden Astrozytomtyp notiert. Neuronale Tumoren und Oligodendrogliome (links oben bzw. unten) scheinen unabhängig zu entstehen. Obwohl grundlegende Erkenntnisse über genetische Merkmale entwickelt worden sind, konnten diese nur inkonsequent in GBM's gefunden werden und erscheinen bis jetzt nicht effektiv vereinbar mit einer gezielten Therapie. Es bleibt im großen und ganzen unklar, wie innerhalb des Tumor-Progresses entweder ein GBM de novo oder eine sekundäre Form entsteht (unbekannte Schritte von potentiellen Vorläufern oder pluripotenten Tumor-Zelle(n) sind durch kleine Pfeile angezeigt).

Therapie und Prognose

Die Therapie der Wahl besteht in einer möglichst radikalen Resektion, an die sich eine Bestrahlung und antiödematöse Therapie anschließen. Mit einer subtotalen Resektion, einer Bestrahlung, einer Zytostase und Kortikoiden kann man das Leben der Kranken lediglich um einige Monate verlängern. Prognostische Faktoren wie Resektionsumfang, Lebensalter und Ausmaß der klinischen Beeinträchtigung zu Beginn der Therapie spielen dabei eine Rolle (Stummer et al 2006).

Obwohl innerhalb der Neurochirurgie und Strahlentherapie bedeutende Fortschritte erzielt worden sind, besitzt der Tumor mit einer 5-12%igen 2-Jahres-Überlebensrate noch immer eine äußerst schlechte Prognose (Peiffer et al. 2002). Eine Radikaloperation des Tumors ist nicht möglich, schon früh treten Rezidive auf (Poeck u. Hacke 2001). Die mediane Lebenserwartung unter der gegenwärtigen Standardtherapie (Operation und anschließende Bestrahlung) beträgt 8-13 Monate (Peiffer et al. 2002). Neueste Therapieformen zeigen hier eine mögliche Verbesserung durch Temozolomid (Weller et al. 2005)

3.3 Genetische Aspekte von Wif1 und Rab34

3.3.1 Das Onkogen Wif1

Wif1 steht für Wnt inhibitory factor-1 (Wnt inhibierender Faktor-1) und ist ein bekanntes Onkogen, das zu der Wnt-Proteinfamilie gehört. Die Wnt (Wingless-type, flügelloser Typ)-Proteinfamilie besteht aus 19 Mitgliedern, die als sezernierende Glycoproteine mit Signalfunktion beschrieben werden. Diese Signalmoleküle scheinen sowohl in Entwicklungsprozesse als auch weitreichend in die Onkogenese involviert zu sein. Anhand verschiedenster menschlicher Krebsarten konnte bereits eine aberrante Aktivierung des Wnt-Signal-Pathways demonstriert werden. Hierzu gehören kolorektale Tumoren, Kopf- und Nackenkarzinome, Melanome und Leukämie (Reguart et al. 2004). Sowohl in NSCLC (non-small-cell lung cancer, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom), als auch in Mesotheliom-Zellen induziert die Blockade der Wnt-1-Signalkaskade Apoptose und unterdrückt Wachstum (Reguart et al. 2004).

3.3.1.1 Der Wnt-Pathway

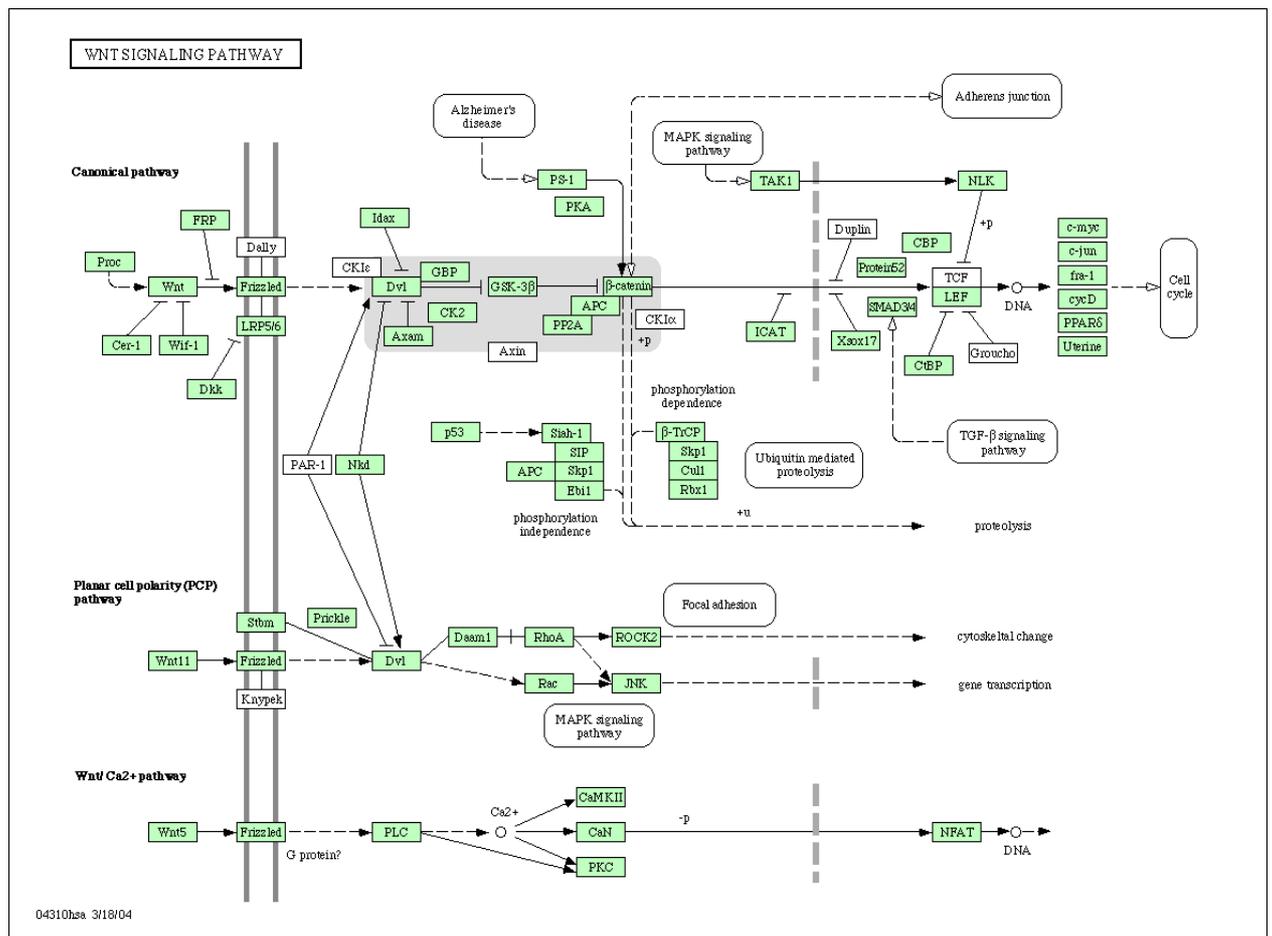
Für Wnt konnten bisher drei Pathways mit verschiedenen Aktivierungsmechanismen innerhalb der Wnt-Antagonisten identifiziert werden (siehe Abbildung 6; Reguart et al. 2004):

Der am besten verstandene wird als Canonical-Pathway (traditioneller Reaktionsweg) bezeichnet (siehe Abbildung 6 oben). Er beinhaltet die direkte Bindung von Wnt-Liganden an zwei verschiedene Familien von Zell-Oberflächenrezeptoren: die Fz (Frizzled, gezischt)-Rezeptorfamilie und die LRP (LDL-receptor-related protein, LDL-Rezeptor assoziiertes Protein)-Familie. Intrazellulär aktivieren die Wnt-Signale Dvl-Proteine, welche wiederum GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3beta, Glycogen Synthase Kinase 3beta) inhibieren. Das Ausschalten von GSK-3 β wird durch Kasein-Kinase1epsilon vermittelt, welche an die Protein-Interaktionsdomäne PDZ bindet und Dvl phosphoryliert. Dadurch wird die Phosphorylierung von β -Catenin verhindert. Dieses freie β -Catenin ist stabilisiert und akkumuliert im Zytosol, was seine Translokation in den Zellkern erlaubt, von wo aus es an Transkriptionsfaktoren wie LEF/TCF binden kann. Dieser β -Catenin-LEF/TCF-Komplex induziert die Transkription von wichtigen nachfolgenden

Zielgenen, von denen viele eine Rolle beim Tumorwachstum spielen (Mazieres et al. 2005).

Die anderen beiden Pathways, welche das Wnt-Signal beeinflussen können, wirken entweder durch eine Aktivierung von Calmodulin Kinase II und Protein Kinase C (der sog. Wnt/Ca²⁺ Pathway) oder durch eine Aktivierung von Jun N-terminaler Kinase (der sog. planare Zell-Polaritäts-Pathway) (Mazieres et al. 2005).

Abbildung 6 (englisch): The Wnt pathways, (a) Wnt/beta signaling pathway, (b) Wnt/Ca²⁺ pathway, (c) Wnt/polarity pathway (Internet: The Wnt-Pathways)



3.3.1.2 Extrazelluläre Antagonisten des Wnt-Pathways

Extrazelluläre Antagonisten Wnt signalisierender Pathways können in zwei große Klassen unterteilt werden. Beide Molekülklassen verhindern eine Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor, allerdings durch unterschiedliche Mechanismen: Mitglieder der ersten Klasse, welche die sFRP (secreted Frizzled-related protein, abgesondertes Frizzled-assoziiertes Protein)-Familie, den Wif (Wnt inhibitory factor, Wnt-hemmender Faktor)-1 und Cerberus umfassen, binden in erster Linie an die Wnt-Proteine selbst (Kawano u. Kypta 2003).

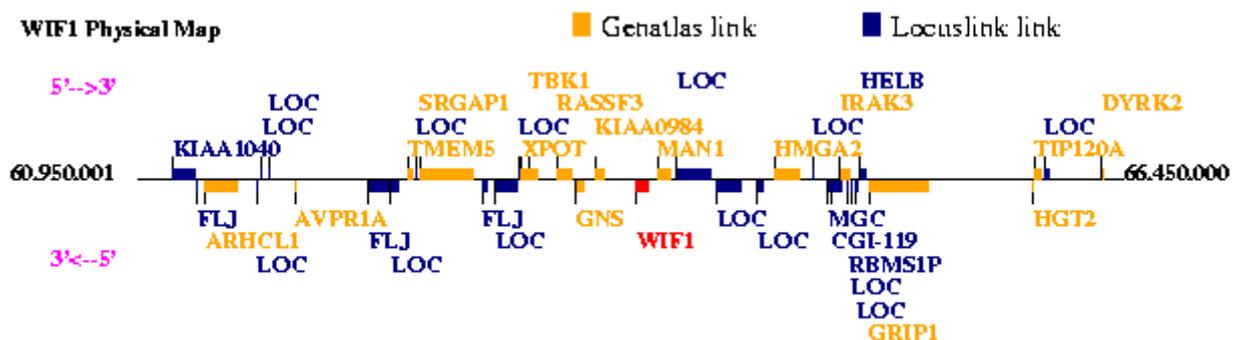
Die zweite Gruppe besteht aus der Dkk (Dickkopf)-Familie, welche die Wnt-Signale durch Bindung an die LRP5/LRP6-Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes unterbindet (Reguart et al. 2004).

3.3.1.3 Struktur von Wif1

Die Rolle des Wif1 innerhalb der Wnt-Signalkaskade wurde erstmals im Zusammenhang mit der menschlichen Retina identifiziert, es wurden hoch konservierte Orthologe im Krallenfrosch (*Xenopus*) und Zebrafisch (*Danio rerio*) gefunden (Reguart et al. 2004).

Wif1 ist ein Antagonist des Wnt, es kann Wnt-Proteine im extrazellulären Raum binden und seine Aktivität inhibieren (siehe Abbildung 7; Mazieres et al. 2004).

Abbildung 7 (englisch): *Wif1* physical map; location 12q13.13 (Internet: GeneAtlas - Database)



Entwicklungsgeschichtlich ist Wif1 ein konserviertes Protein, das auf dem Chromosom 12q14 lokalisiert ist und am N-terminalen Ende eine einzigartige Signalsequenz enthält, die als Wif-Domäne bezeichnet wird (Reguart et al. 2004).

Wif1 enthält zusätzlich 5-EGF (five-epidermal growth factor, fünf epidermaler Wachstumsfaktor)-ähnliche Wiederholungen. Es zeigt keine Ähnlichkeiten mit der cysteinreichen Domäne (CRD, cysteine-rich domain) von Fz oder sFRP.

Es konnte gezeigt werden, dass Wif1 an XWnt-8 und an *Drosophila* Wg (wingless, Übersetzung)-Mutanten im extrazellulären Raum binden kann und sowohl eine Unterbindung der Interaktion von XWnt-8 mit Dfz2, als auch eine Armadillo-Stabilisierung von XWnt-8 behandelten Klon-8-Zellen von *Drosophila* verursacht (Reguart et al. 2004).

Eine Funktionsanalyse der 5' Promotorregion (etwa 1,5 Kilobasen) des menschlichen Wif1-Genes zeigt, dass diese Region ein ganzes Fragment mit hoher basaler Promotor-Aktivität in verschiedenen Zelllinien aufweist, während die gekürzten Formen dies nicht tun (Reguart et al. 2004). Verschiedene wichtige Transkriptionselemente wurden auf der 5' flankierenden Region gefunden, hierzu gehören das Homeobox Protein Engrailed (ausgezacktes Homeobox Protein; -826 bis -830 von ATG), E2F (-807 bis -811), GLI-Krüppel (-548 bis -552), MYC-assoziiert (-419 bis -423) und NF- κ B (-421 bis -425) (Reguart et al. 2004). Der G/C-Gehalt der menschlichen Wif1-Promotorregion ist hoch (ungefähr 63,5%) (Reguart et al. 2004). Diese Integrität der Wif1-Promotorregion demonstriert möglicherweise seine zentrale Rolle bei der Wif1-Aktivität bzw. -Aktivierung.

Beim Klonen und der Charakterisierung des menschlichen Wif1-Promotors fand man unterschiedliche Aktivitäten dieses Wif-Promotors in verschiedenen menschlichen Krebs-Zelllinien. Es wird über eine innerhalb dieses Promotors gelegene CpG-Insel (105 CpGs) berichtet und vermutet, dass dieser Promotor eine mutmaßliche TATA-Box (-1368 bis -1378 über dem ATG) enthält (Reguart et al. 2004). Ein weiterer wichtiger Reaktionsmechanismus ist die aus menschlichem Lungenkrebs beobachtete Methylierung von CpG-Inseln, welche innerhalb der funktionellen Wif1-Promotorregion liegt (Reguart et al. 2004). Die Methylierung in diesem Gebiet scheint ein wichtiger Regulationsmechanismus im Zusammenhang mit aberranter Wnt-Signal-Aktivierung in Tumoren zu sein (Reguart et al. 2004). Reguart et al. fanden des Weiteren eine Korrelation zwischen dem Expressionslevel von β -Catenin in Tumorzelllinien und der Wif1-Promotoraktivität. Dies legt nahe, dass der Wif-Promotor durch den Wnt/ β -Catenin-Pathway reguliert wird und möglicherweise eine Funktion im Sinne eines negativen Feedbacks übernimmt (Reguart et al. 2004).

Zusammenfassend kann man aus diesen Untersuchungen schließen, dass die CpG-Insel innerhalb eines funktionellen Wif1-Promotors liegt, folglich kann diese methylierte Region als wichtig für das Wif1-Gen-Silencing (Wif1-Gen-Verstummen) und somit innerhalb des Wnt/ β -Catenin-Pathways angesehen werden (Reguart et al. 2004).

3.3.1.4 Expressionsverhalten von Wif1

Bekanntermaßen spielen die Wnt-Aktivierung und Wif1 eine Rolle in der Tumorgenese. An dieser Stelle sei auf das unterschiedliche Expressionsverhalten innerhalb verschiedenster Tumorarten der einzelnen Mitglieder des Wnt-Pathways verwiesen, die in nachstehender Tabelle 3 aufgeführt sind.

Tabelle 3: Auszug aus Alterationen im Wnt-Pathway in verschiedenen Tumoren (Nach Ilyas 2005)

Diese Tabelle (in englisch) zeigt in Auszügen Mechanismen, durch die Wnt aktiviert werden kann. Außerdem zeigt sie die unterschiedlichen Tumoren, über die im Zusammenhang mit einer aberranten Wnt-Signalisierung berichtet worden ist.

Wnt pathway component	Change	Cancer type
Wnts	Overexpression Down-regulation	NSCLC CLL Gastric cancer HNSCC Colorectal Ovarian BCC Breast
sFRPs	Overexpression Down-regulation	Prostate Breast Bladder Mesothelioma Colorectal
WIF1	Down-regulation	NSCLC Prostate Breast Lung Bladder
LRP5	Overexpression	Osteosarcoma
Frizzled	Overexpression	Prostate HNSCC Colorectal Ovarian Oesophageal Gastric
Dishevelled	Overexpression	Prostate Breast Mesothelioma Cervix

Legende: NSCLC = non-small cell lung cancer; HNSCC = head and neck squamous cell carcinoma; CLL = chronic lymphatic leukaemia; BCC = basal cell carcinoma; GOF = gain-of-function; LOF = loss-of-function.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist ein Wnt-Pathway u.a. bei der Lungenkarzinogenese beschrieben worden. Es wird ein unterschiedlicher Zusammenhang zwischen der Aktivierung Wnt-vermittelter Signale bei Lungentumoren und beispielsweise bei kolorektalem Krebs gesehen.

Beim Lungenkrebs sind APC (Antigen presenting cell, Antigen-präsentierende Zelle)- oder β -Catenin-Veränderungen selten, der Wnt-Pathway scheint

stromaufwärts des β -Catenins aktiviert zu werden (Mazieres et al. 2005). Drei Mechanismen der Aktivierung wurden identifiziert: Eine Überexpression von Wnt-Effektoren wie Dvl, eine Aktivierung des nicht-kanonischen Pathways, einschließlich der JNK (Jun N-terminale Kinase) und eine Verdrängung von Wnt-Antagonisten wie Wif1 (Mazieres et al. 2005).

Die jeweilige Relevanz jener Ereignisse und ihre wahrscheinliche Beziehung bleiben unklar. Dennoch könnte die Blockade des Wnt-Pathways in Zukunft zu neuen Behandlungsstrategien bei Lungenkrebs führen (Mazieres et al. 2005).

Um den Mechanismus von Wif1 zu klären, der für das Silencing von Lungentumoren sorgt, wurde der menschliche Wif1-Promotor identifiziert und der Methylierungsstatus der CpG-Inseln untersucht. Anhand methylierungsspezifischer PCR und Sequenzanalysen nach Bisulfidbehandlung demonstrierten Mazieres et al. eine häufige CpG-Insel-Hypermethylierung im funktionellen Wif1-Promotor-Gebiet (Mazieres et al. 2004). Diese Hypermethylierung korrelierte mit seinem transkriptionellen Silencing (Schweigen) in menschlichen Lungenkrebs-Zelllinien. Außerdem stellte die Behandlung mit 5-aza-2'-Deoxycytidin die Wif1-Expression wieder her. Weiterhin konnte in 15 (83%) von 18 frisch resezierten Lungentumoren eine Herunterregulierung der Wif1-Expression gezeigt werden. Dieses Silencing korrelierte mit der Wif1-Promotor-Methylierung (Mazieres et al. 2004).

In intestinalen Adenomen wurde eine, verglichen zu normalen epithelialen Zellen von APC (Min.n / +) Mutant-Mäusen, erhöhte Expression von Opg-, Ctse-, Krt2-4-, Fut-2-, 24p3- und Wif1-Genen gefunden. Eine Wif1-Expression konnte auch in mehreren Tumor-Zelllinien epithelialer Abstammung einschließlich zweier menschlicher Kolon Adenokarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden (Cebrat et al. 2004).

In einer Untersuchung an Mäuse-Großhirnen zur Charakterisierung von Wnt-Antagonisten der Dkk-Familie waren nur dkk1 und dkk4, zusammen mit den zwei anderen Antagonisten Axin2 und Wif1, an einem Feedback-Mechanismus beteiligt (Diep et al. 2004). Dieser Feedback-Mechanismus verhindert in transgenen Mäusen, die eine bedingte Vermehrung von β -Catenin in ihrem Großhirn aufweisen, die Wnt-Signale (Diep et al. 2004).

Der Zusammenhang zwischen der Wnt-Signalkaskade und dem Akt (Protein Kinase B)-Pathway in Prostatatumoren ist bisher noch unklar. Wif1 reguliert den Akt-Pathway herunter (Ohigashi et al. 2005). Hierdurch konnte die Chemosensitivität in PTEN-Null-Zellen (Zellen ohne PTEN-Suppressorgen) erhöht werden, man erreichte dies durch einen Transfer von Wif1 in PC-3 (von Knochenmetastasen stammende)- und DU145 (von Gehirnmastasen stammende)-Pca-Zellen, die Charakteristika des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms zeigen. Als Resultat fand man eine Akt-Phosphorylierung in PTEN-Null-PC-3-Zellen und eine zu geringe Phosphorylierung in PTEN-exprimierten DU145-Zellen (Ohigashi et al. 2005). Der Phosphorylierungsgrad von Akt in Wif1-überexprimierten PC-3-Zellen war niedriger als der in nativen Zellgruppen oder Kontrollgruppen mit Vektor-übertragenen PC-3-Zellen. Wif1 zeigte dabei eine zusätzliche Hemmung bei bereits reduzierter Akt-Aktivität in DU145-Zellen (Ohigashi et al. 2005). Eine Überexpression von Wif1 resultierte in einer Sensibilisierung von PC-3-Zellen für Paclitaxel und veranlasste so eine Apoptose. DU145-Zellen waren empfindlicher für Paclitaxel, allerdings wurden sie nicht durch Wif1 beeinflusst. Der PI3K-Inhibitor LY294002 schien die Chemosensitivität nativer PC-3-Zellen wiederherzustellen, genauso wie Wif1 es tat (Ohigashi et al. 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wnt-Nachrichtenübermittlung in die Akt-Aktivierung der Pca-Zellen involviert ist. Des Weiteren zeigen diese Daten die Möglichkeit auf, Wnt und seinen Pathway für therapeutische Ziele bei PTEN-veränderten Pca-Zellen zu verwenden (Ohigashi et al. 2005).

Wissmann et al. führten eine Chip Hybridisierung durch, bei der sie das Expressionslevel von 40 Genen des Wnt-Pathways bei 54 primären Prostatakarzinomen analysierten (Wissmann et al. 2003). Elf Gene zeigten in mindestens 10% der Prostatatumoren eine mehr als doppelt so hohe Expression. Während sFRP4, FZD4, FZD6, Dvl1, TCF4 und MYC hoch reguliert waren, waren Wif1, Wnt2, PPP2CB, CCND2 und CD44 bei bestimmten Prostata-Krebs-Patienten runterreguliert. Die signifikantesten Veränderungen in der Expressionsabweichung der RNA-Niveaus zeigten Wif1 und sFRP4. In 64% der primären Prostatatumoren zeigte sich eine Herabregulierung des Wif1, während sFRP4 bei 81% der Patienten hochreguliert war. Immunohistochemische Analysen, die einen polyklonalen Antikörper verwendeten, deckten eine starke zytoplasmatische perinukleäre Wif1-

Expression in normalen epithelialen Zellen der Prostata, der Brust, der Lunge und der Harnblase auf. Eine starke Verminderung der Wif1-Protein-Expression wurde in 23% der Prostatakarzinome, in 60% der Brusttumoren, in 75% der NSCLC und in 26% der analysierten Blasentumoren gefunden. Keine bedeutende Assoziation zwischen der Wif1-Herunterregulation und dem Tumor-Stadium oder -Grad wurde für die Prostata, die Brust oder NSCLC beobachtet. In Blasentumoren korrelierte die Wif1-Runterregulation mit höheren Tumor-Stadien (pTa gegen pT1-pT4; $p = 0.038$) (Wissmann et al. 2003).

3.3.2 Das Onkogen Rab34

3.3.2.1 Übersicht

Eines der Kennzeichen von eukaryontischen Zellen ist der interzelluläre vesikuläre Transport. Die Vesikel tragen verschiedene Moleküle und Signalmoleküle wie Lipide und Proteine durch die Zelle. Rab34 gehört der Gruppe der Ras-Gene an. Rab-GTPasen sind Ras-ähnliche GTP-bindende Proteine mit kleiner Molekularmasse, die in verschiedene Stufen entlang exozytischer und endozytischer Pathways involviert sind (Chen et al. 2003). Ursprünglich wurde die partielle cDNA für Rab34 als Rah (ras-related homolog) identifiziert (Wang u. Hong 2002).

Ras-Gene sind Onkogene, sie umfassen eine Gruppe von Protoonkogenen (H-Ras, K-Ras, K-RasB, N-Ras), die für G-Proteine kodieren. Die heute bekannten mehr als 50 Protoonkogene können aufgrund der Funktion der Produkte, für die sie kodieren, eingeteilt werden in:

- 1) Wachstumsfaktoren
- 2) Wachstumsfaktor-Rezeptoren
- 3) G-Proteine
- 4) Nichtrezeptor-Proteinkinasen (Tyrosinkinasen, Serin-/Theoninkinasen)
- 5) nukleäre Proteine, Transkriptionsfaktoren
- 6) tumorspezifische Chromosomenrearrangements
- 7) virale Onkogene (Roche Lexikon 2003).

Eine Reihe von onkogenen Mutationen von Effektoren des Zytoplasmas (und der anderen Effektoren) ist bekannt. Diese Mutationen bewirken wie bei den onkogenen Rezeptoren häufig eine Aktivierung der entsprechenden Proteine, welche zu deren Intensivierung gegenüber regulatorischen oder inhibitorischen Faktoren führen oder in deren subzellulärer Umverteilung resultieren. Durch diese Veränderungen kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung von Molekülen, welche weiter unterhalb in der Signalübertragungskaskade gelegen sind, und führen zu einer zumindest teilweisen Entkoppelung der entsprechenden Signalwege von regulatorischen Einflüssen, die über Rezeptoren in die entsprechende Zelle weitergeleitet werden. Mutationen von Ras sind die am häufigsten vorkommenden Mutationen eines einzelnen Onkogens (Schmoll et al. 2005).

3.3.2.2 Rab-Proteine

Rab-Proteine gehören zu den am frühesten identifizierten Proteingruppen, die die Membrananhaftung und -fusion kontrollieren. Rab-Proteine sind kleine Guanin-Nukleotid-bindende Proteine. Sie repräsentieren mit mehr als 60 Proteinen die größte der sog. Ras-ähnlichen kleinen GTPase-Familie vor allem in Säugetierzellen und sind bislang in allen eukaryontischen Organismen gefunden worden. Von den isolierten und charakterisierten Rab-Proteinen (inklusive Isoformen) scheinen elf Rab-Proteine eine Rolle im endozytotischen Pathway zu spielen (Chen et al. 2003).

Die Rab-Proteine regulieren die Transportwege durch die Membran, indem sie als molekulare Schalter zwischen der aktiven (GTP-gebundenen) und der inaktiven (GDP-gebundenen) Form agieren, welche durch zusätzliche Faktoren wie GAPs (GTPase activating proteins), GEFs (Guanosine exchange factors) und GDIs (GDP dissociation inhibitors) reguliert werden. Im aktiven Status erfüllen Rab-Proteine ihre Funktion bei der Vesikelformation, Bewegung von Organellen sowie Membranspaltung und -fusionen durch die Rekrutierung von Effektor-Proteinen (Chen et al. 2003).

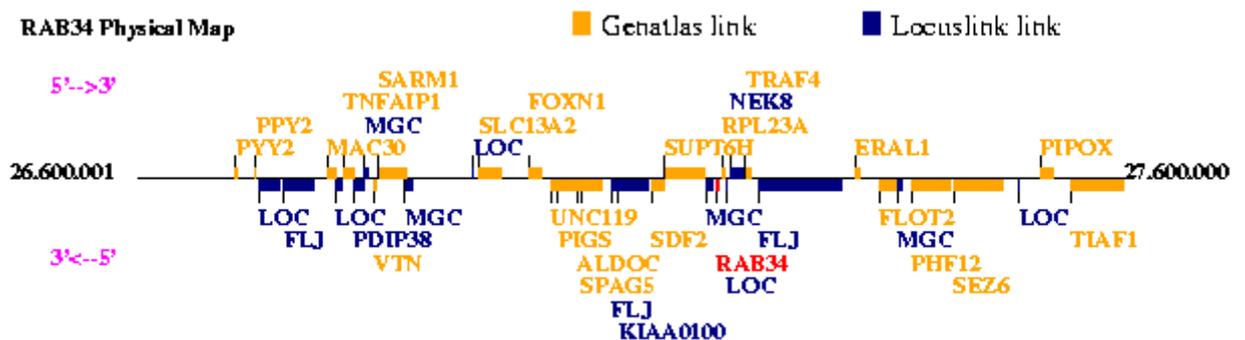
In Rab-Proteinen sind verschiedene Moleküle spezifisch lokalisiert und regulieren über unterschiedliche Pathways die Endo- und Exocytose. Sie regeln viele biologische Mechanismen, von der Freisetzung von Neurotransmittern über die Entwicklung von Intelligenz bis hin zu Befruchtung und Knochenwachstum (Chen et al. 2003). Rab-Proteine bestimmen als Signal das Zustandekommen, das Andocken und die Verbindung von intrazellulären Räumen. Die Proteine selbst unterliegen verschiedenen Kontrollmechanismen, inklusive den Vorgängen bei der Expression, Lokalisation und Aktivierung.

Bekannte Krankheits-Beispiele für Mutationen in Rab-GTPasen oder den mit ihnen interagierenden Proteinen sind immunologische- und Pigmentstörungen wie das Griscelli-Syndrom, mentale Retardierung, Neuropathie (Charcot-Marie-Tooth), Nierenkrankheiten und Blindheit. In vielen vaskulären, Lungen- und Schilddrüsenerkrankungen sowie in einigen Krebsarten wurde die Überexpression von Rab-GTPasen gemessen und korrelierte mit der Stärke des Krankheitsverlaufes.

3.3.2.3 Struktur von Rab34/Ras-related protein

RAB34 (Ras-related protein Rab34; Ras-verwandtes Protein Rab34) trägt als Synonyme die Bezeichnungen RAH, RAB39, Rab-39 und Ras-related protein (siehe Abbildung 8). In den folgenden Texten werden die Bezeichnungen je nach zitierter Quelle verwendet.

Abbildung 8 (englisch): *Rab34 physical map; location 17q11.1* (Internet: GeneAtlas - Database)



Man findet Rab34 sowohl beim Menschen (*Homo sapiens*), als auch bei der Maus (*Mus musculus*) und beim Zebrafisch (*Danio rerio*).

Rab34 ist auf Chromosom 17q11.1 lokalisiert und umfasst die Abschnitte 54 bis 213, während Rab39 auf Chromosom 11q22-q23 lokalisiert ist und die Abschnitte 8 bis 178 umfasst. Obwohl beide Gene auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, scheint Rab39 eine kurze splice-Variante von Rab34 zu sein. Zu dieser Annahme kamen Chen et al. (2003), indem durch Druckwellenanalyse von Rab39-cDNA und Proteinsequenz mit Homologen Rab39 als eine mögliche Variante von Rab34 detektiert wurde. Auch innerhalb der Literatur wird Rab39 synonym zum Begriff Rab34 verwendet, da beide Gene eine hohe Homogenität aufweisen. Die höchste Homogenität zeigt Rab39 mit dem Rah/Rab34-Protein der Maus und dem menschlichen Rab34 an der N-terminalen Aminosäure 192 (>95% Identität), welche in den Membranausstülpungen lokalisiert und in die Mikropinosomen-Formation involviert ist (Chen et al. 2003).

3.3.2.4 Rab39

In voller Länge umfasst die cDNA von Rab39 1251 Basenpaare mit einem kompletten ORF (open reading frame) von 636 Basenpaaren Länge, welcher potentiell ein 211 aa (aminoacid; Aminosäure, AS)-Rest-Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 23,7 kDa verschlüsselt (Chen et al. 2003). Rab39 besitzt genaufwärts des ORF ein innerhalb des Leserahmens liegendes Stopcodon und ATTAAA-übereinstimmende Sequenzen, sowie einen Polyadenosin-Schwanz an seinem 3'-Ende. Somit scheint die cDNA in ihrer vollen Länge isoliert worden zu sein (Chen et al. 2003).

Beim Vergleich von Homologen zeigte das Rab39-Protein drei Phosphat/Mg²⁺-bindende Motive (59-67, 85-87 und 107-113 AS) und zwei Guanosin-bindende Motive (122-124 und 165-170 AS). Weiterhin konnten drei Proteinkinase-C-Phosphorylierungs-Abschnitte (167-169, 199-201 und 208-210 AS), ein Caseinkinase II Phosphorylierungs-Abschnitt (167-170 AS), ein Tyrosin Phosphorylierungs-Abschnitt (75-80 AS), ein Myristoyl-Abschnitt (99-104 AS), ein ATP/GTP- bindendes Motiv (60-67 AS) und ein C-terminales Microbody (Mikrokörper) Zielsignal (209-211 AS) aufgezeigt werden (Chen et al. 2003).

Rab39 enthält konservierte Motive, welche bei der Phosphat/Guanosin-Bindung und einem Microbody-C-Terminal als Signal eine Rolle spielen (Chen et al. 2003). Aus diesem Grund scheint Rab39 als neues Rab-Protein in den Proteintransport unter Regulierung von Kinasen involviert zu sein (Chen et al. 2003).

Vorkommen von Rab39

Ein Rab39-Vorkommen konnte sowohl in der DC (Dünnschichtchromatographie) als auch in verschiedenen hämatologischen Leukämie-Zelllinien detektiert werden. Auch in den meisten epithelialen Tumorzellen fand man eine Rab39-Expression (Chen et al. 2003). Ein verstärktes Vorkommen von Rab39 fand man in der Leber, während es in der Milz, dem Kolon, dem Herzen, der Plazenta, der Lunge, dem Skelettmuskel und in den Nieren nur moderat ausgebildet war. Eine niedrige Expression wurde in der Prostata, den Testes, den Ovarien, im Dünndarm, in den peripheren Blut-Leukozyten (PBL) und im Pankreas gefunden. Rab39 konnte in HeLa-S3-Zellen, in Lungenkarzinom-Zellen A549, in Melanom-G361-Zellen und NIH3T3-Zellen (permanente Fibroblastenzelllinie aus Mausembryonen) detektiert

werden (Chen et al. 2003). Man findet Rab39 hauptsächlich in epithelialen Zellen (Chen et al. 2003).

Subzelluläre Lokalisation von Rab39

Rab39-GFP (C-terminal) ist vorzugsweise im Zytosol lokalisiert, in manchen Fällen auch im Nukleus, während GFP-Rab39 (N-terminal) komplett im Zytosol zu finden ist. GFP- Rab39 wurde vor allem in perinukleären Strukturen und kolokalisiert mit Golgi-assoziierten Organellen gefunden, wie anhand gelber Overlays in Fluoreszenzbildern in HeLa-Zellen und NIH3T3-Zellen demonstriert werden konnte. Zellen, auf welche nur pGFP (phosphorylated GFP) übertragen wurde, zeigten sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus eine Fluoreszenz, welche keine Übereinstimmung mit den BFA (Brefeldin A)-positiven Golgi-verwandten Organellen zeigte. Auch bei der Überprüfung des Rab39 mittels konfokaler Mikroskopie lässt die subzelluläre Lokalisation darauf schließen, dass Rab39 mit Golgi-verbundenen Organellen assoziiert ist (Chen et al. 2003). Eines der Charakteristika der Rab-Proteine ist ihre Bindung an GTP und die Hydrolyse zu GDP, welche zu einer Regulierung der Vesikel-Knospung und des Fusionsprozesses führt.

3.3.2.5 Rab34 und seine Interaktion mit dem Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat übernimmt neu hergestellte Proteine aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), modifiziert ihre Oligosaccharide, sortiert die Proteine und versendet sie aus dem trans-Golgi-Netz zur Plasmamembran, den Lysosomen oder sekretorischen Vesikeln. In allen eukaryontischen Zellen schnüren sich Transportvesikel ständig vom trans-Golgi-Netz ab und verschmelzen mit der Plasmamembran (konsekutive Exozytose); der Golgi-Apparat bringt Plasmalipide und -proteine zur Zelloberfläche und entlässt im Prozess der Sekretion Moleküle aus der Zelle. Spezialisierte sekretorische Zellen verfügen zusätzlich über einen geregelten exozytotischen Ausscheidungsweg, in dessen Verlauf Moleküle, die in sekretorischen Vesikeln gespeichert werden, von der Zelle nur nach Empfang eines Sekretionssignals durch Exozytose freigesetzt werden. Durch Endozytose nehmen Zellen Flüssigkeit, Moleküle und kleinere Partikel auf; Bereiche der Plasmamembran stülpen sich ein und schnüren sich unter Bildung von endozytotischen Vesikeln ab. Der größte Teil des endozytierten Materials wird erst

den Endosomen und dann den Lysosomen übergeben, wo es von hydrolytischen Enzymen verdaut wird. Die meisten Bestandteile der endozytotischen Vesikelmembran werden jedoch zur Wiederverwendung in Transportvesikeln zur Plasmamembran zurückgebracht (Alberts et al. 1999).

Wang et al. wiesen in ihren Studien die Assoziation von Rab34 mit dem Golgi-Apparat nach. Expression des Wild-Typs oder GTP-gebundenen aber nicht GDP-gebundenen Versionen von Rab34 verursachen Raumneuverteilungen von Lysosomen von der Peripherie bis in das peri-Golgi-Gebiet (Wang u. Hong 2002). Vermittelt durch Prenylation (Isoprenrest) und seine direkte Wechselwirkung mit dem RILP (Rab-interacting lysosomal protein) hängt die Regulierung lysosomaler Positionierung durch Rab34 von seiner Assoziation mit der Membran ab. Diese biologische Aktivität, vermittelt durch die Rab34-RILP Wechselwirkung, ist abhängig vom Lysin an der Position 82 in der switch (Schalt)-I Region (Wang u. Hong 2002).

Diese Ergebnisse beweisen die Existenz von regulatorischen Pathways innerhalb des Golgi-Apparates, die zur Modulierung der räumlichen Positionierung von sonst entfernt gelegenen Lysosomen führen. Dennoch ist der genaue Mechanismus bis heute nicht bekannt.

Die Makropinozytose ist ein effizienter Mechanismus in der Nährstoffaufnahme und bei der Lösung von Makromolekülen. Makropinosomen werden aus Ausstülpungen der Zelloberfläche gebildet und wandern, (v. a. in Fibroblasten) von Aktin umgeben, zum Zellzentrum ab (Sun et al. 2003). In Untersuchungen zur Makropinozytose wurde die komplette codierende Sequenz von Rah/Rab34 geklont. Dabei konnte eine merkliche GTPase Tätigkeit in vivo gezeigt werden, obwohl der Wild-Typ Rah in vitro eine äußerst niedrige GTPase-Aktivität aufwies (Sun et al. 2003). Es konnte eine teilweise Koexistenz von Rah und Rab5 gezeigt werden, vor allem Rah konnte bei der Bildung der Makropinosomen gefunden werden, wohingegen Rab5 in späteren Stadien der Endosomen anwesend war (Sun et al. 2003).

Des Weiteren konnte die Bildung von Makropinosomen durch die Behandlung des von Thrombozyten hergeleiteten Wachstumsfaktors PDGF (plateled-derived growth factor) oder Phorbol ester (karzinogen wirksame Diterpene in pflanzl. Öl, z.B. Crotonöl) durch Rah erleichtert werden, wurde aber durch einen dominant-negativen

Rah unterdrückt (Sun et al. 2003). In den Untersuchungen von Sun et al. zeigte sich auch durch die dominant-negativen Mutanten von Rac1 und WAVE2 eine Verzögerung bzw. Hemmung der Rah-geförderten Makropinosombildung, die für das Membranzerzausen wesentlich ist (Sun et al. 2003). Diese Ergebnisse deuten an, dass Rah/Rab34 für die effiziente Bildung von Makropinosomen aus der Membranoberfläche erforderlich ist.

3.3.2.6 Rab34 und RILP (Rab-interacting lysosomal protein)

Innerhalb des Vesikel- und Membrantransportes scheint das Rab-interacting lysosomal protein (RILP) eine wichtige Rolle als interaktiver Dimerisationspunkt zu spielen und steht somit im Zusammenhang mit effektiven Wechselwirkungen bei der Entstehung und Verteilung der Lysosomen.

Während der Regulation der lysosomalen Morphologie findet man die kleinen GTPasen Rab7 und Rab34 und über einen gemeinsamen Effektor ihre Interaktion mit RILP (Wang et al. 2004, Colluci et al. 2005). RILP ist ein bekannter Effektor von Rab7 und Rab34. Rab GTPasen und ihre Effektoren sind Schlüsselfaktoren in der Regulation des Membranverkehrs. Tatsächlich organisieren Rab-Proteine verschiedene Proteinkomplexe innerhalb einzelner Vesikel/Organeln und regulieren alle Stadien des Vesikeltransportes. Verschiedene Rab-Proteine scheinen in die Bewegung von Vesikeln/Organeln verwickelt zu sein. Sie sind oftmals assoziiert mit spezifischen Mikrotubuli- oder Aktin-Motorkomplexen (Colluci et al. 2005).

3.3.2.7 LDR (low dose radiation)-Abhängigkeit von Rab34

Es wurden weiterhin Studien über LDR (low dose radiation; niedrige Strahlendosis)-abhängige Expressionsmuster onkogener Signalvermittlung im Muskel, in der Leber und in der Milz von Mäusen durchgeführt, welche anfällig für akute und chronische LDR-Exposition sind (Besplug et al. 2005). Analysen der Genexpression von Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, zytoplasmatischen Serin/Threonin Protein Kinasen, G-Proteinen und DNA-bindenden Kernproteinen, sowie anderen wichtigen Bestandteilen der onkogenen Signalvermittlung wurden erstellt (Besplug et al. 2005).

Als Ergebnis zeigten sich sexual- und gewebespezifische Änderungen in der Expression von Mitgliedern der Ras Superfamilie (N-Ras, Rab2, Rab34, Vav2),

Protein Kinase C (PKC) Isoformen (PKC β , PKC μ), AP 1 Faktor-Komponenten (Jun, JunB und FosB), Wnt signalisierenden Pathway-Mitgliedern sowie in vielen anderen zellulären Protoonkogenen und Onkogenen. Wesentlich unterschiedliche Protein-Niveaus wurden in allen drei Geweben (Muskel, Milz und Leber) akut und chronisch bestrahlter weiblicher und männlicher Tiere beobachtet (Besplug et al. 2005).

4. Material

4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

123bp-Marker	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose (electrophoresis grade; Unit 500)	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform 70 %	Merck, Darmstadt
DEPC-Wasser (Aqua ad injectabilia Braun), Wasser mit Diethyl Pyrocarbonat behandelt	B. Braun Melsungen AG
Einmalkanülen, BD Microlance 3	BD Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritzen Inject, Solo, 5 ml, Innendurchmesser: 8 mm	B. Braun Melsungen AG
Eppendorf Reaktionsgefäße: - 0,5 ml, Safe lock - 1,0 ml, 1,5 ml Standard Micro Test Tubes 3810	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben (Duran Jenaer Glas)	Schott, Mainz
Ethanol, absolut	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid (EtBr) 1 %	Carl Roth, Karlsruhe
Filter tip Pipettenspitzen, RNase-frei, 10 E, 100, 1000 (g)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
H ₂ O ₂ (30 %)	Acros Organics, Geel, Belgien
H ₂ O dest.	Milli-Q Anlage, Millipore, Schwalbach
Optical caps, Qty: 300 strips <i>Part No: 4323032</i>	AB Applied Biosystems, Darmstadt
Optical reaction plate, 96 well; code 128, Qty: 20; <i>Part No: 4306737</i>	AB Applied Biosystems, Darmstadt
QIAzol Lysis Reagent <i>Kat. Nr. 74804 and 75842</i>	Qiagen, Hilden

4.2 Geräte

ABI PRISM 7700 Sequence Detector + Power Macintosh G3	Applied Biosystems, Darmstadt
Biofuge (max. 13000 UpM)	Heraeus Instruments, Hanau
Camera Transilluminator	Stratagene, La Jolla, USA

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50) Qiagen, Hilden Kat. Nr. 74804

50	RNeasy Mini Spin Columns, jede in einem 2 ml Collection Tube
50	1,5 ml Collection Tubes
50	2 ml Collection Tubes
50 ml	QIAzol Lysis Reagent
45 ml	Buffer RW1
11 ml	Buffer RPE
10 ml	RNase-Free Water

Taq PCR Core Kit (250 U) Qiagen, Hilden Kat. Nr. 201223

18,8 µl	Distilled water
1,2 ml	Qiagen PCR Buffer, 10x
1,2 ml	MgCl ₂ , 25 MM
200 µl	dNTP Mix, 10 MM each
250 Units	Taq DNA Polymerase

4.4 Primer

Alle genspezifischen Primer wurden von der Firma Sigma-Genosys, Steinheim bezogen. Über die Datenbank des National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wurden die Sequenzen der Zielgene abgerufen.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
GAPDH forward	5'CTC CTC CAC CTT TGA CGC TG 3'
GAPDH reward	5'ACC ACC CTG TTG CTG TAG CC 3'
β-Actin forward	5'CAT TGC CGA CAG GAT GCA 3'
β-Actin reward	5'CCG ATC CAC ACG GAG TAC 3'
Wif1 forward	5'CGA TGC TCA CCA GGC AAG A 3'
Wif1 reward	5'GCT GGC ATT CTC TGT TGC G 3'

Rab34 forward 5'AGG AAG GAG GCC GCT TTG CA 3'
Rab34 reward 5'CAA GTC TTC CCC ACC GAC AC 3'

Oligo (dT₁₈)-Primer für den Master-Mix Operon, Köln

4.5 Medien und Puffer

Tris-Eisessig-EDTA Puffer, 0,5 M EDTA, pH 8,0 Sigma, Seelze
Ladepuffer für PCR, *Kat. Nr. 36097401090* Applied Biosystems, Foster
City, USA

5. Methoden

5.1 Probenpräparation für die PCR

5.1.1 Materialgewinnung

Alle verwendeten Tumorproben stammen aus intraoperativ entnommenen Proben von Patienten, die in den Jahren 2002 bis 2005 in der Neurochirurgie des Universitätsklinikums Marburg operativ behandelt wurden. Insgesamt wurden 51 Tumorproben untersucht, hierunter waren 36 Proben von männlichen und 15 von weiblichen Patienten. Das mediane Alter der Patienten lag bei 54 Jahren (Altersspanne: 6 bis 79 Jahre).

Sofort nach ihrer Entnahme wurden die Tumorproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Weiterhin erfolgte durch das Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Marburg eine histologische Bestimmung der Proben nach der WHO-Klassifizierung in Astrozytome der Grade II, III und IV, den Glioblastomen. Des Weiteren wurde eine Gruppe mit rezidivierenden Glioblastomen gebildet, das heißt denjenigen Tumoren, die mit Chemotherapie und Radiatio vorbehandelt waren (siehe Tabelle 4). Die Chemotherapie mit ACNU/VM26 (Nitrosoharnstoff in Kombination mit einem halbsynthetischen Epipodophyllotoxinderivat) wurde möglichst parallel zur Bestrahlung mit 60 Gy (fraktioniert) und zunächst für ein halbes Jahr mit regelmäßigen Nachuntersuchungen alle sechs Wochen durchgeführt.

Als Referenz diente ein pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I.

Tabelle 4: Verwendete Tumorproben und ihre histologische Einordnung

Histologische Einordnung nach WHO	Verwendete Proben
Astrozytom Grad II	67/02, 08/04, 58/04, 11/05, 18/05
Astrozytom Grad III	63/02, 21/03, 37/03, 65/03, 75/03, 96/03, 121/03, 137/03, 87/04, 78/05, 89/05, 45/06
Glioblastom	37/02, 64/02, 124/02, 01/03, 17/03, 27/03, 29/03, 35/03, 68/03, 76/03, 103/03, 03/04, 60/04, 10/05, 44/05, 74/05, 79/05, 80/05, 83/05, 103/05, 119/05, 33/06, 51/06
Glioblastom-Rezidiv	28/03, 36/03, 51/03, 54/03, 74/03, 152/03, 153/03, 47/04, 76/04, 04/05, 29/06
	Referenz-Probe: 08/03

Die Gruppe der Astrozytome Grad II umfasst 5 Proben, die Gruppe der Astrozytome Grad III 12 Proben, die Gruppe der Glioblastome 23 Proben und die Gruppe der Rezidive 11 Proben; Gesamtmenge: 51 Tumorproben.

5.1.2 Probenpräparation/RNA-Isolierung anhand der „single step“ Methode

Mittels der single-step-Methode ist es möglich, die Gesamt-RNA zu isolieren. Hierfür sind ein kompletter Aufschluss von Zellwänden sowie Zell- und Organellmembranen und eine Homogenisation notwendig. Bei der RNA-Isolierung werden die Zellen zuerst lysiert, die RNasen inaktiviert und die RNA anschließend isoliert. Auf diese Weise erhält man Gesamt-RNA, das heißt ein Gemisch aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA), messenger RNA (mRNA) und anderen RNA-Formen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das RNeasy Lipid Tissue Mini Kit der Firma Qiagen zur RNA-Isolierung verwendet. Bei der Aufbereitung wurde nach dem von Qiagen empfohlenen Protokoll vorgegangen.

Chemikalien je Ansatz:

100 mg	Tumorgewebe	1000 µl	Qiazol
200 µl	Chloroform	600 µl	Ethanol (70%)
700 µl	RW-Puffer	2 x 500 µl	RPE-Puffer
2 x 30 µl	H ₂ O DEPC	190 µl	H ₂ O DEPC
50 µl	Ethanol (100%)	200 µl	H ₂ O dest.

5.1.3 Homogenisierung

Das Homogenisieren der Probe führt zu einem Scheren der genomischen DNA und zu einer Reduktion der Viskosität des Lysats. Die dafür verwendete Guanidinisothiocyanat-Lösung (GTC-Lösung) ist ein chaotropes Salz, durch das RNasen inaktiviert werden, so dass die Isolierung einer intakten RNA gewährleistet wird.

Als biologisches Ausgangsmaterial werden je 100 mg des tiefgefrorenen Gewebes von Astrozytomen Grad II, III und Glioblastomen, hierunter primäre Astrozytome sowie Glioblastom-Rezidive verwendet. Dieses Material wird zunächst in 1 ml einer GTC-Lösung in Form des Puffers Qiazol aus dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit lysiert. Für die Aufbereitung wird ein Stößel verwendet. Hochmolekulare DNA kann durch 5- bis 10-maliges Aufziehen des Lysats in einer sterilen Einmal-Spritze mit Kanüle geschert werden bzw. so lange, bis ein homogenes Lysat vorliegt (Qiagen 2003).

5.1.4 Phasentrennung

Nach einer Sedimentationszeit von 2-3 min. werden 200 µl Chloroform zu der homogenisierten Probe hinzugegeben. Dieser Ansatz wird nach Überführung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß 15 sec. lang geschüttelt und für weitere 2-3 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der anschließenden 20-minütigen Zentrifugation bei +4 °C und einer Rotationseinstellung von 12 000 UpM entsteht eine endgültige Trennung in drei Phasen:

Entsprechend ihrer Dichte verteilen sich die suspendierten Partikel in eine oberste, wässrige Phase, die die benötigte RNA enthält. Die größeren DNA-Fragmente sammeln sich nach der Zentrifugation in der Interphase, welche als mittlerer, weißer Bereich sichtbar wird, während die unterste, rote Phase aus organischen Substanzen wie Proteinen besteht.

5.1.5 RNA-Aufreinigung

Nach der Zentrifugation wird die wässrige Phase abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Ihr Volumen beträgt durchschnittlich 600 µl. 70%iges Ethanol wird im Verhältnis 1:1 zugegeben. Die Interphase und die organische Phase werden verworfen.

Unter Zuhilfenahme des RNeasy Lipid Tissue Mini Kit der Firma Qiagen wird nach dem Auftragen der mit Ethanol versetzten Probe auf die RNeasy Mini-Säule mit Silicagelmembran diese bei 10 000 UpM für 15 sec. zentrifugiert. Zur möglichst hohen RNA-Aufreinigung wird des Weiteren 700 µl RW-Puffer auf die Säule gegeben und bei 10 000 UpM für 15 sec. zentrifugiert. Zum Auswaschen von Kontaminationen werden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben, für 15 sec. bei 10 000 UpM zentrifugiert und danach weitere 500 µl RPE-Puffer aufgetragen und für 2 min. bei 10 000 UpM zentrifugiert. Die Gesamt-RNA bindet hierbei an die Membran, während die übrigen Substanzen ausgewaschen und somit abgetrennt werden. Nach einer weiteren ein-minütigen Zentrifugation bei 14 000 UpM, wird die gereinigte RNA dann zwei Mal mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert, indem sie jeweils bei 10 000 UpM für 1 min. zentrifugiert wird.

Parallel wird in einem Eppendorfgefäß die Probe für die OD-Messung vorbereitet. Sie besteht aus 10 µl der mit RNase-freiem Wasser eluierten Probe und 190 µl H₂O DEPC (Diethyl Pyrocarbonat).

Danach wird die restliche Probe (50 µl) im Verhältnis 1:1 mit 100%igem Ethanol gefällt, um sie zu konservieren. Nach der Fällung wird die Probe bei -80 °C eingefroren.

5.1.6 Messung der Optischen Dichte (OD-Messung)

Die OD-Messung dient der Quantitätsüberprüfung der RNA. Hierbei wird die Absorption der RNA über ein Spektrophotometer (Gene Quant II RNA/DNA Calculator) bei 260 nm erfasst. Eine Einheit bei 260 nm entspricht einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml.

Für die OD-Messung werden 10 µl der zuvor mit RNase-freiem Wasser eluierten Probe mit 190 µl H₂O verdünnt. Als Referenzprobe dient destilliertes H₂O. Mittels einer Quarzglasküvette mit einem Durchmesser von 10 mm wird zwei Mal die Absorption bei 260 nm gemessen, um den gewonnenen Mittelwert als Grundlage für die Berechnung der isolierten RNA-Menge zu verwenden.

OD-Berechnung:

Berechnung des Mittelwertes der beiden gemessenen RNA-Konzentrationen

=> µg/ml totale RNA

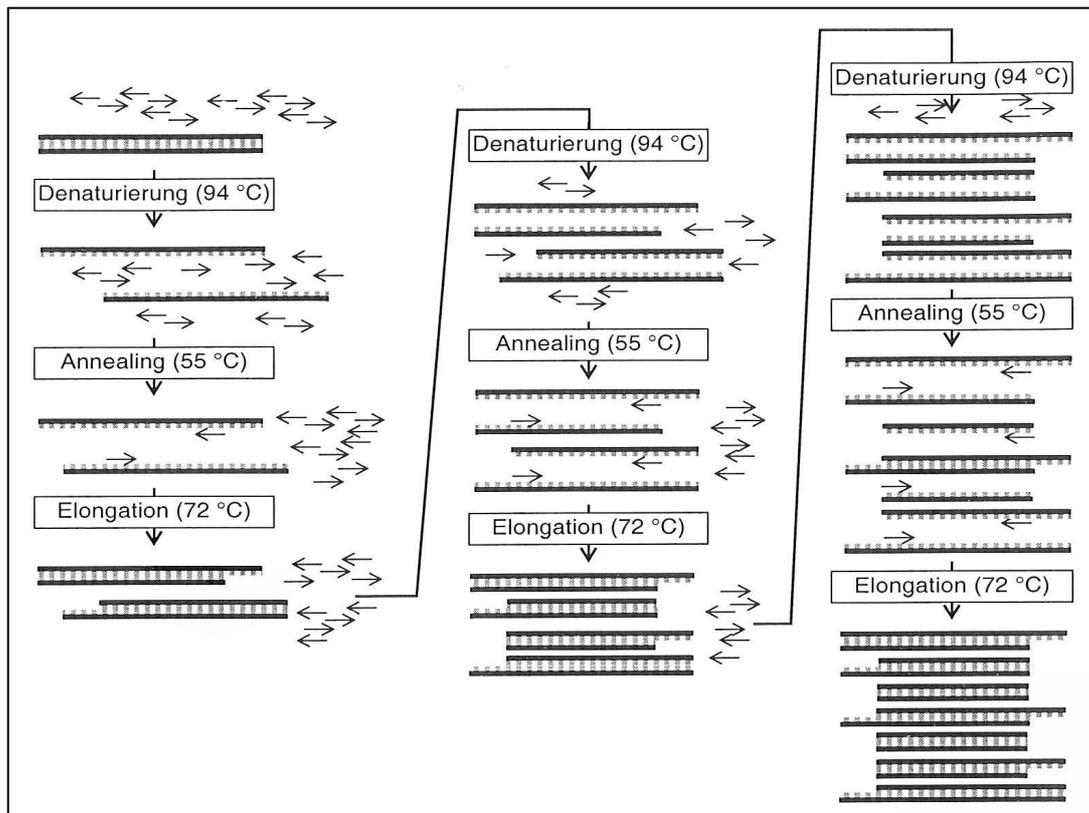
µg/ml totale RNA: 1000 = µg/µl totale RNA

µg/µl totale RNA x Eluatmenge = µg totale RNA in der Probe

5.2 Die Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion oder kurz PCR (Polymerase Chain Reaction) ist eine Methode zur selektiven Vervielfältigung (Amplifikation) bestimmter DNA-Sequenzen, in vorliegendem Fall bestimmter RNA-Sequenzen. Wie bei der Replikation werden anhand einer Matrizen-RNA durch zwei Oligonukleotide, Hin- und Rückprimer, die jeweils dem Strang in 3'→5'-Richtung und in 5'→3'-Richtung komplementär sind, neue RNA-Stränge enzymatisch synthetisiert (siehe Abbildung 9).

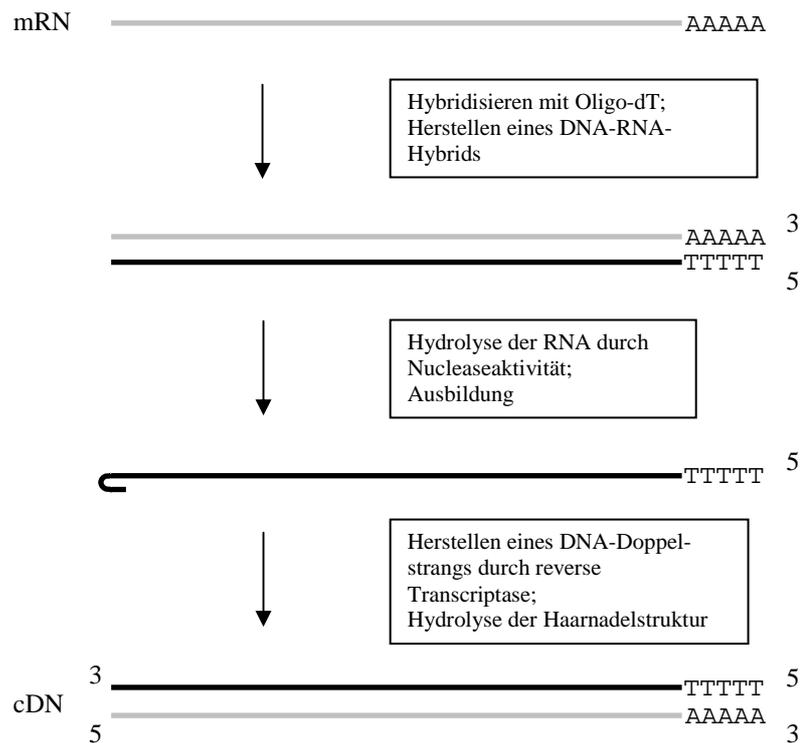
Abbildung 9: Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch die Polymerase-Kettenreaktion (Mülhardt 2002)



Das typische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, bei dem dsDNA getrennt wird, einem Anlagerungsschritt der Oligonukleotide (Annealing) und einem Verlängerungsschritt (Elongation), bei dem die Polymerase eine Extension zu neuen Doppelsträngen durchführt. Durch die etwa 35-malige Wiederholung eines Zyklus kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung des zwischen den Oligonukleotiden gelegenen DNA- bzw. RNA-Abschnittes.

Ursprünglich wurde das PCR-Verfahren für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten beschrieben. Es eignet sich für DNA-Stücke von einigen 100 bis mehreren 1000 Bp Länge. Inzwischen hat es ein breites Feld von Anwendungsmöglichkeiten, so ist es beispielsweise mit Hilfe der Reverse Transkription-PCR (RT-PCR) möglich, auch RNA als Ausgangsmaterial zu verwenden. Hierbei wird isolierte mRNA zunächst mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, welche dann als Ausgangsmatrize für die Amplifikation dient (siehe Abbildung 10).

Abbildung 10: Herstellung spezifischer DNA-Sequenzen (nach Löffler u. Petrides 2003)



5.2.1 Probenvorbereitung für die PCR

Die zuvor bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefrorene RNA-Probe wird bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min. bei 14 000 UpM zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wird die Probe zur anschließenden Aufreinigung mit $500\text{ }\mu\text{l}$ 70%igem Ethanol aufgefüllt und zur Entfällung ein weiteres Mal bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min. bei 14 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abpipettiert, anschließend erfolgt die Eintrocknung und Niederschlagbildung (Pellet) der RNA in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac), um Ethanolreste zu entfernen.

In einem weiteren Schritt wird der RNA-Niederschlag im Verhältnis 1:5 mit DEPC-Wasser gelöst. $20\text{ }\mu\text{l}$ davon werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt, so dass eine Konzentration von $4\text{ }\mu\text{g}$ RNA in $20\text{ }\mu\text{l}$ H_2O vorliegt. Für die Transkription der RNA in cDNA werden je $4\text{ }\mu\text{g}$ RNA eingesetzt.

Die Restprobe wird im Verhältnis 1:1 mit 100%igem Ethanol gefällt und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

5.2.2 Transkription der RNA in cDNA

Zunächst wird nach dem Protokoll des Herstellers ein Master-Mix aus dem Omniscript RT Kit der Firma Quiagen mit dem entsprechenden unspezifischen Primer angesetzt (pro Probe zwei Ansätze).

Standard-Reaktionsansatz Master-Mix je Probe (einfacher Ansatz):

3 µl	RNase freies H ₂ O
2 µl	Puffer RT, 10 x
2 µl	dNTP-Mix, jeweils 5 MM
2 µl	Oligo (dT ₁₈) – Primer, 10 µM
1 µl	Omniscript Reverse Transcriptase

Daraufhin wird jede Probe (20 µl) mit je 20 µl Master-Mix gemischt und kurz zentrifugiert. Danach werden die Proben für 60 min. bei +37 °C im Thermocycler inkubiert. Die Proben werden bis zu ihrer weiteren Anwendung bei -20 °C eingefroren.

5.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Anschluss an die oben beschriebene Inkubation wird der PCR-Mix angesetzt. Die Durchführung erfolgt unter Zuhilfenahme des Taq PCR Core Kit der Firma Quiagen nach dem Protokoll des Herstellers.

Standard-Reaktionsansatz PCR-Mix je Probe:

18,8 µl	H ₂ O
2,5 µl	Reaktionspuffer, 10 x
0,5 µl	dNTP-Mix, jeweils 10 MM
0,2 µl	Taq DNA Polymerase (zum Schluss hinzufügen)

Die hitzestabile Taq DNA Polymerase ist ein rekombinantes Enzym, das mit einer 3'→5'-Exonuclease-Aktivität ausgestattet ist. Durch das im PCR-Puffer enthaltene MgCl₂ wird die Amplifikation spezifischer PCR-Produkte begünstigt.

Auf 1 µl der zuvor synthetisierten cDNA-Probe werden nun 1 µl Vorwärtsprimer (Primer forward) und 1 µl Rückwärtsprimer (Primer reward) gegeben und anschließend 22 µl des PCR-Mixes hinzugefügt.

Nach der Fertigstellung der PCR-Ansätze werden die Restproben für die längerfristige Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß pipettierten Proben werden für 90 min. in der Programm-Einstellung des β -Actin-Zyklus im PTC – 200 Gradient Cycler inkubiert (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Zyklusparameter des Thermocycler-Programmes nach Taq PCR Core Kit (Qiagen 1999)

Versuchsschritte	Zeit (Min.)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Zusatzinformationen
Initiale Denaturierung	3	+94	
3-Schritt-Zyklus			25-35 Zyklen
Denaturierung	0,5-1	+94	
Annealing	0,5-1	+50 bis +68	Circa $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter dem T_m der Primer
Extension	1	+72	Für PCR-Produkte, die länger als 1 kb sind, erhöhen sie die Extensionszeit um ca. 1 min. pro kb DNA.
Abschließende Extension	10	+72	
Holding		+20	

T_m = Schmelztemperatur

5.2.4 DNA-Agarosegel zur elektrophoretischen DNA-Auftrennung

Im Anschluss an die PCR wird eine Agarosegel-Elektrophorese mit dem Housekeepinggen β -Actin durchgeführt.

Hierfür werden in einem Erlenmeyerkolben 3 g Agarose in 100 ml 1%igem TAE-Puffer (Tris-Acetate-EDTA-Buffer) gelöst und in einem Mikrowellengerät unter mehrmaligem Zwischenstopp mit Schwenken aufgeköcht, bis die Agarose gelöst ist und keine Blasen bzw. Klümpchen mehr sichtbar sind.

Parallel wird ein Gelschlitten zur Anfärbung der DNA mit $10\text{ }\mu\text{l}$ 1%igem Ethidiumbromid (EtBr) versehen, welches anschließend mit einem Kamm gleichmäßig verteilt wird. Durch Bindung von EtBr an Nukleinsäuren nimmt die Intensität der Fluoreszenz-Emission um den Faktor 50 bis 100 zu. Nach Einsetzen des Kammes auf der Kathodenseite des Gels kann die gelöste Agarose möglichst blasenfrei in den Gelschlitten gegossen werden, so dass sich nach ca. 45 min. ein erstarrtes Gel mit Taschen bildet.

Sobald die Agarose erstarrt ist, wird der Kamm entfernt und das Gel mit dem Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer gestellt. Dort werden die Geltaschen mit dem Elektrophoresepuffer TAE aufgefüllt, bis das Gel knapp bedeckt ist, so dass man später die DNA-Lösungen in die Taschen pipettieren kann.

Zur Dichteerhöhung und Anfärbung der Proben werden nach der abgeschlossenen PCR jeweils 15 µl der Probe mit 3 µl des Laufpuffers (loading buffer) in einem Eppendorfgefäß gemischt. Anschließend werden pro Reihe in die erste und die letzte Kammer des Gels ein 123-bp-Marker (123-Basenpaare-Marker) pipettiert und in die dazwischen verbleibenden Kammern entsprechend die DNA-Proben. Nun wird für 45 min. eine Spannung von 100 Volt angelegt, so dass sich die DNA entsprechend ihrer Größe auftrennen kann. Nach ausreichender Auftrennung der DNA wird die Spannung abgestellt, der Gelschlitten aus der Elektrophoresekammer genommen und das Gel ohne Gelschlitten unter UV-Licht betrachtet.

Nach dem digitalen Fotografieren und Speichern dieser Ergebnisse wird das Gel verworfen.

5.3 Das Prinzip der Real-Time PCR

Bei der Real-Time (Echtzeit-) PCR misst man die Entstehung von PCR-Produkten während der Amplifikation. Hierfür verwendet man den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I, der unspezifisch mit der Doppelstrang-DNA interkaliert und ungebunden nur eine geringe Eigenfluoreszenz zeigt. Die Anregungswellenlänge dieses Fluorophors liegt bei 470 nm, die Fluoreszenzwellenlänge bei 585 nm. Sobald der Farbstoff an der doppelsträngigen DNA bindet, fluoresziert er stark. Es binden sich mehrere Farbstoffmoleküle an einem PCR-Amplikon, so dass der dabei entstehende Fluoreszenzanstieg gegen die Hintergrundfluoreszenz gemessen werden kann.

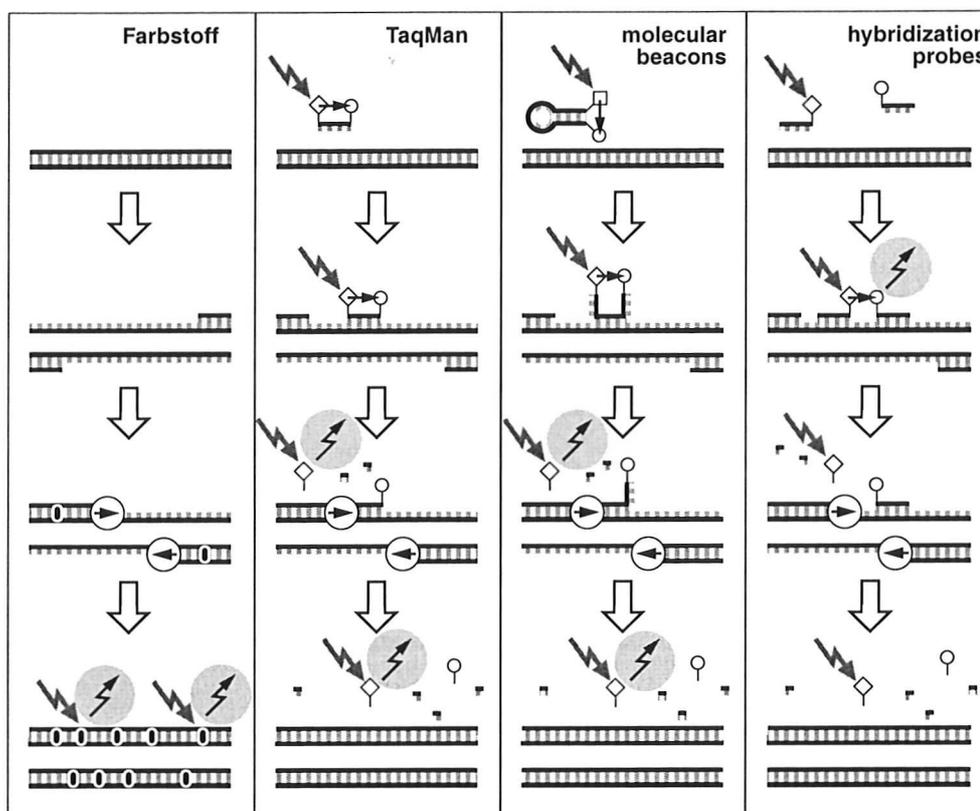
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das ABI Sequence Detection System 7700 verwendet. Hiermit ist es möglich, zeitgleich 96 Reaktionen zu untersuchen.

Das Real-time PCR-Gerät ist mit einer UV-Lampe (Ultra Violett Lampe) und einer CCD-Kamera (Charge-Coupled Device Kamera, Digitalkamera) ausgestattet und ermöglicht während der laufenden Zyklen einen Überblick über das Geschehen in den PCR-Reaktionsgefäßen. Durch Hinzufügen des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR®

Green I (Molecular Probes) zu der PCR-Reaktion kommt es zu einer Interkalierung des Fluorophors in doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz messbar erhöht wird (Higuchi et al. 1992, Mülhardt 2002).

Aus der Kombination von PCR-Gerät mit Fluoreszenz-Detektor (spektroskopischer Detektor), spezifischem Oligonucleotid und FRET entwickelten sich drei mehr oder weniger ähnliche Nachweismethoden, der sog. TaqMan®, die Molecular Beacons und die Hybridization Probes (siehe Abbildung 11).

Abbildung 11: Die verschiedenen Nachweismethoden der Real-time quantitative PCR (Mülhardt 2002)



Farbstoffe wie SYBR green I werden unspezifisch in doppelsträngige DNA eingebaut. TaqMan-Sonden und molecular beacons fluoreszieren, wenn das Oligonucleotid von der Polymerase abgebaut wurde, hybridization probes dagegen, solange beide Oligonucleotide an das Template binden.

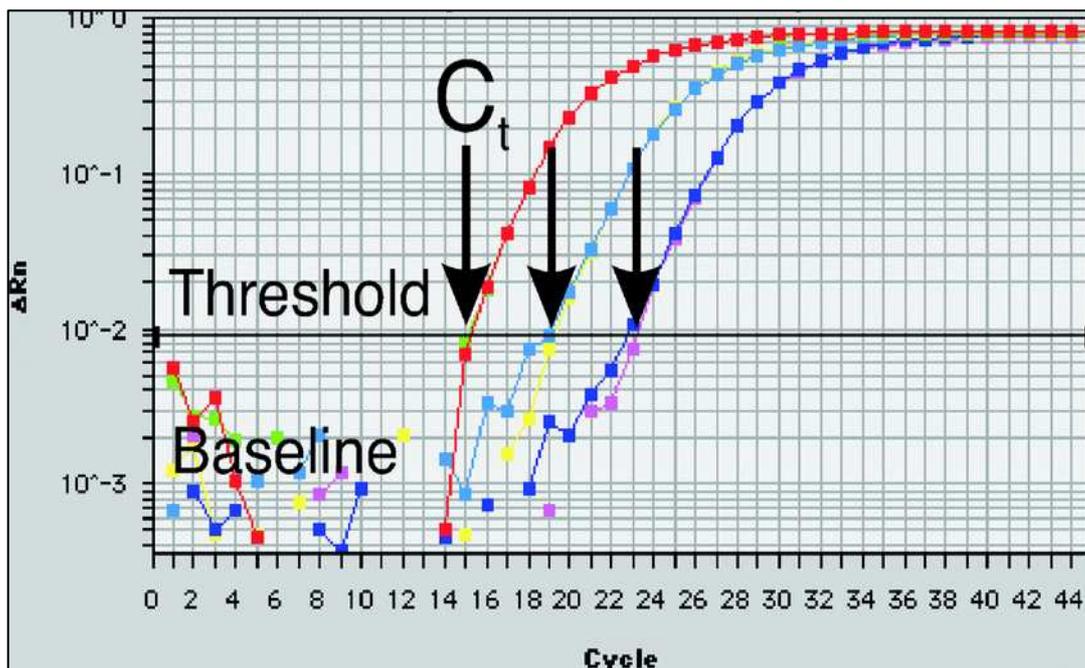
Am ältesten und bekanntesten ist das TaqMan-Prinzip (Livak et al. 1995, Mülhardt 2002), welches auch in vorliegenden Versuchen Anwendung fand. Bei dieser Methode befinden sich Reporter (Reporter-Fluoreszenz) und Quencher (Fluoreszenz-Löscher) auf demselben Oligonucleotid, vorzugsweise am 5'-und 3'-Ende. Die Lichtstärke bei E1 ist gering, solange das Oligonucleotid intakt ist. Durch die herannahende Polymerase wird dann der Reporter freigesetzt, dadurch steigt die

Lichtproduktion bei dieser Wellenlänge an. Proportional zur DNA-Synthese werden also Reporter-Moleküle freigesetzt und entsprechend steigt die Signalstärke.

Als Prinzip der Quantifizierung wird nicht die absolute Menge an PCR-Produkt gemessen, sondern man nutzt die Kinetik der PCR-Reaktion aus, da anfangs eine weitgehend exponentielle Vermehrung der DNA stattfindet, auch wenn diese noch nicht sichtbar ist. Bei der Akkumulation des Produktes steigen auch störende Einflüsse, zum einen werden Primer und Nucleotide knapper, zum anderen gehen Polymerase oder Nucleotide aufgrund der anhaltend hohen Temperaturen kaputt. Außerdem wird die Reaktion durch die Anhäufung von Produkten wie Pyrophosphat gehemmt.

All diese Parameter führen zu einer Verlangsamung des Prozesses zu einem linearen Wachstum, bis es zu einem Stillstand kommt (siehe Abbildung 12).

Abbildung 12: Charakteristika einer Real-Time PCR-Kurve, Fluoreszenz-Signal gegen Zyklus-Anzahl aufgetragen (Bustin u. Mueller 2005)



Gezeigt werden die Kurven von drei Proben, welche in doppelter Ausführung den Real-time PCR-Zyklus durchlaufen. Die Pfeile markieren die Ct-Werte und repräsentieren die Zyklusfraktionen, bei denen das Gerät zuerst zuverlässig eine Fluoreszenz detektieren kann (hergeleitet aus der Amplifikations-Reaktion). Während der initialen Zyklen der PCR liegt das Fluoreszenzsignal unterhalb des Schwellenwertes des Gerätes und definiert die Grundlinie für den Amplifikations-Plot (Anschlag). Ein Anstieg der Fluoreszenz oberhalb dieses Schwellenwertes zeigt die Ermittlung eines akkumulierten PCR-Produktes an. Der Ct-Parameter ist definiert als die minimale Zyklen-Anzahl der Proben, bei welcher die Fluoreszenz einen fixierten Schwellenwert durchläuft. Ein Anschlag der Aufzeichnung der anfänglichen Zielkopie-Zahl für eine Reihe von Standards gegen Ct bildet eine Gerade. Durch die Messung des Ct und die Verwendung der Standardkurve wird der Betrag des Ziels in einer unbekannt Probe gemessen, um so die Startkopie-Zahl zu bestimmen.

Aus diesem Grund nimmt man als Richtwert die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt (Ct-Wert), weil zu diesem Zeitpunkt die Vermehrung noch exponentiell ist.

Parallel amplifiziert man bekannte Templatemengen und vergleicht die Ct-Werte der entsprechenden Templatemengen. Aus diesen Werten lässt sich eine Standardkurve erstellen, aus der sich aus einem Ct-Wert auf die Templatemenge schließen lässt.

5.3.1 Etablierung der Standardkurve

Um ein geeignetes Protokoll für die Real-Time PCR zu etablieren, ist es notwendig, zunächst eine Standardkurve zu erstellen, die die Bedingungen zur Durchführung der Delta Delta Ct-Methode erfüllt. Hierfür verwendet man die genspezifischen Primer, sowie die Housekeepinggene GAPDH und β -Actin.

Voraussetzung für die Etablierung der Standardkurve ist eine Primertestung. Außerdem muss die richtige Annealing-Temperatur (Anlagerungs-Temperatur) entsprechend der Schmelztemperatur (T_m) ermittelt werden. Hierzu führt man eine Gradienten-PCR durch, bei der die individuelle Temperatur gewählt werden kann. Zusätzliche Voraussetzung ist eine Probe, die aufgrund ihrer ausreichenden cDNA-Menge und der Vergleichbarkeit mit den anderen zu messenden Proben als Kalibrator verwendet werden kann. Als Referenz wird ein Pilozytisches Astrozytom mitgeführt, dessen cDNA wie folgt in sieben Schritten verdünnt wird:

1	9 μ l cDNA
1:5	4 μ l cDNA + 16 μ l H ₂ O
1:10	10 μ l cDNA (1:5) + 10 μ l H ₂ O
1:50	5 μ l cDNA (1:10) + 20 μ l H ₂ O
1:100	13 μ l cDNA (1:50) + 13 μ l H ₂ O
1:200	14 μ l cDNA (1:100) + 14 μ l H ₂ O
1:400	14 μ l cDNA (1:200) + 14 μ l H ₂ O
1:500	16 μ l cDNA (1:5) + 4 μ l H ₂ O

Für den Ansatz einer 96 Mikrotiter-Platte wird anschließend ein Master-Mix aus dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (200) erstellt.

Standard-Reaktionsansatz pro Vertiefung (Well):

12,5 µl SYBR Green I

10,0 µl RNase-Free Water (RNase-freies Wasser)

0,75 µl Primer 1 (Primer forward)

0,75 µl Primer 2 (Primer reward)

24 µl des entsprechenden Master-Mixes werden pro Vertiefung vorgelegt, erst dann wird 1 µl cDNA hinzupipettiert.

Insgesamt wird jeweils ein Master-Mix für die Housekeepinggene GAPDH und β -Actin, sowie für den genspezifischen Primer angesetzt. Entsprechend der sieben cDNA-Verdünnungen wird für jede Verdünnung jeweils ein Master-Mix verwendet, so dass die Platte anhand des ABI PRISM 770 Sequence Detectors entsprechend der Schmelztemperatur des jeweiligen spezifischen Primers bemessen werden kann.

Die Auswertung der Standardkurve erfolgt durch die Berechnungen des Computer-Programmes cdf (Cyberspace Description Format), Applied Biosystems.

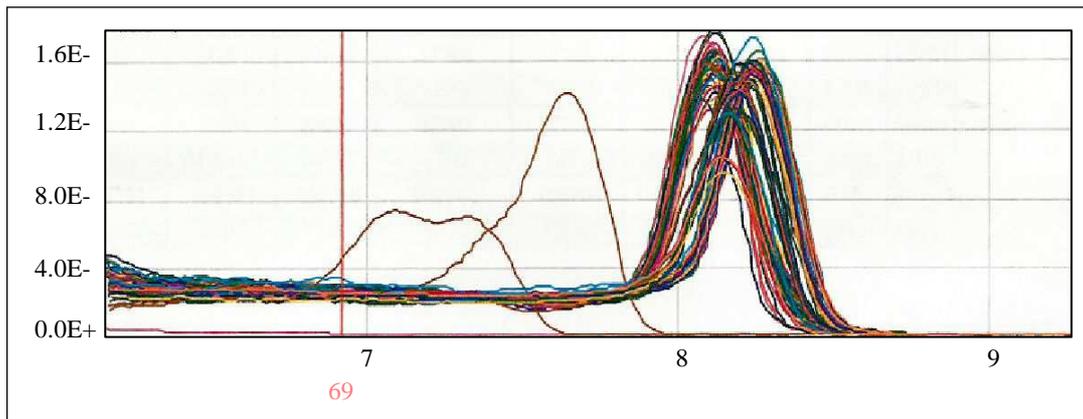
5.3.2 Etablierung und Auswertung der Schmelzkurve

Um den Erfolg der Real-Time PCR zu bestätigen, erfolgt die Messung der Schmelzkurve. Hierbei werden die PCR-Produkte bei kontinuierlicher Aufheizung der einzelnen Vertiefungen bei +95 °C gemessen, das heißt bis sie, ihrem Schmelzpunkt entsprechend, nur noch als Einzelstrang vorliegen. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet, kleinere Fragmente weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt als die spezifischen PCR-Produkte auf.

In der Regel wird die Schmelzkurve nach Beenden des Laufes der Standardkurve erstellt, um zu kontrollieren, ob die PCR-Produkte bei dem angegebenen spezifischen Wert, also der Schmelztemperatur des jeweiligen Primers einen DNA-Doppelstrang gebildet haben, oder ob sich eventuell vor allem bei niedrigen Temperaturen Primer-Dimere gebildet haben.

Für diese Schmelzkurve muss die Einstellung am Taqman verändert werden, die Platte selbst muss nicht gewechselt werden. Über das Auswertungsprogramm cdf erfolgt daraufhin eine Darstellung der Schmelzkurven (siehe Abbildung 13).

Abbildung 13: Bild einer Schmelzkurve



Dieser Beispiel-Lauf verdeutlicht, dass in jeder Probe das richtige Produkt hergestellt wurde. Ausnahme stellen nur die beiden braunen Kurven dar, diese haben ein kleineres Produkt als das eigentliche Produkt, d.h. es handelt sich hier um Primer-Dimere. Alle restlichen Proben können ausgewertet werden.

5.3.3 Auswertung der Standardkurve

Zur Auswertung der Standardkurve wird als erstes eine Tabelle mit den Ct-Werten der einzelnen Verdünnungen des Referenzgenes erstellt. Aus diesen Dreifachbestimmungen kann nun der Mittelwert für das jeweilige Housekeepinggen und das zu untersuchende Zielgen errechnet werden.

Der Mittelwert entspricht dem mittleren Ct-Wert, der logarithmisch zur jeweiligen RNA-Konzentration in eine Grafik eingetragen wird. Nun wird durch Subtraktion der Ct-Werte des Referenzgenes von den Ct-Werten des Zielgenes der einzelnen Verdünnungen der sogenannte Delta Ct-Wert bestimmt, welcher wiederum logarithmisch gegen die RNA-Konzentrationen in den einzelnen Verdünnungen aufgetragen wird.

Da die vorliegende Arbeit auf vorausgegangen Microarray-Analysen basiert und hierüber die Housekeepinggene evaluiert wurden, wurde als Beispiel das Zielgen EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) aufgeführt (Köhler 2007; siehe Tabelle 6).

Berechnung des Ct-Wertes:

Delta Ct (Probe) = Ct Zielgen – Ct Referenzgen

Delta Ct (Kalibrator) = Ct Zielgen - Ct Referenzgen

Delta Delta Ct = Delta Ct Zielgen - Delta Ct Referenzgen

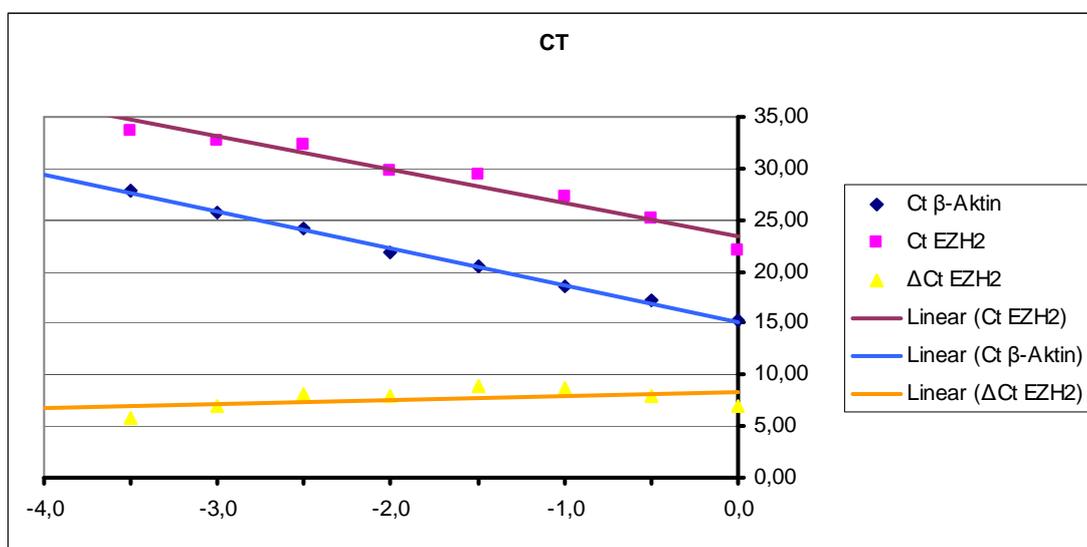
Tabelle 6: Beispiel der Auswertung einer Standardkurve von dem Referenzgen β -Actin und dem Zielgen EZH2

RNA-Konz.	Ct β -Aktin	Ct EZH2	Δ Ct EZH2
0,00	15,25	22,14	6,89
-0,70	17,13	25,06	7,92
-1,00	18,61	27,27	8,66
-1,70	20,41	29,36	8,95
-2,00	21,77	29,73	7,96
-2,70	24,20	32,29	8,09
-3,00	25,76	32,76	7,00
-3,70	27,92	33,72	5,80

Bei EZH2 handelt es sich um ein Gen, das als transkriptioneller Hemmer im Sinne einer Kontrolle des Zellgedächtnisses und der Aufeinanderfolge der Zellgenerationen fungiert. Es ist möglicherweise wichtig innerhalb der Hämatopoese und für das Zentrale Nervensystem (Kleer et al. 2003).

Um die Effizienz des Referenzgenes und des Zielgenes zu kontrollieren, wird der Ct-Wert logarithmisch gegen die RNA-Konzentrationen in den einzelnen Verdünnungen aufgetragen (siehe Abbildung 14). Um von einer Effizienz von beinahe 100% ausgehen zu können, muss die Steigung der Geraden zwischen 3,2 und 3,8 liegen, das heißt es liegen vergleichbare Bedingungen vor. Weiterhin werden die beiden Effizienzen der Referenz und des Zielgenes gegeneinander aufgetragen. Wenn der Wert der Steigung der Geraden unter 0,1 liegt, sind die Effizienzen der Referenz und des Zielgenes fast identisch, so dass hierdurch die Voraussetzungen für die Anwendung der Delta Delta Ct-Methode erfüllt werden.

Abbildung 14: Vergleichs-Diagramm zur Kontrolle der Effizienzen des Referenz- und des Zielgens am Beispiel von β -Actin und EZH2



5.3.4 Messung der Proben

Nach der Erstellung der oben beschriebenen Kurven können die Proben gemessen werden. Hierfür wird wiederum ein Master-Mix-Ansatz für eine 96 Mikrotiter-Platte aus dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (200) erstellt. Sowohl für die Bedingungen erfüllende Housekeepinggen GAPDH oder β -Actin, als auch für den genspezifischen Primer wird ein Master-Mix nach der Anleitung des Herstellers angesetzt.

Standard-Reaktionsansatz pro Vertiefung:

12,5 μ l	SYBR Green I
10,0 μ l	RNase-freies Wasser
0,75 μ l	Primer 1 (Primer forward)
0,75 μ l	Primer 2 (Primer reward)

24 μ l des entsprechenden Master-Mixes werden pro Vertiefung vorgelegt, erst dann wird 1 μ l cDNA hinzu pipettiert. Entsprechend der jeweils drei Ansätze werden also das Housekeepinggen, die zu untersuchende cDNA der Probe und eine Probe ohne DNA als Negativkontrolle (Non Template Control, NTC) auf die Platte aufgetragen und untersucht (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Beispiel eines Pipettierschemas mit dem Gen Rab34 und dem Housekeeping-Gen GAPDH

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
37/02	37/02	37/02	63/02	63/02	63/02	64/02	64/02	64/02	124/02	124/02	124/02
GAPDH	GAPDH	GAPDH									
01/03	01/03	01/03	21/03	21/03	21/03	29/03	29/03	29/03	35/03	35/03	35/03
GAPDH	GAPDH	GAPDH									
37/03	37/03	37/03	65/03	65/03	65/03	96/03	96/03	96/03	137/03	137/03	137/03
GAPDH	GAPDH	GAPDH									
10/05	10/05	10/05	18/05	18/05	18/05	74/05	74/05	74/05	NTC	NTC	NTC
GAPDH	GAPDH	GAPDH									
37/02	37/02	37/02	63/02	63/02	63/02	64/02	64/02	64/02	124/02	124/02	124/02
Rab34	Rab34	Rab34									
01/03	01/03	01/03	21/03	21/03	21/03	29/03	29/03	29/03	35/03	35/03	35/03
Rab34	Rab34	Rab34									
37/03	37/03	37/03	65/03	65/03	65/03	96/03	96/03	96/03	137/03	137/03	137/03
Rab34	Rab34	Rab34									
10/05	10/05	10/05	18/05	18/05	18/05	74/05	74/05	74/05	NTC	NTC	NTC
Rab34	Rab34	Rab34									

ANNEALING 65 °C	2 x 50 Ansätze (Überschuss)	12,5 μ l SYBR Green n MM 0,75 μ l Primer1 0,75 μ l Primer2 10,00 μ l H ₂ O	→ 625 μ l → 37,5 μ l → 37,5 μ l → 500 μ l
-----------------	--------------------------------	--	--

1,00 μ l cDNA

auf jeden Ansatz 24,00 μ l

Diese Platte wird nun im ABI PRISM 770 Sequence Detector entsprechend der Einstellungen für die Probenmessung programmiert. Die Messung erfolgt bei der genspezifischen Schmelztemperatur des Primers, also sowohl für Wif1 als auch für Rab34 bei 65 °C.

Um den Erfolg der Real-Time PCR zu bestätigen, erfolgt die oben beschriebene Messung der Schmelzkurve, das heißt die Messung bei kontinuierlicher Aufheizung der einzelnen Vertiefungen auf +95 °C. Sie ist notwendig, um eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren oder Nebenprodukten zu machen und kann erst nach Abschluss der PCR-Reaktion erfolgen.

5.3.5 Auswertung der Proben

Zur Auswertung der Probenmessung wird eine weitere Tabelle mit den Ct-Werten und den Ct-Mittelwerten aus den Dreifachbestimmungen für das jeweilige Housekeepinggen und das zu untersuchende Zielgen erstellt. Voran die Werte der Referenzprobe, die hier dem Wert 1 gleichgesetzt werden, da sie eine gleichmäßige Expression aller zu vergleichenden Gene aufweist.

Durch Subtraktion der Ct-Werte des Referenzgenes von den Ct-Werten des Zielgenes der einzelnen Verdünnungen wird der Delta Ct-Wert bestimmt. Dieser Wert dient als Grundlage für die Berechnung des Delta Delta Ct-Wertes, der sich aus Delta Ct Zielgen und Delta Ct Referenzgen errechnet.

Alle Delta Delta Ct-Werte werden in Relation zu dem Wert 1 der Referenzprobe gesetzt.

Berechnungen:

$\Delta Ct (\text{Probe}) = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$

$\Delta Ct (\text{Kalibrator}) = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Zielgen} - \Delta Ct \text{ Referenzgen}$

Zur Darstellung der relativen Delta Delta Ct-Werte wird ein Diagramm erstellt (siehe Kapitel 6, Ergebnisse).

5.4. Auswertung mittels U-Test/Mann-Whitney-U-Test

Um eine Aussage über die statistische Signifikanz der Versuchsergebnisse zu machen, wird der U-Test zur statistischen Datenanalyse herangezogen. Dieser sog.

Mann-Whitney-U-Test oder (äquivalent dazu) der Wilcoxon-W-Test stellt das nichtparametrische Pendant zum T-Test für zwei unabhängige Stichproben dar.

Anhand des U-Testes ist es möglich, aus den Beobachtungen einer Stichprobe Rückschlüsse auf bestimmte Eigenschaften der Grundgesamtheit zu ziehen. Der Zweigruppen-Vergleich mittels U-Test und der Mehrgruppenvergleich mit dem Kruskal-Wallis-Test wird bei ordinalskalierten Variablen berechnet oder wenn die Verteilungsvoraussetzungen für die parametrischen Verfahren nicht als gegeben angenommen werden können.

Mittels des Programmes SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) können die Ergebnisse ausgewertet werden. Voraussetzungen für den U-Test sind eine Ordinalskalierung der abhängigen Variablen (= Histologie der Tumoren) und die „Ähnlichkeit“ der Verteilungen der Testvariablen (= Expression der Gene) in beiden Gruppen.

Beim U-Test werden die Daten der Test-Variablen durch das SPSS-Programm zunächst in eine Rangreihe umgewandelt, das heißt der kleinste aller Werte wird zu 1, der nächstkleinste zu 2, bis hin zum größten Wert, der zu N (Anzahl der Fälle in der Datei) wird. Anschließend werden die jeweiligen Mittelwerte dieser Rangdaten in den beiden Gruppen errechnet.

Der Unterschied der beiden mittleren Rangplätze wird dann über die U-Statistik auf Signifikanz geprüft (siehe Beispiel, Tabelle 8).

Tabelle 8: U-Test-Auswertung anhand des Genes Wif1 beim Vergleich der Astrozytom-Gruppe Grad II gegen die Gruppe der IIIer

Ränge

	Histo	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Expression	Astro II	5	9,40	47,00
	Astro III	12	8,83	106,00
	Gesamt	17		

Bei großen Stichproben lässt sich diese Signifikanzprüfung nicht immer exakt durchführen (Rechenzeit und/oder Genauigkeitsprobleme). In diesem Falle lässt sich die U-Statistik approximativ in eine z-verteilte Prüfstatistik überführen, die in jedem Falle auf Signifikanz geprüft werden kann. Diesen approximativen Test führt SPSS immer aus, auch dann, wenn die exakte Signifikanz der U-Statistik ermittelt werden kann (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: U-Test-Auswertung anhand des Genes Wif1 beim Vergleich der Astrozytom-Gruppe Grad II gegen die Gruppe der IIIer

Statistik für Test (b)

	Expression
Mann-Whitney-U	28,000
Wilcoxon-W	106,000
Z	-,211
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,833
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,879 (a)

a = Nicht für Bindungen korrigiert

b = Gruppenvariable: Histologie

Auch für den U-Test gilt als Grenze für die (zwei seitige) Signifikanz ein Wert von 0,05. Werte $> 0,05$ bezeichnen keinen signifikanten Unterschied, während Werte $< 0,05$ eine Signifikanz anzeigen.

6. Ergebnisse

6.1 Ergebnisse der PCR

Mittels der OD-Messung (siehe Kapitel 5, Methoden) wurden alle Tumorproben auf ihren Gehalt totaler RNA in μg berechnet. Diese Tumorproben wurden nun gegen eine gemeinsame Referenz, den Marker bp123, in der PCR überprüft.

Tabelle 10 zeigt Auszüge der verwendeten Proben und ihrer Histologien, des Weiteren gibt sie eine Übersicht über die in der Probenpräparation erhaltenen RNA-Mengen und die durchgeführte PCR (siehe Kapitel 10, Tabellenanhang).

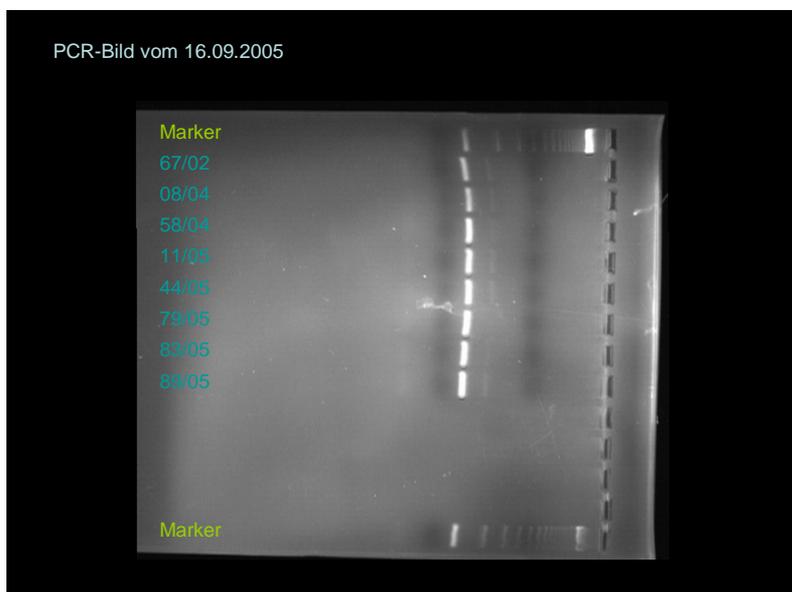
Tabelle 10: Auszug aus der Auflistung aller Proben und ihrer Probenpräparation, sortiert nach histologischer Nummer

Anzahl	Proben-Nr.	Präparationsdatum	Histologie	Total RNA in μg	Rest RNA in μg	PCR Datum	PCR Nr.	Gel Position Nr.
1	37/02	25.10.2005	GBM	58,01	48,2	16.03.2006	7+	2
2	63/02	25.10.2005	Astro III	5,72	*	16.03.2006	7+	3
3	64/02	26.10.2005	GBM	46,39	37,7	16.03.2006	7+	4
4	67/02	14.09.2005	Astro II	16,09	10,48	16.09.2005	5+	2

Fortführung der Tabelle: siehe Kapitel 10, Tabellenanhang

Unter UV-Licht betrachtet zeigte sich eine unterschiedliche Bandenbildung auf dem verwendeten Elektrophoresegel. Nach dem Abfotografieren mit der Kamera und dem Speichern dieser Ergebnisse auf dem Computer konnten die Bilder wie im Folgenden ausgewertet werden (siehe Abbildung 15).

Abbildung 15: PCR Bild vom 16.09.2005



Alle Proben zeigen in dieser Versuchsreihe aufgrund der beweisenden Bandenfärbung eindeutige Ergebnisse. Die Färbung und Wanderung des Markers bestätigt den Erfolg des durchgeführten Versuches.

6.2 Ergebnisse der Real-Time-PCR

6.2.1 Ergebnisse für Wif1

Siehe Tabelle 11 im Tabellenanhang (Kapitel 10)

Aus den tabellarischen Berechnungen (siehe Tabelle 11 im Tabellenanhang, Kapitel 10) wurde zunächst eine Tabelle mit den Mittelwerten für die einzelnen Tumorgruppen erstellt (siehe Tabelle 12). Desweiteren wurde ein Balkendiagramm erstellt, das die Mittelwerte der Wif1-Expression in den nach Farben sortierten Tumorgruppen zeigt. In orange sind die Astrozytome Grad II, in gelb die Astrozytome Grad III, in hellblau die primären Glioblastome und in lila die Glioblastom Rezidive dargestellt (siehe Abbildung 16).

Tabelle 12: Mittelwerte für die einzelnen Tumorgruppen für Wif1

Probe	rel. WIF1
Reference	1,0000
67/02	0,0078
08/04	0,0886
58/04	0,2852
11/05	0,0079
18/05	0,0021

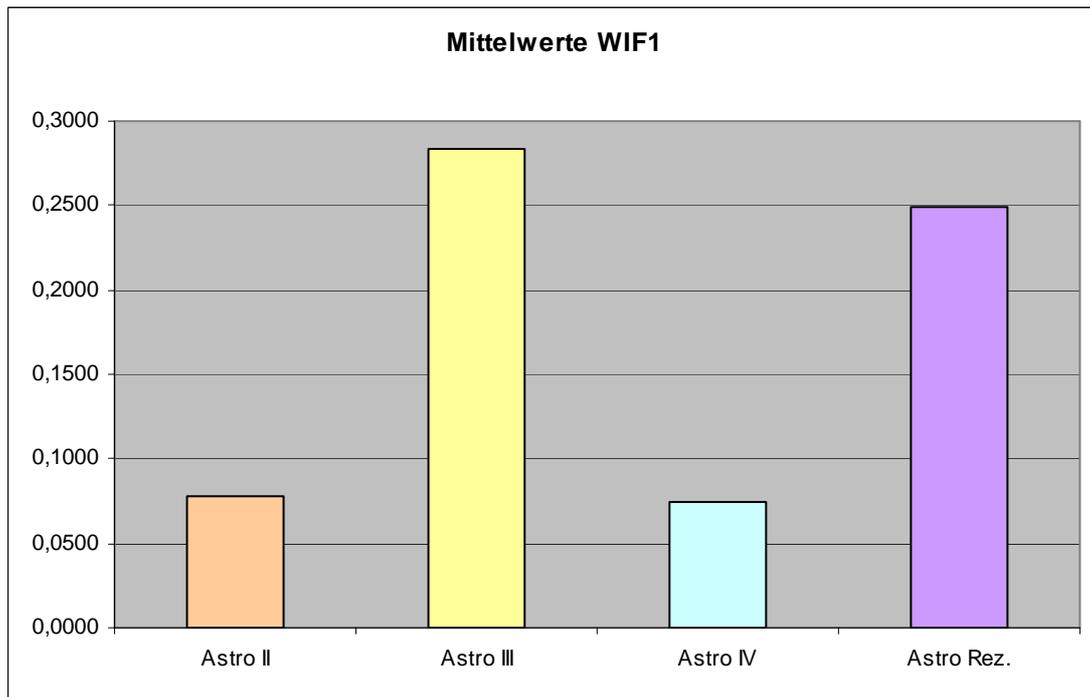
63/02	0,0012
21/03	0,0001
37/03	0,0002
65/03	0,0008
75/03	2,4737
96/03	0,0227
121/03	0,0088
137/03	0,4343
87/04	0,4118
78/05	0,0157
89/05	0,0064
45/06	0,0321

Probe	rel. WIF1
Reference	1,0000
37/02	0,0000
64/02	0,0001
124/02	0,0000
01/03	0,0000
17/03	0,0002
27/03	0,0486
29/03	0,0001
35/03	0,0007
68/03	0,0786
76/03	0,2449
103/03	0,0009
03/04	0,0153
60/04	0,0125
10/05	0,0016
44/05	0,0988
74/05	0,0640
79/05	0,0167
80/05	0,2898
83/05	0,0438
103/05	0,4353
119/05	0,0403
33/06	0,3150
51/06	0,0009

Probe	rel. WIF1
Reference	1,0000
28/03	0,6256
36/03	0,2088
51/03	0,0380
54/03	0,0528
74/03	0,0557
152/03	0,9482
153/03	0,0380
47/04	0,0844
76/04	0,0379
04/05	0,0974
29/06	0,5574

Histo	Mittelwert
Astro II	0,0783
Astro III	0,2840
GBM	0,0743
Astro Rez.	0,2495

Abbildung 16: grafische Darstellung der Mittelwerte der Wif1-Expression, sortiert nach Tumorgruppen



Im Vergleich zum Astrozytom Grad II wies das Gen Wif1 in der Real-Time-PCR-Analyse einen signifikanten Expressionsanstieg beim Astrozytom Grad III auf. Eine deutliche Reduktion dieser Wif1-Expression zeigte sich im Vergleich vom Astrozytom Grad III mit der Gruppe der Glioblastome.

Das Expressionsmuster in der Gruppe der Astrozytome Grad II zeigte sich nahezu äquivalent zu der Gruppe der Glioblastome.

Eine weitere Zunahme der Expressionsstärke verdeutlichte der Vergleich der Glioblastome mit der Gruppe der Glioblastom-Rezidive, hier zeigte sich eine rund dreifache Zunahme.

Eine statistische Auswertung folgt in Kapitel 6.3., Tabelle 15.

6.2.2 Ergebnisse für Rab34

Siehe Tabelle 13 im Tabellenanhang (Kapitel 10)

Aus den tabellarischen Berechnungen (siehe Tabelle 13 im Tabellenanhang, Kapitel 10) wurde zunächst eine Tabelle mit den Mittelwerten für die einzelnen Tumorgruppen erstellt (siehe Tabelle 14). Desweiteren wurde ein Balkendiagramm erstellt, das die Mittelwerte der Rab34-Expression in den nach Farben sortierten Tumorgruppen zeigt. In orange sind die Astrozytome Grad II, in gelb die

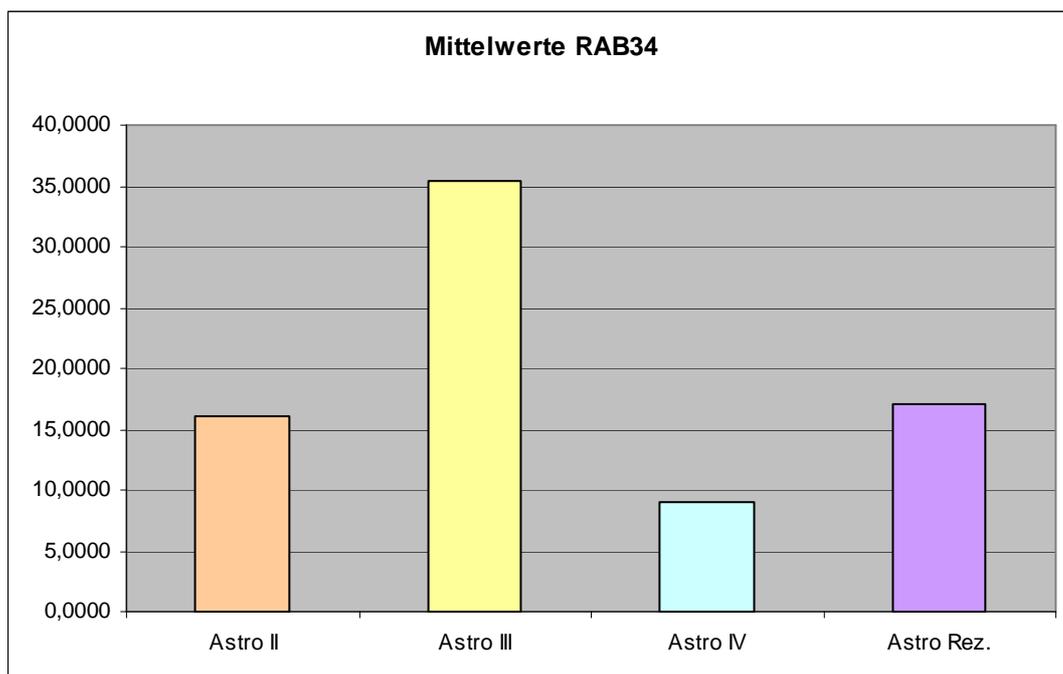
Astrozytome Grad III, in hellblau die primären Glioblastome und in lila die Glioblastom Rezidive dargestellt (siehe Abbildung 17).

Tabelle 14: Mittelwerte für die einzelnen Tumorgruppen für Rab34

Probe	rel. RAB34	Probe	rel. RAB34	Probe	rel. RAB34
Reference	1,0000	Reference	1,0000	Reference	1,0000
67/02	9,4044	37/02	0,6752	28/03	35,6707
08/04	44,3235	64/02	1,1920	36/03	15,3128
58/04	20,2054	124/02	1,0210	51/03	5,1575
11/05	5,7358	01/03	0,1792	54/03	14,4868
18/05	1,0140	17/03	7,8354	74/03	16,2609
		27/03	7,2267	152/03	40,3175
63/02	0,6213	29/03	0,2649	153/03	14,6890
21/03	0,3703	35/03	3,9086	47/04	19,9272
37/03	0,0827	68/03	4,8568	76/04	19,7895
65/03	1,9141	76/03	37,2715	04/05	1,7171
75/03	319,5726	103/03	3,2266	29/06	3,7581
96/03	0,4363	03/04	8,9797		
121/03	45,4644	60/04	3,4263		
137/03	0,4166	10/05	0,8746		
87/04	19,0273	44/05	77,1717		
78/05	0,4061	74/05	0,7137		
89/05	27,4741	79/05	8,1492		
45/06	8,5347	80/05	1,9543		
		83/05	32,5970		
		103/05	2,9349		
		119/05	0,2717		
		33/06	2,1238		
		51/06	1,1460		

Histo	Mittelwert
Astro II	16,1366
Astro III	35,3600
GBM	9,0435
Astro Rez.	17,0079

Abbildung 17: grafische Darstellung der Mittelwerte der Rab34-Expression, sortiert nach Tumorgruppen



Im Vergleich zum Astrozytom Grad II wies das Gen Rab34 in der Real-Time-PCR-Analyse seine höchste Expression bei der Gruppe der Astrozytome Grad III auf. Eine deutliche Reduktion dieser Rab34-Expression zeigte sich im Vergleich vom Astrozytom Grad III mit der Gruppe der Glioblastome. Beim Vergleich der Expressionsstärke von Rab34 zwischen den Glioblastom-Gruppen zeigte sich eine Verdoppelung der Werte vom primären verglichen zum Glioblastom-Rezidiv.

Eine statistische Auswertung folgt in Kapitel 6.3., Tabelle 15.

6.3. Auswertung mittels U-Test/Mann-Whitney-Test

Anhand des SPSS-Programmes wurden die Ergebnisse mit dem U-Test ausgewertet. Hierfür wurden alle Tumorgrade miteinander verglichen und auf ihre Signifikanz geprüft (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Ergebnisvergleich Wif1 und Rab34 im U-Test/Mann-Whitney-Test

	Astro IIer gegen IIIer	Astro IIer gegen GBM	Astro IIer gegen Rezidive	Astro IIIer gegen GBM	Astro IIIer gegen Rezidive	GBM gegen Rezidive
Auswertung für Wif1						
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,833	0,528	0,126	0,664	0,016	0,012
Signifikant					X	X
Nicht signifikant	X	X	X	X		
Auswertung für Rab34						
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,292	0,112	0,865	0,728	0,140	0,005
Signifikant						X
Nicht signifikant	X	X	X	X	X	

Für das Gen Wif1 zeigte der U-Test/Mann-Whitney-Test sowohl beim Auftragen der Astrozytome Grad III gegen die Gruppe der Rezidive als auch beim Vergleich zwischen den Glioblastomen und den Rezidiven eine statistische Signifikanz.

Für das Gen Rab34 zeigte der U-Test/Mann-Whitney-Test beim Auftragen der Glioblastome gegen die Gruppe der Rezidive eine statistisch auswertbare Signifikanz.

7. Diskussion

7.1. Einleitung

7.1.1. Allgemeine Probleme der histologischen Einteilung

Die zentrale Rolle der Gehirntumoren und die funktionellen Konsequenzen von neuronalen Verlusten erklären die Wichtigkeit der Forschung innerhalb der Tumorgenese von Gehirntumoren. Neuronale Tumoren variieren in ihrer Malignität, allerdings sind für gewöhnlich auch benigne Formen aufgrund ihres infiltrativen Wachstums und der Tendenz zum Übergang in maligne Formen oft letztlich letal (Peiffer et al. 2002).

Trotz der Häufigkeit ihres Vorkommens und der drastischen Auswirkung auf den Patienten, ist die Darstellbarkeit dieser Tumoren oft nicht eindeutig und die Diagnose muss durch eine histologische Probe mittels Biopsie oder chirurgischer Resektion gestellt werden (Böcker et al. 2001). Hier stellt sich jedoch das Problem der formalen Einordnung der Tumoren in bestimmte Gruppen. Innerhalb der durch die WHO beschriebenen Gruppen lassen sich histologisch oft weitere Unterteilungen machen, die in der Literatur zu Diskussionen führen.

Die WHO-Klassifikation für Oligodendrogliome und gemischte Oligoastrozytome beschreibt beispielsweise zwei Grade: Die niedriggradige (Grad II) und die anaplastische (Grad III) Form. Es bleibt als Fragestellung, ob nicht eine dritte Gruppe hinzugefügt werden sollte, die Glioblastome mit oligodendroglialer Komponente erfasst (Claes et al. 2008).

Die Inzidenz dieser drei Subtypen ist kontrovers zu betrachten. Verschiedene Gruppen beschreiben für die Inzidenz eine ansteigende Tendenz, die mit Werten zwischen 5% bis hin zu 25-33% bei allen glialen Tumoren angegeben wird. Weiterhin beschreiben sie ein Absinken der Astrozytom-Inzidenz (Behin et al. 2003).

Dieser Wechsel führt zu der Annahme, dass einige Tumoren, die ursprünglich als Astrozytome eingestuft wurden, nun als Oligodendrogliome oder gemischte Oligoastrozytome klassifiziert wurden.

Aus diesem Grunde irritiert die morphologische Einordnung in manchen Fällen; selbst geschulte Pathologen sind nicht in der Lage, eine eindeutige Zuordnung zu treffen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden alle Astrozytome als reine Astrozytome ohne Mischgruppen logisch definiert, so dass oligodendrogliale Anteile ausgeschlossen werden konnten. Dennoch gelten auch für die in der vorliegenden Studie gemachten Einteilungen diese formalen Einschränkungen.

In unklaren Fällen ist demnach eine interdisziplinäre Abklärung anzustreben. Nach Möglichkeit sollten klinische, radiologische und pathologische Aspekte mit in die Einordnung fließen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt beim Staging (Stadien-Einteilung) der neuronalen Tumoren ist die Tatsache, dass viele niedriggradige Gliome über die Zeit hinweg eine maligne Transformation durchlaufen. Aus diesem Grunde ist die gegebene morphologische Klassifikation nicht als endgültig zu betrachten (Daumas-Duport et al. 1997).

Ferner ist oft nicht nachvollziehbar, in welchem Stadium der Tumorgenese sich das Gewebe derzeit befindet (Progression versus de novo-Bildung). Aus diesen genannten Gründen sind analysierte Gewebeproben nicht repräsentativ (Behin et al. 2003).

Auch regionale Tumorproben weisen eine Heterogenität auf, so dass es vor allem nach stereotaktischen Biopsien zu Fehlklassifikationen kommt (Coons et al. 1997). Für die Differenzierung zwischen astrozytischen und oligodendroglialen Tumoren bzw. die Identifikation von anaplastischen Astrozytomen ist die Reproduzierbarkeit innerhalb und zwischen Beobachtern häufig mangelhaft (Behin et al. 2003). Diese könnte deutlich verbessert werden, wenn klare geradlinige Abstammungs-Marker identifizierbar wären.

Ein weiterer Punkt ist, dass Tumorproben zwar das gleiche morphologische Erscheinungsbild zeigen können, aber dennoch genetische Unterschiede und auch abweichende Verläufe aufweisen, trotz ähnlicher prognostischer Faktoren.

Aus diesem Grunde spielen molekular-genetische Analysen in zunehmendem Maße eine wichtige Rolle innerhalb der Klassifikation, der Therapieansätze und der Heilungschancen von Gliomen (Behin et al. 2003).

Wie für andere Tumorarten auch, ist für alle Gliome die Zugehörigkeit in die durch abnorme Genexpression verursachte Genese nachgewiesen. Gliome zeigen in allen Formen genetische Aberrationen (Claes et al. 2008).

Wenn eine vorausgehende Radiatio-Therapie nicht in Betracht gezogen wird, bleibt die Ursache von genetischen Ereignissen gelegentlich unbestimmbar.

Die in die Gliomgenese involvierten Veränderungen von Onkogenen und Tumor-Suppressor-Genen sind nicht spezifisch, aber ihre Kombination und Akkumulation ist charakteristisch (Wager et al. 2008).

Die Gliomgenese und die Tumorprogression zeigen eine starke Assoziation mit dem Verlust der Zell-Zyklus-Kontrolle, welche vor allem durch eine Dysregulation des TP53 und des Retinoblastom-Pathways zustande kommt (Zhu u. Parada 2002). Weiterhin spielt der Anstieg der Tyrosin-Kinase-Signalisierung eine wichtige Rolle, hierzu zählen die Amplifikation des EGF-Rezeptors und die Überexpression von PDGF oder des PDGF-Rezeptors (Maher et al. 2001). Im späten Stadium der Tumorprogression sind diese Reaktionswege in alle malignen Gliome involviert und miteinander verbunden.

In der Hoffnung, eine neue molekulargenetische Klassifikation der Tumoren schaffen zu können, haben sich Techniken eröffnet, welche eine detaillierte Charakterisierung des Tumor-Genomes, der Transkriptome und der Proteome ermöglichen. Am meisten gebraucht wird das cDNA Microarray (Mikro Datenreihe), da es auf einem Objektträger (Slide) die Selektion (Screening) tausender von Genen ermöglicht (Mülhardt 2002). Dieser Array zur Darstellung der Expression hat sich als Methode für ein objektives Grading der Gliome und die Definition molekularer Pathways der Tumorprogression angeboten. Diese Technik sollte dabei helfen, neue prognostische Marker zu identifizieren, so basiert auch die vorliegende Doktorarbeit auf Ergebnissen dieser Methode (Köhler 2007, Bozinov et al. 2008).

7.1.2. Allgemeine Probleme des Versuchsaufbaus

Die Real-Time quantitative PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet (Higuchi et al. 1992).

Diese Methode ist sehr aufwendig und teuer, bietet aber folgende Vorteile:

Die Real-Time PCR zeichnet sich durch eine hohe Spezifität des Assays aus. Durch Messung der Fluoreszenz kann man jederzeit die Menge des entstehenden Produkts berechnen und unspezifische PCR-Produkte, die das Ergebnis verfälschen könnten, werden nicht nachgewiesen (Mülhardt 2002).

Die Verwendung der heutigen Farbstoffe, die ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis liefern, bietet eine universale Verwendbarkeit, weil damit jede beliebige PCR-Reaktion verfolgt werden kann. Außerdem ist die Signalstärke hoch, weil jedes DNA-Molekül mehrere Farbstoffmoleküle bindet. Aus diesem Vorteil resultiert allerdings auch ein großer Nachteil, weil man nicht zwischen korrektem Produkt und Artefakten unterscheiden kann (Mülhardt 2002). Obwohl Artefakte wie Substitutionen, Insertionen und Deletionen allgegenwärtig sind und den Nutzen der Klone für funktionelle Analysen einschränken, können diese durch sorgfältiges Arbeiten eingeschränkt werden. Hierzu zählen die Durchführung möglichst weniger Amplifikationszyklen, einer möglichst langen Elongationsphase und die Verwendung von AmpliTaq DNA-Polymerase (Higuchi et al. 1992).

7.1.3. Allgemeine Probleme der statistischen Auswertung

Voraussetzungen für die Durchführung und Interpretation eines statistischen Tests sind vor dem Studienbeginn bis ins Detail festgelegte Rahmenbedingungen (Schäfer 1997). Hierzu zählt die Festlegung der Zielgröße oder Messgröße, auf die der Test angewendet werden soll. Auch die Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau α) und die Art des durchzuführenden Tests müssen festgelegt werden. Weiterhin ist die Anzahl der Patienten anzugeben.

Alle in die Studie aufgenommenen Patienten müssen in den statistischen Test einbezogen werden. Kein Patient darf von der Auswertung ausgeschlossen werden. Dabei ist das sog. Intention-to-treat-Prinzip anzuwenden. Dieses Prinzip besagt, dass jeder Patient in derjenigen Gruppe ausgewertet wird, der er bei Studienbeginn zugeteilt wurde (Schäfer 1997).

Im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit ergibt sich an der Stelle allerdings ein wesentliches Problem:

Trotz Untersuchung aller seit 2002 im Institut gesammelten Proben ist die Probenanzahl insgesamt gering, so dass vorliegende Auswertungen als Tendenzen angesehen werden müssen. Weil es generell nicht viele Tumorproben gibt, wurden den Auswertungen alle während der Versuchszeit neu entnommenen Proben beigelegt.

7.2. Diskussion für Wif1

Der Wnt-Reaktionsweg spielt innerhalb verschiedenster Entwicklungsprozesse eine entscheidende Rolle und ist aus diesem Grund an unterschiedlichen dynamischen Regulationsmechanismen beteiligt, die durch eine Anzahl morphogenetischer Faktoren begründet ist. Aberrante Reaktionsabläufe haben darum Konsequenzen, welche von unbeabsichtigter Apoptose bis hin zur Tumorgenese oder abnormalem embryogenetischen Wachstum führen können (Diep et al. 2004).

In der dieser Dissertation vorausgehenden Studie von Köhler (2007) wurde das Transkriptions-Verhalten von 4608 Genen in 15 unterschiedlichen Tumorproben mittels Mikroarray-Analyse untersucht. Die Proben setzten sich aus einer Gruppe von sechs anaplastischen Astrozytomen und neun Glioblastomen zusammen. Für das Gen Wif1 konnte mittels Mikroarray kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen beiden malignen Astrozytomen nachgewiesen werden. Einzig in einer gesonderten Einzelfalluntersuchung fand Köhler einen Expressionsunterschied vom anaplastischen Astrozytom zum folgenden sekundären Glioblastom (WHO Grad IV), also einem therapierten malignen Rezidiv-Gliom. Hier zeigte sich sowohl im Microarray als auch in der Real-Time PCR richtungsgleich eine Verminderung der Expression zwischen anaplastischem Astrozytom vs. sekundärem Glioblastom.

In der vorliegenden Dissertation wurde daraufhin mittels Real-Time PCR-Analyse eine größere Anzahl verschiedener Tumorstadien der Astrozytome gegeneinander verglichen.

Wie bei Köhler bereits im Array-Verfahren und in der gesonderten Einzelfalluntersuchung aufgezeigt, bestätigte sich in vorliegenden Versuchen der signifikante Expressionsverlust von Wif1 im Vergleich zwischen den Astrozytomen

Grad III und der Gruppe der Rezidive. Weiterhin konnte für das Gen Wif1 ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Glioblastomen und den Rezidiven gezeigt werden. In allen anderen Vergleichsgruppen konnten keine statistisch relevanten Unterschiede festgestellt werden. Dennoch zeigte sich im Vergleich vom Astrozytom Grad II zum Astrozytom Grad III der Hinweis eines Expressionsanstieges, der aber statistisch aufgrund des kleinen Probenumfangs keine Signifikanz zeigte. Eine Reduktion dieser Wif1-Expression zeigte sich auch im Vergleich vom Astrozytom Grad III mit der Gruppe der Glioblastome, ließ sich aber ebenfalls statistisch nicht belegen. Das Expressionsmuster in der Gruppe der Astrozytome Grad II zeigte sich nahezu äquivalent zu der Gruppe der Glioblastome. Eine statistisch signifikante Zunahme der Expressionsstärke verdeutlichte der Vergleich der Glioblastome mit der Gruppe der Glioblastom-Rezidive.

Da sich in den durchgeführten Untersuchungen lediglich in der Vergleichsgruppe der beiden malignen Astrozytom-Formen Grad III und Glioblastom im Vergleich zu den Rezidiven eine statistisch auswertbare Signifikanz zeigte, muss davon ausgegangen werden, dass ein klarer Zusammenhang zwischen der Radio-Chemotherapie und der Expression des Gens besteht. Man kann daraus schließen, dass ein Expressionsunterschied von Wif1 möglicherweise zu einer Strahlenresistenz führt oder umgekehrt.

Neben dem Wnt/planar cell polarity (Wnt/PCP) pathway und dem Wnt/calcium (Wnt/Ca²⁺) pathway spielt der sog. Canonical Wnt signalling pathway die wichtigste Rolle. Hierbei kommt es zu einer Stabilisierung und zu einem Anstieg der Transkriptionsaktivität von β -Catenin. Letzteres wird vom Zytoplasma in den Nukleus transloziert, wo es als Transkriptionsfaktor fungiert und zu einer Aktivierung der eigentlichen Effektoren führt. Es kommt zu einem Tumorwachstum. Dieses Tumorwachstum geht entweder mit einer ungeeigneten Inaktivierung für Off-Schalter oder einer ungeeigneten Aktivierung von On-Schaltern einher (Mazieres et al. 2004).

Es ist bisher gut bekannt, dass Mutationen im APC-Gen, Axin oder β -Catenin, welche zu einer Akkumulation von β -Catenin im Zellkern führen, oft in menschlichen Tumoren nachzuweisen sind (Reguart et al. 2004). Zudem bindet β -Catenin selbst nicht an die DNA, sondern es benötigt für seine Bindung an LEF/TCF Transkriptionsfaktoren für die Transaktion in den Zellkern, welches wiederum an

bestimmte Gene bzw. Genexpressionen gebunden ist. Allen Tumor-Typen gleich ist die Assoziation mit verschiedenen Stadien der β -Catenin-Form innerhalb des Reaktionsweges (Diep et al. 2004).

Obwohl der intrazytoplasmatische Teil des Wnt-Pathway weitestgehend verstanden wurde, ist dennoch nur wenig über den Zusammenhang zwischen Antagonisten von Wnt-Liganden und ihrer Rolle innerhalb der Karzinogenese bekannt (Reguart et al. 2004).

Aus den oben genannten, in der Literatur beschriebenen Reaktionsmechanismen des Wif1 (Diep et al. 2004, Reguart et al. 2004) könnte man erwarten, dass eine Expressionszunahme von Wif1 mit einem Anstieg von Apoptose und einer Wachstumsverminderung einhergeht. Mit zunehmendem Tumor-Grad wäre also mit einem Expressionsverlust zu rechnen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch keine Korrelation zwischen der Tumor-Schwere und der Expression von Wif1. Es scheint für Astrozytome also keinen Zusammenhang in dieser Hinsicht zu geben. Zu berücksichtigen ist bei diesen Ergebnissen jedoch immer, dass die Gesamtuntersuchungszahl wie bereits erwähnt zwangsläufig gering und somit die statistische Signifikanz nur eingeschränkt möglich ist.

Interessanterweise ist in der Literatur aber auch eine Störung der normalen Entwicklung von Zellverbänden durch eine Überexpression von Wif1 beschrieben (Mazieres et al. 2004). Da Wnt-Proteine sowohl in der Embryogenese als auch beim Gewebewachstum eine Schlüsselrolle spielen (Vaes et al. 2005) und zur Kontrolle der Zellproliferation und Determination der Stammzellen-Entwicklung beitragen, kann eine aberrante Aktivierung des Wnt-Signal-Pathways - egal in welche Richtung - zu verschiedensten menschlichen Krebsarten beitragen. Hierzu könnte es sowohl durch Unter- als auch durch Überexpression kommen (Mazieres et al. 2004, Cebrat et al. 2004).

Des Weiteren bleibt zu überlegen, inwiefern die Radio-Chemo-Therapie bei der Rezidiv-Tumorgruppe eine wichtige Rolle spielt. Sowohl Bestrahlung als auch Chemotherapie kann entweder eine palliative oder potentiell kurative Behandlung bedeuten. Die therapeutischen Effekte lassen sich im Groben in die vier Wirkmechanismen Nekrose, Apoptose, beschleunigter Alterungsprozess und

terminale Differenzierung unterteilen (Böcker et al. 2001). Eine Zelle, die durch Radio-Chemo-Therapie beschädigt worden ist und ihre reproduktive Integrität verloren hat, kann sich ein oder mehrere Male teilen, bevor die Nachkommenschaft eine sterile Reproduktivität hergestellt hat (DeVita et al. 2004). Jede Zelle unterläuft nach Beschädigung durch diese Art von Therapie eine kritische Periode, in welcher sich entscheidet, ob die Zelle untergeht, den Schaden behebt oder trotz dem Schaden weitere Zellteilungen durchläuft. Auf molekularer Ebene initiiert ein Chemo-Radiatio-induzierter Schaden komplexe Signalkaskaden in den Zellen, welche in einer Vielzahl von Reaktionen resultieren. Hierzu zählen Zellzyklus Arrest, Induktion von sog. Stress-Reaktions-Genen, DNA-Reparation und Apoptose (Böcker et al. 2001). Das Protein p53 spielt zum Beispiel eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von Apoptose und Zell-Zyklus-Arrest nach DNA-Schaden (DeVita et al. 2004). Auch andere Signal-Kaskaden werden durch die Wirkung der Radio-Chemo-Therapie aktiviert. In vielen dieser Pathways spielen Mitogene (Proteine innerhalb der Mitose) eine wichtige Rolle, so fördern beispielsweise Wachstumsfaktoren das Überleben der Zelle (Schmoll et al. 2005). Viele dieser Effekte sind von einem bestimmten Zelltyp abhängig. Verschiedene Membran-gebundene Rezeptoren sind in solche Signalisierungen verwickelt und agieren via nachfolgender Aktivierung multipler Pathways. Zu diesen Rezeptoren zählen zum Beispiel die mitogen-aktivierte Protein Kinase, Phosphatidyl 3 Kinase, K-/H-Ras, JAK/STAT und c-Jun NH₂-terminale Kinase (Schmoll et al. 2005, DeVita et al. 2004). Ein Beispiel ist weiterhin die durch Bestrahlung induzierte EGFR-Signal-Kaskade, die mit überlebens-fördernden Effekten einhergeht. Auch andere Zell-Oberflächen-Rezeptoren zeigen solche Effekte nach Bestrahlung, hierzu zählen HER2, VEGF und der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (Preiß et al. 2008, DeVita et al. 2004). Nicht nur Oberflächenrezeptoren, sondern auch Wachstumsfaktoren und Zytokin-Rezeptor-Pathways sind in die Bestrahlungs-Reaktion involviert. Bestrahlung führt zu einer schnellen Aktivierung des Tumor Nekrose Faktor- α -Rezeptor (TNF- α -Rezeptor) und induziert auf diese Weise die Expression des TNF- α -Proteins. Auch Zytokine scheinen bei antiapoptotischen Signalen eine Rolle zu spielen, hierzu zählen Interleukin-6, TGF- β und der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (Preiß et al. 2008, DeVita et al. 2004).

Bei den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation kann mit einem engen Zusammenhang zwischen der Radio-Chemo-Therapie und der Beeinflussung der Wif1-Expression gerechnet werden. An welcher Stelle der drei bekannten Wnt-Reaktionswege eine therapeutische Beeinflussung durch Radio-Chemo-Therapie vonstatten geht, ist und bleibt unklar (Ohigashi et al. 2005). Dennoch zeigen die in vorliegender Arbeit signifikanten Expressionsunterschiede, dass die Radio-Chemo-Therapie mit 60 Gy und ACNU/VM26 eine Auswirkung auf das Gen Wif1 hat. Dieses Ergebnis repräsentiert mögliche Ansätze für potentielle therapeutische Maßnahmen.

7.3. Diskussion für Rab34

In den dieser Doktorarbeit vorausgegangenen Untersuchungen mittels Mikroarray-Analyse zeigte sich ein signifikanter Expressionsunterschied von Rab34 in Astrozytomen Grad III und Glioblastomen. Es konnte eine deutliche Herunter-Regulierung von Rab34 in Glioblastomen verglichen zu Astrozytomen Grad III beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die anschließende Real-Time PCR für dieselben Tumorproben einen Expressionsanstieg (Köhler 2007, Bozinov et al. 2008). Trotz der in den unterschiedlichen Versuchen entgegengesetzten Ergebnisse konnten mit den hier vorliegenden Daten die Ergebnisse für die Real-Time PCR bekräftigt werden: In den vorliegend präsentierten Versuchen, die mit einer größeren Anzahl von Astrozytom-Tumor-Proben durchgeführt wurden, konnte entsprechend der Tumor-Grade eine ansteigende Expression von Rab34 nachgewiesen werden, es gab also auch keinen Tumorgrad, in dem es zu gar keiner Expression kam.

Beim Vergleich der Mittelwerte (MW) der einzelnen Gruppen gegeneinander konnte in der Real-Time-PCR-Analyse jeweils eine Expressionszunahme von Grad II zu Grad III und wiederum von Glioblastomen zu den Rezidiven gezeigt werden. Die insgesamt höchste Expression zeigte das Astrozytom Grad III (MW = 35,36).

Beim Vergleich der Expressionsstärke von Rab34 innerhalb der Glioblastom-Gruppen zeigte sich eine statistisch signifikante Verdoppelung der Werte vom primären verglichen zum Glioblastom-Rezidiv (primäres Glioblastom: MW = 9,04; Glioblastom Rezidiv: MW = 17,01). Diese statistisch auswertbare Signifikanz der Messungen konnte im U-Test/Mann-Whitney-Test beim Auftragen der Glioblastome gegen die Gruppe der Rezidive bestätigt werden. Dieses Ergebnis

könnte ein wichtiger Hinweis dafür sein, dass Rab34 eine Rolle bei der Einleitung von einem Glioblastom zu einem Glioblastom-Rezidiv spielt. Weiterhin demonstrieren die vorliegenden Daten eine signifikante Assoziation zwischen der Gen-Expression und einer Radio-Chemo-Therapie.

Im Zuge der oben genannten Zellspezifität und ihrer Abhängigkeit zum Tumor-Grad stellt sich bei den vorliegenden Versuchsergebnissen nun die Frage, inwieweit zelluläre Mechanismen durch Radiatio und Chemotherapie zu einer Veränderung führen, die wiederum eine Expressionsverdoppelung von Rab34 veranlassen. – Führt die bisher angewandte Therapie zu einer verstärkten Expression von Rab34? Gibt es in dem vorliegenden Beispiel einen direkten Zusammenhang zwischen Therapie und Expression von Rab34?

Wie beim Gen *Wif1* vorhergehend schon beschrieben, findet man in vielen der Pathways, die durch Radio-Chemo-Therapie behandelt worden sind, Mitogene (DeVita et al. 2004). Diese Proteine spielen innerhalb der Mitose eine wichtige Rolle, für die Mitose sind wiederum das Mikrotubulus-Netzwerk und die Formation von Membranen von Bedeutung. Genau an dieser Stelle wirken die Rab-Proteine im Zusammenhang mit RILP:

Für verschiedene Rab-Proteine/-Gene und Rab-Effektoren konnte gezeigt werden, dass eine Dimerisation zu einer grundlegenden Veränderung dieser Proteine führt (Goldenberg et al. 2007). Die Oligomerisation ist eine der fundamentalen Zustandsformen ihrer physiologischen Funktion. Die Dimerisation dieser Rab-Proteine hängt von ihrer nukleotid-gebundenen Konformation ab, sie ist unabhängig von einer Lipid-Modifikation und könnte dazu führen, dass diese Proteine den GDP/GTP-Zyklus durchlaufen, ohne im Zytosol recycelt zu werden (Wang u. Hong 2002). Rab34 reguliert die lysosomale Formation durch einen Mikrotubulus-abhängigen Weg, obwohl es selbst durch eine Interaktion mit RILP gesteuert wird. Eine Unterbrechung der Selbst-Interaktion führt in diesem Falle zu einem Funktionsverlust (Colucci et al. 2005).

- Ist es also möglich, dass Rab34 in seiner Interaktion mit RILP durch die Radio-Chemo-Therapie noch stabilisiert wird? Wird durch eine Radio-Chemo-Therapie lediglich die Expression von Rab34 gesteigert, so dass mehr Rab34-Proteine vorliegen oder hat die Chemotherapie mit ACNU/VM26 möglicherweise auf chemischer Ebene eine direkte Stabilisierung der Verbindung zur Folge?

Ein entscheidender Unterschied zwischen Rab34 und RILP ist die Tatsache, dass Rab34 über einen langen Reaktionsweg wirkt, der primär über den Golgi-Apparat gesteuert ist. RILP hingegen agiert in der cis-Formation direkt an den Lysosomen. Aus diesem Grunde ist anzunehmen, dass der Mikrotubulus-abhängige Effekt von Rab34 mit der Möglichkeit einhergeht, dass das effektive und produktive „Signaling“ von Rab34 auf RILP abhängig von einem intakten Mikrotubulus ist (Wang et al. 2004). Ansätze für neue Therapieoptionen wären in diesem Falle also das Mikrotubulus-Netzwerk, welches durchaus durch Medikamente beeinflussbar ist.

Ein weiterer Unterschied zwischen Rab34 und RILP besteht darin, dass RILP eine größere Potenz bei der Induktion der Formation von kleineren und größeren Lysosomen zeigt. (Wang et al. 2004). Aufgrund ihrer Größe bilden größere Lysosomen natürlicherweise ein Cluster (Anhäufung) innerhalb der viel geräumigeren Zentralregion. Dieser Vorgang ist unabhängig von der Intaktheit des mikrotubulären Netzwerkes (Wang et al. 2004). Innerhalb kultivierter Zellen stellt die weniger geräumige Peripherie keine bevorzugte Lokalisation für diese vergrößerten Lysosomen dar. Aufgrund der kleineren Größe der Lysosomen in Rab34-exprimierenden Zellen scheint der Mikrotubulus-Apparat eine Rolle innerhalb der aktiven Cluster-Bildung in der perinuklearen Region zu spielen (Wang et al. 2004). Man weiß, dass eine Zerstörung des Mikrotubulus durch beispielsweise Nocodazol in einer freien Diffusion dieser Lysosomen in die periphere Region resultiert (Wang u. Hong 2002, Wang et al. 2004). - Warum sollten eine Bestrahlung und/oder Chemotherapie hier nicht eine ähnliche Wirkung zeigen? Die Kombination dieser beiden Möglichkeiten, gemeinsam mit anderen Faktoren, könnte eine Basis für die unterschiedliche Mikrotubulus-Nutzung von Rab34 und RILP innerhalb der lysosomalen Formation sein.

Ein weiterer interessanter Punkt ist der Zusammenhang mit phosphorylierten PKC-Motiven innerhalb von Rab39. Für verschiedene Rab-Proteine, wie zum Beispiel Rab5 und Rab8, konnte eine Regulation durch Proteinkinasen wie PKC, PKB, cdc2, ERK1 und andere gezeigt werden. Auch für p38 konnte eine Inhibition des durch Rab5 gesteuerten endozytotischen Reaktionsweges nachgewiesen werden (Chen et al. 2003).

Seit Rab39 sowohl aus dendritischen als auch anderen Lymphozyten-Zell-Linien isoliert und exprimiert wird (Nachweis mittels RT-PCR), sind zudem zwei Dinge bekannt: Rab39 könnte an der Internalisation und bei dem Transport von exogenen Protein-Antigenen oder sogar an der Regulation des Antigen-präsentierenden Prozesses beteiligt sein. Dieses wurde bisher schon für Rab5 und Rab4 angenommen (Chen et al. 2003).

Weil Rab39 in engem Zusammenhang mit Proteinkinasen steht und die potentielle Rolle des Rab39 in der Regulation der Antigen-Präsentation gesehen wird (Chen et al. 2003), ist es von großem Interesse, zukünftige Investitionen in die Erforschung dieser Zusammenhänge zu machen.

Daß Bestrahlung die Expression einer Menge Gene induziert und dass die Mitglieder dieser immer weiterwachsenden Liste der Bestrahlungs-induzierten Gene zu einem weiten Spektrum an nachgeschalteten Effekten führen, ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (DeVita et al. 2004). Zum Beispiel hilft die induzierte Expression von Egr-1 (early growth response 1, frühe Wachstums Antwort 1) und c-Jun Zellen beim Überleben nach Beschädigung durch Strahlung. Diese Bestrahlungsanregung hängt von Modifikationen von Transkriptionsfaktoren durch den Protein Kinase C-Pathway ab. Gezielte Inhibition von Egr-1 und c-Jun-Proteinen verhindert den Beginn der S-Phase und reduziert das Überleben von menschlichen Zellen nach Bestrahlungs-Schäden (DeVita et al. 2004). Auch andere bestrahlungsinduzierte Gene sind beschrieben worden, hierzu zählen GADD45 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 45, Wachstumshemmung und DNA Schaden erzeugendes Protein), β -Aktin, Interleukin-1, Protein-Kinase-C, der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor, Interleukin-1 β und der Gewebe-Plasminogen-Aktivator (DeVita et al. 2004). Die Identifikation der genauen Reaktionsabläufe, die Gene wie Egr-1 und auch Rab34 steuern, wird zur Entwicklung der Gentechnologie mittels bestrahlungsinduzierter Gene beitragen.

Vielleicht kann man an dieser Stelle noch einen Schritt weiter gehen: welche Faktoren werden durch die Radio-Chemo-Therapie genau beeinflusst? Sind es einzelne chemische Strukturen wie die o.g. Mikrotubulus-Formation oder bestrahlungsinduzierte Gene, die eine Modifikation erfahren? Oder ist es vielleicht die Tatsache, dass eben bestimmte Strukturen nicht beeinflusst werden, während der

Rest eine Wandlung durchläuft? Gibt es neben der chemischen und radiologischen vielleicht eine infektiöse Genese dieser Expressionsunterschiede? - Das interessante Ergebnis dieser Dissertation ist, dass sich ausgerechnet zwischen den behandelten und den unbehandelten Glioblastomen eine Signifikanz nachweisen ließ.

Während die Wirkung der Bestrahlung auf der Energieübertragung auf das durchstrahlte Gewebe in Streuprozessen beruht, wobei im Wesentlichen die Ionisierung von Wassermolekülen und die dadurch entstehenden freien Radikale hochtoxisch sind, verwendet die Chemotherapie Stoffe, die ihre schädigende Wirkung möglichst gezielt auf bestimmte krankheitsverursachende Zellen beziehungsweise Mikroorganismen ausüben und diese abtöten oder in ihrem Wachstum hemmen (Schmoll et al. 2005).

Coyne et al (2007) beispielsweise zeigten in diesem Zusammenhang, dass das Coxsackievirus B (CVB) keine bedeutende Reorganisation der Tight junctions induziert, es aber die spezifische Internalisation von Okkludin A (einem Hauptprotein der Tight junctions) innerhalb der Makropinosomen stimuliert. Obwohl Okkludin A nicht direkt mit dem Virus interagiert, führt eine Verminderung von Okkludin A zu einer Prävention vom Eintritt von CBV in das Zytoplasma und verhindert eine Infektion. Sowohl die Okkludin Internalisation als auch CVB werden durch Inhibitoren der Makropinozytose blockiert und benötigen hierfür die Aktivität von Rab34, Ras und Rab5 (Coyne et al. 2007).

Mit diesem Beispiel wird veranschaulicht, dass der Eintritt eines Virus (in diesem Falle CVB) abhängig von Okkludin A ist, welcher wiederum bei einem Prozess stattfindet, bei dem Aspekte der kaveolären Endozytose mit charakteristischen Eigenschaften der Maktopinozytose kombiniert werden. Übertragen auf die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse könnte es möglich sein, dass nicht nur die strukturellen Prozesse durch Rab34 beeinflusst werden, sondern dass in der Folge Infektionserreger einen Weg in die Zelle oder wie o.g. eben nicht in die Zelle finden und möglicherweise so zu einer Progression der Tumorgeschehens führen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse durchaus mit den in der Literatur angegebenen Thesen über die Bedeutung des Rab34 übereinstimmen. Durch Voruntersuchungen in der vorausgegangenen Doktorarbeit (Köhler 2007) konnte bereits ein aussagekräftiger Nachweis über Rab34 in malignen Astrozytomen gemacht werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde mittels Real-Time-PCR lediglich die relative mRNA-Expression der beiden Zielgene Rab34 und Wif1 in den verschiedenen Tumorproben untersucht. Weiterführende Untersuchungen sollten eine gezielte Mengenbestimmung einer größeren Anzahl von Proben anstreben, um genauere Aussagen über das wirkliche Vorliegen und Wirken der Proteine machen zu können. Aus den signifikanten Expressionsunterschieden zwischen den Glioblastomen und den trotz Radio- und Chemo-Therapie behandelten Rezidiven geht dennoch hervor, dass hier möglicherweise ein sehr sensibler Schritt innerhalb des Rab34/39-Pathways zugrunde liegt.

Die zentrale Rolle innerhalb des Organellen-Transportes im Axoplasma, Mikrotubulus-abhängige Effekte und die Regulation der Antigen-Präsentation scheinen sowohl durch Radio-, als auch Chemo-Therapie beeinflussbar zu sein, auch eine infektiöse Genese ist nicht auszuschließen. Die genaue Funktion bleibt jedoch unklar.

8. Literatur

Agamanolis DP (2006): Neuropathology; An illustrated course for medical students and residents. Chapter Seven: Tumors of the central nervous system. Homepage der Northeastern Ohio University college of Medicine, Stand: 06.05.2007, last update: february 2007. <http://neuropathology.neoucom.edu/chapter7/chapter7bGliomas.html>

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1999); Übersetzungsherausgeber Simons K, Kurzchalia T: Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. Wiley-Vch, 631ff., 665ff., 501ff..

Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY (2003): Primary brain tumors in adults. Lancet 361 [9354], 323-331.

Berlit P (1999): Klinische Neurologie. 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 641-646.

Besplug J, Burke P, Ponton A, Filkowski J, Titov V, Kovalchuk I, Kovalchuk O (2005): Sex and tissue-specific differences in low-dose radiation-induced oncogenic signaling. Int J Radiat Biol. 2005 Feb; 81(2): 157-168.

Böcker W, Denk H, Heitz PU (2001): Pathologie. 2. Auflage, Urban und Fischer, München Jena, 164ff., 166ff., 175ff., 313ff., 317ff..

Bozinov O, Köhler S, Samans B, Benes L, Miller D, Ritter M, Sure U, Bertalanffy H (2008): Candidate genes for the progression of malignant gliomas identified by microarray analysis. Neurosurg Rev. 2008 Jan; 31(1): 83-9; discussion 89-90. Epub 2007 Oct 5.

Bustin A, Mueller R (2005): Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clinical Science 2005; 109: 365-379.

Cebrat M, Strzadala L, Kisielow P (2004): Wnt inhibitory factor-1: A candidate for a new player in tumorigenesis of intestinal epithelial cells. *Cancer Lett.* 2004 Mar 31; 206(1): 107-13.

Chen T, Han Y, Yang M, Zhang W, Li N, Wan T, Guo J, Cao X (2003): Rab39, a novel Golgi-associated Rab GTPase from human dendritic cells involved in cellular endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Apr 18; 303(4): 1114-20.

Claes A, Schuurin J, Boots-Sprender S, Hendriks-Cornelissen S, Dekkers M, van der Kogel AJ, Leender WP, Wesseling P, Jeuken JW (2008): Phenotypic and genotypic characterization of orthotopic human glioma models and its relevance for the study of anti-glioma therapy. *Brain Pathology* 2008 Jul; 18(3): 423-33.

Colucci AMR, Campana MC, Bellopede M, Bucci C (2005): The Rab-interacting lysosomal protein, a Rab7 and Rab34 effector, is capable of self-interaction. *Biochem Biophys Commun.* 2005 Aug 19; 334(1): 128-33.

Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK (1997): Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* 1997; 79: 1381-93.

Coyne CB, Shen L, Turner JR, Bergelson JM (2007): Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe.* 2007 Sep 13; 2(3): 181-92.

Daumas-Duport C, Varlet P, Tucker ML, Beuvon F, Cervera P, Chodkiewicz JP (1997): Oligodendrogliomas, part I: patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations – a study of 153 cases. *J Neurooncol* 1997; 34: 37-59.

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (2004): *Cancer: Principles & Practice Of Oncology*, 7th Edition, 2 Vol. Set. Lippincott Williams & Wilkins, 7. Auflage, 2 Vol. Set-CD-Rom.

Diep DB, Hoen N, Backman M, Machon O, Krauss S (2004): Characterisation of the Wnt antagonists and their response to conditionally activated Wnt signalling in the developing mouse forebrain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004 Nov 25; 153(2): 261-70.

Fuller GN, Scheithauer BW (2007): Symposium: The 2007 Revised World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System: Newly Codified Entities. *Brain Pathology* 2007 July; 17(2): 204-307.

Glas M, Hau P, Bogdahn U (2007): Die Rolle der Chemotherapie bei malignen Gliomen – Aktuelle Trends. Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg im Bezirksklinikum. *Onkologie* 2007 Mai, Zeitschrift Online-Ausgabe 07-05.

Goldenberg NM, Grinstein S, Silverman m (2007): Golgi-bound Rab34 is a novel member of the secretory pathway. *Mol Biol Cell.* 2007 Dec; 18(12): 4762-71.

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413-417.

Holland EC (2001): Gliomagenesis: Genetic alterations and mouse models. *Nature* 2001 Feb; 2: 120-129. Review.

Ilyas M (2005): Wnt signalling and the mechanistic basis of tumor development. *J Pathol* 2005; 205: 130-144.

Internet:

GeneAtlas – Database: Rab34 physical map; PUBMED GeneAtlas: Gene Database; Stand: 06.05.2007, last update: 13.09.2002.

<http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?symbol=RAB34>

The Wnt pathways: KEGG Pathway Database; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, GenomeNet, Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University; Stand: 06.05.2007, last update: 01.04.2007.
http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?path:hsa04310

GeneAtlas – Database: Wif1 physical map; PUBMED GeneAtlas: Gene Database; Stand: 06.05.2007, last update: 12.05.2006.
<http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche1.php?symbol=WIF1>

Kaji M, Takeshima H, Nakazato Y, Kuratsu J (2006): Low-grade astroblastoma recurring with extensive invasion. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2006 Sep; 46(9): 450-4.

Kawano Y, Kypta R (2003): Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 2003 Jul 1; 116(Pt 13): 2627-34.

Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2003): EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *PNAS* Sep 2003; 100 (20): 11611.

Kleihues P, Cavenee W (2000): World Health Organization Classification of Tumours, Pathology & Genetics, Tumours of the Nervous System. International Agency for Research on Cancer Press, Lyon (France) 2000, 6ff., 9-81.

Kleihues P, Ohgaki H. (2000): Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol.* 2000 Jan-Feb; 28(1): 164-70. Review.

Köhler S (2007): Genetische Analyse maligner Gliome mittels Mikroarray-Analyse. Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin, dem Fachbereich Medizin der Phillips-Universität Marburg 2007 vorgelegt.

Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giustu W, Deetz K (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* 4, 357-362.

Löffler G, Petrides P (2003): *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage, Springer Heidelberg, 229ff., 1161ff..

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA (2001): Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & Development* 2001; 15: 1311-1333.

Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, Mikami I, Reguart N, Rosell R, McCormick F, Jablons DM (2004): Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res.* 2004 Jul 15; 64(14): 4717-20.

Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM (2005): Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett.* 2005 May 10; 222(1): 1-10.

Mülhardt C (2002): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Cornel Mülhardt*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin, 18ff., 50ff., 93ff., 106ff., 107ff..

Nafe R, Schlote W, Schneider B (2005): Histomorphometry of tumour cell nuclei in astrocytomas using shape analysis, densitometry and topometric analysis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005 Feb; 31(1): 34-44.

Nakamura M, Shimada K, Ishida E, Higuchi T, Nakase H, Sakaki T, Konishi N (2007): Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors. *Neuro-oncol.* 2007 Apr; 9(2):113-23. Epub 2007 Feb 27.

Ohgaki H, Kleihues P (2007): Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May; 170(5): 1445-53.

Ohigashi T, Mizuno R, Nakashima J, Marumo K, Murai M (2005): Inhibition of Wnt signaling downregulates Akt activity and induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells. *Prostate* 2005 Jan 1; 62(1): 61-8.

Omuro AM, Faivre S, Raymond E (2007): Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Mol Cancer Ther.* 2007 Jul; 6(7): 1909-19.

Peiffer J, Schröder JM, Paulus W (2002): *Neuropathologie*. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 348-356.

Poeck K, Hacke W (2001): *Neurologie*. Springer-Lehrbuch. 11. Auflage, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 317-323.

Preiß J, Dornoff W, Hagmann FG, Schmieder A (2008): *Taschenbuch Onkologie 2008/09. Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie*. 14. Auflage, W. Zuckschwerdt, Germering/München, 259ff..

Qiagen (1999): *Taq PCR Handbuch*

Qiagen (2002): *Taq PCR Handbook*

Qiagen (2003): *RNeasy® Lipid Tissue Mini Handbook*

Qiagen (2004): *Omniscript® Reverse Transcription Handbook*

Qiagen (2005): *QuantiTect® SYBR® Green PCR Handbook*

Reguart N, He B, Xu Z, You L, Lee AY, Mazieres J, Mikami I, Batra S, Rosell R, McCormick F, Jablons DM (2004): Cloning and characterization of the promoter of human Wnt inhibitory factor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Oct 8; 323(1): 229-34.

Roche Lexikon (2003): 5. Auflage, Urban und Fischer, München – Jena, 1264ff..

Schäfer H (1997): Anforderungen an eine patientenorientierte klinisch-therapeutische Forschung. Dtsch. Med. Wschr. 1997; 122: 1531-1536.

Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (2005): Kompendium Internistische Onkologie. 4. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 1-28.

Srivastava S, Zou Z, Pirolo K, Blattner W, Chang EH (1990): Germ line transmission of a mutated p53 gene in cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. Nature 348: 747-749.

Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-Glioma Study Group (2006): Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. Lancet Oncol. 2006 May; 7(5):392-401. Comment in: Lancet Oncol. 2006 May;7(5):359-60.

Sun P, Yamamoto H, Suetsugu S, Miki H, Takenawa T, Endo T (2003): Small GTPase Rac/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation. J Biol Chem. 2003 Feb 7; 278(6): 4063-71. Epub 2002 Nov 21.

Vaes BL, Dechering KJ, van Someren EP, Hendricks JM, van de Ven CJ, Feijen A, Mummery CL, Reinders MJ, Olijve W, van Zoelen EJ, Steegenga WT (2005): Microarray analysis reveals expression regulation of Wnt antagonists in differentiating osteoblasts. Bone. 2005 May; 36(5): 803-11.

Wager M, Menei P, Guilhot J, Levillain P, Michalak S, Bataille B, Blanc JL, Lapierre F, Rigoard P, Milin S, Duthe F, Bonneau D, Larsen CJ, Karayan-Tapon L (2008): Prognostic molecular markers with no impact on decision-making: the paradox of gliomas based on a prospective study. Br J Cancer. 2008 Jun 3;98(11):1830-8.

Wang T, Hong W (2002): Interorganellar regulation of lysosome positioning by the Golgi apparatus through Rab34 interaction with Rab-interacting lysosomal protein. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec; 13(12): 4317-32.

Wang T, Wong KK, Hong W (2004): A unique region of RILP distinguishes it from its related proteins in its regulation of lysosomal morphology and interaction with Rab7 and Rab34. *Mol Biol Cell*. 2004 Feb; 15(2): 815-26. Epub 2003 Dec 10.

Weil RJ (2006): Glioblastoma Multiforme – Treading a deadly tumor with both strands of RNA. *PLoS Medicine*. January 2006; 3 (1): e31.

Weller M (2004): Interdisziplinäre S 2-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Gliome des Erwachsenenalters. Informationszentrum für Standards in der Onkologie (ISTO), im Auftrag der Deutschen Krebsgesellschaft, vom Sprecher der Neuroonkologischen Arbeitsgemeinschaft (NOA). W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, Germering/München, 2-16.

Weller M, Steinbach JP, Wick W (2005): Temozolomide: a milestone in the pharmacotherapy of brain tumors. *Future Oncology* 2005 Dec; 1 (6): 747-54.

Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Hofstaedter F, Hartmann A, Knuechel R, Rosenthal A, Pilarsky C (2003): WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *Pathol*. 2003 Oct; 201(2): 204-12.

Zhu Y, Parada LF (2002): The molecular and genetic basis of neurological tumors. *Nature Publishing Group* 2002 Aug; 2.

9. Abkürzungen, Kurzzeichen

% = Prozent
< = kleiner
> = größer
° = Grad
°C = Grad Celsius
13q14 = Chromosom Nummer 13, langer Arm, Position 14
24p3 = Chromosom Nummer 24, kurzer Arm, Position 3
5-AZA-CdR = 5-aza-2'-Deoxycytidin
A = Anregungsspektrum
a = nicht für Bindungen korrigiert (U-Test)
A549 = Lungenkarzinom-Zellen
aa = aminoacid, Aminosäure, AS
ADP = Adenosindiphosphat
Akt = alpha serine/threonine-protein kinase
AmpliTaQ = Amplifikation mittels thermostabiler Taq-Polymerase
AP 1 = activator protein 1
APC = adenomatosis polyposis coli
APC = antigen presenting cell
ARF = cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
Arg = Arginin
AS = Aminosäure
Astro = Astrozytom
ATG = Adenosin, Thymin, Guanosin
ATP = Adenosintriphosphat
Axin2 = axis inhibition protein 2
b = Gruppenvariable (in vorliegendem Fall: Histologie)
BCC = basal cell carcinoma
BFA = Brefeldin A
BMP2A = bone morphogenetic protein 2
bp = Basenpaare
bzw. = beziehungsweise
C = Celsius
C = Cytosin
Ca²⁺ = Calcium, Oxidationszahl +2
-C-A-A-X- = C: Cystein, A: aliphatische Aminosäure, X: Leucin, Methionin, Serin oder Glutamin
cag-Insertion = Cytosin, Adenin, Guanin-Insertion
cAMP = Zyklisches

Adenosinmonophosphat
-C-C- = Phosphoglycolat, C2-Verbindung, aktivierte Essigsäure = Acetyl-CoA
CCD-Kamera = Charge-Coupled Device Kamera, Digitalkamera
CCND2 = cyclin D2
CCNU = Cecenu®
CD44 = CD44 molecule (Indian blood group)
cdc2 = cell division cycle 2
cdf = Cyberspace Description Format
CDK = cyclin-dependent kinase
CDKN2A/p16 = cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
cDNA = complementary DNA
cis-Formation = räumliche Anordnung aller Atome in eine gemeinsame Richtung
CLL = chronic lymphatic leukaemia
c-myc = v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
CpG-Insel = Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin-Insel
CRD = cysteine-rich domain
CSPG2 = chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)
CT = Computertomographie
C-terminal = Carboxyl-Terminus (C-Terminus), bezeichnet das Ende eines Proteins oder Polypeptides
CTNBI = catenin, beta interacting protein 1
Ctse = cathepsin E
Ct-Wert = Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus"
-C-X-C- = C: Cystein, X: Leucin, Methionin, Serin oder Glutamin
d.h. = das heisst
DC = Dünnschichtchromatographie
de novo = neu entstanden
Delta Ct = Subtraktionswert zweier Ct-Werte
DEPC-Wasser = Diethyl Pyrocarbonat-Wasser
dest. = destilliert

Dfz2 = Drosophila frizzled 2
 Dkk = Dickkopf
 Dkk1 = dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)
 Dkk1-3 = dickkopf homolog 1-3 (Xenopus laevis)
 Dkk2 = dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)
 DNA = Deoxyribonucleic acid
 dNTP = Desoxynukleosidtriphosphat
 dsDNA = double-stranded DNA
 DU145-Zellen = von Gehirnetastasen stammende Pca-Zellen
 Dvl = Dishevelled
 E = Emissionsspektrum
 E2F = E2F transcription factor 1
 EGF = epidermal growth factor
 EGFR = epidermal growth factor receptor
 ER = Endoplasmatischen Retikulum
 ERK1 = mitogen-activated protein kinase 3
 et al. = et alii bzw. et aliae oder et alia
 EtBr = Ethidiumbromid
 EZH2 = enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)
 F = Fluorochrom
 FosB = FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
 Frat I = Frataxin, mitochondrial precursor
 FRET = fluorescence resonance energy transfer
 FrzB = frizzled-related protein
 FST = follistatin, activin-binding protein
 Fut-2 = fucosyltransferase 2 (secretor status included)
 Fz = Frizzled
 FZD = frizzled homolog (Drosophila)
 g = Gramm
 G = Guanotin
 G1-Phase = gap-phase
 G361-Zellen = Melanom-Zellen
 GAP = GTPase activating proteins
 GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 GBM = Glioblastoma multiforme
 GDI = GDP dissociation inhibitor
 GDP = Guanosindiphosphat
 GDPasen = Proteine, die als molekulare Schalter fungieren
 GEF = Guanosine exchange factor

GFAP = glial fibrillary acidic protein
 GFP = grün fluoreszierendes Protein
 GLI-Krueppel = glioma-associated oncogene homolog 1 (zinc finger protein)
 GOF = gain of function
 G-Proteine = Guaninnukleotid-bindendes Protein
 GSK-3 β = glycogen synthase kinase-3beta
 GTC-Lösung = Guanidinisothiocyanat-Lösung
 GTP = Guanosintriphosphat
 GTPasen = Proteine, die als molekulare Schalter fungieren
 Gy = Gray
 H = Höhe
 H₂O = Wasser
 H₂O DEPC = Diethyl Pyrocarbonat Wasser
 H₂O dest. = destilliertes Wasser
 H₂O₂ = Wasserstoffperoxid
 HeLa-S3-Zellen = in Suspension adaptierte Zelllinie, leitet sich von einem menschlichen Cervixkarzinom ab
 HNSCC = head and neck squamous cell carcinoma
 HNSCC = head and neck squamous cell carcinoma
 H-Ras = v-Ha-ras harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
 in situ = am Ort, in natürlicher Lage
 in vitro = im Reagenzglas, d.h. außerhalb des Organismus
 in vivo = im lebenden Organismus
 JNK = Jun N-terminale Kinase
 Jun = v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)
 JunB = jun B proto-oncogene
 K⁺ = Kalium
 Kat. Nr. = Katalog Nummer
 kb = Kilobasen
 kDa = Kilo Dalton
 Ki-67/MIB1 = Proliferationsmarker auf der Chromosomenoberfläche
 Konz. = Konzentration
 K-Ras = proto-oncogene K-Ras2A
 K-RasB = v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
 Krt2-4 = keratin complex 2, basic, gene 4
 LBX1 = ladybird homeobox homolog 1

(Drosophila)
 LDL = low density lipoprotein
 LDR = low dose radiation
 LEF/TCF = Pangolin
 LOF = loss-of-function
 LOH = Loss of Heterozygosity
 LRP = LDL-receptor-related protein
 LY294002 = PI3K-Inhibitor
 MAPK = mitogen-activated protein kinase 1
 max. = maximal, maximus
 MDM2 = murine double minute 2
 mg = Milligramm
 Mg²⁺ = Magnesium, Oxidationszahl +2
 MgCl₂ = Magnesiumchlorid
 min. = Minute
 ml = Milli Liter
 mm = Milli Meter
 MM = Milli Mol
 MOX2 = Mox2 protein
 MR-Bilder = Magnetresonanz-Bilder
 mRNA = messenger RNA
 MRT = Magnetresonanztomographie
 MYC = v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
 N = Anzahl der Fälle in einer Datei
 NF-κB = transcription factor NRF
 NIH3T3-Zellen = permanente Fibroblastenzelllinie aus Maus-Embryonen
 nm = Nanometer
 Nr. = Nummer
 N-Ras = neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
 NSCLC = non-small cell lung cancer
 nt = nucleotides; Transkript-Länge
 NTC = non template control
 N-terminal = Amino-Terminus (N-Terminus) bezeichnet den Anfang eines Proteins oder eines Polypeptides
 OD-Messung = Optische Dichtemessung
 Oligo (dT18)-Primer = Primer von Operon, Köln
 Opg = Osteoprotegerin
 ORF = open reading frame
 p = kurzer Arm eines Chromosoms
 p108Rb = Retinoblastom-Gen, Kurzer Arm, Position 108
 p19^{ARF} = cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)

p38 = mitogen-activated protein kinase 1
 p53 = tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
 Part No = Partikel Nummer
 PBL = periphere Blut-Leukozyten
 PC-3 = von Knochenmetastasen stammende Pca-Zellen
 Pca-Zellen = Prostatakarzinom-Zellen
 PCP-pathway = planar cell polarity-pathway
 PCR = Polymerase Chain Reaction
 PCV-Schema = Procarbazin, CCNU, Vincristin-Schema
 PDGF = platelet-derived growth factor
 PDZ = Protein-Interaktionsdomäne
 pGFP = phosphorylated GFP
 pH = pondus Hydrogenii, potentia Hydrogenii
 PI3K = phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
 PKB = PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta
 PKC = protein kinase C
 PKCmu = protein kinase D1
 PKCβ = protein kinase C beta 1
 PPP2CB = protein phosphatase 2 (formerly 2A)
 pRB = Retinoblastomprotein
 pTa = phosphate acetyltransferase
 PTEN-Null-Zellen = Zellen ohne PTEN-Suppressorgen
 PTQ-PCR = Real-Time-quantitative-PCR
 q = langer Arm eines Chromosoms
 Qty = quantity
 Rab = Ras-related protein Rah
 Rab2 = Ras-related protein Rab-2A
 Rab34 = Ras-related protein Rab34, Synonyme: RAH, RAB39, Rab-39, Ras-related protein
 Rab39 = RAB39, member RAS oncogene family
 Rab4 = Ras-related protein Rab-4A
 Rab5 = Ras-related protein Rab-5A
 Rac1 = ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
 Raf = v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
 Rah = ras-related homolog
 Ras-Gene = Gruppe von kleinen GTP-bindenden Proteinen
 RB = Retinoblastom

real-time quantitative PCR = real-time quantitative polymerase-chain-reaction, Synonyme: PTQ-PCR, RTD-PCR (real-time detection PCR, Echtzeit Detektions-PCR)
 real-time-PCR = real-time-polymerase-chain-reaction
 rel. = relative/r
 Rez. = Rezidiv
 RILP = Rab-interacting lysosomal protein
 RNA = Ribonuclein acid
 RNasen = Ribonukleasen
 RPE-Puffer = Puffer aus dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50)
 rRNA = ribosomale RNA
 RT = Reverse Transkriptase
 RTD-PCR = real-time detection PCR
 RTK = Rezeptortyrosinkinase
 RT-PCR = Reverse Transkription-PCR
 RW-Puffer = Puffer aus dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50)
 sec. = Sekunde
 Ser = Serin
 sFRP = secreted Frizzled-related protein
 Sig. = Signifikanz
 SIM2 = single-minded homolog 2 (Drosophila)
 sog. = sogenannt/e/es
 S-Phase = Synthese-Phase
 SPSS = Statistical Package for the Social Sciences; Softwarefirma, die Statistik- und Analyse-Software entwickelt und vertreibt
 S-R-A-Sequenz = C: Cystein, S: Serin
 STAT-Faktoren = Signal Transducers and Activators of Transcription
 sWAs = soluble Wnt antagonists
 SYBR-Green = 2-[2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl]-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
 T = Temperatur
 T = Thymin
 T1,T2-gewichtetes Bild = Signalintensitäten im MRT
 TAE-Puffer = Tris-Acetat-EDTA-Puffer
 Taq = Thermus aquaticus
 TATA-Box = Thymin-Adenin-Thymin-Adenin-Box
 TCF4 = transcription factor 4

TGFB2 = transforming growth factor, beta 2
 TGF- β = transforming growth factor, beta
 Thr = Threonin
 Tm = Schmelztemperatur
 TP53 = tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
 tRNA = transfer RNA
 T-Test = beliebigen Hypothesentest mit t-verteilter Testprüfgröße
 Tyr = Tyrosin
 U = Units
 u.a. = unter anderem
 UpM = Umdrehungen pro Minute
 USA = United States of America
 U-Test = Mann-Whitney-Test, Homogenitätstest
 UV = Ultra Violett
 v.a. = vor allem
 Vav2 = vav 2 oncogene
 VCR = Vincristin
 VEGF = vascular endothelial growth factor
 W = Watt
 WAVE2 = Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2
 Wg = wingless, bezieht sich auf Drosophila
 WHO = World Health Organisation
 Wif1 = Wnt inhibitory factor-1
 Wilcoxon-W-Test = U-Test, Mann-Whitney-Test
 Wnt = Wingless-type
 Wnt2 = wingless-type MMTV integration site family member 2
 WT = Wilms Tumor
 WT-1 = Wilms Tumor 1
 XWnt-8 = Wnt-1/int-1-related
 YO-PRO-1 = Fluoreszenzfarbstoff
 z = Verteilung innerhalb einer Prüfstatistik (U-Test)
 z.B. = zum Beispiel
 ZNS = Zentrales Nerven System
 α = alpha
 α = Irrtumswahrscheinlichkeit, Signifikanzniveau
 β = beta
 μ g = Mikro Gramm
 μ l = Mikro Gramm
 μ M = Mikro Mol

10. Tabellenanhang

Tabelle 10

Auflistung aller Proben und ihrer Probenpräparation, sortiert nach histologischer Nummer

Anzahl	Proben-Nr.	Präparationsdatum	Histologie	Total RNA in µg	Rest RNA in µg	PCR Datum	PCR Nummer	Gel Position Nr.
1	37/02	25.10.2005	GBM	58,01	48,2	16.03.2006	7+	2
2	63/02	25.10.2005	Astro III	5,72	*	16.03.2006	7+	3
3	64/02	26.10.2005	GBM	46,39	37,7	16.03.2006	7+	4
4	67/02	14.09.2005	Astro II	16,09	10,48	16.09.2005	5+	2
*	122/02	26.10.2005	GBM Rez.	230,95	203,0	16.03.2006	7-	5
5	124/02	27.10.2005	GBM	45,77	37,1	16.03.2006	7+	6
6	01/03	10.10.2005	GBM	21,36	15,1	16.03.2006	7+	7
7	04/03	03.09.2005	GBM	29,65	22,60	08.09.2005	3+	2
Referenz	08/03	03.09.2005	Pilozytisches Astro	15,24	*	*		
8	17/03	28.04.2006	GBM	64,66	54,10	29.04.2006	9+	2
9	21/03 (1)	02.09.2005	Astro III	3,43	*	*		
9	21/03 (2)	09.09.2005	Astro III	4,12	*	08.04.2006	8+	3
10	27/03	28.04.2006	GBM	19,77	13,70	29.04.2006	9+	3
11	28/03 (1)	30.08.2005	GBM Rez.	4,40	*	*		
11	28/03 (2)	01.09.2005	GBM Rez.	53,92	44,50	08.09.2005	3+	3
12	29/03	10.10.2005	GBM	6,735	*	16.03.2006	7+	8
13	35/03 (1)	10.10.2005	GBM	3,29	*	*		
13	35/03 (2)	27.10.2005	GBM	12,97	7,6	16.03.2006	7+	9
14	36/03	08.04.2006	GBM Rez.	41,81	33,60	29.04.2006	9+	4
15	37/03	24.10.2005	Astro III	25,36	18,7	16.03.2006	7+	10
16	51/03 (1)	20.08.2005	GBM	6,20	*	*		
16	51/03 (2)	03.09.2005	GBM Rez.	11,20	6,08	07.09.2005	2+	3
17	54/03	24.05.2005	GBM Rez.	9,50	4,50	28.08.2005	1+	2
18	65/03	15.09.2005	Astro III	4,93	*	08.04.2006	8+	4
19	68/03	08.04.2006	GBM	11,04	5,92	29.04.2006	9+	5
20	69/03	09.09.2005	Astro II	9,10	4,10	12.09.2005	4+	2
21	74/03 (1)	03.09.2005	GBM Rez.	6,75	*	*		
21	74/03 (2)	10.09.2005	GBM Rez.	15,1	9,50	12.09.2005	4+	3
22	75/03 (1)	09.09.2005	Astro III	7,25	*	*		
22	75/03 (2)	10.09.2005	Astro III	4,5	6,50	12.09.2005	4+	4
23	76/03 (1)	21.08.2005	GBM	?	*	*		
23	76/03 (2)	03.09.2005	GBM	3,36	*	*		
23	76/03 (3)	10.09.2005	GBM	10,64	5,50	12.09.2005	4+	5
24	96/03	10.10.2005	Astro III	4,69	---	16.03.2006	7+	11
25	103/03	28.04.2006	GBM	8,47	*	29.04.2006	9+	6

Anzahl	Proben-Nr.	Präparationsdatum	Histologie	Total RNA in µg	Rest RNA in µg	PCR Datum	PCR Nummer	Gel Position Nr.
26	121/03	03.09.2005	Astro III	12,70	7,40	08.09.2005	3-	4
27	137/03	24.10.2005	Astro III	24,35	17,8	16.03.2006	7+	12
28	152/03 (1)	03.09.2005	GBM 1. Rez.	5,67	*	*		
28	152/03 (2)	10.09.2005	GBM Rez.	21,98	15,70	12.09.2005	4+	7
29	153/03	03.09.2005	GBM 2. Rez.	69,90	58,90	08.09.2005	3+	5
30	03/04	08.04.2006	GBM	7,50	*	29.04.2006	9+	7
31	08/04	10.09.2005	Astro II	8,36	*	16.09.2005	5+	3
32	47/04	01.09.2005	GBM Rez.	21,00	14,90	07.09.2005	2-	2
*	53/04	08.04.2006	GBM	0,97	*	*		
33	58/04	14.09.2005	Astro II	24,13	17,71	16.09.2005	5+	4
34	60/04	08.04.2006	GBM	40,34	32,30	29.04.2006	9+	8
35	76/04	26.08.2005	GBM Rez.	20,12	14,00	28.08.2005	1+	3
36	87/04 (1)	06.09.2005	Astro III	4,10	*	*		
36	87/04 (2)	09.09.2005	Astro III	23,29	16,90	12.09.2005	4+	8
37	04/05	05.09.2005	GBM Rez.	15,09	9,60	08.09.2005	3+	7
38	10/05	03.04.2006	GBM	91,20	78,00	08.04.2006	8+	5
39	11/05	14.09.2005	Astro II	8,66	*	16.09.2005	5+	5
40	18/05	05.04.2006	Astro II	7,53	*	08.04.2006	8+	6
41	30/05 (1)	09.09.2005	Astro II - III	5,09	*	*		
41	30/05 (2)	10.09.2005	Astro II - III	25,6	19,00	12.09.2005	4+	9
42	44/05 (1)	15.09.2005	GBM	119,12	103,20	16.09.2005	5+	6
42	44/05 (2)	03.03.2006	GBM	11,0	---	06.03.2006	6+	2
*	68/05	15.09.2005	Astro II	1,57	*	*		
43	74/05	03.04.2006	GBM	9,47	4,52	08.04.2006	8+	7
44	78/05	04.04.2005	Astro III	12,88	7,60	08.04.2006	8+	8
45	79/05	15.09.2005	GBM	31,04	23,94	16.09.2005	5+	7
46	80/05	05.04.2006	GBM	35,74	28,10	08.04.2006	8+	9
47	83/05	15.09.2005	GBM	25,29	18,76	16.09.2005	5+	8
48	89/05	15.09.2005	Astro III	48,04	39,23	16.09.2005	5+	9
49	103/05	03.04.2006	GBM	70,90	59,80	08.04.2006	8+	10
50	119/05	25.03.2006	GBM	15,34	9,80	08.04.2006	8+	11
*	124/05	04.04.2006	GBM Rez.	1,97	*	*		
51	29/06	05.04.2006	GBM Rez.	36,22	28,60	08.04.2006	8+	12
52	33/06	05.04.2006	GBM	55,41	45,80	08.04.2006	8+	13
53	45/06	10.04.2006	Astro II-III	9,92	*	29.04.2006	9+	9
54	51/06	28.04.2006	GBM	3,89	*	29.04.2006	9+	10

Tabelle 11

Ergebnisse für Wif1

Probe	Ct GAPDH	Ct MW GAPDH	Ct WIF1	Ct MW WIF1	delta Ct	delta delta Ct	rel. WIF1
Reference	14,15	14,7167	21,61	21,6200	6,9033	0,0000	1,0000
	14,82		21,15				
	15,18		22,10				
67/02	16,34	16,3300	29,53	30,2333	13,9033	7,0000	0,0078
	16,25		30,90				
	16,40		30,27				
08/04	17,90	18,5000	28,48	28,9000	10,4000	3,4967	0,0886
	18,90		29,42				
	18,70		28,80				
58/04	16,49	16,5567	25,40	25,2700	8,7133	1,8100	0,2852
	16,59		24,91				
	16,59		25,50				
11/05	16,69	17,0500	31,62	30,9433	13,8933	6,9900	0,0079
	17,29		30,70				
	17,17		30,51				
18/05	20,10	20,1100	34,46	35,9200	15,8100	8,9067	0,0021
	19,73		31,98				
	20,50		41,32				
65/03	22,60	22,3033	40,32	39,4300	17,1267	10,2233	0,0008
	21,41		39,67				
	22,90		38,30				
69/03	15,90	15,4533	26,26	25,6267	10,1733	3,2700	0,1037
	15,23		25,19				
	15,23		25,43				
87/04	16,82	17,2400	26,22	25,4233	8,1833	1,2800	0,4118
	17,10		25,34				
	17,80		24,71				
30/05	16,79	16,8633	31,51	29,9900	13,1267	6,2233	0,0134
	16,86		29,21				
	16,94		29,25				
45/06	17,80	17,4833	28,94	29,3467	11,8633	4,9600	0,0321
	17,17		29,40				
	17,48		29,70				
63/02	18,33	18,5467	36,01	35,1033	16,5567	9,6533	0,0012
	18,80		34,31				
	18,51		34,99				
21/03	21,10	21,2067	41,53	41,0367	19,8300	12,9267	0,0001
	21,30		40,13				
	21,22		41,45				
37/03	20,74	20,6767	37,25	39,9433	19,2667	12,3633	0,0002
	20,56		45,00				
	20,73		37,58				
75/03	20,70	20,0633	26,24	25,6600	5,5967	-1,3067	2,4737
	19,67		26,40				

Probe	Ct GAPDH	Ct MW GAPDH	Ct WIF1	Ct MW WIF1	delta Ct	delta delta Ct	rel. WIF1
	19,82		24,34				
96/03	21,72	21,2867	35,71	33,6533	12,3667	5,4633	0,0227
	20,60		31,12				
	21,54		34,13				
121/03	16,20	16,1767	30,14	29,9067	13,7300	6,8267	0,0088
	16,11		28,65				
	16,22		30,93				
137/03	21,39	21,6933	30,47	29,8000	8,1067	1,2033	0,4343
	21,19		29,30				
	22,50		29,63				
78/05	15,51	15,5567	29,21	28,4500	12,8933	5,9900	0,0157
	15,72		28,49				
	15,44		27,65				
89/05	17,45	17,3600	31,81	31,5467	14,1867	7,2833	0,0064
	17,28		33,64				
	17,35		29,19				
37/02	19,37	19,3433	44,53	44,3367	24,9933	18,0900	0,0000
	19,30		45,00				
	19,36		43,48				
64/02	18,75	19,1433	40,19	39,7867	20,6433	13,7400	0,0001
	18,78		39,05				
	19,90		40,12				
124/02	18,43	18,5467	41,33	40,8933	22,3467	15,4433	0,0000
	18,43		40,68				
	18,78		40,67				
01/03	20,60	20,4667	45,00	45,0000	24,5333	17,6300	0,0000
	20,52		45,00				
	20,28		45,00				
17/03	15,47	15,5233	34,08	34,9267	19,4033	12,5000	0,0002
	15,38		33,12				
	15,72		37,58				
27/03	16,80	16,3633	28,23	27,6300	11,2667	4,3633	0,0486
	16,10		27,49				
	16,19		27,17				
29/03	19,57	19,5867	38,35	39,5233	19,9367	13,0333	0,0001
	19,30		41,24				
	19,89		38,98				
35/03	19,58	19,9600	32,87	37,4100	17,4500	10,5467	0,0007
	19,80		40,32				
	20,50		39,04				
68/03	16,26	16,5033	26,56	27,0767	10,5733	3,6700	0,0786
	16,49		27,23				
	16,76		27,44				
76/03	19,69	20,1967	28,99	29,1300	8,9333	2,0300	0,2449
	20,70		29,65				
	20,20		28,75				
103/03	16,39	16,3700	34,66	33,4467	17,0767	10,1733	0,0009

Probe	Ct GAPDH	Ct MW GAPDH	Ct WIF1	Ct MW WIF1	delta Ct	delta delta Ct	rel. WIF1
	16,47		32,91				
	16,25		32,77				
03/04	15,47	15,6167	29,28	28,5500	12,9333	6,0300	0,0153
	15,78		28,60				
	15,60		27,77				
60/04	14,87	15,0567	28,86	28,2767	13,2200	6,3167	0,0125
	14,80		28,39				
	15,50		27,58				
10/05	20,22	19,8567	37,54	36,0200	16,1633	9,2600	0,0016
	19,82		35,58				
	19,53		34,94				
44/05	17,78	17,8533	28,32	28,0967	10,2433	3,3400	0,0988
	17,84		27,77				
	17,94		28,20				
74/05	20,11	20,0567	29,20	30,9267	10,8700	3,9667	0,0640
	20,10		27,20				
	19,96		36,38				
79/05	14,40	14,4500	27,75	27,2567	12,8067	5,9033	0,0167
	14,43		26,65				
	14,52		27,37				
80/05	15,77	16,2167	25,29	24,9067	8,6900	1,7867	0,2898
	16,90		24,92				
	15,98		24,51				
83/05	16,86	16,9767	28,23	28,3933	11,4167	4,5133	0,0438
	16,91		28,50				
	17,16		28,45				
103/05	15,95	16,0800	24,23	24,1833	8,1033	1,2000	0,4353
	16,30		24,12				
	15,99		24,20				
119/05	14,58	14,6367	25,57	26,1733	11,5367	4,6333	0,0403
	14,68		26,48				
	14,65		26,47				
33/06	14,67	15,0433	23,73	23,6133	8,5700	1,6667	0,3150
	14,86		23,51				
	15,60		23,60				
51/06	14,76	14,7400	32,31	31,7600	17,0200	10,1167	0,0009
	14,72		31,21				
28/03	19,21	19,3700	27,12	26,9500	7,5800	0,6767	0,6256
	19,12		27,11				
	19,78		26,62				
36/03	16,60	16,8300	26,33	25,9933	9,1633	2,2600	0,2088
	16,75		25,99				
	17,14		25,66				
51/03	18,47	18,5100	28,97	30,1300	11,6200	4,7167	0,0380
	18,49		32,54				
	18,57		28,88				

Probe	Ct GAPDH	Ct MW GAPDH	Ct WIF1	Ct MW WIF1	delta Ct	delta delta Ct	rel. WIF1
54/03	18,35	18,3133	28,95	29,4600	11,1467	4,2433	0,0528
	18,35		30,76				
	18,24		28,67				
74/03	16,47	16,4800	28,21	27,5500	11,0700	4,1667	0,0557
	16,50		27,50				
	16,47		26,94				
152/03	19,60	18,9833	24,98	25,9633	6,9800	0,0767	0,9482
	18,77		28,38				
	18,58		24,53				
153/03	16,56	17,0833	29,19	28,7033	11,6200	4,7167	0,0380
	16,79		28,70				
	17,90		28,22				
47/04	17,53	17,7033	27,74	28,1733	10,4700	3,5667	0,0844
	17,63		28,23				
	17,95		28,55				
76/04	17,20	17,2600	28,49	28,8833	11,6233	4,7200	0,0379
	17,31		29,47				
	17,27		28,69				
04/05	16,33	16,3633	26,92	26,6267	10,2633	3,3600	0,0974
	16,36		26,54				
	16,40		26,42				
29/06	16,20	16,1367	24,30	23,8833	7,7467	0,8433	0,5574
	16,23		23,23				
	15,98		24,12				

Tabelle 13

Ergebnisse für Rab34

Probe	Ct GAPDH	Ct MW GAPDH	Ct RAB34	Ct MW RAB34	delta Ct	delta delta Ct	rel. RAB34
Reference	15,70	15,8767	25,97	25,5333	9,6567	0,0000	1,0000
	16,00		24,88				
	15,93		25,75				
67/02	16,34	16,3300	22,30	22,7533	6,4233	-3,2333	9,4044
	16,25		22,36				
	16,40		23,60				
08/04	17,90	18,5000	22,78	22,6867	4,1867	-5,4700	44,3235
	18,90		22,30				
	18,70		22,98				
58/04	16,49	16,5567	21,70	21,8767	5,3200	-4,3367	20,2054
	16,59		21,58				
	16,59		22,35				
11/05	16,69	17,0500	24,51	24,1867	7,1367	-2,5200	5,7358
	17,29		23,85				
	17,17		24,20				
18/05	17,50	17,2233	28,10	26,8600	9,6367	-0,0200	1,0140

Probe	Ct GAPDH	Ct MW GAPDH	Ct RAB34	Ct MW RAB34	delta Ct	delta delta Ct	rel. RAB34
	16,87		26,74				
	17,30		25,74				
65/03	18,34	18,4933	24,24	27,2133	8,7200	-0,9367	1,9141
	18,34		28,57				
	18,80		28,83				
69/03	15,90	15,4533	20,62	20,4800	5,0267	-4,6300	24,7610
	15,23		20,40				
	15,23		20,42				
87/04	16,82	17,2400	23,31	22,6467	5,4067	-4,2500	19,0273
	17,10		22,38				
	17,80		22,25				
30/05	16,79	16,8633	22,59	22,2700	5,4067	-4,2500	19,0273
	16,86		22,33				
	16,94		21,89				
45/06	17,53	17,7400	23,85	24,3033	6,5633	-3,0933	8,5347
	17,59		24,80				
	18,10		24,26				
63/02	15,66	15,8333	27,90	26,1767	10,3433	0,6867	0,6213
	15,95		23,77				
	15,89		26,86				
21/03	17,55	16,8133	28,19	27,9033	11,0900	1,4333	0,3703
	15,50		27,71				
	17,39		27,81				
37/03	17,27	17,2833	31,80	30,5367	13,2533	3,5967	0,0827
	17,36		29,71				
	17,22		30,10				
75/03	20,70	20,0633	21,72	21,4000	1,3367	-8,3200	319,5726
	19,67		21,27				
	19,82		21,21				
96/03	17,77	17,6700	28,40	28,5233	10,8533	1,1967	0,4363
	17,38		28,37				
	17,86		28,80				
121/03	16,20	16,1767	20,26	20,3267	4,1500	-5,5067	45,4644
	16,11		20,15				
	16,22		20,57				
137/03	18,30	18,1300	28,26	29,0500	10,9200	1,2633	0,4166
	17,90		29,11				
	18,19		29,78				
78/05	15,51	15,5567	27,13	26,5133	10,9567	1,3000	0,4061
	15,72		26,13				
	15,44		26,28				
89/05	17,45	17,3600	22,37	22,2367	4,8767	-4,7800	27,4741
	17,28		21,84				
	17,35		22,50				
37/02	16,44	16,4833	26,82	26,7067	10,2233	0,5667	0,6752
	16,46		27,34				
	16,55		25,96				

Probe	Ct GAPDH	Ct MW GAPDH	Ct RAB34	Ct MW RAB34	delta Ct	delta delta Ct	rel. RAB34
64/02	15,67	15,8067	26,46	25,2100	9,4033	-0,2533	1,1920
	15,79		24,59				
	15,96		24,58				
124/02	15,41	15,5733	25,44	25,2000	9,6267	-0,0300	1,0210
	15,50		24,71				
	15,81		25,45				
01/03	17,18	17,2367	29,42	29,3733	12,1367	2,4800	0,1792
	17,31		28,90				
	17,22		29,80				
17/03	15,91	15,9133	22,95	22,6000	6,6867	-2,9700	7,8354
	15,90		22,17				
	15,93		22,68				
27/03	16,29	16,3700	23,74	23,1733	6,8033	-2,8533	7,2267
	16,42		22,50				
	16,40		23,28				
29/03	16,27	16,3867	29,35	27,9600	11,5733	1,9167	0,2649
	16,35		28,21				
	16,54		26,32				
35/03	16,80	16,8633	24,71	24,5533	7,6900	-1,9667	3,9086
	16,69		23,63				
	17,10		25,32				
68/03	16,40	16,4100	24,50	23,7867	7,3767	-2,2800	4,8568
	16,71		23,38				
	16,12		23,48				
76/03	19,69	20,1967	24,67	24,6333	4,4367	-5,2200	37,2715
	20,70		24,61				
	20,20		24,62				
103/03	16,91	16,8333	24,60	24,8000	7,9667	-1,6900	3,2266
	16,98		25,27				
	16,61		24,53				
03/04	15,75	15,9833	22,86	22,4733	6,4900	-3,1667	8,9797
	15,90		22,61				
	16,30		21,95				
60/04	15,40	15,0400	23,30	22,9200	7,8800	-1,7767	3,4263
	14,62		22,80				
	15,10		22,66				
10/05	16,55	16,6767	26,45	26,5267	9,8500	0,1933	0,8746
	16,79		26,30				
	16,69		26,83				
44/05	17,78	17,8533	21,30	21,2400	3,3867	-6,2700	77,1717
	17,84		21,27				
	17,94		21,15				
74/05	16,85	17,1900	27,69	27,3333	10,1433	0,4867	0,7137
	17,32		27,39				
	17,40		26,92				
79/05	14,40	14,4500	20,99	21,0800	6,6300	-3,0267	8,1492
	14,43		21,13				

Probe	Ct GAPDH	Ct MW GAPDH	Ct RAB34	Ct MW RAB34	delta Ct	delta delta Ct	rel. RAB34
	14,52		21,12				
80/05	15,77	16,2167	25,29	24,9067	8,6900	-0,9667	1,9543
	16,90		24,92				
	15,98		24,51				
83/05	16,86	16,9767	21,49	21,6067	4,6300	-5,0267	32,5970
	16,91		21,69				
	17,16		21,64				
103/05	15,95	16,0800	24,23	24,1833	8,1033	-1,5533	2,9349
	16,30		24,12				
	15,99		24,20				
119/05	14,58	14,6367	25,57	26,1733	11,5367	1,8800	0,2717
	14,68		26,48				
	14,65		26,47				
33/06	14,67	15,0433	23,73	23,6133	8,5700	-1,0867	2,1238
	14,86		23,51				
	15,60		23,60				
51/06	15,13	15,1250	24,45	24,5850	9,4600	-0,1967	1,1460
	15,12		24,72				
28/03	19,21	19,3700	23,51	23,8700	4,5000	-5,1567	35,6707
	19,12		23,60				
	19,78		24,50				
36/03	17,11	17,1933	22,90	22,9133	5,7200	-3,9367	15,3128
	17,14		22,93				
	17,33		22,91				
51/03	18,47	18,5100	25,61	25,8000	7,2900	-2,3667	5,1575
	18,49		25,98				
	18,57		25,81				
54/03	18,35	18,3133	24,22	24,1133	5,8000	-3,8567	14,4868
	18,35		24,15				
	18,24		23,97				
74/03	16,47	16,4800	22,27	22,1133	5,6333	-4,0233	16,2609
	16,50		21,89				
	16,47		22,18				
152/03	19,60	18,9833	22,93	23,3067	4,3233	-5,3333	40,3175
	18,77		23,31				
	18,58		23,68				
153/03	16,56	17,0833	22,92	22,8633	5,7800	-3,8767	14,6890
	16,79		22,90				
	17,90		22,77				
47/04	17,53	17,7033	22,60	23,0433	5,3400	-4,3167	19,9272
	17,63		23,70				
	17,95		22,83				
76/04	17,20	17,2600	22,82	22,6100	5,3500	-4,3067	19,7895
	17,31		22,20				
	17,27		22,81				
04/05	16,33	16,3633	25,17	25,2400	8,8767	-0,7800	1,7171

Probe	Ct GAPDH	Ct MW GAPDH	Ct RAB34	Ct MW RAB34	delta Ct	delta delta Ct	rel. RAB34
	16,36		25,28				
	16,40		25,27				
29/06	16,20	16,1367	24,30	23,8833	7,7467	-1,9100	3,7581
	16,23		23,23				
	15,98		24,12				

11. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name, Vorname: Henzgen, Julia
Anschrift: Vondelstraße 39
50677 Köln
Telefon: 0 221 – 30 09 68 31
Geburtsdatum/-ort: 06.07.1981, Berlin-Wilmersdorf

Schulbildung und Universität

1987 - 1993 Besuch der Grundschule auf dem Tempelhofer Feld,
Berlin
1993 - 2000 Besuch der Eckener-Oberschule (Gymnasium), Berlin,
Abschluss Abitur
10/2001 – 04/2008 Studium der Medizin an der Philipps-Universität,
Marburg; Abschluss Examen
03/2002 Pflegepraktikum im Krankenhaus Neukölln, Berlin
08/2002 Pflegepraktikum in der Reha Chrischona Basel, Schweiz
09/2003 Physikikum an der Philipps-Universität Marburg
03/2004 Famulatur in einer Gemeinschaftspraxis, Marburg
08/2004 Famulatur am Universitätsklinikum Bonn (Zentrum für
Geburtshilfe und Frauenheilkunde)
04/2005 Famulatur im Krankenhaus Matema, Tanzania
Seit 07/2005 Experimentelle Doktorarbeit in der Neurochirurgie,
Marburg
02/2006 Famulatur im Krankenhaus Adakpame/Lome, Togo
08/2006 1. Terial Praktisches Jahr (Chirurgie) im St.
Marienkrankenhaus, Siegen
12/2006 2. Terial Praktisches Jahr (Gynäkologie) im
St. Marienkrankenhaus, Siegen
04/2007 3. Terial Praktisches Jahr (Innere Medizin) an der
Philipps-Universität, Marburg
04/2008 Examen (zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung)

Beruf

Seit 06/2008 Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe im Krankenhaus der Augustinerinnen gGmbH, Köln

Wissenschaftliche Veröffentlichungen/Vorträge

11/2005 Vortrag mit dem Titel "Genetic progression of malignant glioma" an der Philipps-Universität Marburg

05/2006 Poster mit dem Titel "Wif-1 and Rab34 as markers for early events in malignant astrocytoma genesis" auf der 57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Essen

10/2006 Poster mit dem Titel "Wif-1 and Rab34 as markers for early events in malignant astrocytoma genesis" auf dem Congress of Neurological Surgeons Chicago, Illinois

Auslandsaufenthalt

Freiwilliges soziales Jahr in Südafrika in der Zeit von September 2000 bis September 2001; Arbeit in einem Kindergarten und einer Holzwerkstatt auf der Missionsstation Makapanspoort

Nebentätigkeit

11/2004 – 06/2006 Mitarbeit in einer Gemeinschaftspraxis, Marburg

Köln, Dezember 2009

12. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren Damen/Herren

Adamkiewicz	Hofmann	Radsak
Arnold	Hoyer	Renschmidt
Aumüller		Renz
	Jungclas	Richter
Basler		Riera
Baum	Kalder	Röhm
Becker	Kill	Röper
Bertalanffy	Klenk	Rosenow
Bien	Klose	Rothmund
Boudriot	Koch	
	Köhler	Schäfer
Cetin	Koolman	Schmidt
Christiansen	Krause	Schnabel
Czubayko	Krieg	Schneider
	Kroll	Schrader
Daut	Kuhlmann	Seitz
		Sommer
Eilers	Lang	Steiniger
	Lenz	Strauch
Feuser	Lill	Sure
Folz	Löffler	
Fuchs	Lohoff	Vogelmeier
Gerdes	Maier	Wagner
Göke	Maisch	Weihe
Görg	Mandrek	Weiler
Gotzen	Moll	Werner
Griss	Moosdorf	Westermann
Grundmann	Mueller	Wollenberg
Grzeschik	Müller	Wulf
Gudermann	Mutters	
Hamer	Neubauer	
Hasilik		
Hertl	Oertel	
Herrmann-Lingen		

13. Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an meine Betreuer Prof. Dr. med. H. Bertalanffy und Dr. med. O. Bozinov aus der Klinik für Neurochirurgie der Philipps-Universität Marburg und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg für die hervorragende Betreuung und sorgfältige Überarbeitung dieser Doktorarbeit. Besonderer Dank gilt dem ehemaligen Klinikleiter Prof. Dr. med. H. Bertalanffy für die Bereitstellung des molekularen neurochirurgischen Labors und die Nutzung der Geräte. Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. U. Sure in Zusammenarbeit mit Dr. med. O. Bozinov für die Bereitstellung dieses Themas danken.

Ein besonderer Dank gilt Silvia Köhler für die Hilfe und Unterstützung im Labor, weiterhin für alle Informationen, durch die diese Arbeit erst zustande kommen konnte; Jens-Martin Kalk für die Zusammenarbeit und die schönen Tage und Nächte im Labor, für geduldige Erklärungen und zuverlässiges zur Seite stehen.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. M. Ritter, Herrn Prof. A. Neubauer und D. Schwell aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Philipps-Universität Marburg und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg für die selbstverständliche Überlassung von Geräten zur Durchführung der PCR und Real-Time PCR; Herrn Prof. Dr. K. Strauch aus dem Institut für Med. Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung; Herrn P. Rexin von der Philipps-Universität Marburg und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg für die freundliche Bereitstellung der histologischen Bilder.

Auch geht mein herzlicher Dank an Katharina Dolata und Denis Richter für tägliche und nächtliche wissenschaftliche, aber auch seelische Betreuung, vor allem auch für die Verbreitung von Ruhe, wenn es eigentlich mal wieder um eine „Hau-Ruck-Aktion“ ging; Ute Hangleiter für Korrekturlesen, Probedrucke, Apfelkuchen und sonstige Wohltaten; Ina Kluge für all die tollen Partys und Ablenk-Manöver; Rolf Landskron für die Lebendorganspende und den Traum von Australien.

Weiterhin möchte ich meiner Familie und vor allem meinen Eltern danken, denen diese Doktorarbeit gewidmet ist. Mein herzlicher Dank gilt auch meiner Patentante und all meinen guten Freunden, die mir in manch' verzweifelter Minute zur Seite standen.

14. Ehrenwörtliche Erklärung

über die selbstständige Anfertigung der Dissertation

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Expressionsunterschiede von Wif1 und Rab34 bei Gliomen“

in der Klinik für Neurochirurgie unter Leitung von Prof. Dr. med. C. Nimsky mit Unterstützung durch Dr. med. Oliver Bozinov ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

- | | |
|---------|---|
| 11/2005 | Vortrag mit dem Titel "Genetic progression of malignant glioma" an der Philipps-Universität Marburg |
| 05/2006 | Poster mit dem Titel "Wif-1 and Rab34 as markers for early events in malignant astrocytoma genesis" auf der 57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Essen |
| 10/2006 | Poster mit dem Titel "Wif-1 and Rab34 as markers for early events in malignant astrocytoma genesis" auf dem Congress of Neurological Surgeons Chicago, Illinois |

Ort, Datum

Julia Henzgen