

Aus dem 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

Genetische Analyse maligner Gliome mittels Mikroarray-Technologie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sylvia Köhler

aus Neuruppin

Bremen, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin

Der Philipps-Universität Marburg am: 22.02.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr.med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. H. Bertalanffy

Korreferent: Prof. Dr. G. Suske

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	3
II	Tabellen- und Listenverzeichniss	6
III	Abbildungsverzeichnis	7
1	Einleitung	8
1.1	Einführung in die Thematik und Fragestellung	8
1.1.1	Gliome	11
1.1.1.1	Astrozytome WHO-Grad I und WHO-Grad II	12
1.1.1.2	Anaplastische Astrozytome und Glioblastome	13
1.1.1.3	Therapie maligner Gliome	17
1.1.2	Allgemeine genetische Untersuchungen	20
1.2.1.1	Zellulärer Ursprung der Gliome	22
1.1.2.2	Genetik der Astrozytome und Glioblastome	23
1.1.3	Spezielle Aspekte der Progression des Astrozytoms zum Glioblastom	24
1.1.3.1	Progression zum anaplastischen Astrozytom	24
1.1.3.2	Progression zum Glioblastoma multiforme WHO Grad IV	25
1.2	Mikroarray Technik bei malignen Gliomen	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Veruchsaufbau und Methodik	29
2.1.1	Aufbau und Arten der Mikroarray-Genchips	29
2.1.2	Prinzipien der Durchführung von Mikroarray-Analysen	30
2.1.3	Auswertung der Mikroarray-Analysen	31
2.1.4	Validierung der Mikroarray-Ergebnisse	31
2.2	Chemikalien und Lösungen	32
2.2.1	Chemikalien/ Kits	33
2.2.2	Lösungen	33
2.3	Genprodukte	34
2.4	Materialgewinnung/ Histologien	34
2.4.1	Materialgewinnung	34
2.4.2	Histologien	34

2.5	Durchführung der Mikroarray-Analysen	35
2.5.1	RNA- Präparation und Markierung	35
2.5.1.1	RNA-Isolierung	35
2.5.1.2	Amplifikation	37
2.5.1.3	Markierung	39
2.5.2	Beladung der Array-Chips	43
2.5.3	Scannen	44
2.5.4	Datenanalyse	45
2.5.6	Troubleshooting und Validierung	46
2.6	Methoden und Durchführung RT-Real-Time-PCR zur Validierung	47
2.6.1	Validierung durch Real-Time PCR	48
2.6.2	Reverse Transkription	50
2.6.3	Primerdesign	51
2.6.4	Durchführung der Real-Time PCR	50
3	Ergebnisse	57
3.1	Ergebnisse des Gruppenvergleiches anaplastisches Astrozytom vs. Glioblastom	57
3.1.1	Mikroarray-Ergebnisse	57
3.1.2	Ergebnisse Real- Time PCR	58
3.1.3	Ergebnisvergleich der Mikroarrays vs. Real- Time PCR	62
3.2	Erklärung zur Publikation	63
4	Diskussion	64
4.1	Grundsätzliche Einordnung von Mikroarray-Analysen	64
4.2	Mikroarray-Ergebnisse und semiquantitative Real-Time PCR	65
4.2.1	Gene im Vergleich der malignen Gliome	66
4.2.1.1	Fehlen erwarteter Gene	66
4.2.1.2	Darstellung neuer mit Gliomen assoziierter Gene	66
4.3	Ausblick und Zukunft der Mikroarray-Technologie	76
5	Zusammenfassung	78
6	Summary	79
7	Literaturverzeichnis	80
8	Abkürzungen	97

9	<i>Tabellenanhang</i>	99
10	<i>Danksagung</i>	103
12	<i>Verzeichnis akademischer Lehrer</i>	104
13	<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	105

II Tabellen- und Listenverzeichnis

<i>Tabelle 1 WHO-Klassifikation der Astrozytome</i>	11
<i>Tabelle 2 Therapieleitlinien</i>	18
<i>Tabelle 3 In Gliomen gefundene genetische Alterationen in den einzelnen Gliomgraden</i>	24
<i>Tabelle 4 Probenzuordnungen – Anonymisierung der Proben</i>	34
<i>Tabelle 5 Angewendete Kriterien zur optimalen Primerherstellung</i>	51
<i>Tabelle 6 Ausgewählte Gene, die entsprechenden Primerbezeichnungen, die Schmelztemperatur, sowie das Funktionieren dieser Primer</i>	52
<i>Tabelle 7 Verwendete genspezifischen Primer und die zugehörige Schmelztemperatur</i>	53
<i>Tabelle 8 Ct-Werte des Housekeepinggenes GAPDH und des Gens OLIG2</i>	56
<i>Tabelle 9 Ergebnisse der Mikroarray-Analysen</i>	57
<i>Tabelle 10 Ausgewählte Gene der Microarray-Analysen</i>	59
<i>Tabelle 11 Anzahl der Versuchsansätze N für die Referenz</i>	59
<i>Tabelle 12 Expressionsstärke des OLIG2Gens</i>	60
<i>Tabelle 13 Relative Expressionsstärke des Genes RAB34</i>	61
<i>Tabelle 14 Fold change der ausgewählten Gene</i>	62
<i>Tabelle 15 Prozentualen Anteil an Tumorentitäten mit OLIG2 Expression modifiziert</i>	68
<i>Tabelle 16 Mikroarrays aus dem Gruppenvergleich anaplastische Astrozytome versus Glioblastome</i>	99

III Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Schmetterlingsglioms mit Ausbreitung in die kontralaterale Hemisphäre über den Balken</i>	14
<i>Abbildung 2 Histologisches Bild eines Glioblastoms in HE-Färbung mit deutlich erkennbaren Nekrosen</i>	15
<i>Abbildung 3 CT GBM</i>	17
<i>Abbildung 4 MRT GBM</i>	17
<i>Abbildung 5 Hauptkriterien und Grad-spezifische Mutationen</i>	21
<i>Abbildung 6 Verschiedene Differenzierungsformen der Ursprungszelle durch Mutation</i>	23
<i>Abbildung 7 Beziehung zwischen den RTK-Pathways und dem Zellzyklus</i>	26
<i>Abbildung 8 Durchführung und Auswertung von Mikroarray-Analysen</i>	32
<i>Abbildung 9 Schematische Darstellung der Hybridisierung der farbstoffmarkierten cDNA mit der DNA des Mikroarrays</i>	44
<i>Abbildung 10 Gescanntes Bild, unbearbeitet ohne false-colour overlay</i>	45
<i>Abbildung 11 false-colour overlay mit vergrößertem Ausschnitt</i>	46
<i>Abbildung 12 Messkurve während eines Real-Time PCR Zyklus</i>	50
<i>Abbildung 13 gefärbtes Agarosegel von einer PCR</i>	51
<i>Abbildung 14 Darstellung von Schmelzkurven</i>	54
<i>Abbildung 15 Effizienzen des Kalibrator</i>	55
<i>Abbildung 16 Darstellung der relativen $\Delta\Delta C_t$-Werte</i>	56
<i>Abbildung 17 Relative IL13RA2 Expression in Astrozytomen WHO-Grad III und primären Glioblastomen</i>	60
<i>Abbildung 18 Darstellung der relativen OLIG2 Expression in Astrozytomen WHO-Grad III und primären Glioblastomen</i>	61
<i>Abbildung 19 RAB34 Expression in anaplastischen Astrozytomen und primären Glioblastomen</i>	61
<i>Abbildung 20 Fold change Werte und der RT-PCR Mittelwerte</i>	62
<i>Abbildung 21 Einfluß der Transkriptionsfaktoren OLIG 1 und OLIG2 auf die Zelldifferenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzelle</i>	69
<i>Abbildung 22 Intrazelluläre Funktion der RAB GTPasen</i>	75

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik und Fragestellung

Tumore stellen die klinisch wichtigste Form eines vermehrten Wachstums dar. Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen stehen sie an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik. Die Inzidenz pro Jahr liegt bei 500 pro 1000 Einwohner (RKI 2010/ Krebsregister).

Als Tumor (Synonyme: Neoplasma, Geschwulst) bezeichnet man eine abnorme Gewebsmasse, die durch Vermehrung von körpereigenen entarteten Zellen entsteht. Dieser Prozess ist vor allem durch das Ergebnis von Regulationsstörungen im Rahmen der Zellteilung (Proliferation), und Zellverlust (Apoptose) transformierter Zellen charakterisiert (Böcker et al. 2001).

Zusätzliche Eigenschaften der Tumorzellen können zu einer lokalen Invasion und Metastasierung führen, ebenso können von ihnen freigesetzte Stoffwechselprodukte wie Hormone, den Organismus zusätzlich schädigen. Die Ursachen von Tumoren sind meist komplexe Aberrationen im Genom der Zellen, welche ihren Ursprung in Umweltfaktoren und genetischen Faktoren haben.

Im normalen Gewebe unterliegen Proliferation, Differenzierung, Zell-Zell-Kontakte und Apoptose einer strengen Kontrolle durch extrazelluläre Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren. Dieser Prozess ist eng gekoppelt an die Zellverlustrate. Aus diesem Gleichgewicht resultiert eine präzise regulierte Massenkonzanz von Geweben und Organen im Erwachsenenalter. Die durch genetische Mutationen ausgelöste Transformation von Zellen zu Tumorzellen geht mit einer Störung der zellulären Regulationsmechanismen der Zellteilung versus Apoptose einher. Die Tumorzelle besitzt damit die Eigenschaft ohne exogenen Stimuli zu proliferieren, man spricht von einem autonomen Wachstum. Dieser Prozess ist irreversibel, progressiv und nicht mit dem normalen Gewebe koordiniert. Es bildet sich eine abnorme Gewebsmasse.

Für das Tumorwachstum spielt aber die durch die Tumorzelle induzierte Gefäßneubildung (Tumorangiogenese) mit Ausbildung von Tumorstroma eine entscheidende Rolle. Jeder Tumor besteht somit aus den eigentlichen Tumorzellen (Tumorparenchym) und dem gefäßhaltigen Stützgewebe (Tumorstroma). Das Stroma dient als Stütze und ist essentiell für die Gefäßversorgung. Zusätzlich zum unkontrollierten Wachstum können Tumorzellen die Fähigkeit erlangen, Gewebe zu infiltrieren und in den Gesamtorganismus zu streuen.

Die klinischen Symptome eines Tumors entstehen durch lokales Wachstum (Druck, Gewebedestruktion), die Wirkung von Stoffwechselprodukten (Hormone) auf den Gesamtorganismus sowie durch fortschreitende Metastasierung.

Ein wichtiges Einteilungskriterium für Tumoren ist ihre Dignitätsbeurteilung in benigne und maligne Geschwulste. Nach den WHO-Klassifikationen zeichnen sich benigne Tumore durch ein langsames, expansiv- verdrängendes Wachstum ohne Metastasierung aus. Die durch das Zellwachstum entstehende zusammenhängende Masse führt zu einer Verdrängung, Kompression und Druckatrophie des angrenzenden normalen Gewebes. Benigne Tumore sind überwiegend gut begrenzt und weisen häufig eine sie umgebende fibröse Kapsel auf. Histologisch zeigen sie einen hohen Differenzierungsgrad, d.h. sie ähneln dem entsprechendem Normalgewebe. Maligne Tumore hingegen zeichnen sich meist durch invasives, destruierendes Wachstum und die Fähigkeit zur Metastasierung aus. Histologisch zeigen sie im Vergleich zum Normalgewebe zumeist stärkere Kern- und Zellveränderungen und ähneln mehr oder minder dem Normalgewebe. Das entscheidende Merkmal maligner Tumore liegt in der Fähigkeit ihrer Tumorzellen, das normale Gewebe zu infiltrieren (Invasion) und zu zerstören (Destruktion). Es findet sich beim malignen Tumor makroskopisch eine tumoröse Durchsetzung des normalen Gewebes mit demzufolge unscharfer Begrenzung. Bei inadäquater chirurgischer Therapie kann es auch durch die verbliebenen Tumorzellen zum Rezidiv kommen. Die Fähigkeit der Tumorzellen zum invasiven Wachstum führt aber ebenfalls zu Einbrüchen in Lymph- und Blutgefäße. Auf diesem Weg kommt es zur Verschleppung und Weiterwachsen des Tumors an anderer Stelle ([pathologie-online.de/Thema 9/Tumore 2007](http://pathologie-online.de/Thema%209/Tumore)).

Tumoren des Nervensystems machen nur 2 % aller menschlichen Tumore aus. Sie spielen klinisch aber eine wichtige Rolle, weil alle Altersstufen, insbesondere auch Kinder betroffen sein können. Prinzipiell können sich Neoplasien in allen Abschnitten des Nervensystems und aus allen Zelltypen mit Ausnahme der Mikroglia entwickeln. Am häufigsten sind jedoch Gliome des ZNS, insbesondere des Großhirns. Traditionell werden auch Neoplasien hinzugerechnet die ihren Ursprung von den Meningen nehmen, die sogenannten Meningeome.

Tumore des ZNS unterscheiden sich in einigen Aspekten von denen anderer Organe. Die biologische Wertigkeit wird durch das histologische Grading der WHO standardisiert. Die klinische Prognose wird jedoch nicht allein von der biologischen Wertigkeit bestimmt. Da das

Hirn in den knöchernen Schädel eingeschlossen ist, führen alle raumfordernden Prozesse, also auch benigne, früher oder später zur Hirndrucksteigerung mit lebensbedrohenden intrakraniellen Massenverschiebungen. Die klassischen Merkmale der Malignität, wie infiltrativ-destruierendes Wachstum und Metastasierung gelten nur eingeschränkt. Die Tumordinfiltration bleibt in der Regel auf das Hirnparenchym beschränkt, selten wird ein Übergreifen auf benachbarte Strukturen wie Dura oder Knochen beobachtet. Eine hämatogene Streuung in andere Organe ist selten und klinisch meist ohne bestimmenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Allerdings neigen einige Hirntumore, wie Medulloblastome zur Metastasierung über den Liquor cerebrospinalis.

Tumore des ZNS zeigen häufig eine ausgeprägte Bevorzugung bestimmter Lokalisationen und Altersgruppen. Die Inzidenz intrakranieller Tumore liegt in den USA bei 11 Neuerkerankungen pro 100000 Einwohner/ Jahr und ist weitgehend konstant. Männer sind insgesamt häufiger betroffen als Frauen (Verhältnis 1,35:1) (Reifenberger et al. 1999).

Trotz ausgedehnter epidemiologischer Studien ist es bisher nicht gelungen, Umweltfaktoren zu identifizieren, die für die Entstehung von Hirntumoren verantwortlich sein könnten. Gesichert ist allein die gelegentliche Induktion von Hirntumoren durch therapeutische Dosen ionisierender Strahlen, insbesondere bei Kindern. Tumoren des Nervensystems treten hingegen ungewöhnlich häufig im Rahmen erblicher Tumorsyndrome auf, wie im Rahmen der Neurofibromatose (Böcker et al. 2001).

Es hat in der letzten Zeit hat es eine starke Zunahme an Wissen und Kenntnissen über die Tumorbilogie gegeben und dies ermöglicht einen wesentlichen Fortschritt in der Behandlung von den meisten Tumoren wie beispielsweise den Prostatakarzinomen. Es ist jedoch bemerkenswert, dass diese durchaus effektiven Behandlungsstrategien wie Chemotherapie und Radiatio ineffektiv in der Behandlung von Gliomen sind. Diese Situation spiegelt die exzentrische Biologie und den besonderen zellulären Ursprung dieser Tumorzellen wider (Maher et al. 2001, Zhu et al. 2002). Die einzig hoffnungsvolle Aussicht liegt in der Gewinnung von Informationen über die biologischen Eigenschaften der Astrozytome. Zum Teil verständliche Einsichten in die molekulare Biologie dieser Tumore hat man bereits durch humane genetische Studien mittels PCR-Techniken, der Entwicklungsanalyse von Astrozyten, der sogenannten Gliogenese und durch die Formation von Gliomen in Mäusen gewonnen (Zhu et al. 2002). Die in der vorliegenden Dissertation durchgeführte genetische Studie über die maligne Progression der anaplastischen Astrozytome zum Glioblastom anhand von

Mikroarray-Analysen soll einen Beitrag leisten, um die Molekularbiologie dieser aggressiven Tumore zu verstehen und somit möglicherweise neue Behandlungsoptionen zu schaffen.

1.1.1 Gliome

Als Gliome werden Astrozytome ohne ein näheres Eingehen auf ihre Dignität bezeichnet. Astrozytome zählen gemeinsam mit Oligodendrogliomen, Ependymomen, Tumoren des Plexus choroideus sowie den neuronalen und embryonalen Tumoren zu den neuroepithelialen Tumoren. Sie machen etwa 25% aller intrakraniellen Tumore aus und sind in jedem Lebensalter und in jeder Lokalisation anzutreffen (RKI 2010/Krebsregister). Die Spanne reicht von gutartigen Veränderungen wie dem pilozytischen Astrozytom bis zu hoch malignen Veränderungen wie dem Glioblastom. Sie werden nach der aktuellen WHO-Klassifikation geordnet, welche die Histologie und die genetischen Alterationen berücksichtigt. Die Astrozytome werden anhand dieser Kriterien in vier verschiedene Klassen eingeteilt. Gemeinsam ist allen Astrozytomen ein Wachstum entlang der Marklagerbahnen und somit eine Infiltration weit vom Tumorzentrum gelegener Hirnareale.

Tabelle 1 WHO-Klassifikation der Astrozytome, modifiziert nach Böcker et al. 2001

WHO-Grad	WHO-Bezeichnung	Histologie	Genetische Alterationen
I	Pilozytisches Astrozytom	Bipolare Zellen, Rosenthal-Fasern, eosinophile Körperchen	Deletion Chromosom 17q (< 20%), Akkumulation von TP53-Protein
II	Astrozytom niedriggradig	Kernatypien	Mutation TP53 (>70%)
III	Anaplastisches Astrozytom	Kernatypien, Mitosen	Mutation TP53 (>70%), Deletion 19q (50%)
IV	Glioblastoma multiforme (GBM)	Kernatypien, Mitosen, Nekrosen und Gefäßproliferationen	Deletion Chromosom 10 (>60%), und 19q GBM: Amplifikation/Überexpression EGFR (60%), PTEN-Mutation (30%), p16-Deletion (30%), MDM2-Amplifikation (>10%), sekundäres GBM: TP53-Mutation

1.1.1.1 Astrozytome WHO-Grad I und WHO-Grad II

Das pilozytische Astrozytom entspricht dem WHO-Grad I und ist eine gutartige Geschwulst. Es macht 12% der Hirntumore bei Kindern aus und tritt gelegentlich auch bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen auf. Es hat die beste Prognose aller Hirntumore. Der bevorzugte Sitz ist das Kleinhirn, der Frontallappen und vor allem um die Mittellinie gelegene anatomische Strukturen. Pilozytische Astrozytome weisen ein langsames und wenig infiltratives Wachstum auf. Makroskopisch sind sie durch Zystenbildung und wandständige Tumorknoten charakterisiert. Mikroskopisch findet man typischerweise Degenerationsprodukte der Gliafilamente, die Rosenthal-Fasern (Böcker et al. 2001). Zu den pilozytischen Astrozytomen werden auch die Optikusgliome gerechnet, ebenso das subependymale Riesenzellastrozytom, welches häufig in Assoziation mit der tuberösen Hirnsklerose auftritt.

Dem pilozytischen Astrozytom WHO-Grad I werden die weitaus häufigeren, malignen und diffus infiltrierend wachsenden Gliome gegenüber gestellt. Nach Histologie und biologischer Wertigkeit werden hier drei Formen unterschieden: Das niedriggradige Astrozytom WHO-Grad II, das anaplastische Astrozytom WHO-Grad III und das Glioblastoma multiforme WHO-Grad IV. Das Astrozytom WHO-Grad II tritt vor allem in den Großhirnhemisphären auf und manifestiert sich bei 70% der Patienten durch einen epileptischen Anfall. Der Erkrankungsgipfel liegt in der 3. und 4. Lebensdekade. Makroskopisch imponiert das Astrozytom WHO-Grad II als unscharf begrenzter, infiltrativ wachsender, jedoch wegen geringer Mitosenraten noch relativ benigner Tumor, der zu einer Auftreibung des betroffenen Hirnareals führt. Häufig beobachtet man glattwandige Zysten mit wasserheller Flüssigkeit. Mikroskopisch lassen sich vier Formen unterscheiden: fibrillär, protoplasmatisch, gemistozytische und gemischte Varianten. Die Mitoserate ist zwar gering, aber therapeutisch gelingt aufgrund des bereits bei diesem Grad auftretenden infiltrativen Wachstums selten eine vollständige Resektion. Es kommt immer nach lange ruhendem Tumorwachstum zu Rezidiven und Progressen. Alle Tumorzellen zeigen eine starke Akkumulation des immunhistochemisch nachweisbaren sauren Gliafaserproteins GFAP. Bei 50% der Astrozytome Grad II wird eine Chromosomenaberration mit Verlust des kurzen Armes von Chromosom 17 beobachtet, diese führt zum Verlust des Tumorsuppressorgens TP53 (Reifenberger et al. 1999).

1.1.1.2 Anaplastische Astrozytome und Glioblastome

Da in dieser Studie die Progression des anaplastischen Astrozytomes zum Glioblastoma multiforme untersucht wurde, werden beide Tumore detailliert dargestellt.

Das anaplastische Astrozytom WHO-Grad III und das Glioblastoma multiforme WHO-Grad IV werden als maligne Gliome den niedriggradigen Astrozytomen WHO-Grad I und II gegenübergestellt. Die malignen Astrozytome machen mit 15-20% die Mehrzahl der primären Hirntumore aus (Reifenberger et al. 1999). Sie treten überall im Bereich des ZNS auf, vor allem jedoch im Bereich der Großhirnhemisphären, insbesondere frontotemporal. Die Mehrzahl der Patienten mit einem anaplastischen Astrozytom sind zwischen 40- 60 Jahren, während das Prädilektionsalter beim Glioblastom bei 60-70 Jahren liegt. Männliche Patienten sind häufiger betroffen als weibliche, das Verhältnis liegt bei 2:1 (Brandt et al. 2000). Gelegentlich treten Glioblastome im Hirnstamm, insbesondere bei Kindern auf, die sogenannten malignen Hirnstammgliome.

Die Prognose der malignen Gliome ist schlecht. Die Zwei-Jahresüberlebensrate beträgt trotz maximaler Therapie beim anaplastischen Astrozytom 46%, beim Glioblastom 9%, die Fünf-Jahresüberlebensrate beträgt beim anaplastischen Astrozytom 31% und beim Glioblastom nur noch 3% (RKI/krebsregister 2010).

Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der Astrozytome ist unbekannt, mit Ausnahme ihres seltenen Auftretens im Rahmen erblicher Tumorsyndrome oder nach Radiatio der ZNS-Achse im Kindesalter. Wie bei Tumoren anderer Organe ist die Progression der Astrozytome begleitet von einer Akkumulation genetischer Veränderungen. Es finden sich beim anaplastischen Astrozytom Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 und Deletionen des Chromosomes 19q (Reifenberger et al.1999).

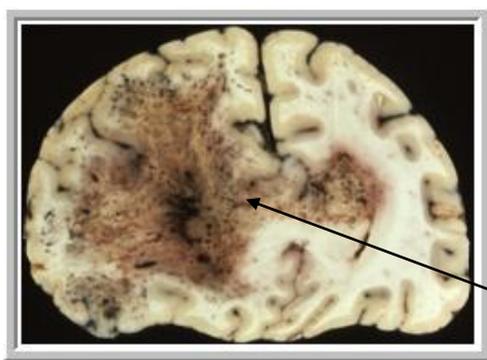
Das Glioblastom lässt sich klinisch und molekularpathologisch in drei Formen unterteilen. Das primäre Glioblastom entsteht de-novo ohne einen vorherigen Hinweis auf einen Tumor mit kurzer Anamnese, es entsteht meist im höheren Lebensalter. Es ist genetisch charakterisiert durch EGFR-Überexpression, PTEN-Mutationen, p16-Deletionen und seltener Amplifikationen des MDM2-Gens. Das sekundäre Glioblastom entwickelt sich durch Tumorprogression aus einem niedriggradigen oder anaplastischen Astrozytom, betrifft meist Patienten im mittleren Lebensalter und enthält in mehr als 70% der Fälle Mutationen des TP53-Tumorsuppressorgens. Neben der sekundären Entstehung aus niedriggradigen

Astrozytomen können auch Oligodendrogliome und Ependymome zum Glioblastoma multiforme entarten (Reifenberger et al. 1999). Eine Sonderform der Glioblastome stellen Rezidive dar.

Morphologie

Morphologisch sind die anaplastischen Astrozytome nur schwer von den Glioblastomen zu unterscheiden, sie weisen lediglich eine geringere Mitoserate auf. Beide Entitäten werden deshalb gemeinsam besprochen.

Makroskopisch weisen Glioblastome eine charakteristische „bunte“ Schnittfläche auf mit gelblichen Nekrosen, Blutungen und grau-weißem Tumorgewebe. Das Glioblastom hat eine ausgeprägte Neigung zum diffus-infiltrativen Wachstum. Es breitet sich besonders rasch entlang kompakter Myelinbahnen aus. Typisch ist eine Ausdehnung über den Balken in die kontralaterale Hemisphäre, wodurch neuroradiologisch und makroskopisch das Bild bilateral symmetrischer Glioblastome entsteht, das sogenannte Schmetterlingsgliom, wie in der Abbildung 1 deutlich erkennbar. Anaplastische Astrozytome und Glioblastome sind in der Regel von einem fingerförmigen perifokalem Ödem umgeben, dessen Volumen größer sein kann als das Tumolvolumen. Das Tumolvolumen wird durch das gleichzeitige Einschmelzen von Hirngewebe kompensiert. Die Herniation von verdrängtem Hirngewebe unter der Falx cerebri und tentoriell wird bei frontoparietalen bzw. temporalen Tumoren beobachtet.



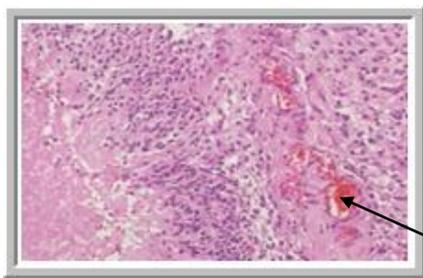
Schmetterlingsgliom

Abbildung 1 Aspekt eines Schmetterlingglioms mit Ausbreitung in die kontralaterale Hemisphäre über den Balken (von Prof. Dr. med. U. Sure zur Verfügung gestellt)

Histologisch handelt es sich um zellreiche, meist polymorphe Tumoren mit hoher Mitoserate, die Wachstumsfraktion beträgt 8-25%. Typisch, aber nicht obligat, sind mehrkernige Riesenzellen. Für die Diagnose entscheidend ist das Vorkommen flächenhafter oder strichförmiger Nekrosen, um die sich die Tumorzellen radiär anordnen (Palisadenstellung der

Zellkerne, wie in der Abbildung 2 deutlich erkennbar). Ein weiteres typisches Merkmal sind ausgeprägte Gefäßproliferationen, insbesondere in der Infiltrationszone des Tumors. Sie werden durch ein von den Gliomzellen sezerniertes angiogenetisches Protein, dem VEGF, induziert. Dabei handelt es sich typischerweise um glomerulumartige Gefäßneubildungen mit defekter Wandstruktur und mangelhaft ausgebildeter Tunica media. Dadurch kommt es zu kleinen Aneurysmen, Varizen und arteriovenösen Kurzschlüssen.

Die histogenetische Abstammung der Glioblastome ist häufig schwer zu verifizieren, jedoch finden sich in der Regel noch einige GFAP-/ Protein S100 anreichernde Tumorzellen, die den astrozytären Ursprung belegen. Anaplastische Astrozytome weisen weniger ausgedehnte Nekrosen, Gefäßproliferationen und eine geringere Wachstumsfraktion auf (Reifenberger et al.1999). Zur Beurteilung der Proliferationsaktivität und dem Grading supratentorieller Gliome wird häufig das Proliferations-assoziierte Antigen Ki-67 mit Hilfe des MIB 1-Antikörpers bestimmt (www.dgn.org/leitlinien 2006).



flächenhafte Nekrosen, um die sich die Tumorzellen radiär anordnen

Abbildung 2 Histologischer Aspekt eines Glioblastoms in HE-Färbung mit deutlich erkennbaren Nekrosen (von Prof. Dr. med. U. Sure zur Verfügung gestellt)

Klinik

Klinische Symptome entwickeln sich in einem relativ kurzen Zeitraum von 3-5 Monaten. Die Symptome und klinischen Befunde bei intrakraniellen Tumoren hängen im Wesentlichen von der Lokalisation der Geschwulst innerhalb des Kopfes ab. Charakteristisch sind epileptische Anfälle vor allem bei Astrozytomen des Großhirnes, konstante oder intermittierende Kopfschmerzen, psychische Veränderungen, sowie ein progredientes fokales sensorisches oder motorisches neurologisches Defizit, wie z.B. Gangstörungen. Ein weiteres frühes neurologisches Defizit ist die Merkfähigkeitsstörung.

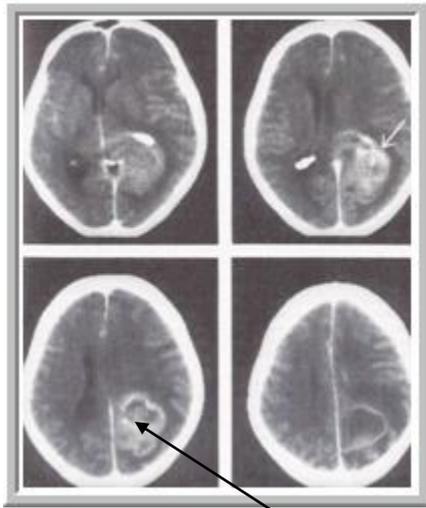
Ein erhöhter Hirndruck kann aufgrund des raumfordernden Effekts des Tumors und eine konsekutive Liquorzirkulationsstörung den Kopfschmerzen zugrunde liegen und ist meist mit Übelkeit, Erbrechen und Papillenödem assoziiert. Diese klassische Hirndruck-Trias tritt vor

allem bei Tumoren in der hinteren Schädelgrube und solchen am oder im Ventrikelsystem auf (Hydrocephalus internus/occlusus). Akut auftretende Symptome, wie eine Hemiparese, sind häufig auf eine Tumoreinblutung zurückzuführen.

Diagnostik

Die Diagnoseerhebung wird bei vielen neurologischen und neurochirurgischen Erkrankungen oft schon durch die Anamnese und klinische Befunderhebung möglich. An die klinische Befunderhebung können sich verschiedene apparative Untersuchungen anschließen. Sie sind eine der Grundvoraussetzungen für die Operationsplanung. Die Anamneseerhebung ist wichtig für die Erfassung der ersten durch den Tumor bedingten Symptome und deren weiteren Entwicklung. Die neurologische Untersuchung dient der Dokumentation durch den Tumor bereits bei Diagnosestellung verursachten Defiziten. Sie ist zur Beurteilung späterer Folgen von Tumorprogression und Therapie von großer Bedeutung. Ein EEG kann bei erhöhter Krampfbereitschaft und bei symptomatischen Anfällen für die weitere Therapieplanung hilfreich sein. In der sich nun anschließenden neuroradiologischen Diagnostik können CT oder MRT Aufnahmen mit und ohne Kontrastmittel zur Verdachtsdiagnose Gliom führen. Die diagnostische Bildgebungen, wie CT und MRT mit Kontrastmittel, nehmen eine zentrale Rolle in der Gliomdiagnostik ein und sind für die exakte Bestimmung der Tumorlokalisation sowie dessen anatomischen Lagebeziehungen essentiell. Das Glioblastom hat im CT und vor allem in der MRT ein typisches Erscheinungsbild. Charakteristisch sind im CT und vor allem in der T1-gewichteten MRT-Aufnahme ein zentral nekrotisierender hypointenser Tumor mit perifokalem Ödem und einer girlandenförmigen Kontrastmittelanreicherung in der Peripherie des Tumors (siehe Abbildung 3 und 4). Das perifokale Ödem ist besonders gut in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen zu erkennen.

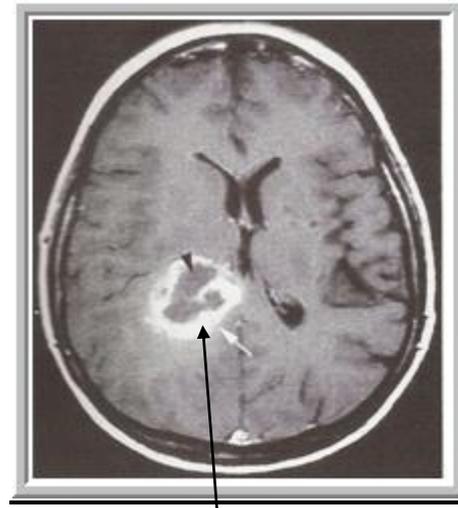
Zu den differentialdiagnostischen Abgrenzungen kann die Liquordiagnostik unter Umständen weitere wertvolle Hinweise liefern. Sie ist aber bei erhöhtem Hirndruck, insbesondere bei infratentoriellen Raumforderungen kontraindiziert (www.dgn.org/leitlinien 2006).



Nekrose

Abbildung 3 CT GBM

(Schirmer et al. 2004) mit deutlichem zentraler Nekrose und girlandenförmiger KM-Anreicherung zentral.



Ringförmiges KM-Enhancement

Abbildung 4 T1 gewichtetes MRT GBM

(Kauffmann et al. 2001) GBM im dorsalen Stammganglienlager mit Einwachsen in das Splenium corpus callosi, typisch sind die girlandenförmige KM-Anreicherung und die zentrale hypointense Nekrose.

1.1.1.3 Therapie maligner Gliome

Viele therapeutische Fragen sind nicht oder nur in älteren Studien beantwortet, die alte histologische Klassifikationen sowie alte Operations- und Bestrahlungstechniken verwenden und deren Ergebnisse nicht uneingeschränkt übernommen werden können. Um das therapeutische Vorgehen zu verbessern, sollten Patienten deshalb wenn möglich im Rahmen von Studien behandelt werden. Außerhalb von Studien können die Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie für die Behandlung zugrunde gelegt werden.

Allgemeine Richtlinien zu Gliomtherapie

Allgemeine Richtlinien zur Gliomtherapie umfassen Operation, Biopsie, Radiatio und Chemotherapie. Operationen werden sehr häufig mit therapeutischer Intention durchgeführt, der stereotaktischen Biopsie ist Vorzug zu geben bei ungünstig gelegenen Läsionen, multiplen Läsionen, die Metastasen entsprechen können, bei Läsionen die in erster Linie an ein zerebrales Lymphom denken lassen und bei älteren Patienten in einem schlechten Allgemeinzustand. Bei einem Verdacht auf ein supratentoriales Gliom und Indikation zur offenen Operation sollte eine Tumoresektion zur Reduktion der Tumormasse, zur Entlastung des Hirndruckes und zur Wiederherstellung einer ungestörten neurologischen Funktion erfolgen. Im Interesse der Funktionserhaltung sind mikrochirurgische Operationstechniken

empfehlenswert. In funktionell wichtigen Arealen des ZNS ist ein Monitoring der jeweiligen Hirnfunktion empfehlenswert. Hier befinden sich noch einige Verfahren in der Phase der Validierung, wie beispielsweise intraoperative Stimulation und Registrierung des Sprachvermögens. Für die intraoperative sehr genaue Tumorlokalisation werden Techniken wie die Neuronavigation, intraoperative Ultraschalldiagnostik und intraoperative MRT angewendet. Neuerdings kann den Patienten auch präoperativ 5-Amino-Lävulinsäure verabreicht werden, welche sich an den Tumorgrenzen anreichert. Intraoperativ können diese selbst mikroskopisch nicht mehr sichtbaren Tumorgrenzen im ultravioletten Licht sichtbar werden und ermöglichen so eine sehr genaue Resektion auch in kritischen Gebieten (Schirmer et al. 2005). Allerdings hat die Prävention neuer neurologischer Defizite bei nicht kurativ resezierbaren Gliomen eine höhere Priorität als die Radikalität der Operation (www.dgn.org/leitlinien 2006, Schirmer et al. 2005, www.dgho.de 2005, Brandt et al. 2005).

Eine postoperative Strahlenbehandlung ist, unabhängig vom Ausmaß der Resektion ebenfalls Standard. Dabei wird das Tumorbett mit einem Sicherheitsabstand von 2-3 cm mit 60 Gy innerhalb von 6 Wochen bestrahlt. Diese Indikation stützt sich auf zwei größere Studien, die einen positiven Effekt höherer Strahlendosis (im Vergleich zur Standarddosis) nachweisen konnten mit Verlängerung der Überlebenszeit um etwa 4-5 Monate (Medical Research Council Brain Tumor Working Party 1991/ 2001).

Die Chemotherapie besitzt in der Gliomtherapie allgemein einen geringeren Wert als die Strahlentherapie, da Astrozytome und Glioblastome wesentlich weniger gut als andere Tumoren auf eine Chemotherapie ansprechen. Der optimale Einsatz ist nach wie vor umstritten. Sie sollte vor allem jüngeren Patienten und Patienten mit einem Karnofsky-Index von über 70% angeboten werden. Unumstritten ist jedoch ihr Einsatz in der Behandlung von Rezidiven nach vorangegangener Operation und Strahlentherapie.

Neuere Ansätze der Gliomtherapie, einschließlich Migrationshemmung, Invasionshemmung, Angiogenesehemmung, Suizidgentherapie und Immuntherapie kommen nur im Rahmen der experimentell-klinischen Prüfung zur Anwendung.

Tabelle 2 Therapieleitlinien modifiziert nach www.dgn.org/leitlinien 2005

	<u><i>Primärtherapie</i></u>	<u><i>Rezidivtherapie</i></u>
Anaplastisches Astrozytom	Resektion oder Biopsie und Chemotherapie oder Strahlentherapie	Resektion und Chemotherapie oder Strahlentherapie
Glioblastom WHO Grad IV	Resektion oder Biopsie und Chemotherapie und Strahlentherapie	Resektion und Chemotherapie oder Strahlentherapie

Therapie des anaplastischen Astrozytoms WHO Grad III

Als Standardtherapie des anaplastischen Astrozytoms gilt die Biopsie oder Resektion und die nachfolgende Strahlentherapie der erweiterten Tumorregion mit 54 Gy in Einzelfractionen von 1,8-2,0 Gy. Als Chemotherapeutika werden Nitrosoharnstoffe wie BCNU, ACNU oder das PCV-Schema mit CCNU, Procarbazin und Vincristin eingesetzt. Die Optimierung der Primärtherapie anaplastischer Astrozytome ist Gegenstand NOA-04 Studie. Diese randomisierte Phase III Studie dient der Optimierung der Therapie und beinhaltet eine sequentielle Radiochemotherapie nach dem PCV-Schema oder mit dem strahlensensibilisierenden Chemotherapeutikum Temozolomid.

Im Rezidivfall muss zunächst die Indikation zu einer erneuten Operation geprüft werden. Für umschriebene Läsionen oder bei Kontraindikationen für die Chemotherapie kommt auch eine erneute hypofraktionierte Bestrahlung in Frage. Für die Rezidivsituation nach vorangegangener Strahlentherapie ist die Wirksamkeit der Chemotherapie belegt. Etwa gleichwertige Regimes dürften die Nitrosoharnstoffmonotherapie, die PCV-Chemotherapie (Levin et al.1990, Cairncross et al.1994), die Kombination aus ACNU und Teniposid (VM26) (NOA-01 Protokoll) und Temozolomid (Yung et al.1999). Bei Wirksamkeit (komplette oder partielle Remission, Krankheitsstabilität) sollte die Chemotherapie nach 4 Zyklen Nitroselhaltiger Therapie bzw. nach 8 Zyklen Temozolomid unterbrochen werden.

Therapie des Glioblastoma multiforme WHO Grad IV

Die Bedeutung der neurochirurgischen Radikalität für die Prognose beim Glioblastom gehört zu den fortdauernden Kontroversen der chirurgischen Neuroonkologie. Die meisten Studien, wie die NOA-01 Studie, identifizierten das Ausmaß der Resektion als positiven Prädiktor für die Überlebenszeit (Hess et al. 1999). Die sich anschließende Radiatio in Dosierungen von 54-60 Gy (1.8-2 Gy Fractionen) ist die Standardtherapie des Glioblastoms. Die Verlängerung der medianen Überlebenszeit durch diese Therapie beträgt etwa 6 Monate. Diese palliative Strategie kann bei älteren Patienten und bei Patienten mit schlechten prognostischen Faktoren sinnvoll sein (www.dgn.org/leitlinien 2005). In der Primärtherapie ist der Wert der Chemotherapie zusätzlich zur Strahlentherapie noch nicht vollständig gesichert. Metaanalytisch ergibt sich eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 2-3 Monaten durch die Chemotherapie. Außerhalb klinischer Studien sollte die Chemotherapie vor allem jüngeren Patienten in einem guten Allgemeinzustand angeboten werden. Nach der randomisierten EORTC-Studie ist bei den Glioblastomen eine Verbesserung der Behandlung durch die Gabe von Temozolomid während und nach der Bestrahlung möglich (Stupp et al. 1999). Der Vergleich erfolgte zur alleinigen Bestrahlung nach der Operation. Hier konnte die

mediane Überlebenszeit durch die Chemotherapie von 12 auf 15 Monate hochsignifikant gesteigert werden. Dies in allen Altersgruppen und bei guter Verträglichkeit, nur bei Patienten in einem schlechten Allgemeinzustand war die adjuvante Chemotherapie nicht sicher wirksam. Eine kleinere Studie speziell bei älteren Patienten kam zu einem ähnlichen Ergebnis (Brandes et al. 2003).

Im Rezidivfall ist der Wert der Chemotherapie besser belegt (Wong et al. 1999). Bei Wirksamkeit (komplette oder partielle Remission, Krankheitsstabilität) sollte die Chemotherapie in der Regel nach 4 Zyklen Nitrosoharnstoff-haltiger Therapie bzw. 8 Zyklen Temozolomid unterbrochen werden.

Für einzelne Patienten mit umschriebenen Läsionen kommt in der Rezidivsituation eine zweite Strahlentherapie in Betracht, am ehesten in Form einer stereotaktischen, hypofraktionierten Radiatio. Für Therapiestrategien wie Hemmung der Migration, Invasion und Angiogenese liegen keine positiven Studien vor, so dass solche Strategien weiterhin nur im Rahmen kontrollierter Studien zum Einsatz kommen (www.dgn.org/Leitlinien 2006, www.dgho.de 2005).

1.1.2 Allgemeine genetische Untersuchungen

Die diffus infiltrierend wachsenden astrozytären Tumore werden klassifiziert nach den Definitionen der World Health Organisation 2000. Diese umfasst primär morphologische Charakteristika. Die Prognose korreliert aber nicht mit dem Grad der Anaplasie, sondern mit dem Gliom-Subtyp. Aus diesem Grund ist es wichtig eine akkurate Diagnose zu etablieren und somit eine optimale, anhand molekularer Kriterien auf diesen Gliomtyp passende Therapie zu definieren. Die Kenntnisse über die molekulare Pathogenese der diffus infiltrierend wachsenden astrozytären Tumore sind in den letzten 20 Jahren stark gewachsen, dennoch ist man noch weit davon entfernt die genauen molekularen Prozesse zu verstehen und die gewonnen Erkenntnisse in Form von Klassifikationen, Prognosen oder speziellen Therapien anzuwenden (Ichimura et al. 2004).

Das Gliom ist der am häufigsten molekular untersuchte hirneigene Tumor. Die meisten der bisher gewonnen Erkenntnisse von genetischen Alterationen in Gliomen finden sich in drei zellulären Hauptsystemen: RB1, TP53 und in Tyrosin-Kinase-Rezeptor Signaltransduktionswegen. Neuere genetische Alterationen in Gliomen wurden mit Techniken wie den Mikroarrays erkannt und umfassen die Identifizierung von Genen und deren Proteine, welche involviert sind in der Initiierung der mitotischen Signaltransduktion, der Zellzyklus-

Regulation, der Apoptose, der Angiogenese und Invasion. Ebenso gelang eine Zuordnung bestimmter Genveränderungen zu bestimmten Tumorstadien und Tumorsubtypen (Sanson et al. 2004, van Meir et al 2010).

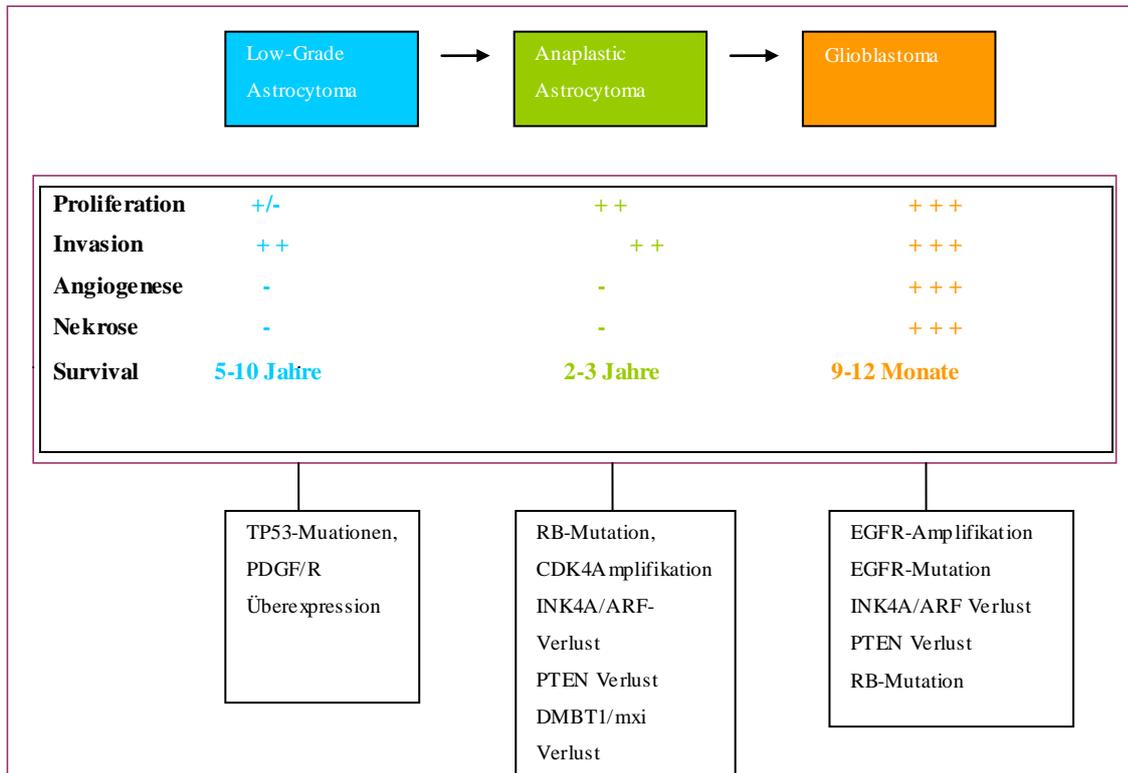


Abbildung 5 Hauptkriterien und Grad-spezifische Mutationen. Die Tabelle stellt eine Zusammenfassung der gradspezifischen Mutationen der einzelnen Gliomgrade dar, sowie den gradspezifischen Tumoreigenschaften, wie der Fähigkeit der Tumorzellen zur Proliferation, zum invasiven Wachstum und zur Angiogenese dar.

(modifiziert nach Maher et al. 2001)

Die meisten dieser molekularen Veränderungen finden sich in sporadisch entstehenden Gliomen, aber es existiert auch eine Zahl von familiären Syndromen mit einer erhöhten Inzidenz ein Gliom zu entwickeln, wie das Li-Fraumeni-Syndrom (Ichimura et al. 2004).

Allen genetischen Alterationen, unabhängig davon ob sie in sporadisch entstandenen Gliomen oder bei Gliomen im Rahmen von familiären Syndromen auftreten, ist ihre morphologisch einheitliche Erscheinungsform als Gliom gemeinsam. Weiterhin sehr unsicher ist die Frage nach dem zellulären Ursprungstyp der Gliome (Merlo et al. 2003, Sanson et al. 2004, Maher et al. 2001).

1.2.1.1 Zellulärer Ursprung der Gliome

Ein wichtiger Hinweis auf die Signaltransduktionswege, welche involviert sind in die Gliomagenetik, liegt in den beiden Glioblastom-Subtypen. Diese Subtypen wurden ursprünglich nur klinisch definiert. Primäre Glioblastome präsentieren sich typischerweise in älteren Patienten als aggressive, hochinvasiv wachsenden Tumore ohne ein vorheriges klinisches Zeichen. Sekundäre Glioblastome haben eine unterschiedliche klinische Vorgeschichte. Sie treten typischerweise bei jüngeren Patienten auf, die initial ein niedriggradiges Astrozytom aufwiesen, das sich 5-10 Jahre nach der Diagnose in ein Glioblastom transformierte. Die genetischen Alterationen in beiden Subtypen entsprechen einem jeweils unterschiedlichen genetischen Profil mit spezifischen Mutationen. Als Ergebnis lässt sich sagen, dass primäre und sekundäre Glioblastome zwei unterschiedliche klinische Entitäten darstellen und beide Subtypen sich entlang eigener genetischer Pathways entwickeln. Histologisch sind jedoch beide Glioblastom-Entitäten nicht zu unterscheiden. Es wird deshalb postuliert, dass Glioblastome eine maligne Transformation von primitiven glialen Vorläuferzellen, wie einer pluripotenten neuronalen Stammzelle oder einer glialen Vorläuferzelle repräsentieren (Maher et al. 2001, van Meir et al. 2010). Es ist möglich, dass durch die Akkumulation von genetischen Mutationen an den Schlüsselpunkten, der die gliale Differenzierung regulierenden Pathways, diese beiden Glioblastom-Subtypen, sowie bei den primären vier weitere Subtypen entstehen können (Maher et al. 2001, Sanson et al. 2004, Merlo et al. 2003, Holland et al. 2001, van Meir et al. 2010).

Neuronale Stammzellen im adulten ZNS

Die Identifizierung von neuronalen Stammzellen im adulten ZNS durch Roy et al. 1999 und Palmer et al. 1997 mit der Kapazität von Selbsterneuerung und Differenzierung in astrozytäre Vorläuferzellen und Neurone als Antwort auf Schädigung, ließ auf eine bisher nicht erkannte Plastizitätskapazität des adulten Hirnes schließen. Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass neurale Stammzellen oder frühe gliale Vorläuferzellen möglicherweise die Ziele der Gliomentstehung sein könnten. Diese Zellen sind nicht an den typischen Stellen des Gliomwachstums lokalisiert, sondern in der subventrikulären Zone und im Gyrus dentatus des Hippokampus (Roy et al. 1999, Palmer et al. 1997). Diese Zellen weisen so starke proliferative und migratorische Kapazitäten auf, dass Tumorwachstum an jedem Ort im ZNS entstehen könnte. Es ist vorstellbar, dass die tumorassoziierten Mutationen die migratorische Natur dieser Stammzellen aktivieren und diese die aktivierten Zellen aus der subventrikulären Zone ins Striatum, Septum oder in den Kortex aussenden, genauso wie es bisher in der

Embryogenese und als Antwort auf den experimentell und exogen zugeführten Epidermal Growth Factor in der Maus gesehen worden ist (Craig et al. 1996, Fricker-Gates et al. 2000). Diese prämaligen Zellen können nun in einer aberranten Lokalisation durch die Akkumulation von genetischen Mutationen zu vollständig transformierten malignen Zellen werden und somit möglicherweise zum Gliomwachstum führen (Maher et al. 2001).

Eine weitere Hypothese über die Ursprungszellen besagt, dass eine weitere mögliche Ressource von transformierter Glia in Vorläufer- Astrozyten oder Oligodendrozyten mit den Fähigkeiten von Stammzellen liegen könnte. Diese Zellen können möglicherweise als Antwort auf Mutationen dedifferenzieren (Maher et al. 2001, van Meir et al. 2010).

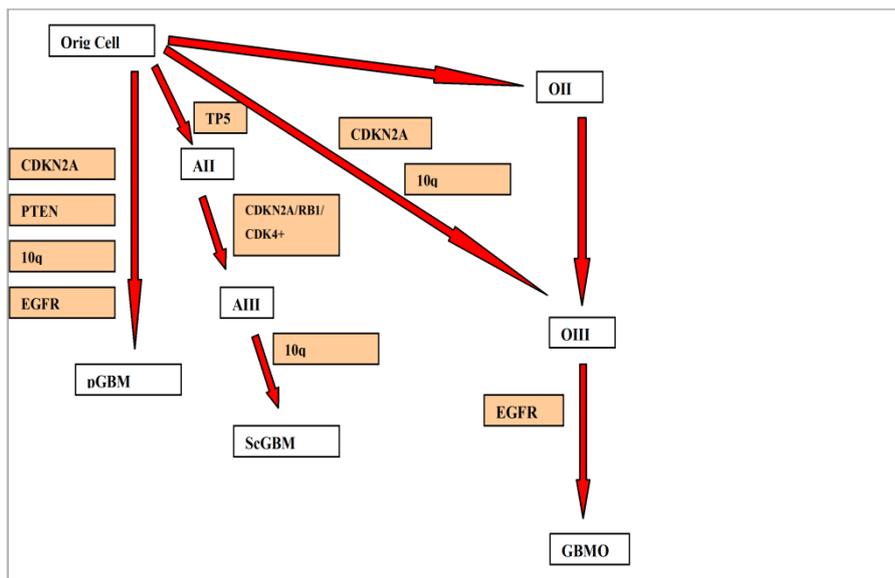


Abbildung 6 Verschiedene Differenzierungsformen der Ursprungszelle durch Mutation

(modifiziert nach Sanson et al. 2004:

Verschiedene Differenzierungsformen der Ursprungszellen durch Mutationen. A steht für Astrozytom, die römischen Zahlen entsprechen den WHO-Graden, pGBM- primäres Glioblastom, ScGBM- sekundäres GBM, O- Oligoastrozytom, GBMO- Oligoastrozytäres GBM)

1.1.2.2 Genetik der Astrozytome und Glioblastome

Die meisten Mutationen in Gliomen findet man in Genen, die den Zellzyklus und Apoptose-Weg regulieren. Die anhaltende Dysregulation von Wachstum, Überleben und Migration suggeriert, dass diese Punkte im Zellzyklus der glialen Entwicklung sehr wichtig sind. Die wichtigsten Mutationen der den Zellzyklus regulierenden Systeme sind die Tyrosin-Kinase Rezeptoren, der TP53-Pathway, der RB-Pathway, PTEN und PI3K/ Akt (Maher et al. 2001, Sanson et al. 2004, Ohgaki et al. 2005/2009, Merlo et al. 2003, Reifenberger et al. 2004, Ichimura et al. 2004).

1.1.3 Spezielle Aspekte der Progression des Astrozytoms zum Glioblastom

Die große Mehrzahl an zytogenetischen und molekulargenetischen Studien an humanen Gliomen hat sich auf die diffus infiltrierenden astrozytären Gliome konzentriert. Diese Studien hatten zum Ergebnis, dass eine Reihe von verschiedenen Chromosomen und Genen regelmäßig in Gliomen alteriert sind. Die Tabelle 4 zeigt eine Übersicht an Gliom-assoziierten Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen.

Tabelle 3 In Gliomen gefundene genetische Alterationen bei einzelnen Gliomgraden, modifiziert nach Sanson et al. 2004

Gen	Lokalisation	Typ.Alterationen	Proteinfunktion	Vorkommen der Alterationen
<i>Tumorsuppressorgene</i>				
TP53	17p13	Mutation	Transkriptionsaktivator, Regulator der Apoptose, Zellzyklusprogression, DNA-Reparatur	Glioblastome (sek.>prim.), Anaplastische Astrozytome
RB1	13q14	Mutation/ Hypermethylierung	Zellzyklusregulation	Glioblastome, Anaplastische Astrozytome
CDKN2A	9p21	Homozygote Deletion	Inhibitor der CDK4/6	Glioblastome
P14ARF	9p21	Hypermethylierung Homozygote Deletion	Inhibitor von MDM2	Glioblastome Anaplastische Astrozytome
PTEN	10q23	Mutation	Protein und Lipidphosphatase, neg.Regulator der PI3K	Glioblastome
<i>Protoonkogene</i>				
EGFR	7p11	Amplifikation/ Überexpression, genom.Rearrangement	Tyrosinkinase-Wachstumsrezeptor	Glioblastome

1.1.3.1 Progression zum anaplastischen Astrozytom

Eine Trisomie/Polysomie des Chromosomes 7 und Mutationen des Genes TP53 finden sich in anaplastischen Astrozyten und diffus infiltrierend wachsenden Astrozytomen. Zusammenfassend zeigen diese Tumore Deletionen der Chromosomen 6, 9p, 11p, 19q und

22q. Die betroffenen Gene auf dem Chromosom 9p sind die Tumorsuppressoren CDKN2A, p14^{ARF} und CDKN2B. CDKN2A und CDKN2B kodieren für negative Regulatoren der Zellzyklusprogression von der G1-Phase in die S-Phase (Produkte p16 INK4A und p15 INK4B), sie inhibieren die Komplexbildung zwischen den D-Typ Cyklinen und den Cyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6. Ein kleiner Anteil der anaplastischen Astrozytome zeigt eine Amplifikation und Überexpression des CDK4 Genes, allerdings ist diese Alteration nur in Tumoren präsentiert, denen eine Deletion oder Mutation der CDKN2A fehlt. Eine weitere Untergruppe von anaplastischen Astrozytomen, denen Abnormalitäten der Gene CDK4 oder CDKN2A fehlen, zeigt Mutationen im Retinoblastom-Gen (Ohgaki et al. 2005/2009, Reifenberger et al. 2004, Ichimura et al. 2004).

Genetische Alterationen, die die Rb-abhängige Zellzykluskontrolle in anaplastischen Astrozytomen beeinflussen, werden begleitet von Deregulationen der TP53-Funktion. Diese Deregulationen entstehen durch TP53-Mutationen, homozygoten Deletionen oder Mutationen des p14 ARF oder MDM2- Amplifikationen.

Im Gegensatz zum Glioblastom werden Mutationen des Tumorsuppressorgenes PTEN auf Chromosom 10q23 in weniger als 10% der anaplastischen Astrozytome gefunden. Sind PTEN-Mutationen in anaplastischen Astrozytomen präsent, so können diese als Indikatoren für eine schlechte Prognose angesehen werden (Reifenberger et al. 2004).

1.1.3.2 Progression zum Glioblastoma multiforme WHO Grad IV

Zytogenetische Analysen von Glioblastomen WHO Grad IV zeigten insgesamt ein Rearrangement des Karyotyps mit zahlreichen numerischen und strukturellen chromosomalen Aberrationen. Doppelsträngige Chromosomen mit /oder gestreckten homozygoten Regionen, als Ausdruck von genetischen Amplifikationen, werden in über der Hälfte der Glioblastome gefunden (Reifenberger et al. 2004).

Grundsätzlich zeigen GBM's immer eine Deletion des Chromosomes 10. Primäre Glioblastome präsentieren zudem fast immer EGFR-Amplifikationen, homozygote Deletionen von CDKN2A oder p14 ARF, CDK4-Mutationen, MDM2 oder MDM4 Amplifikationen, Mutationen /homozygote Deletionen des RB1, eine Monosomie des Chromosomes 10 und PTEN-Mutationen. TP53 Mutationen werden in circa 30% der primären Glioblastome gefunden. Jedoch ist der TP53-Signaltransduktionsweg in über 2/3 der primären Glioblastome verändert, ursächlich können TP53-Mutationen, p14/ARF Alterationen oder MDM2/MDM4-Amplifikationen sein.

Von den sekundären Glioblastomen zeigen mehr als 60% der Tumore eine TP53-Mutation, während Amplifikationen der EGFR, MDM2/MDM4 und des PTEN sehr selten auftreten. Regelmäßig finden sich in sekundären Glioblastomen allelische Verluste der Chromosomen 19q und 13q, eine Hypermethylierung der Promotorregion des Rb1-Genes und PDGFRA Überexpressionen.

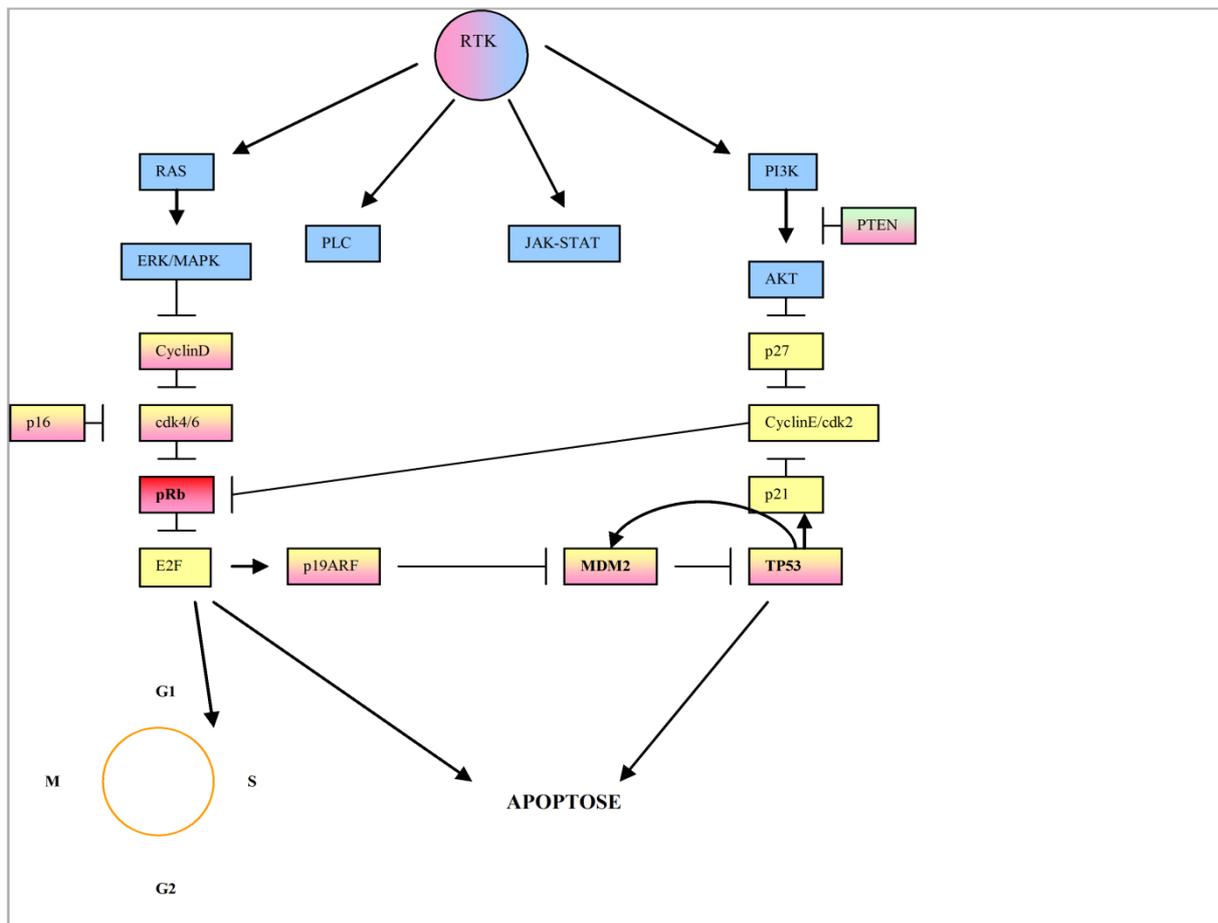


Abbildung 7 Beziehung zwischen den RTK-Pathways und dem Zellzyklus

(modifiziert nach Maher et al. 2001)

Die Abbildung zeigt die Beziehung zwischen den RTK-Pathways und dem Zellzyklus. Die RTK's, aktiviert in Gliomen durch PDGF oder EGF vermitteln ihre Signale durch Ras-Erk/MAPK, PLC-Gamma, Jak-Stat und PI3K- Signaltransduktionswege. Gezeigt wird hier der Einfluss des pRb (rot) in Netzwerk mit Auswirkung auf den Zellzyklus und die Apoptose.)

Diese Daten verdeutlichen, dass primäre und sekundäre Glioblastome unterschiedliche Mutationen aufweisen. Die funktionellen Folgen der unterschiedlichen Mutationen sind sich sehr ähnlich und führen zu den gleichen Alterationen in den Signaltransduktionswegen, wie TP53, pRB1, PTEN/PI3K/AKT und MAPK (Reifenberger et al. 2004, Ohgaki et al. 2005/2009, Ichimura et al. 2004).

1.2 Mikroarray Technik bei malignen Gliomen

Genexpressionsstudien sind besonders wichtig für das Verständnis der Tumorbiologie, da es gerade bei Tumoren durch die Akkumulation und durch Kombinationseffekte von genetischen Abnormalitäten zur Initiation der malignen Progression kommt. Mikroarray-Analysen sind Genexpressionstechnologiestudien. Das Prinzip von ihnen beruht in der globalen Erfassung von Gengruppen mit ähnlichen Expressionsmuster, sowie der Identifizierung von unterschiedlichen und coexprimierten Genen, die auf derselben biologischen Grundlage basieren (Gu et al. 2002, Golub et al. 1999, Clark et al. 2001, Gabig et al. 2001). Ein Array zeigt die Expression von allen potentiell relevanten Genen in einem Gewebe. Bei den in dieser Dissertation durchgeführten Versuchen handelte es sich um Mikroarray-Analysen an Astrozytomen WHO Grad III und WHO Grad IV.

Die meisten Studien verwenden unterschiedliche Array-Genchips, nehmen unterschiedliches Tumorgewebe als Referenz, setzen den Focus auf verschiedene Fragestellungen und nutzen zuletzt unterschiedliche Typen astrozytärer Tumore und auch verschiedene Techniken der Biomathematik und Statistik. In einigen Fällen konnte die histopathologische Klassifikation der WHO anhand der Mikroarrays revidiert werden (Gabig et al. 2001, Golub et al. 1999, Clark et al. 2001, Gu et al. 2002). Frühere Beobachtungen konnten durch die Mikroarrays auf einfache Weise bestätigt werden, es handelt sich dabei um die gesteigerte Expression des VEGF in malignen Graden der Gliome, die Überexpression der Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder um weitere bekannte Gene, welche in Gliomen amplifiziert/überexprimiert vorliegen (Gabig et al. 2001, Golub et al. 1999, Clark et al. 2001, Gu et al. 2002). Es konnte erstmals ein direkter objektiver Vergleich zwischen den einzelnen Gliomgraden vorgenommen werden. Eine Vielzahl an Studien konnte zeigen, dass die mRNA Expression unterschiedlich ist zwischen normalen ZNS-Gewebe und Tumorgewebe, es existieren aber auch beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorgraden. Es konnte bisher gezeigt werden, dass auch genetische Unterschiede in Gruppen mit einheitlicher Histologie bestehen, wie beispielsweise die signifikanten genetischen Unterschiede zwischen primären und sekundären Glioblastomen, sowie in vier genetischen Subtypen der primären Glioblastome, die sich histologisch jedoch nicht zu unterscheiden scheinen (van Meir et al. 2010). Die Ergebnisse zeigten erhebliche Wechsel der Genexpression in diffus infiltrierend wachsenden Astrozytomen. Es ähnelten sich dabei die Expressionsprofile der Astrozytome WHO-Grad II, während bei Glioblastomen sich eine stärkere genetische Heterogenität zeigte (Gabig et al.

2001, Golub et al. 1999, Clark et al. 2001, Gu et al. 2002, Ichimura et al. 2004, van Meir et al. 2010).

Die bisher durchgeführten Mikroarray-Analysen wurden bisher nur genutzt um genetische Unterschiede in Tumoren gleicher Histopathologie hervorzuheben oder um Vergleiche zwischen normalem ZNS-Gewebe, benignen und malignen Gliomen durchzuführen. Es wurde bisher keine Studie veröffentlicht, welche den Vergleich zwischen Astrozytomen WHO-Grad III und Glioblastomen vornahm, um die für die Progression verantwortliche Gene zu identifizieren.

Mikroarrays könnten genutzt werden, um verschiedene Tumortypen zu identifizieren und den Malignitätsgrad automatisch auf der Basis eines Expressionsprofiles festzulegen. Es wäre damit eine Möglichkeit gegeben die Diagnose eines Gliomes zu objektivieren (Ichimura et al. 2004).

Zielsetzung der in dieser durchgeführten Dissertation ist die genetische Analyse der malignen Gliome anhand der Mikroarray-Technologie. Es sollen die für die Progression des anaplastischen Astrozytomes zum Glioblastoma multi forme verantwortlichen Gene identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau und Methodik

Bei den in dieser Dissertation durchgeführten Versuche handelte es sich um Mikroarray-Analysen an Astrozytomen WHO Grad III und WHO Grad IV mit anschließender Validierung durch Real-Time-PCR.

Ein Mikroarray-Experiment kann aufgeteilt werden in 5 Schritte:

1. *Herstellung der Arrays*
2. *RNA-Präparation und Labelling (Farbstoffmarkierung)*
3. *Aufbringen der RNA/ cDNA auf das Array, Durchführung der Hybridisierung und Scannen*
4. *Datenanalyse*
5. *Troubleshooting und Validierung*

Es können zwei Haupttypen von Arrays unterschieden werden, Oligonukleotid-Arrays und Arrays mit PCR-Produkten. Eine dritte Art, das Proteinarray, befindet sich in der Entwicklung (Gabig et al. 2001, Su et al. 2003, Clark et al. 2001). Eine vierte Art von Arrays sind Matrix CGH-Chips zur Analyse der DNA-Strukturen hinsichtlich Deletionen und Amplifikationen von einzelnen DNA-Abschnitten (Holzmann et. al. 2006).

2.1.1 Aufbau und Arten der Mikroarray-Genchips

Ein Mikroarray besteht aus cDNA/ Oligonukleotidsequenzen Tausender von Genen, die auf Glas, Nylon oder Plastikmaterial in Duplikatur und in Form von Spots fest angeordnet vorliegen. Bei den Oligonukleotid-Arrays liegen in situ synthetisierte Oligonukleotide vor (10^7 pro Spot), sie werden durch Photolithographie aufgebracht. Bei den Arrays mit PCR-Produkten werden diese per Roboter auf eine feste Oberfläche gebracht (Southern et al. 1999). Das hier benutzte Microarray enthält ca. Strangfragmente mit einer Länge von rund 80 Basen. Die Sequenz der Fragmente wurde dabei so gewählt, dass sie nur geringe Homologien untereinander aufweisen, so werden sich überkreuzende Hybridisationen mit den aus den Geweben hergestellten cDNA's vermieden. Die Länge von 80 Basen je cDNA-Fragment

gewährleistet die Kombination einer hohen Hybridisierungseffizienz mit der Möglichkeit zwischen homologen Genen zu unterscheiden. Für die Konstruktion von human-spezifischen Arrays verwendet man Gendatenbanken für die Auswahl und spätere Identifizierung der Sequenzen. Sie sind eine wichtige Ressource für die Sequenz von gut charakterisierten Genen. Zudem eignen sie sich perfekt für die Aufteilung von Klonsequenzen in nicht-redundante aber funktionelle Sets.

Die gewünschten Klone oder PCR-Produkte werden in verschiedenen Lösungen anschließend geprintet, dh. ein Roboter ordnet sie fest charakterisierten Spots zu und bringt sie auf das Trägermaterial. Die Spots selber sind in Form eines Gitters angeordnet.

Nach dem Printen erfolgt eine UV-Bestrahlung, es bilden sich DNA-Dithymine an der Aminogruppe des Klones/ PCR-Produktes, sie dienen als Stütze an der Oberfläche des Trägermaterials. In einem letzten Schritt erfolgt die Denaturierung der cDNA durch Hitze oder Alkalibehandlung. Damit gewährleistet werden kann, dass bis zum Gebrauch des Array Chip weiterhin Einzelstrang-cDNA vorliegt, wird die denaturierte cDNA einer Fixierung durch 20°C kalten Ethanol unterzogen.

2.1.2 Prinzipien der Durchführung von Mikroarray-Analysen

Für Mikroarrayanalysen wird aus dem interessierenden biologischen Gewebe, wie Zellkulturen oder Gewebebiopsien der zelluläre mRNA-Pool präpariert. Dieser entspricht den Transkriptionsaktivitäten des Gewebes zu bestimmten Zeiten und unter bestimmten Umständen. Er spiegelt den Ist-Zustand der Zellen wider. Von jeder dieser mRNA's wird durch Reverse Transkription eine Einzelstrang-cDNA-Kopie hergestellt.

Die für die cDNA eingesetzten Nukleotide weisen eine Besonderheit auf, sie sind mit Amino-Allylgruppen modifiziert. An diese Amino-Allylgruppen binden nach ihrer Inkorporation in den cDNA-Einzelstrang, die Farbstoffe Cy3 und Cy5. Diese Farbstoffe sind fluoreszierende Cyaninfarbstoffe.

Es kann zur Arrayanalyse die totale zelluläre RNA eingesetzt werden. Bei zu geringen RNA-Mengen kann eine PCR mit anschließender In-vitro-Transkription zwischengeschaltet werden.

Diese markierte cDNA wird gemeinsam mit der cDNA einer Referenz, gegen die das Gewebe verglichen werden soll, zur Hybridisierung mit den Zellklonen auf das Array gebracht.

Die Hybridisierung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten cDNA wird mit einem Laserscanner visualisiert, er erfasst ihre Emissionen bei farbstoffspezifischen, relevanten

Wellenlängen. Es ist eine Zwei-Kanal-Auswertung, die keine Sequenzinformationen liefert. Das Signal und dessen Intensität hingegen, ausgehend vom Fluoreszenzfarbstoff, ergibt die Anzahl der Moleküle die an dem PCR-Produkt gebunden haben und führt gleichzeitig zu ihrer Identifizierung, da die Klone/PCR-Produkte in dem Spot, dem sie sich angelagert haben, bekannt sind.

2.1.3 Auswertung der Mikroarray-Analysen

In der sich anschließenden Image- und Datenanalyse werden über bestimmte Softwarepakete die korrekte Identifizierung der Spots und die Berechnung der Backgroundsignale vorgenommen.

Dieses Backgroundsignal wird über bestimmte Algorithmen, die die Größe, Form und Position der Spots berücksichtigen und den lokalen Background in der Umgebung eines jeden Spots berechnen, abgezogen. Durch diese Software wird es möglich die getrennt erfassten Kanäle für Cy3 und Cy5, die jeweils für Probe und Referenz stehen, übereinander zu legen und den gemeinsamen Background zu berechnen.

In einem weiteren Schritte erfolgt nun der Abgleich der Daten zueinander. Als Ergebnis produziert diese Software einen Output der absoluten Expression bzw. erlaubt die Berechnung von Genratios (getestete Probe im Vergleich zur Referenz). Über diese Genratios kann auch der Vergleich zu vorausgegangenen Mikroarrayanalysen vorgenommen werden.

Zur weiteren Auswertung können hierarchische Cluster erstellt werden. Anhand dieser Cluster kann festgestellt werden, dass Gene mit ähnlichem Expressionsmuster oft coreguliert oder funktionell miteinander verbunden sind. Dies erleichtert die Identifizierung von funktionellen Gengruppen. Diese hierarchischen Cluster können aber auch nach anderen Kriterien, wie Funktionalität erstellt werden (Gabig et al. 2001, Golub et al. 1999, Clark et al. 2001, Gu et al. 2002).

2.1.4 Validierung der Mikroarray-Ergebnisse

In einem letzten Schritt erfolgt neben dem Troubleshooting, die Validierung der Ergebnisse durch Methoden wie der Real-Time PCR.

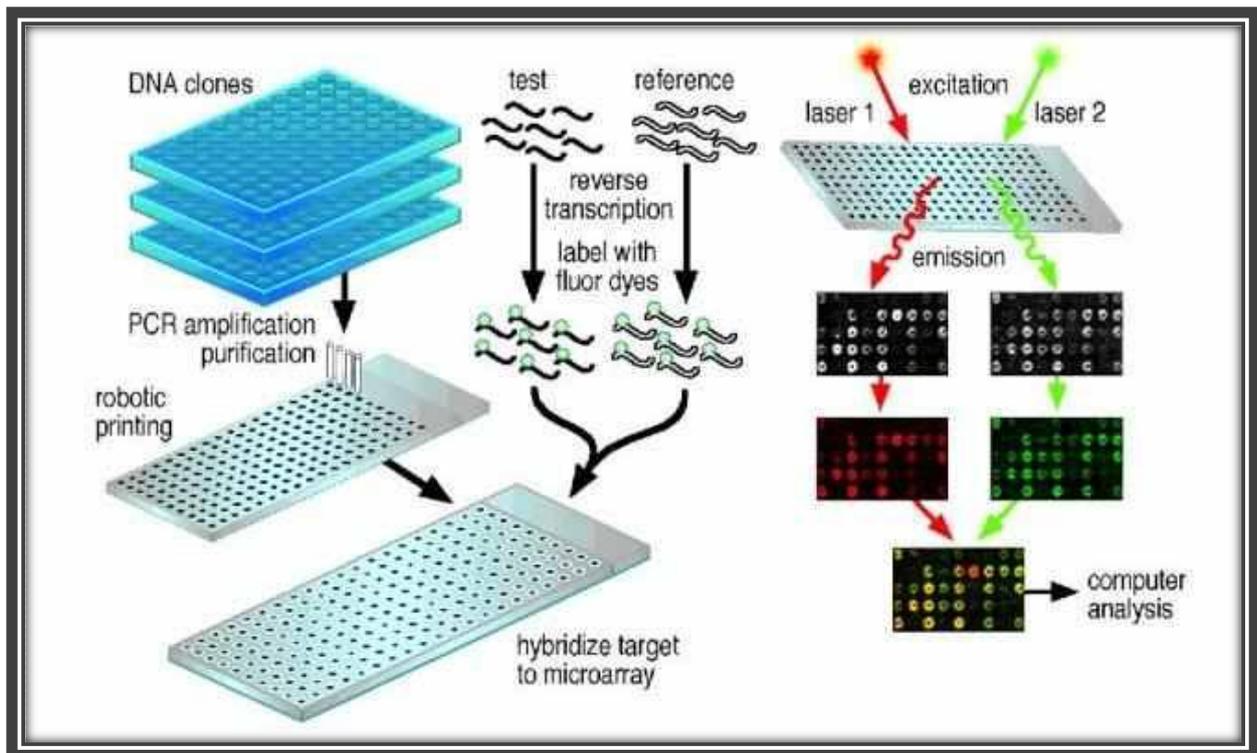


Abbildung 8 Durchführung und Auswertung von Mikroarray-Analysen

Siehe im Text Aufbau, Durchführung und Auswertung von Mikroarray-Analysen exemplarisch (www.240.eng.nci.edu 2012)

Real-Time und RT-PCR Technik

Mikroarrays erlauben die Analyse tausender Gene in zwei unterschiedlich markierten RNA-Populationen, während Real-Time PCR dasselbe Ausmaß an Genexpressionen in vielen verschiedenen Proben erlaubt zu erfassen, jedoch nur an einer begrenzten Zahl von Genen. Sie ist insbesondere anwendbar, wenn nur eine kleine Anzahl von Zellen vorhanden ist (Vandesompele et al. 2002).

Real-Time PCR erlauben eine akkurate Quantifikation der Ausgangsexpression von DNA, cDNA und RNA Zielen. PCR-Produkte können detektiert werden, indem Fluoreszenzfarbstoffe entweder an Doppelstrang DNA binden oder mit Fluoreszenz markierte Sequenz-spezifische Proben eingesetzt werden.

2.2 Chemikalien und Lösungen

2.2.1 Chemikalien/ Kits

Es wurden folgende Kits verwendet

Qiagen: RNeasy Lipid Tissue KIT Cat.No. 74804
Ambion: Message Amp aRNA Kit Cat.No.RPN5660
Amersham: CyScript Post-Labeling Kit Cat.No.1751
Qiagen: PCR-Purifikationskit Cat.No. 28104
Qiagen: Omniscript RT-Kit Cat.No.205110
Qiagen: PCR Core Kit Cat.No.201223
Qiagen: SYBR Green DNA PCR-Kit Cat.No.204143

Sigma-Aldrich: Genspezifische Primer

β-Actin forward: 5'CAT TGC CGA CAG GAT GCA 3'
β-Actin reverse: 5'CCG ATC CAC ACG GAG TAC 3'

GAPDH forward: 5'CTC CTC CAC CTT TGA CGC TG 3'
GAPDH reverse: 5'ACC ACC CTG TTG CTG TAG CC 3'

IL13RA2 forward: 5'GGC TGT ACT TCA TCT TCA G 3'
IL13RA2 reverse: 5'AAT GAT CCA GAG ACA GTG G 3'

OLIG2forward: 5'CGT CGT CCA CCA AGA AGG AC 3'
OLIG2reverse: 5'TGT GCC TAC GGC ATG ACC TC 3'

RAB34 forward: 5'AGG AAG GAG GCC GCT TTG CA 3'
RAB34 reverse: 5'CAA GTC TTC CCC ACC GAC AC 3'

2.2.2 Lösungen

Chloroform 70%

Ethanol 70%

Ethanol 99,999%

DEPC- Wasser (Wasser behandelt mit Diethyl-Pyrocbonat)

2.3 Genprodukte

Microarrayslides der Microarray Unit des Institutes für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg: Serie B091101.

Sigma-Aldrich: Genspezifische Primer.

Sequenzierung ausgewählter Mikroarray-Klone durch SeqLab, Göttingen.

2.4 Materialgewinnung/ Histologien

2.4.1 Materialgewinnung

Die verwendeten Tumorproben stammten von einem Kollektiv von 24 Patienten im Alter von 6-70 Jahren. Histologisch entsprachen die in dieser Studie aufgenommenen Tumore anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen. Die Glioblastome wurden zusätzlich noch je nach Entstehungsart unterteilt in primäre und sekundäre Tumore, sowie in Rezidive. Bei den primären Glioblastomen handelt es sich um de-novo Entstehungen, bei sekundären Glioblastomen um die Progression eines niedergradigen Astrozytoms und bei den Rezidiven um mit Chemotherapie und Radiatio vorbehandelte Glioblastome.

Als Referenz diente ein pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I, welches jedoch bei allen Berechnungen der Expressionstärke einzelner Gene mathematisch eliminiert wurde. Diese untersuchten Tumorproben wurden sofort nach ihrer operativen Entnahme in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Eine Einverständniserklärung zur weiteren Forschung wurde damals von den Patienten (projektunabhängig) in den Jahren 2002-2005 eingeholt.

2.4.2 Histologien

Tabelle 4 Probenzuordnungen – Anonymisierung der Proben

Proben-ID	Histologie
08/03, 36/03, 29/03, 04/03, 01/03, 35/03, 124/02, 64/02, 37/02, 83/02	Primäre Glioblastoma multiforme
37/03, 03/02, 75/03, 21/03, 63/02, 36/02, 69/03, 65/03, 96/03, 137/03	Anaplastische Astrozytome WHO III°
80/02	Pilozytisches Astrozytom – Referenz

2.5 Durchführung der Mikroarray-Analysen

2.5.1 RNA-Präparation und Markierung

2.5.1.1 RNA-Isolierung

Verwendet wurde das RNeasy Lipid Tissue Kit der Firma Qiagen. Es wurde nach dem von Qiagen empfohlenen Protokoll 2002 vorgegangen. Zunächst musste die gesamte zelluläre RNA, aus den für die Studie gewählten Astrozytomen, extrahiert werden. Damit die gesamte zelluläre RNA aus dem Gewebe gewonnen werden konnte, wurde eine Zellyse vorgenommen. Anschließend folgten eine Aufreinigung der RNA, sowie eine Quantitäts- und Qualitätsüberprüfung dieser gewonnenen RNA.

Zellyse

Grundvoraussetzungen für einen effizienten RNA-Gewinn waren einerseits Zellyse/Aufschluss und andererseits Homogenisation. Bei der Zellyse handelte es sich um den Aufschluss von Zellwänden und Zell-/Organellenmembranen, es wurde dadurch die gesamte RNA aus den Tumorzellen freigesetzt (Biochemie Löffler/Petrides 2000, Qiagen lipid Tissue Kit Handbook 2002). Durch die sich anschließende Homogenisation wurde die Viskosität des Zellysates, das nach dem Aufschluss vorlag, reduziert. Bei der Homogenisation wurden die DNA und andere hochmolekulare Zellbestandteile geschert, man erhielt ein homogenes Lysat (Qiagen lipid Tissue Kit Handbook 2002).

Das biologische Ausgangsmaterial, in diesem Fall Gliome, wurden zunächst in einem stark denaturierenden Guanidinthiocyanat enthaltenen Puffer (Qiazol) für 20-40 Sekunden homogenisiert. Durch diesen Puffer erfolgte zunächst die Zellyse (Biochemie Löffler/Petrides 2001, Qiagen lipid Tissue Kit Handbook 2002).

Dieser Puffer ermöglichte gleichzeitig eine Immobilisation von RNasen und gewährte somit eine optimalere Isolierung der RNA. Die Homogenisierung wurde in einem Glasgefäß mit eingepassten Teflonstempel durchgeführt. Durch das Hineinpressen des Gewebes in den kapillären Spalt wurden die Zellen durch die auftretenden Scherkräfte fragmentiert, kleinere zelluläre Partikel wie Zellkerne wurden hierbei jedoch unversehrt gelassen (Biochemie Löffler/Petrides, Qiagen lipid Tissue Kit Handbook). Die Proben mussten nach der Fragmentation für 2- 3 Minuten sedimentieren. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte sedimentierten die im Homogenisat suspendierten Partikel unterschiedlich schnell. Es erfolgte so eine gröbere Abtrennung der Nukleinsäuren von den Proteinen. Anschließend wurde eine Chloroformextraktion zur RNA und Proteinauftrennung durchgeführt.

Phasentrennung und Aufreinigung

Es folgte eine Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4°C für 15 Minuten durchgeführt, um die endgültige Phasenauftrennung zu erreichen. Die Partikel verteilten sich ihrer Dichte entsprechend in 3 Phasen:

Die oberste Phase hatte ein wässriges Aussehen und enthielt die gewünschte RNA, es folgte eine zweite weiße Phase, die sogenannte Interphase, welche die zelluläre DNA enthielt und abschließend fand sich eine unterste rote Phase, welche aus organischen Substanzen, wie Proteine bestand.

Bei sehr fettreichem Gewebe konnte gelegentlich auch eine vierte fetthaltige Phase auftreten.

Die obere, wässrige RNA-haltige Phase wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, ihr Volumen betrug durchschnittlich 600 µl. Zur möglichst suffizienten RNA-Aufreinigung über Säulen, wurde im Verhältnis 1:1 Ethanol 70% zu der Probe gegeben. Ethanol sollte die Bindungseigenschaften der RNA an den Filtern der Säulen erhöhen (Qiagen Lipid Tissue Kit Handbook 2002). Die Filter der Säulen waren Silicagelmembranen, die die Bindung von bis zu 100 µg gesamter zellulärer RNA ermöglichten. Auf diese Säulen wurden die Proben einzeln pipettiert, die in der wässrigen Phase enthaltene RNA band aufgrund des Ethanol an die Filter und die anderen noch in der Probe enthaltenen Kontaminanten wurden mit 700 µl und Puffer aus dem Kit in einzelnen Schritten ausgewaschen. In einem letzten Schritt erfolgte die Eluierung von qualitativ hochwertiger RNA mit 2x 30 µl RNase freiem Wasser.

Bei der eluierten RNA handelte es sich um Fragmente mit mehr als 200 Basen. RNA mit weniger als 200 Basen, wie 5.8 s rRNA, 5s rRNA und tRNA, die in einer Zelle circa 15- 20% der gesamten RNA ausmachen, wurde von den Gelmembranen der Filter nicht zurückgehalten und somit mit den anderen sich in der Probe befindlichen Kontaminanten ausgewaschen (Qiagen Lipid Tissue Kit Handbook 2002).

Quantitätsüberprüfung der RNA

Zur Quantitätsüberprüfung der RNA wurde eine OD-Messung durchgeführt. Hierbei wird die Absorption der RNA über ein Spektrometer bei 260 nm und 280 nm erfasst. OD: 260nm-1 und einem RNA-Gehalt von 44µg/ml. Bei reiner RNA lag das Verhältnis OD 260/280 bei 1,9-2,1.

Zur OD-Messung wurden 5 µl der mit 60 µl RNase freiem Wasser isolierten RNA, verdünnt mit 95µl Wasser verwendet. Als Leerwert zur Kalibrierung wurden 5 µl RNA Elution Solution in einer Verdünnung von 1:20 verwendet. Gemessen wurde zweimal die Absorption

bei 260 nm. Der daraus gewonnene Mittelwert war die Grundlage für die Berechnung der isolierten RNA-Menge und diente gleichzeitig zur Berechnung der Ratio von 260 nm/280 nm.

OD-Berechnung:

OD-Wert x 40 x Verdünnungsfaktor = $\mu\text{g/ml}$ gesamte RNA : 1000 = $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gesamte RNA
 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gesamte RNA x Eluatmenge = μg gesamte RNA in der Probe

Berechnung der OD-Ratio:

Mittelwert 260 nm / 280 nm

Norm: 1.9- 2.1

Nach erfolgter OD-Messung schloss sich die Fällung der gesamten zellulären RNA an. Es wurde dem Volumen der Proben entsprechend 1 Volumen Ammoniumacetat (Konzentration 5 mol/l) und 4 Volumen Ethanol (Konzentration 100%) zu den Proben pipettiert. Diese wurden dann bei -80°C für mindestens 4 Stunden gefällt.

2.5.1.2 Amplifikation

Zur Amplifikation wurde das Message Amp aRNA Kit der Firma Ambion verwendet.

Es wurde ebenfalls nach dem empfohlenen Protokoll 2002 der Firma vorgegangen. Im Juli 2003 nahm Ambion einige Veränderungen in diesem Protokoll vor. Diese Veränderungen wurden ebenfalls auf die Versuche übertragen und werden in dieser Dissertation explizit hervorgehoben.

Die aus den Tumorproben präparierte gesamte zelluläre RNA war quantitativ zu gering um sie direkt der Methode des indirekten Labeln zu unterziehen, deshalb wurde im Versuchsablauf eine Amplifikation zwischengeschaltet.

Der Sinn einer Amplifikation liegt darin, aus einer zu geringen Menge gesamter zellulärer RNA eine genügend große Anzahl von Kopien dieser RNA zu gewinnen. Da mRNA bereits im Gewebe gespleißt wurde und damit keine Exons mehr besitzt, konnte man über sie direkt Aufschlüsse über die relevanten Transkriptionsprodukte in diesem Gewebe ziehen.

Prinzip der Amplifikation

Zunächst wurde die mRNA in Einzelstrang cDNA umgewandelt. Primer war, da es sich um gesamte zelluläre RNA handelte, ein Oligo(dT)Primer. Dieser Primer bindet an den Poly-A-Schwanz der mRNA und startet hier die Synthese einer der RNA komplementären single

strand cDNA mit T₇-Promotor. Dieser T₇- Promotor ist für die spätere RNA-Synthese essentiell, da an ihm die T₇ RNA-Polymerase bindet.

Nachdem von jeder RNA-Vorlage eine cDNA-Kopie erstellt worden war, erfolgte an diesen cDNA-Einzelsträngen die Doppelstrangsynthese. An der nun vorliegenden cDNA verlief anschließend die In-vitro-Transkription mit einer T₇-RNA-Polymerase, die hunderte bis tausende von antisense RNA-Kopien herstellte, die ihrerseits direkte Kopien der aus dem Gewebe isolierten totalen zellulären RNA waren.

Die zum Schluss erfolgte Aufreinigung der amplifizierten RNA wurde über Filter durchgeführt und diente dem Entfernen von nicht inkorporierten Nukleotriphosphaten, Salzen, Enzymen und anorganischen Phosphaten.

Durchführung der Amplifikation

Als Ausgangsmaterial wurden zur Amplifikation 1000 ng amplifizierte RNA, gelöst in 11 µl DEPC-Wasser (DEPC ist ein Reagenz durch das die im Wasser enthaltenen RNasen inaktiviert wurden, dieses Wasser wurde anschließend noch autoklaviert) eingesetzt.

cDNA-Synthese

Für die first strand cDNA-Synthese wurde zu jeder Probe 1 µl Oligo(dT) Primer pipettiert. Dieser lagerte sich in einer zehnminütigen Inkubation bei 70°C dem Poly-A-Schwanz der RNA an. Parallel zur Inkubation musste ein Master Mix mit den Komponenten für die Amplifikation in 5% Überschuss angesetzt werden. Er umfasste je Probe 2 µl 10x First Strand Buffer, 1 µl Ribonucleaseinhibitor, 4 µl dNTP Mix. Es wurde der Master Mix direkt eisgekühlt auf die Proben gegeben. Zuletzt wurden auf jede Probe 1 µl der Reversen Transkriptase pipettiert und alles bei 42°C für 2 Stunden inkubiert.

In der sich nach vollendeter first strand cDNA-Synthese anschließenden second strand cDNA-Synthese wurden 63 µl nucleasefreies Wasser, 10 µl 10x second strand Puffer, 4 µl dNTP-Mix, 2 µl DNA-Polymerase und 1 µl RNaseH auf jede Probe gegeben. Es folgte wieder eine zweistündige Inkubation, allerdings diesmal bei 16°C.

Nach Beendigung der Inkubation wurde eine cDNA-Aufreinigung über spezielle Filter mit 350 µl Binding Puffer und 500 µl cDNA-Waschpuffer notwendig. Der Binding Puffer diente dem besseren Binden der cDNA an den Filter, während mit dem Waschpuffer das selektive Entfernen von RNA-Fragmenten, Primern, Enzymen und Salzen durch die Poren an den Filtern erleichtert wurde (Amersham Message Amp a RNA Kit Handbook 2002). Die an dem

Filter gebundene doppelsträngige cDNA wurde eluiert und anschließend in einer Vakuumentrifuge auf 8 µl konzentriert.

In-vitro-Transkription/aRNA-Synthese

Als nächstes folgte die In-vitro-Transkription. Es wurden auf jede 8 µl Probe je 2 µl ATP, 2 µl CTP, 2 µl GTP, 2 µl UTP, 2 µl Reaktionspuffer und 2 µl Enzymmix einzeln pipettiert.

Es erfolgte zunächst eine Inkubation von 6- 14 Stunden bei 37°C. Während dieser Inkubation erfolgte die Bildung von antisense RNA-Kopien von den denaturierten cDNA-Strängen (Amersham Message Amp a RNA Kit Handbook). Diese Inkubation wurde primär über Nacht durchgeführt.

Die In-vitro-Transkription wurde durch die Zugabe von 2 µl DNase I und einer anschließenden dreißigminütigen Inkubation bei 37°C gestoppt. Diese DNase I fragmentierte die als Vorlagen für die Herstellung der aRNA dienende cDNA.

Zur aRNA-Aufreinigung wurde der Filter zunächst mit 160 µl Binding Puffer vorbehandelt. Gleichzeitig wurden zu jeder Probe 78 µl auf 50°C vorgewärmte Elution Solution, 350µl aRNA-Binding Puffer und 250 µl Ethanol 100% pipettiert. Diese Vorbehandlung der Proben und der Filter sollte garantieren, dass möglichst viele aRNA-Moleküle an den Filter banden und während des Waschens mit 650 µl aRNA Waschpuffer auch gebunden blieben, während fragmentierte cDNA, Enzyme, Salze und freie Nukleotide nicht vom Filter zurückgehalten und somit selektiv ausgespült wurden. Anschließend musste die aRNA mit auf 50°C vorgewärmter aRNA Elution Solution wieder eluiert werden.

Quantitätsüberprüfung der aRNA

Zur Quantitätsüberprüfung der antisense RNA wurde wieder eine OD-Messung durchgeführt (siehe Kap. 2.4.1.1). Nach der OD-Messung erfolgte wieder eine Fällung der aRNA. Zur Fällung wurde, dem Volumen der Proben entsprechend (Probenvolumen 95 µl), 1 Volumen Ammoniumacetat und 4 Volumen Ethanol 100% zu den Proben gegeben. Diese wurden anschließend bei -80°C für mindestens eine Stunde gefroren.

2.5.1.3 Markierung

Bei der Markierung wird eine Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der zu untersuchenden Probe für ein Dual-Colour-Microarray vorgenommen. Ausgangspunkt ist die aus dem Gewebe gewonnene gesamte zelluläre RNA oder bei zu geringen Mengen gesamter zellulärer RNA, die in der In-vitro-Transkription gewonnene antisense RNA.

Es sind zwei Methoden des Markierens beschrieben, das direkte und das indirekte Markieren (Amersham CyScript Post-Labeling Kit 2003). Beiden Methoden ist der erste Schritt gemeinsam, das Umschreiben der RNA in cDNA. Dieser Schritt ist notwendig, damit eine Hybridisierung mit den cDNA-Klonen/ Produkten auf dem Microarrayslide erfolgen kann. Der Unterschied zwischen indirekten und direkten Markierens liegt in der Markierung der cDNA mit Fluoreszenzfarbstoff.

Prinzip und Durchführung des indirekten Markierens

Das Prinzip des indirekten Markierens ist ein Zwei-Stufen-Prozess und beruht darauf, dass während der cDNA-Synthese in den cDNA-Strang Amino-Allyl modifizierte Nukleotriphosphate inkorporiert werden. In einem zweiten Schritt bindet der Farbstoff, ein CyDye-NHS-Ester, an die Amino-Allylgruppen, der bereits in den cDNA-Strang integrierten modifizierten Nukleotriphosphate. Die mit Amino-Allyl modifizierte Nukleotriphosphate werden mit derselben Effizienz in den entstehenden cDNA-Einzelstrang eingebaut werden wie unmodifizierte Nukleotriphosphate. Wohingegen bereits mit Farbstoff markierte Nukleotriphosphate eine wesentlich geringere Einbaurate in den cDNA-Strang aufweisen (Amersham CyScript Post-Labeling Kit 2003). Verwendet wurde das CyScript Postlabelling Kit der Firma Amersham Bioscience.

Reverse Transkription

Für das indirekte Markieren wurden 2-4 µg antisense RNA gelöst in 9 µl Wasser eingesetzt. Es wurde antisense RNA verwendet, da die erforderliche Menge an totaler zellulärer RNA, 30-50 µg gelöst in 8 µl Wasser, nicht in ausreichender Menge aus dem zu untersuchenden Gewebe gewonnen werden konnte.

Für die Einzelstrang cDNA-Synthese wurde ein Randomprimer verwendet. Zur optimalen Primeranlagerung wurden die Proben für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Diese Inkubation diente der Denaturierung der antisense-RNA. Anschließend folgte eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur, sie diente der eigentlichen Primeranlagerung an die denaturierten RNA-Stränge. Nach Beendigung dieser Inkubationen erfolgte die cDNA-Synthese durch Reverse Transkription. Sie beinhaltet zugleich die Inkorporation der Amino-Allyl modifizierten Nukleotriphosphate. Zur cDNA-Synthese wurde wieder ein Master Mix mit 5% Überschuss angesetzt. Dieser Mix setzte sich je Probe zusammen aus 4 µl 5xCyScript Puffer, 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl 20xdNTP Mix, 1 µl aaadUTP und 1 µl Reverser Transkriptase. Das 0.1 molare DTT im Ansatz diente der Verhinderung von Oxidationen (Amersham

CyScript Post-Labeling Kit 2003). Die Reverse Transkription erfolgte bei 42°C 1,5 Stunden lang.

Nach Beendigung der Inkubation wurde die Reverse Transkription durch die Zugabe von 2 µl 2,5 M NaOH gestoppt. Durch die Natronlauge lag in der Probe ein basisches Milieu vor und die RNA, welche Hybride mit den neu synthetisierten cDNA-Strängen bildete, wurde innerhalb von 15 Minuten bei 37°C in kurze Oligomere degradiert. Zur Neutralisierung des basischen Milieus nach der RNA-Degradation gab man 10 µl Hepes hinzu.

Aufreinigung

Es lagen nun Einzelstrang cDNA-Moleküle mit degradierter RNA und Enzymen in den Proben vor, da jedoch nur die cDNA für die Microarrayhybridisierung benötigt wurde, schloss sich eine Aufreinigung der cDNA mit dem PCR-Purifikationskit von Qiagen an.

Die Aufreinigung erfolgte über Qiaquick-Säulen mit 160 µl Binding Puffer und 1150 µl Waschpuffer, die Eluierung der an den Filter gebundenen cDNA erfolgte mit zweimal 30 µl DEPC-Wasser, das mit NaOH auf einen pH-Wert von 8-9 eingestellt war (5 µl 1M NaOH auf 4 ml Wasser). Die Aufreinigung der Einzelstrang cDNA-Moleküle war notwendig, um vor allem die kurzen RNA-Oligomere zu entfernen und damit unspezifischen Hybridisationen der komplementären RNA mit den Einzelstrang cDNA-Molekülen der Probe, aber auch besonders um unspezifische Hybridisationen mit den cDNA-Klonen /Produkten der Slides zu verhindern. Die eluierte Probe wurde in der Speed vac auf 15 µl konzentriert.

Farbstoffmarkierung

Nach der Ankonzentrierung der Proben auf 15 µl mussten die Fluoreszenzfarbstoffe in 15 µl 0,1M NaHCO₃ mit einem pH-Wert von 9 gelöst werden. Bei diesen Farbstoffen handelt es sich um CyDye 5, der ein blauer Fluoreszenzfarbstoff ist, und um CyDye 3, der ein roter Fluoreszenzfarbstoff ist. CyDye stand für Fluorescent Dyes, dies sind Farbstoffe auf der Basis von Cyaninfluoren. Diese Farbstoffe weisen nur eine reagierende Gruppe im Molekül auf, die an die Amino-Allylgruppe der Nukleotriphosphate im cDNA-Einzelstrang bindet (Amersham CyScript Post-Labeling Kit 2003).

Diese gelösten Farbstoffe wurden zu den 15 µl Probe pipettiert. In der Regel wurde mit Cy3 die Referenz und mit Cy5 die zu analysierende Tumorprobe markiert. Es folgte eine Inkubation von 1 Stunde im Dunkeln, während dieser Zeit banden die CyDyes an die Amino-Allylgruppen der cDNA-Einzelstränge. Die Inkubation musste wie alle weiteren Schritte im Dunkeln durchgeführt werden, da die Fluoreszenzfarbstoffe bei Licht kontinuierlich durch Zerfallsreaktionen an Signalintensität verloren. Es konnten circa 100-170 pmol CyDye in die

cDNA in einer Standardlabelreaktion, mit einem Einsatz von 0,5 µg aRNA, in den cDNA-Strang inkorporiert werden. Da jedoch nicht die gesamte cDNA CyDye band und somit ein Teil der cDNA verloren gehen konnte, hatte man die Option die Inkorporation von Cy3 und Cy5 an die Amino-Allyl modifizierte cDNA mit einem UV-visible-Spektroskop zu detektieren. Hierzu sollte die markierte cDNA in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Cy3 hatte ein Absorptionsmaximum von 550 nm und Cy5 ein Absorptionsmaximum bei 650 nm (Amersham CyScript Post-Labeling Kit 2003).

Parallel zu der einstündigen Inkubation der Proben wurden die Microarrayslides für die Hybridisierung mit Blocking Reagenz für 20min bei 50°C inkubiert und anschließend für drei Minuten mit Wasser gespült und für 3 Minuten bei 1500 rpm trocken zentrifugiert.

Nach Beendigung der einstündigen Inkubation wurde die Kopplungsreaktion der CyDye NHS-Ester an die Amino-Allylgruppen der cDNA-Einzelstränge durch die Zugabe von 15 µl 4M Hydroxylamin gestoppt. Anschließend wurden die Tumorprobe, mit Cy5 markiert, und die mit Cy3 markierte Referenz zusammengeführt. Wegen dieser Zusammenführung musste die Kopplungsreaktion gestoppt werden. Es folgte nun eine Aufreinigung über Qiaquick-Säulen mit 450 µl Binding Puffer, er diente dem Binden der cDNA an dem Filter, und das Auswaschen freien Farbstoffes mit 1150 µl Waschpuffer.

Im Verlauf der Experimente wurde an dieser Stelle die Kopplungsreaktion der NHS-Ester an die Amino-Allylgruppen nicht mehr mit Hydroxylamin gestoppt und beide Proben auch nicht vor ihrer Aufreinigung vereint, sondern vielmehr wurde nun die Kopplungsreaktion durch das Pipettieren einer Probe auf den mit 300 µl Binding Puffer vorbehandelten Filter gestoppt. Im Allgemeinen wurde die Referenz zuerst auf den Filter pipettiert und erst dann wurde durch das Hinzupipettieren der Probe auf den Filter beide, Probe und Referenz, in einem Ansatz vereint.

Über die Säulen wurden effizient Fragmente, die kleiner als 50 Basen waren, sowie freies CyDye entfernt. Durch diese Aufreinigung ging auch einiges an cDNA Material verloren, es wurden jedoch mehr als 50% der markierten cDNA zurückgehalten. Die Entfernung von freiem, ungebundenen CyDye war nötig, um den späteren Hybridisierungshintergrund zu minimieren und so die Sensitivität für die Detektion von schwachen Hybridisierungssignalen zu gewährleisten. Eluiert wurde die nun mit Fluoreszenzfarbstoff markierte cDNA mit zweimal 30 µl DEPC-Wasser, das einen pH-Wert von 8-9 aufwies.

Weiterbehandlung der markierten cDNA

Zu der eluierten cDNA wurden 20µg Cot1 DNA (Konzentration 1mg/ml) und 4µl Poly A (Konzentration 5 µg/µl). Bei der Cot1 DNA handelte es sich um humane DNA, die aus Plazenta extrahiert wurde. Es war reich an repetitiven Sequenzen. Es wurde zur Hintergrundminimierung eingesetzt, da es unspezifische Hybridisierungen auf den Microarrayslides verhinderte. Poly A band an die Oligo(dT) Schwänze der cDNA-Einzelstränge und sollte so ebenfalls unspezifische Hybridisationen auf den Slides verhindern. Die Proben, deren Volumen nun 74 µl betrug, wurden wieder in der Speed vac auf 26 µl konzentriert. Anschließend wurden 10 µl 20xSSC und 4 µl 2%SDS auf jede Probe pipettiert.

2.5.2 Beladung der Array-Chips

Die Microarrayslides mussten für die Beladung, eine Hybridisierung der mit dem Farbstoff markierten cDNA und den cDNA-Klonen auf dem Array, vorbereitet werden. Dazu wurden sie mit einem Blocking Reagenz vorbehandelt. Dieses Reagenz gewährleistete, dass nur die zu untersuchende cDNA auf dem Arrayslide gebunden wurde. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation bei 50°C. Anschließend folgte eine Aufreinigung mit Spülung von Wasser für drei Minuten und eine Trockenzentrifugation bei 1500 rpm für nochmals drei Minuten.

Hybridisierung

Vor dem Auftragen der Proben auf das Microarrayslide wurde die mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Einzelstrang-cDNA bei 65°C für 30 Sekunden und 95°C für 2 Minuten erwärmt und somit denaturiert. Diese denaturierten Proben (Volumen 40 µl) wurden auf das auf 55°C vorgewärmte Slide pipettiert und das dem Arrayslide entsprechende Deckgläschen (HybriSlip, Grace Biolab) möglichst luftblasenfrei aufgelegt.

Zur Hybridisierung wurde ein 50 ml Falconröhrchen auf 55°C vorgewärmt, in dem ein mit 1ml 3xSSC und 0.1% SDS benetztes und gefaltetes Kimwipestuch lag. Das im Röhrchen liegende Tuch sollte eine Austrocknung der Slides während ihrer späteren Inkubation verhindern. In dieses Falconröhrchen wurde das Arrayslide mit der aufgetragenen Probe geschoben und über Nacht bei 55°C im Wärmeschrank inkubiert.

Während dieser Inkubation sollte sich die mit Farbstoff markierte denaturierte Einzelstrang-cDNA der Tumorprobe und der Referenz den komplementären cDNA-Klonen auf dem Slide anlagern. Das später zu detektierende Signal entsprach der Anzahl der gebundenen cDNA-Moleküle an den cDNA-Klonen in dem jeweiligen Spot.

Da es sich um ein Zwei-Kanal-Mikroarray handelte, wurden die Farbstoffe Cy3 und Cy5 jeweils in einem gesonderten Kanal eingescannt. Dies bedeutet, dass zunächst nur eine Fluoreszenzfarbe vom Scanner erfasst wurde (meist Cy3). Je nach der Qualität der Hybridisierung konnte zwischen der Intensität der Laserpower und dem Hintergrund gewählt werden, um das bestmögliche Ergebnis der Hybridisierung zu erfassen. Der zweite Farbstoff wurde so abgescannt, dass die Signalstärke der Spots in etwa denen des ersten Kanals entsprach. Dies war notwendig für die spätere Berechnung der Genratios.

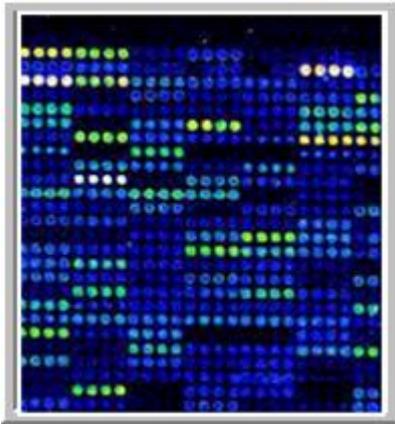


Abbildung 10 Gesanntes Bild, unbearbeitet ohne false-colour overlay

(www.stress-genomics.org 2006).

2.5.4 Datenanalyse

Die Auswertung der eingescannten Slides erfolgte in zwei Teilschritten. Der erste dieser Teilschritte erfolgte noch im IMT-Marburg und beinhaltete die Vorbereitung der Bilder für die Auswertung durch die Biomathematik. Der zweite Teilschritt umfasste die eigentliche Auswertung durch das Institut für Biomathematik der Philipps-Universität Marburg.

Im ersten Teilschritt umfasste die Vorbereitung eine Bearbeitung der abgescannten Slides mit dem Softwareprogramm ImaGene. Hierbei erfolgte zunächst ein False-colour overlay (siehe Abbildung 11), dies bedeutet, dass von den Farben Cy3 und Cy5 nach dem Abscannen die komplementäre Farbe als Signal abgebildet wurde.

Die immer noch getrennten Farbkanäle wurden nun beim false-colour overlay zusammengeführt, indem man die Bilder von beiden Kanälen übereinander legte. Dies war auch einer der Gründe, warum die Bilder so abgescannt werden mussten, dass sie sich in ihrer Signalstärke entsprachen.

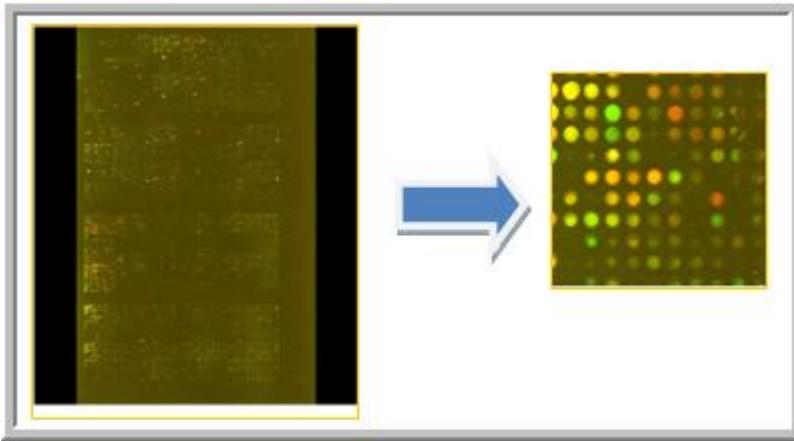


Abbildung 11 false-colour overlay mit vergrößertem Ausschnitt

Nachdem beide Farbkanäle zusammengeführt waren, legte man mit Hilfe der Software ein Gitter auf das gescannte Bild. Die Kreuzungspunkte dieses Gitters mussten sich genau auf den Signalen befinden, damit eine spätere Berechnung dieser Spots möglich war. Nach Bearbeitung der gescannten Bilder wurden diese dem Institut für Biomathematik zugesandt. Im Institut für Biomathematik erfolgte die Auswertung der Microarrayslides. Diese Auswertung umfasste die Zuordnung der Signale zu den cDNA-Klonen und damit war die Identifizierung der hoch- oder runterregulierten Gene im Vergleich zur Referenz erfolgt. Unter diesen Genen wurde mit Hilfe von Gendatenbanken eine Gencharakterisierung vorgenommen und eine relevante Auswahl an Gene getroffen, deren spezifischer Nachweis später durch Real-Time PCR's erfolgte.

2.5.6 Troubleshooting und Validierung

B-Chip 091101

Der genutzte Chip bestand aus 4608 cDNA-Klonen des gf201 Sets der Research Genetics cDNA UniGene Library (ResGen / Invitrogen / Cat. No. 97001 V).

Jede cDNA war zweimal, jeweils in Form eines Punktes, auf dem Chip vorhanden. Alle Tumorproben wurden gegen eine gemeinsame Referenz, RNA aus einem pilozytischen Astrozytom, hybridisiert. Die Spotintensitäten des gescannten Bildes wurden mit dem Computerprogramm ImaGene 3.0 extrahiert. Für jeden einzelnen Spot erhielt man das mediane Signal, dieses wurde von den Hintergrundintensitäten subtrahiert. Zur Erklärung von Spottedifferenzen wurde die Hintergrund korrigierende Ratio der beiden Kanäle berechnet und in Log^2 transformiert. Diese Balancierung der beiden Dye-Fluoreszenzintensitäten erlaubte den Vergleich der Expressionslevel der einzelnen Gene zwischen den Experimenten. Es war eine Standardisierung der rohen Werte. Diese Standardisierung war eine räumliche und

Intensitäten-abhängige Standardisierung, zur Korrektur der inhärenten Bias auf jeden Chip (Yang et al. 2002).

Da jedes Gen zweimal gemessen wurde, mussten die mittleren Log^2 -Ratios von den Replicaten berechnet werden. Differierten die Genreplicate mehr als das Maximum von 3-Fold oder um mehr als 75% von dem mittleren Log^2 -Ratio oder waren die Hintergrundintensitäten stärker als die Intensitäten in den einzelnen Spots, so wurde der Spot von dem Array ausgeschlossen. Unterschiedlich exprimierte Gene wurden selektiert durch eine Fold change- Differenz vom mindestens 2 und einem absoluten Wert von 1,96 in der T-Statistik.

2.6 Methoden und Durchführung RT-Real-Time-PCR zur Validierung

RT-Real-Time PCR ist eine sehr sensitive Technik für die Amplifikation und Quantifikation von spezifischen Nukleinsäuresequenzen und der Detektion von PCR-Produkten in Real-Time. Sie wird genutzt um die RNA-Expression von bestimmten, ausgewählten Genen zu erfassen. Die Quantifikation von DNA, cDNA oder RNA-Zielen kann sehr leicht erfasst werden durch die Erkennung des PCR-Zyklus, bei dem als erstes ein PCR-Produkt detektiert wird bzw. in welchen die exponentielle Phase und die Amplifikation beginnt (Giulletti et al. 2001). Im Gegensatz dazu erreicht man nur eine Endpunkterkennung mit einer konventionellen PCR, jedoch keine Mengenbestimmung der Nukleinsäuren (Qiagen Critical factors of successful Real-Time PCR 2004).

Die RT-Real-Time PCR erlaubt eine akkurate Mengenbestimmung der Ausgangsexpression von DNA, cDNA und RNA Zielen. PCR-Produkte können detektiert werden, indem Fluoreszenzfarbstoffe entweder an Doppelstrang DNA binden oder mit Fluoreszenz markierte sequenzspezifische Proben eingesetzt werden. Als Fluoreszenzfarbstoff, welcher an Doppelstrang-DNA bindet, wird SYBR Green I der Firma Qiagen verwendet.

Dieser Fluorophor hat die Eigenschaft, sich unspezifisch in einen DNA-Doppelstrang zu interkalieren.

SYBR Green zeigt ungebunden nur eine geringe Eigenfluoreszenz. Sobald dieser Farbstoff jedoch an ds-DNA gebunden hat, fluoresziert er stark. Dabei bindet er unspezifisch an jeder ds-DNA, nicht nur an den spezifischen Zielen, sondern auch an unspezifische PCR-Produkte und Primer-Dimere (Giulletti et al. 2001).

Die Fluoreszenzmessung erfolgt vor allem in der Extensionsphase der Real-Time-PCR. Die Signalintensitäten steigen mit jedem weiteren Zyklus und der Akkumulation der PCR-

Produkte (Qiagen SYBR Green Handbook 2004, Qiagen Critical factors of successful Real-Time PCR 2004). Zur Detektion wurde der ABI Prism 7700 Thermocycler der Firma Applied Biosystems eingesetzt, welcher durch Laserlicht die Fluoreszenz von SYBR Green induziert (Giuletti et al. 2001). Die Exzitations- und Emissionsmaxima liegen bei 494 nm und 521 nm. Als positive Kontrollprobe wurde ein Tumor genommen, der alle interessierenden Gene gleichmäßig exprimiert. Zur Qualitätskontrolle wurde ein Housekeeping-Gen wie GAPDH oder β -Actin verwendet. Bei den Housekeepinggenen handelt es sich interne konstitutiv exprimierte Kontrollgene, die im Allgemeinen zur Normalisierung von Quantifikationen verwendet werden (Vandesompele et al. 2002).

2.6.1 Validierung durch Real-Time PCR

Mit einer PCR kann nur mittels Vorlage von DNA oder RNA eine Detektion der Zielsequenz nachgewiesen werden. Werden diese PCR-Produkte analysiert, so ist nur eine Endpunktanalyse möglich. Es wird nur die Plateauphase der PCR erfasst. Die Real-Time PCR umgeht dieses Problem in dem sie die aktuellen Level von PCR-Produkten in jedem PCR Zyklus durch die Fluoreszenzintensität von SYBR Green erfasst, dass an den Doppelstrang der DNA bindet (Qiagen SYBR Green Handbook 2004, Qiagen Critical factors of successful Real-Time PCR 2004, Giuletti et al. 2001).

Es gibt zwei Möglichkeiten eine Real-Time PCR durchzuführen. Für die Analyse von Genexpressionsstärken muss die extrahierte RNA zunächst mittels der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Bei der Methode der zwei Stufen RT-PCR wird die RNA mittels Oligo(dT)Primer, Random Primer oder einem genspezifischen Primer in cDNA revers transkribiert. Ein Aliquot davon kann dann für die RT-PCR verwendet werden. Der Vorteil beim Verwenden von Oligo(dT)- oder Random Primern liegt darin, dass in einer RT-PCR viele verschiedene Transkripte analysiert werden können, da diese Primer an den PolyA Schwanz der RNA binden.

Bei der Einstufen RT-PCR wird die Reverse Transkription und die Real-Time PCR in einem Ansatz vorgenommen.

In dieser Untersuchung wurde die Zwei-Stufen RT-PCR angewendet.

Die Mengenbestimmung der Zielnukleinsäuren kann entweder als absolute oder relative Mengenbestimmung erfolgen. Die absolute Mengenbestimmung ist die absolute Summe der Targets (ausgedrückt als Kopienzahl oder Konzentration). Sie wird vor allem eingesetzt um

beispielsweise die virale Last bestimmter Zellen nachzuweisen (Giulletti et al. 2001). Während bei der relativen Mengenbestimmung die Ratio zwischen der Summe von Targets und einem endogenen Referenzmolekül, gewöhnlich einem Housekeeping-Gen erfolgt.

Der Vorteil der auch in dieser Dissertation verwendeten relativen Quantifikation liegt darin, dass mit dieser Methode die Genexpressionslevel von verschiedenen Proben verglichen werden können. Die Anwendung von Standardkurven und Extrakontrollen in jedem einzelnen Lauf der Real-Time PCR korrigiert deren Effizienz und macht sie valide. Hierzu wird von jeder einzelnen Probe eine Real-Time-PCR mit einem Housekeepinggen und dem zu untersuchenden Gen durchgeführt. Dies normalisiert den Wert für jede Probe und erlaubt so den Vergleich von bestimmten Genexpressionsstärken in verschiedenen Proben oder gar Geweben.

Als Housekeeping-Gene wurden β -Actin und GAPDH verwendet, deren Expression unter einer großen Variation von physiologischen Umständen immer noch konstant ist (Qiagen SYBR Green Handbook 2004, Qiagen Critical factors of successful Real-Time PCR 2004).

Zur Festlegung der Amplifikationseffizienz zwischen zwei Genen und deren Vergleich wird eine Verdünnungsreihe von beiden Genen mit einer Referenz RNA oder cDNA hergestellt.

Jede Verdünnungsreihe wird in einer Real-Time-PCR amplifiziert und die Ct-Werte gemessen. Die Ct-Werte kennzeichnen den Zeitpunkt, an dem in einem bestimmten Zyklus der PCR eine logarithmische Zunahme der Fluoreszenz erfasst werden kann (siehe Abbildung 12). Die Ct-Werte werden genutzt um eine Standardkurve von beiden Genen zu generieren, dem zu untersuchenden Gen und dem Housekeepinggen. Um Amplifikationseffizienzen beider Gene miteinander vergleichen zu können, wird der Ct-Wert von Gen A von dem Ct-Wert des zweiten Genes subtrahiert. Diese Differenz zwischen den Ct –Werten wird dann gegen den Logarithmus der Vorlagenanzahl aufgetragen. Weist die dabei entstandene Kurve eine Abweichung von weniger als 0.1 auf, so sind die Amplifikationseffizienzen vergleichbar. Da verschiedene Amplifikationseffizienzen auftreten können, verwendet man zwei Housekeepinggene und eine Referenzprobe. In diesem Fall kann die $\Delta\Delta$ Ct-Methode angewendet werden, dies ist eine vergleichende Methode, welche die direkten Vergleiche der Ct-Werte ablöst. Die Herstellung der Standardkurve dient alleine zur Festlegung der Amplifikationseffizienzen von dem Ziel- und dem Housekeepinggen in einem initialen Experiment. Sind die Amplifikationseffizienzen vergleichbar, so wird die relative Expressionshöhe des Zielgenes aus den Ct-Werten berechnet.

Das heißt es werden zuerst die Ct-Werte von allen Proben bestimmt und anschließend ihre Differenz mit dem Ct- Wert des endogenen Referenzgenes berechnet.

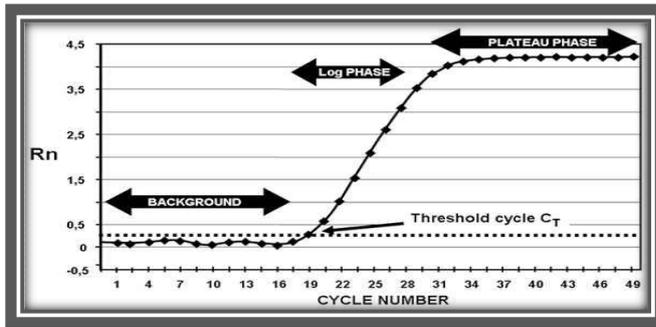


Abbildung 12 Messkurve während eines Real-Time PCR Zyklus (www.colombiamedica.univalle.edu.co)

Messkurve während eines Real-Time PCR Zyklus. Die X-Achse entspricht den PCR-Zyklen, die Y-Achse entspricht der normalisierten Fluoreszenz des Fluoreszenzträgers.

$$\begin{aligned} \Delta C_t (\text{Probe}) &= C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen} \\ \Delta C_t (\text{Kalibrator}) &= C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen} \\ \Delta \Delta C_t &= \Delta C_t (\text{Probe}) - \Delta C_t (\text{Kalibrator}) \end{aligned}$$

Sind die PCR-Effizienzen des Zielgenes und der endogenen Referenz vergleichbar, so wird der normalisierte Level der Zielgenexpression mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Normalisierte Zielgenexpressionslevel in der Probe} = 2^{\Delta \Delta C_t}$$

Die $\Delta \Delta C_t$ Methode sollte nur angewendet werden, wenn die PCR-Effizienzen zwischen dem endogenen Referenzgen und dem Zielgen vergleichbar sind.

2.6.2 Reverse Transkription

Für die nun anstehende RT-PCR musste die totale bzw. amplifizierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Es wurde für die totale RNA ein Oligo dT-Primer und für die aRNA ein Randomprimer verwendet.

Die RNA, welche in gefällter Form vorlag, wurde durch Zentrifugation bei 4°C 13000 rpm 30 min. konzentriert und einer anschließenden Aufreinigung mit 70% Ethanol unterzogen. In einer Vakuumzentrifuge erfolgte anschließend die Trocknung und Pelletbildung der RNA. Dieses RNA-Pellet wurde nun mit Wasser gelöst, so dass eine Konzentration von 2 µg RNA gelöst in 10 µl Wasser vorlag. Für die Umschreibung wurden 2 µg RNA eingesetzt.

Zunächst wurde die umzuschreibenden Proben bei 65°C für 5 min denaturiert und parallel dazu ein Mastermix aus dem Omniscript RT Kit der Firma Qiagen mit dem entsprechenden unspezifischen Primer angesetzt. 10 µl des Mastermix wurden auf die Proben pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die umgeschriebenen Proben wurden bei 20°C bis zu

ihrer weiteren Verwendung eingefroren. Um den Erfolg des Umschreibens der RNA in cDNA zu überprüfen, wurde wieder eine PCR mit dem Housekeepinggen β -Actin durchgeführt.

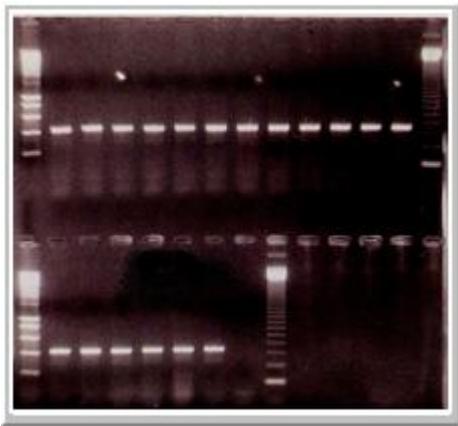


Abbildung 13 gefärbtes Agarosegel von einer PCR. Das Bild zeigt die erfolgreiche Transkription der RNA in cDNA

Die cDNA wurde mit dem Housekeepinggen β -Actin auf ihre Funktionalität getestet, da nur bei vollständig intakter cDNA die PCR-Produkte entstehen können (hier in Form von Banden in den einzelnen Spuren dargestellt). Eine Spur steht für jeweils eine Probe, deren RNA in cDNA transkribiert wurde.

2.6.3 Primerdesign

Für eine optimale RT-Real-Time PCR wurden Primer für die interessierenden und zu untersuchenden Gene nach folgenden Kriterien entwickelt.

Tabelle 5 Angewendete Kriterien zu optimalen Primerherstellung

Länge der Primer	18-30 Nukleotide
GC-Gehalt	40-60%
Tm	Zur Berechnung der Schmelztemperatur wurde folgende Formel genutzt: $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{Gehalt}(\text{AxT})) + 4^\circ\text{C} (\text{Gehalt}(\text{G+C}))$ Bei beiden Primerpaaren sollte Tm annähernd gleich sein.
Sequenz	100-150 Bp Vermeidung von komplementären Basenpaaren am 3`Ende der Primerpaare zur Vermeidung von Primerdimeren
	Vermeidung von >3 G oder C Wiederholung am 3`Ende
	Vermeidung von T am 3`Ende des Primers, da sich so die Mismatch-Gefahr erhöht

Es wurden mittels der Accessionnummer der im Array gefundenen Gene unter der Literaturdatenbank NCBI die entsprechenden Gensequenzen herausgesucht und dem DNS-Doppelstrang entsprechende komplementäre Primerpaare erstellt, einen Vorwärts- und

Rückwärtsprimer. Der Vorwärtsprimer beginnt mit der Amplifikation des am 5`Ende des Genes, während der Rückwärtsprimer am 3`Ende der DNS sich anlagert und so die Amplifikation beginnt. Die herausgesuchten Primersequenzen wurden zur Firma Sigma-Aldrich gesandt und nach unseren Bedürfnissen hergestellt.

Tabelle 6 Primer für ausgewählten Gene mit entsprechenden Primerbezeichnungen, die Schmelztemperatur, sowie das Funktionieren dieser Primer für die Validierung. Für die Validierung wurden die rotmarkierten Primer verwendet.

Bestellte Primer	Tm	Funktionierend
IL13RA2	55°C	+
DBCCR1	60°C	+
FACL3	55°C	+
WIF1	60°C	+
FZD7	70°C	+
SEZL6	65°C	+
OLIG2	65°C	+
N33	70°C	+
RAB34	65°C	+
RAP2X	55°C	+
CYP27A	55°C	+
LTF	60°C	+
ANGPT2	60°C	+
TIGA	60°C	+
LZTS1	60°C	+

Nach dem Design mussten die bestellten Primer auf ihre Funktion getestet werden, ebenso musste ein Standard gefunden werden der alle mutmaßlichen Gene gleichmäßig exprimierte. Dies geschah mit einer PCR in der die Primer getestet wurden. Die Testung der Primer erfolgte zunächst mit zwei Zelllinien, da diese für die Erstellung von Standardkurven von der Herstellerfirma empfohlen wurden (Qiagen SYBR Green Handbook 2004, Qiagen Critical factors of successful Real-Time PCR 2004). Als Zelllinien wurde A549 (einer Bronchialzelllinie) und KG1a Kasumi (Lymphomzelllinie) verwendet.

Für die PCR wurde aus dem PCR Core Kit der Firma Qiagen ein Mastermix mit 18,3 µl H₂O, 2,5 µl Reaktionspuffer, 1,0 µl dNTP und 0,2 µl Taq Polymerase für jede Probe angesetzt.

Die verwendeten Primer wurden in der von Sigma-Aldrich angegebenen H₂O-Menge gelöst und anschließend im Verhältnis 1:10 verdünnt. Es wurde dann 1 µl des verdünnten Primers und 1 µl der Zelllinie zum Mastermix pipettiert.

Als positive Kontrolle wurde das Housekeepinggen β -Actin und als negative Kontrolle H₂O mitgeführt. Die PCR wurde nach folgendem Zyklus durchgeführt:

<i>PCR-Zyklus:</i>	<i>Taq-Aktivierung</i>	<i>10 min</i>	<i>95°C</i>
	<i>Denaturierung</i>	<i>30 sec</i>	<i>95°C</i>
	<i>Annealing</i>	<i>30 sec</i>	<i>T_m 20 Zyklen</i>
	<i>Extension</i>	<i>40 sec</i>	<i>72°C</i>
	<i>Finalexension</i>	<i>5 min</i>	<i>72°C</i>
	<i> Holding</i>		<i>4°C</i>

Es wurden 35 Zyklen durchgeführt. Parallel zur laufenden PCR wurde ein 2% Agarosegel aus 2g Agarose, 100ml TAE 1% und 10 μ l Ethidiumbromid, zur Strangdenaturierung gegossen. Nach Beendigung der PCR und dem Aushärten des Agarosegels wurden 20 μ l der PCR-Proben mit 10 μ l Laufpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen, in die erste und letzte Spur kam ein Größenstandard. Anschließend folgte die elektrophoretische Auftrennung bei 500 mA für 45 min.

2.6.4 Durchführung der Real-Time PCR

Etablierung der Standardkurve

Zur Etablierung der Real-Time PCR musste zunächst eine Standardkurve erstellt werden, die die Bedingungen zur Durchführung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode erfüllte. Verwendet wurden die Housekeepinggene β -Actin und GAPDH, sowie die genspezifischen Primer.

Tabelle 7 Verwendete genspezifischen Primer, die zugehörigen Schmelztemperatur und Primersequenz

Genspezifischer Primer:	T _m :	Primersequenz:
IL13RA2	55°C	forward: 5'GGC TGT ACT TCA TCT TCA G 3' reverse: 5'AAT GAT CCA GAG ACA GTG G 3'
OLIG2	65°C	forward: 5'CGT CGT CCA CCA AGA AGG AC 3' reverse: 5'TGT GCC TAC GGC ATG ACC TC 3'
RAB34	65°C	forward: 5'AGG AAG GAG GCC GCT TTG CA 3' reverse: 5'CAA GTC TTC CCC ACC GAC AC 3'
GAPDH	55-65°C	forward: 5'CTC CTC CAC CTT TGA CGC TG 3' reverse: 5'ACC ACC CTG TTG CTG TAG CC 3'
β -Actin	55-65°C	forward: 5'CAT TGC CGA CAG GAT GCA 3' reverse: 5'CCG ATC CAC ACG GAG TAC 3'

Als Referenz wurde ein primäres Glioblastom mitgeführt, welches alle Gene gleichmäßig exprimierte. Wegen primär negativer PCR-Ergebnisse wurde neuer Standard als bei den Array-Analysen ausgesucht, welcher alle Gene gleichmäßig exprimierte. Von dessen cDNA

wurde nun eine Verdünnungsreihe bis 1:500 hergestellt. Anschließend wurde aus dem SYBR Green RT-PCR Kit der Firma Qiagen ein Master Mix für ein 96 Well Platte angesetzt, dieser bestand pro Well aus je 12,5 µl SYBR Green, 0,75 µl Forward Primer, 0,75 µl Reward Primer und 10 µl H₂O.

Es wurde jeweils ein Master Mix für die Housekeepinggene β -Actin und GAPDH, sowie für den genspezifischen Primer angesetzt. Anschließend wurden 24 µl des jeweiligen Mastermixes auf die Platte für jeweils die dreifache Ausführung der sieben cDNA Verdünnungen pipettiert und anschließend 1 µl cDNA pro Well in dreifacher Ausführung, ein Triplet pro Verdünnung für GAPDH, β -Actin und den genspezifischen Primer auf die Platte gegeben. Diese Platte wurde in den ABI Prism Cyclyer gestellt und die Messung konnte bei der Schmelztemperatur des jeweiligen spezifischen Primers erfolgen.

Zur Bestätigung einer erfolgreichen RT-PCR erfolgte die Messung der Schmelzkurve, d.h. unter kontinuierlicher Aufheizung der einzelnen Wells auf 95°C. Sie zeigte an, ob die PCR-Produkte genau zur Schmelztemperatur des spezifischen Primers einen DNA-Doppelstrang bildeten oder ob sich etwa gerade bei niedrigeren Temperaturen Primer-Dimere gebildet hatten (siehe Abbildung 14).

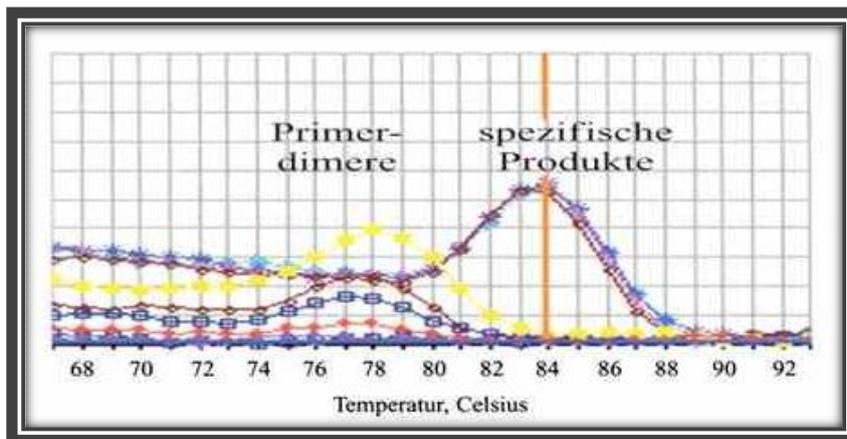


Abbildung 14 Darstellung von Schmelzkurven (www.antibiotikamonitor.at 2012)

Auswertung der Standardkurve

Zur Auswertung der Standardkurve wurde der Mittelwert für jedes Triplet berechnet, für das Housekeepinggen und für das zu untersuchende Gen. Dieser Mittelwert entsprach dem mittleren Ct-Wert und wurde logarithmisch in eine Graphik zur jeweiligen RNA-Konzentration aufgetragen. Aus den Ct-Werten des Housekeeping-Genes und des zu untersuchenden Genes berechnete sich der Δ Ct- Wert, welcher wiederum logarithmisch gegen die RNA-Konzentrationen in den einzelnen Verdünnungen aufgetragen wurde.

Zur Kontrolle der Effizienz des Kalibrators und des Zielgenes wurde anhand der Tabelle ein Diagramm für den Kalibrator und für das Zielgen erstellt, bei dem der Ct-Wert logarithmisch gegen die RNA-Konzentration aufgetragen wurde. Lag die Steigung der Geraden zwischen 3,2 und 3,8, so konnte man von einer Effizienz von nahezu 100% ausgehen, dh. es lagen vergleichbare Bedingungen vor (siehe Abb.15). Anschließend wurden die Effizienzen des Kalibrators und des Zielgenes gegeneinander in einem Diagramm aufgetragen. Die Steigung der Geraden musste unter 0,1 liegen, damit durch die vergleichbaren Effizienzen die Voraussetzungen für die $\Delta\Delta Ct$ -Methode erfüllt wurden.

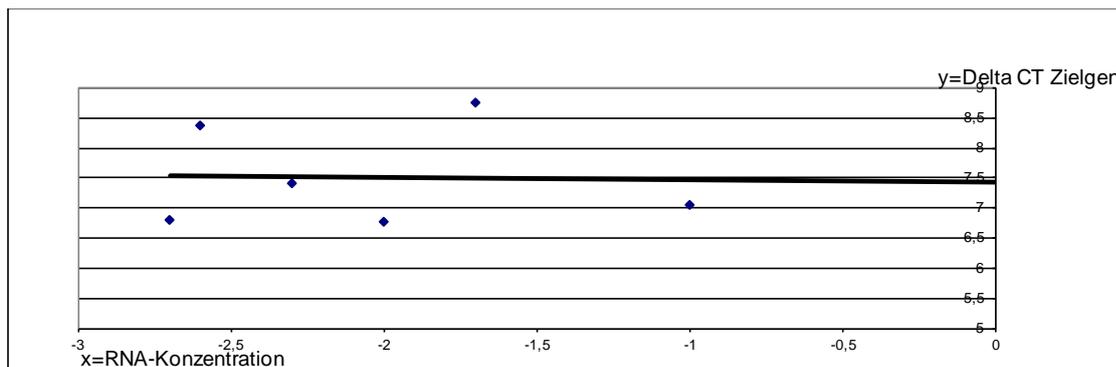


Abbildung 15 Effizienzen des Kalibrators

(Es werden die Effizienzen des Kalibrators und des Zielgenes gegeneinander in einem Diagramm aufgetragen. Die Steigung der Geraden muss unter 0,1 liegen, damit durch die vergleichbaren Effizienzen die Voraussetzungen für die $\Delta\Delta Ct$ -Methode erfüllt wurden.)

Probenmessung

Zur Messung der Proben wurde wiederum ein Master Mix für ein 96 Well Platte angesetzt, dieser bestand pro Well aus 12,5 μ l SYBR Green, je 0,75 μ l Forward Primer und 0,75 μ l Reward Primer, sowie 10 μ l H₂O.

Es wurde jeweils ein Master Mix für die Housekeepinggene β -Actin oder GAPDH, sowie für den genspezifischen Primer angesetzt. Anschließend wurden 24 μ l des jeweiligen Mastermixes pro Well pipettiert und anschließend 1 μ l cDNA von den zu untersuchenden Proben pro Well in dreifacher Ausführung für das Housekeepinggen und für den genspezifischen Primer auf die Platte gegeben. Als Kontrolle wurde der Mastermix ohne cDNA mitgeführt. Die Messung erfolgte zu der bestimmten Schmelztemperatur des genspezifischen Primers in dem ABI Prism Cycler.

Zur Bestätigung einer erfolgreichen RT-PCR erfolgte als zweites die Messung die Schmelzkurve, dh. unter kontinuierlicher Aufheizung der einzelnen Wells auf 95°C. Sie zeigte an, ob die PCR-Produkte genau zur Schmelztemperatur des spezifischen Primers einen DNA-Doppelstrang bildeten oder ob sich etwa gerade bei niedrigeren Temperaturen Primer-Dimere gebildet hatten.

Probenmessung und Auswertung

Es wurden aus jedem Proben-Triplet die Mittelwerte der Ct-Werte für das Housekeepinggen sowie für das spezifische Gen berechnet. Die Ct-Werte einer Probe für das Housekeepinggen und das spezifische Gen wurde gegenübergestellt und aus ihnen berechnete sich der Δ Ct-Wert (Δ Ct (Probe) = Ct Zielgen - Ct Referenzgen). Dieser Wert war die Grundlage zur Berechnung des $\Delta\Delta$ Ct-Wert ($\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct (Probe) - Δ Ct (Kalibrator)). In der Tabelle wurde die Referenzprobe, welche ja alle zu vergleichenden Gene gleichmäßig exprimierte, gleich dem Wert 1.00 gesetzt und alle $\Delta\Delta$ Ct- Werte in Relation zu diesem Wert 1.00 ausgedrückt (siehe Tabelle 8). So entstand eine Vergleichbarkeit der Proben für das spezifische Gen, aber auch eine Vergleichbarkeit der Expressionsstärke von anderen Genen die in derselben Probe gemessen wurden.

Tab 8 zeigt die Ct-Werte des Housekeepinggenes GAPDH und des Genes OLIG2 bei den zu untersuchenden Proben, sowie die aus den Triplets berechneten Mittelwerte. Sie stellen die Grundlage zur Berechnung der Ct-Werte und für die Anwendung der $\Delta\Delta$ Ct-Methode dar. Die relative Expressionstärke des OLIG2 in der Referenz wurde als 1.00 ausgedrückt und stellt das Maß für die Expressionstärke des OLIG2 in den anderen Proben dar.

Tabelle 8 Ct-Werte des Housekeepinggens GAPDH und des Gens OLIG2

Probe	CTGAPDH	CT MW GAPDH	CTOLIG2	CT MWOLIG2	delta CT	delta delta CT	rel. OLIG2
Reference	23.7	20,12	23.98	22,62	2,50	1,5	1,00
	18.39		21.15				
	18.27		22.73				
Astro III	16.4	18,18	33.76	34,76	16,58	15,08	10
	17.95		33.60				
	20.2		36.94				
Astro III	14.78	15,15	32.53	32,5	17,35	15,85	10
	15.15		32.60				
	15.52						

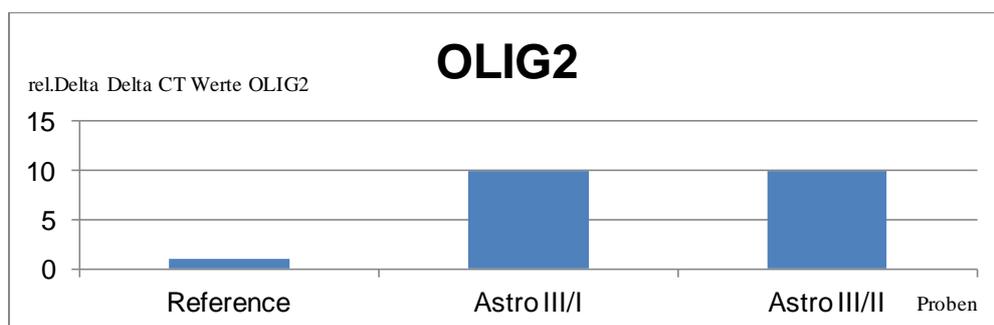


Abbildung 16 Darstellung der relativen $\Delta\Delta$ Ct-Werte

3 Ergebnisse

In die Auswertungen flossen die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen und die Ergebnisse aus den Real-Time PCR's ein. Die Hauptgruppe umfasste den Vergleich der Genexpressionsstärke zwischen Astrozytomen WHO-Grad III und primären Glioblastomen.

3.1 Ergebnisse des Gruppenvergleiches anaplastisches Astrozytom vs. Glioblastom

3.1.1 Mikroarray-Ergebnisse

Die Mikroarray-Ergebnisse wurden in tabellarischer Form dargestellt. Die Tabelle (siehe Tabellenanhang 9) umfasst in dem Gruppenvergleich anaplastisches Astrozytom versus GBM 166 verschiedene Gene. Es wurden nur diese Gene für die Auswertung genutzt, da sie einen Fold change > 2 aufwiesen. Das heißt, sie wiesen eine doppelt verstärkte oder verminderte Expression im Vergleich anaplastisches Astrozytom versus GBM auf. Alle Tumorproben wurden gegen eine gemeinsame Referenz, ein pilozytisches Astrozytom, untersucht.

(dargestellt sind alle Gene mit einem Fold change > 2 . Die letzten beiden Spalten der Ergebnisliste zeigen die dem einzelnen Spot zugeordneten Gensymbole, sowie deren Accessionnummer. Unter den Accessionnummer werden die einzelnen Gensymbole katalogisiert (die Tabelle stellt nur die ersten 24 statistisch relevanten Ergebnisse dar, die komplette Tabelle findet sich im Anhang). GenID -Spot: Genidentifizierungsnummer auf dem Array, MW1-Mittelwert der Genexpressionsstärke Astro)

Tabelle 9 Ergebnisse der Mikroarray-Analysen

GenID Spot1	MW 1	MW 2	AstrolIII/prim. Glioblastom	abs(MW1/MW2)	FC	Richtung	Symbol	Accession No
7755	-0,29	3,97	-4,3	4,26	19,10	Down	LTF	AA677706
8010	-3,14	-0,24	-2,9	2,89	7,44	Down	LGALS3	AA630328
623	0,34	3,19	-2,8	2,84	7,18	Down	RAM2	W04713
2946	-0,18	2,37	-2,5	2,55	5,85	Down	IL13RA2	R52796
7301	-2,53	-0,05	-2,5	2,48	5,59	Down	C1R	T69603
3087	2,61	0,12	2,5	2,48	5,59	Up	SEZ6L	H29013
1892	0,25	2,72	-2,5	2,47	5,53	Down	HS3ST3B1	W95041
6626	-0,47	1,90	-2,4	2,38	5,19	Down	RIS1	AA127069
3952	-0,30	2,07	-2,4	2,37	5,18	Down		T61649
2404	0,22	2,54	-2,3	2,33	5,02	Down	NNAT	R63918
5899	1,38	-0,93	2,3	2,32	4,98	Up	ZDHHC22	AA011100
5482	-0,07	2,20	-2,3	2,27	4,81	Down	LZTS1	N31948
7398	1,04	-1,20	2,2	2,24	4,72	Up	CHGB	W37769
5710	-2,06	0,18	-2,2	2,24	4,71	Down	OCIAD2	AA464688
2731	-0,82	1,40	-2,2	2,21	4,64	Down	BF	AA401441

2058	-0,51	1,61	-2,1	2,12	4,34	Down	MGC17301	T60926
3752	-2,13	-0,04	-2,1	2,09	4,27	Down	FABP7	W72051
103	-1,92	0,17	-2,1	2,09	4,25	Down	RAB34	AA485449
8011	-2,31	-0,23	-2,1	2,08	4,22	Down	IDH2	AA679907
7493	0,19	2,26	-2,1	2,07	4,19	Down	COL4A2	AA430540
9124	0,09	-1,94	2,0	2,03	4,09	Up	MACF1	AA047436
7522	0,03	2,06	-2,0	2,03	4,08	Down	DPP4	W70234
5638	-1,35	0,65	-2,0	2,00	3,99	Down	PTRF	AA443119
2466	0,63	-1,35	2,0	1,99	3,96	Up	OLIG2	H50086

LTF(Lactotransferrin) ist ein oxidative-stress assoziierter Parameter im Serum von Alzheimer Patienten und zeigte in unseren Analysen die stärkste Expressionsänderung mit einem Fold change von -19,10. Dieses Gen übernimmt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Apoptose von Zellen. Es ergänzt die insgesamt verstärkte Expression von metabolischen Genen (ANGPT2 -2,65, SLS16A3 -3,35, HS3ST3B1 -5,53), von Migrationsgenen (LAMA2 -3,33, ROBO -3,33) und Transkriptionsfaktoren (HEYL -3,61, T1A2 -3,56). Die Ras-Onkogen Familie wies signifikante Expressionsänderungen innerhalb ihrer Familie auf (RIS1 -5,19, RAB34 -4,25, RIPX +3,75). Hingegen zeigten sich bei den bereits bekannten Onkogenen wie TGFB, Survivin, EGR2 und WIF1 (WNT-Familie) keine nennenswerten Expressionsunterschiede.

Es konnten jedoch auch Gene identifiziert werden, bei denen bisher noch keine Beschreibung bezüglich ihrer Präsenz in Gliomen erfolgt war oder kein signifikanter Nachweis im adulten normalen ZNS-Gewebe gelungen ist (CHI3L2 -3,41, PPP1R14A -3,96). Zahlreiche Gene sind auch assoziiert mit den neuronalen Stammzellen, der ZNS-Entwicklung, der ZNS-Differenzierung. Sie zeigten in den Array-Analysen eine signifikant verstärkte Expression in höheren Tumorgraden. (NNAT -5,02, FAB37 -4,27, Heyl -3,61, DSCR1 -3,24, HST3ST3B1 -5,53, AQP1-3,50). Nur OLIG2(+3,96), welches eine kritische Rolle in der Oligodendrozytenentwicklung und Motoneuronentwicklung einnimmt, zeigte eine Expressionsminderung. Aus diesem Grund wurde OLIG2 zur Validierung der Real-Time PCR Ergebnisse, neben RAB34 (Ras Onkogenfamilie) und IL13RA2 (bereits bekanntes Gliomantigen) ausgewählt.

3.1.2 Ergebnisse Real- Time PCR

Die Real-Time PCR sollte mit Genen durchgeführt werden, die besondere Voraussetzungen erfüllten. Sie mussten einen signifikanten Fold change zeigen und das Ergebnis des

Mikroarrays sollte durch eine semiquantitative Methode validierbar sein. Gewählt wurden die Gene IL13RA2, RAB34 und Olig2.

(zeigt die für die RT-PCR ausgewählten Gene und ihre Ergebnisse in den Mikroarray-Analysen. GenID-Spot: Genidentifizierungsnummer auf dem Array, MW1-Mittelwert der Genexpressionsstärke Astro III vs. Astro I, MW2-Mittelwert der Genexpressionsstärke GBM vs. Astro I, Differenz Astro III/GBM, abs(MW1/MW2)-Berechnung der Mittelwerte der Genexpressionsstärke zwischen Astro III und Glioblastom, FC-fold change, Richtung- zeigt die vermehrte oder verminderte errechnete Expressionsstärke, Accession No- internationale Identifizierungsnummer der Gene.)

Tabelle 10 Ausgewählte Gene der Mikroarray-Analysen

GenID Spot1	MW 1	MW 2	Astro III/ Prim.GBM	abs(MW1/MW2)	FC	Richtung	Symbol	Accession No
2946	-0,18	2,37	-2,5	2,55	5,85	Down	IL13RA2	R52796
103	-1,92	0,17	-2,1	2,09	4,25	Down	RAB34	AA485449
2466	0,63	-1,35	2,0	1,99	3,96	Up	OLIG2	H50086

IL13 RA2

Interleukin 13 Receptor Alpha Chain 2 wies in den Mikroarray-Analysen in der ersten Hauptgruppe einen signifikanten Fold change von -5,85 auf mit einer verstärkten Expression in primären Glioblastomen. In den Real-Time PCR Analysen zeigte sich eine 3,3fach verminderte Expression des IL13RA2 in den primären Glioblastomen im Vergleich zu anaplastischen Astrozytomen. Es wurde mit beiden Methoden eine gegensätzliche Genexpressionsstärke des IL13RA2 nachgewiesen werden.

(zeigt die Anzahl der Versuchsansätze N für die Referenz, die Astrozytome WHO-Grad III und die primären Glioblastome. Die Genexpression in der Referenz wurde gleich dem Wert 1 gesetzt. An diesem Wert 1 der Referenz wurde die relative Expressionsstärke des IL13 RA2 Gens in Astrozytomen Grad III und primären Glioblastomen gemessen und berechnet.)

Tabelle 11 Versuchsansätze und die relative IL13RA2 Expression in der Real-Time-PCR

<i>Versuchsansatz</i>	<i>Rel.IL13RA2</i>
Referenz (n=1)	1.00
Astro III (n=6)	0.98
Primäres GBM (n=8)	0.60

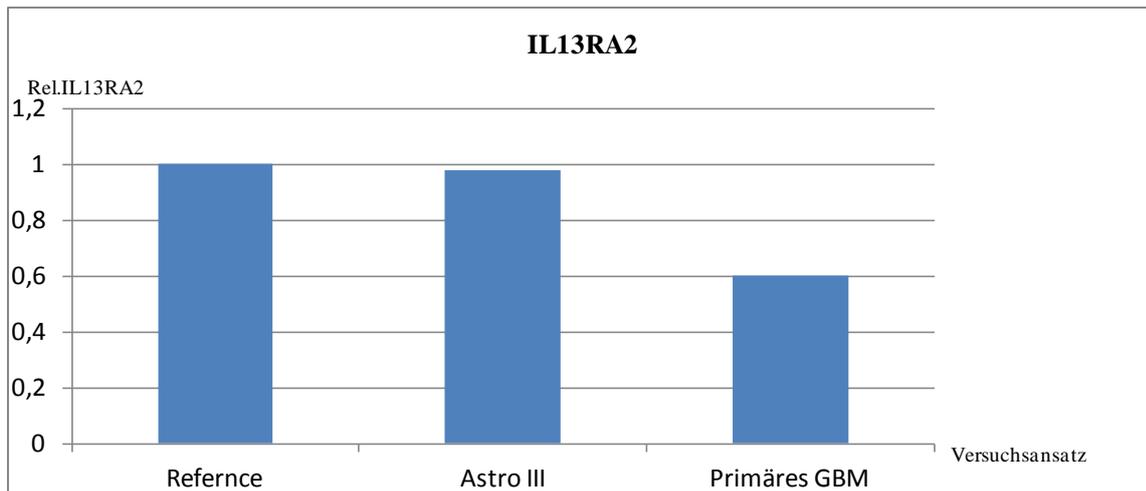


Abbildung 17 Relative IL13RA2 Expression in Astrozytomen WHO-Grad III und primären Glioblastomen

OLIG2

Das OLIG2Gen zeigte in den Mikroarray-Analysen der ersten Hauptgruppe einen signifikanten Fold change von 3,96 auf mit einer verminderten Expression in der Gruppe der primären Glioblastome. In den Real-Time PCR Analysen zeigte jedoch sich eine 39fach erhöhte Expression des OLIG2 Gens in primären Glioblastomen im Vergleich zu anaplastischen Astrozytomen.

Beschreibung siehe Tabelle 11, es wurde die relative Expressionsstärke des OLIG2Gens gemessen und berechnet.

Tabelle 12 Expressionsstärke des OLIG2Gens

<i>Versuchsansatz</i>	<i>Rel.OLIG2</i>
Referenz (n=1)	1.00
Astro III (n=6)	0.01
Primäres GBM (n=8)	0.39

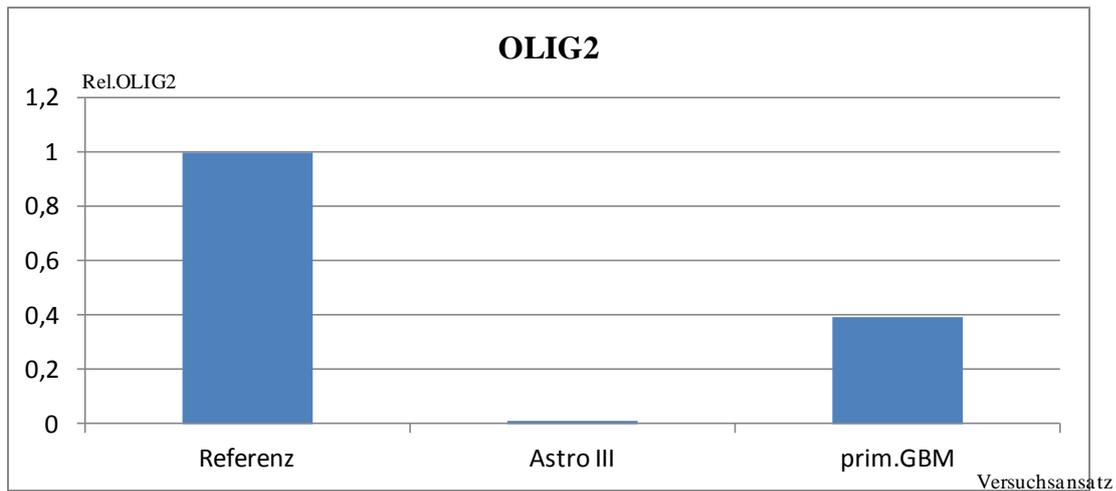


Abbildung 18 Darstellung der relativen OLIG2 Expression in Astrozytomen WHO-Grad III und primären Glioblastomen

RAB34

Das RAB34 Gen wies in den Mikroarray-Analysen in der ersten Hauptgruppe einen signifikanten Fold change von -4,25 auf und entsprach damit einer signifikanten Mehrexpression des Genes in GBMs. Die Real-Time PCR Analysen bestätigten das Ergebnis. Das RAB34 Gen wies in den PCR-Ergebnissen eine 2fach gesteigerte Expression in Glioblastomen versus Astrozytomen WHO-Grad III auf.

Tabelle 13 Relative Expressionsstärke des Genes RAB34

Versuchsansatz	Rel.RAB34
Referenz (n=1)	1.00
Astro III (n=6)	0.78
Primäres GBM (n=8)	1.62

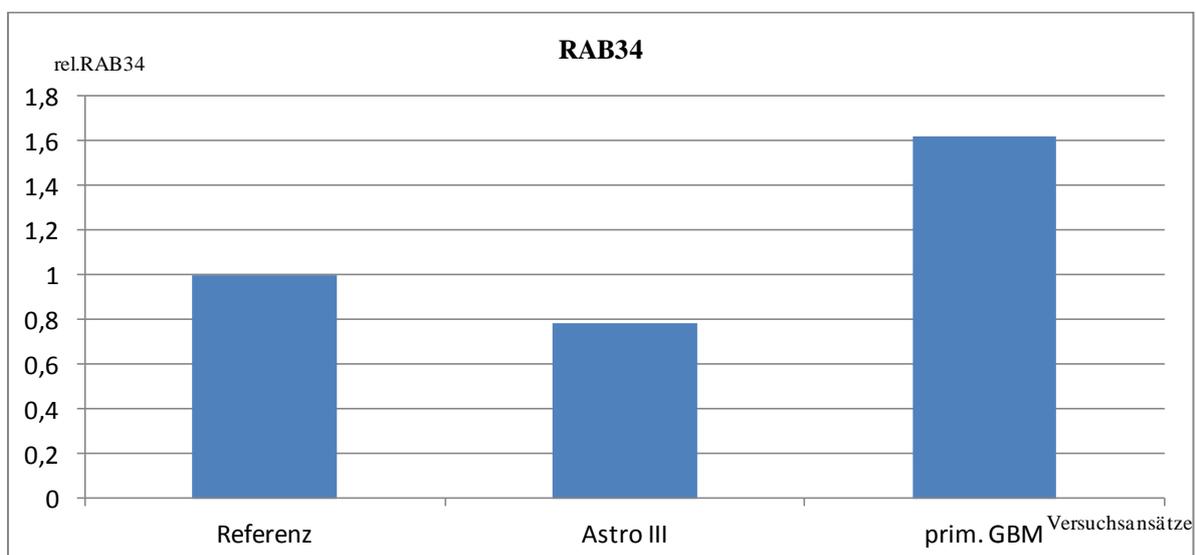


Abbildung 19 RAB34 Expression in anaplastischen Astrozytomen und primären Glioblastomen

3.1.3 Ergebnisvergleich der Mikroarrays vs. Real- Time PCR

Ein Vergleich der aus den Arrays und der Real-Time gewonnenen Ergebnisse zeigt bei den Genen IL13RA2 und OLIG2 eine veränderte Expression der Gene in eine gegensätzliche Richtung in zwei verschiedenen Methoden bei geringer Probenanzahl. Es konnten keine wertgleichen Ergebnisse mit der RT-PCR validiert werden, lediglich die Richtung der Genexpression wurde angegeben.

Lediglich bei dem RAB34 Gen stellte sich eine vermehrte Genexpression in den Array-Analysen und in der Real-Time PCR dar (siehe Abbildung 20). Die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen sind somit für dieses Gen valide.

(zeigt den Fold change der ausgewählten Gene in den Mikroarray-Analysen. Für die RT-PCR wurden die Mittelwerte aus der relativen Expressionsstärke in den Astrozytomen und den Glioblastomen berechnet. Es konnte so eine Vergleichbarkeit der Methoden erreicht werden.)

Tabelle 14 Fold change der ausgewählten Gene

	ARRAY AA vs. GBM	RT-PCR
IL13RA2	5,85	-1,63
RAB34	4,25	2,07
Olig2	-3,96	39

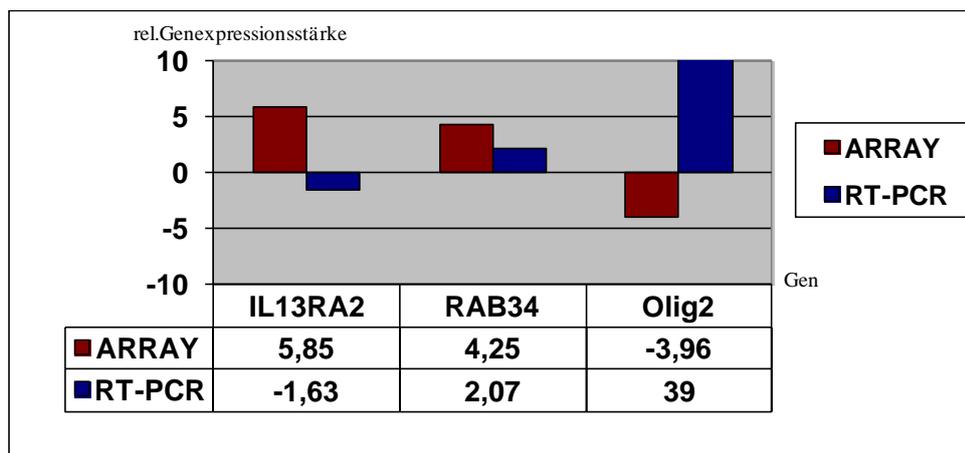


Abbildung 20 Fold change Werte und der RT-PCR Mittelwerte

(Graphische Darstellung der Fold change Werte und der RT-PCR Mittelwerte. Es stellt sich eine vermehrte Genexpression der RAB34 dar, beim IL13RA2 und OLIG2 weichen die Ergebnisse auseinander.)

3.2 Erklärung zur Publikation

Ein Grossteil dieser Arbeit wurde von Herrn Dr. med. O.Bozinov publiziert (Bozinov et al. 2008). Es ergab sich damals eine Fehlinterpretation, auf welche wir von einem Leser aufmerksam gemacht wurden. Das negative logarithmische Ergebnis in Astro III/prim. GBM representiert eine Hochregulation der Gene in GBM. Die Anzeige der Richtung in Spalte 7 der Tabelle 9 hat somit zunächst für eine Fehlinterpretation gesorgt. Im sich sofort anschliessenden Erratum wurde die Ergebnisinterpretation korrekt und detailliert dargestellt und gesondert publiziert. In der hier vorliegenden Arbeit sind alle Ergebnisse nun entsprechend korrekt interpretiert und diskutiert.

Publikation:

Candidate genes for the progression of malignant gliomas identified by microarray analysis.

Bozinov O, Köhler S, Samans B, Benes L, Miller D, Ritter M, Sure U, Bertalanffy H.

Neurosurg Rev. 2008 Jan;31(1):83-9; discussion 89-90. Epub 2007 Oct 5. Erratum in:

Neurosurg Rev. 2008 Apr;31(2):247-8.

4 Diskussion

4.1 Grundsätzliche Einordnung von Mikroarray-Analysen

Ein für unsere Analysen grundlegender Punkt ist, dass durch neue gentechnologische Studien Einblicke in die Molekularbiologie der fast stets letal verlaufenden Gliomerkrankung gefunden wurden. Eine Vielzahl neuerer Therapien beinhaltet die Hoffnung Patienten mit Gliomen adäquat behandeln zu können. In der Realität zeigte sich bisher, dass nur Untergruppen von Patienten auf bestimmte Therapieformen ansprechen. Der entscheidende Wandel in der Wahl der angewendeten Therapien sollte darin liegen, die Behandlung festzulegen, welche das größte Benefit bei dem individuellen Patienten hervorruft. DNA-basierte Mikroarray-Technologien, welche eine gleichzeitige Analyse der Genexpression tausender Gene erlauben, werden bereits genutzt um bisher unbekannte Subgruppen von Patienten zu identifizieren (Rickman et al. 2001, van Meir et al 2010, Holzmann et al. 2006). Diese Subgruppen unterschieden sich bisher nur in ihrem mittleren Überleben und dem unterschiedlichem Ansprechen auf einzelne Therapieformen. Die Nutzung der DNA-Mikroarrays soll der molekularen Identifizierung dieser Subgruppen und der Optimierung der Gliomtherapie dienen.

Niedriggradige Astrozytome und Glioblastome haben ein unterschiedliches Genexpressionsprofil, welches klar voneinander und von normalem ZNS-Gewebe unterschieden werden kann. Rickman et al. 2001 zeigten, dass diese Tumorsubtypen bereits durch eine kleine Anzahl von veränderten Genen sehr genau identifiziert werden können. Diese Gene kodieren für Proteine, die eine Schlüsselrolle in der Zellproliferation, proteosomalen Funktion, dem Zellmetabolismus und der Signaltransduktion einnehmen (Shai et al.2003 , Rickman et al.2001, Mischel et al.2004).

Können Mikroarray-Analysen genutzt werden um Subtypen morphologisch einheitlicher Gliome aufzudecken? Bereits zahlreiche Studien hatten ein Licht auf diese Frage geworfen. Die Festlegung und Identifizierung von Genexpressionsprofilen könnten behilflich sein, diese Gliome akkurat zu klassifizieren und zu therapieren. Nutt et al. 2003 führten DNA-Mikroarray-Analysen an Tumoren durch, welche eindeutig pathologisch als klassische Glioblastome und klassische Oligodendrogliome identifiziert waren. Aufgrund dieser Genexpressionsanalysen wurden molekulare Klassifikationen erstellt. Es zeigte sich, dass die

Identifizierung molekularer Subtypen eine zuverlässigere Methode zur Überlebensvoraussage darstellte, als die alleinige pathologische Diagnose.

Aufgrund der wachsenden Bedeutung von Mikroarray-Genexpressionsstudien in Bereichen der Gliomklassifikation, dem besonderem Ansprechen bestimmter Subtypen auf einzelne Therapieformen, der Identifizierung von Biomarkern und der Analyse der für Tumorwachstum verantwortlichen Signaltransduktionswege erschien es uns besonders interessant, die Progression des anaplastischen Astrozytoms zum Glioblastom multiforme zu untersuchen. Dies erfolgte auf molekularer Ebene durch Mikroarray-Analysen und semiquantitativer RT-PCR.

4.2 Mikroarray-Ergebnisse und semiquantitative Real-Time PCR

Zurzeit beschränken sich die Mikroarray-Analysen von astrozytischen Tumoren auf wenige Studien (Shai et al. 2003, Rickman et al. 2001, Mischel et al. 2004). Die meisten dieser bisher durchgeführten Studien wiesen bisher eine unterschiedlichen Anzahl von Proben auf, nutzten unterschiedliche Mikroarray-Chips, unterschiedliche Referenzen und setzten ihren Schwerpunkt auf verschiedene Fragestellungen. Es bestätigten sich in diesen Studien bereits vorher festgestellte Beobachtungen, wie eine Steigerung der Expressionsstärke von vaskulären Wachstumsfaktoren mit steigendem Malignitätsgrad (Nutt et al. 2003). Es konnten eine Reihe von Genen in ihrer Expressionsstärke bestätigt werden, von denen bekannt war, dass sie in Glioblastomen amplifiziert oder überexprimiert vorlagen. Einige Studien konnten bisher zeigen, dass das mRNA-Expressionsprofil zwischen normalem ZNS-Gewebe und Tumorgewebe sich stark unterscheidet. Es bestehen auch starke Unterschiede zwischen dem mRNA-Expressionsprofil in den einzelnen Malignitätsgraden. Unterschiedliche mRNA-Expressionsprofile fanden sich auch in Gruppen mit einheitlicher Histologie, so konnte bisher sehr deutlich gezeigt werden, dass primäre und sekundäre Glioblastome ein völlig andersartiges Genprofil aufweisen, obwohl sie histologisch einheitlich erscheinen (van de Boom et al. 2003, Godhard et al. 2003, Mischel et al. 2004).

In Ergänzung zu diesen Studien wurde in unserer Untersuchung neue Gene wahrgenommen, die in verschiedenen astrozytären Tumoren über- oder unterexprimiert wurden bzw. einen Funktionsverlust aufwiesen. Es wurden in dieser Studie zwei Arten von Expressionsarrays mit tumor- und entzündungsassoziierten cDNA-Klonen für die Untersuchung von drei verschiedenen Fragestellungen verwendet. Die erste Fragestellung umfasste den Vergleich

zwischen sechs anaplastischen Astrozytomen und acht primären Glioblastomen. Mit dieser bisher einmaligen Fragestellung sollten mögliche neue mit der malignen Progression assoziierten Gene anhand der Arrays identifiziert werden. Die genutzten Arrays wiesen 4608 tumorassoziierte cDNA-Klone auf. In dem Vergleich primäre Glioblastome versus anaplastische Astrozytome fanden sich 166 Gene die einen signifikanten Fold change von >2 aufwiesen. In 56,02%, also bei 93 von den 166 Genen mit einem Fold change <2 , fand sich ein verstärkte Expression in der Gruppe der primären Glioblastome im Vergleich zu den anaplastischen Astrozytomen, in 43,98% (73/166 Genen) mit einem Fold change >2 ließ sich in den primären Glioblastomen eine verminderte Genexpression feststellen.

Eine konventionelle semiquantitative Real-Time-PCR wurde an denen im Array analysierten Proben mit den ausgewählten drei Genen (OLIG2, IL13RA2, RAB34), die einen signifikanten positiven oder negativen Fold change im Array aufwiesen, durchgeführt. Bei dem Gen RAB34 war das Array-Ergebnis mit der Real-Time-PCR validierbar.

4.2.1 Gene im Vergleich der malignen Gliome

4.2.1.1 Fehlen erwarteter Gene

In unserer Studie wurden nicht die bisher klassischen genetischen Veränderungen in Astrozytomen untersucht. Bei diesen klassischen Veränderungen handelte es sich bisher in anaplastischen Astrozytomen um TP53 Mutationen und Deletionen des Chromosomes 10, bei primären Glioblastomen um EGFR und EGF Amplifikationen, PTEN Mutationen, p16 Deletionen, MDM2 Amplifikationen und in sekundären Glioblastomen um TP53 Mutationen. Erklärt kann das Fehlen dieser Gene in unserer Studie durch die Tatsache, dass Mikroarray-Analysen immer nur veränderte Expressionsmuster in den Tumoren darstellen können, jedoch keine Mutationen in bestimmten Genen. Die Erfassung von Mutationen bleibt anderen molekularen Methoden vorbehalten. Dennoch fügen sich unsere Ergebnisse klassisch in das molekulare Bild der Gliome.

4.2.1.2 Darstellung neuer mit Gliomen assoziierter Gene

In den folgenden Kapiteln werden die Gene dargestellt, die signifikante Expressionsänderung in den untersuchten Gliomen aufwiesen. Es handelt sich hauptsächlich um neue mit Gliomen assoziierte Gene, die anscheinend Schlüsselrollen in der Biologie der Astrozytome einnehmen. Beschrieben werden ein Oligodendrozytenmarker (OLIG2), der eine wichtige

Rolle in der Astrozytenentwicklung einnimmt, ein mit Gliomen neu assoziiertes Antigen (IL13RA2) und ein Mitglied der Ras-Superfamilie (RAB34).

Olig2

Das Gen OLIG2 ist auf dem langen Arm des Chromosoms 21q21.11 lokalisiert. Die erste Erwähnung fand OLIG2 zusammen mit Olig1, zu dem es eine 80%ige Homologie aufweist, hinsichtlich ihrer Markerfunktion für Zellen der Oligodendrozytenlinie. Zhou et al. 2000 beschrieben die Expression der Olig-Gene sowohl für Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, als auch für vollständig differenzierte Oligodendrozyten. Im Tierexperiment ließ sich nachweisen, dass OLIG2 vor allem im ventralen Anteil von Neuralrohren aus Mäuseembryonen, in der pNM-Domäne exprimiert wird. Da sich aus Vorläuferzellen dieser Bereiche Motoneuronen sowie Oligodendrozyten differenzieren, ist davon auszugehen, dass OLIG2 bei diesen Vorgängen eine Rolle spielt. Es fungiert dabei wahrscheinlich als Transkriptionsrepressor. Novitch et al. 2001 und Mizuguchi et al. 2001 konnten diese These untermauern, indem sie zeigten, dass OLIG2 eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von Motoneuronen einnimmt. Sie zeigten, dass bereits vor dem Auftreten von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen OLIG2 in der pNM-Domäne des Neuralrohres exprimiert wird. Zu diesem Zeitpunkt führt die Interaktion mit anderen Genen zur Differenzierung von Motoneuronen aus den neuronalen Stammzellen.

Die herausragende Stellung der Olig-Gene wiesen Zhou et al. 2002 in einem weiteren Tierexperiment nach. Sie züchteten Mäuse, denen sowohl das OLIG2 als auch das Olig1 Gen fehlte. In der Entwicklung dieser Mäuse zeigte sich, dass es weder zu einer Differenzierung von Motoneuronen, noch von Oligodendrozyten aus den Vorläuferzellen des Neuralrohres kam. Stattdessen bildeten sich vermehrt V2-Interneurone und Astrozyten. Dieses Ergebnis unterstreicht die Relevanz der Olig-Gene für die Subtypen Spezifizierung während der Entwicklung des ZNS (Zhou et al. 2002).

Eine Reihe von Autoren hofften, dass die Olig-Gene Verwendung als molekularer Marker für humane Gliazelltumore finden könnten, insbesondere durch die verstärkte Expression dieser Gene in Oligodendrozyten und Oligodendrogliomen (Ligon et al. 2004, Ohnishi et al. 2003, Bouvier et al. 2003, Mokhtari et al. 2005).

In ersten Versuchen wurde festgestellt, dass im Gegensatz zu der hohen Expression der Olig-Gene in Oligodendrogliomen, die Expression in Astrozytomen nur gering oder nicht vorhanden ist (Lu et al. 2001). Deshalb wurde davon ausgegangen, dass anhand dieser Gegebenheit eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Gliazelltumoren möglich sei (Hang-Xuan et al. 2002). Allerdings konnte diese Annahme in weiteren Untersuchungen nicht

bestätigt werden, da sich die Expression von Olig1 und OLIG2 sich in Astrozytomen nicht signifikant von der in Oligodendrogliomen unterscheidet (Aguirre-Cruz et al. 2004, Riemenschneider et al. 2004). Vielmehr zeigten Ligon et al. 2004, dass mit sensibleren Methoden eine Expression von OLIG2 in allen diffusen Gliazelltumoren zu finden ist.

In unseren Array-Analysen fand sich das Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2 Gen, als eigentlicher Marker für Oligodendrozyten, in allen untersuchten anaplastischen Astrozytomen und allen Glioblastomen. In der Mikroarray-Untersuchung anaplastische Astrozytome versus Glioblastome trat das OLIG2 mit einer verminderten Expression in Glioblastomen auf, in der semiquantitativen PCR bestätigte sich nicht dieses aus den Arrays gewonnen Ergebnis. Es zeigte sich in der Real-Time-PCR eine verstärkte Expression des OLIG2 in Glioblastomen gegenüber den Astrozytomen WHO-Grad III, bei jedoch geringerer Probenanzahl. Bereits Bouvier et al. 2003 und Ohnishi et al. 2003 belegten, dass das bis zu diesem Zeitpunkt als Oligodendrozytom spezifische Genprodukt in allen Gliomformen exprimiert wurde. Ebenso wies zusätzlich Ligon et al. 2004 wiesen mittels semiquantitativer RT-PCR's nach, dass dieses Gen OLIG2 ubiquitär in allen Gliomen, also auch Astrozytomen und Oligodendrogliomen exprimiert wird (siehe Tabelle 15). Es fanden sich jedoch starke Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Gliomentitäten (Ligon et al.2004, Ohnishi et al. 2003, Bouvier et al. 2003, Mokhtari et al. 2005).

Tabelle 15 Prozentualen Anteil an Tumorentitäten mit OLIG2 Expression modifiziert nach Ligon et al. 2004

Tumorentität	Prozentualer Anteil mit OLIG2Expression
Gliale Neoplasien	97%
-Oligodendrogliome	100%
-Astrozytome	100%
-Mischgliome	100%
-Ependymome	73%
nicht-neurale Neoplasien	0%
Neuronale Neoplasien	
-Medulloblastom	75%
-zentrales Neurozytom	86%
-DNET WHO Grad I	100%
Embryonale Neoplasien	
-PNET WHO Grad VI	36%

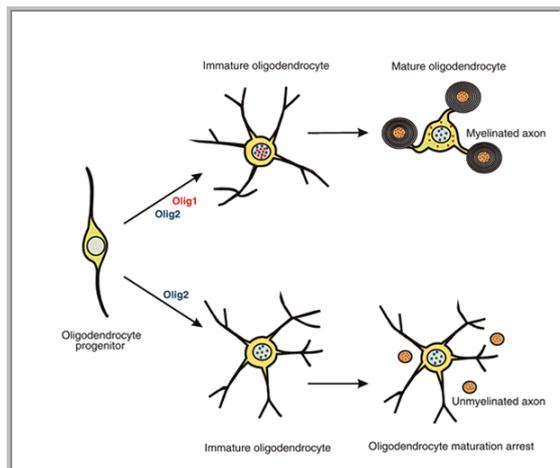


Abbildung 21 Einfluß der Transkriptionsfaktoren OLIG1 und OLIG2 auf die Zelldifferenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzelle (nach Balabanov et al. 2005)

Es fand sich eine in Oligodendrogliomen verstärkte Expression des Olig2-Genes gegenüber Astrozytomen (Mokhtari et al. 2005). Innerhalb der einzelnen Tumorstadien der Astrozytome ließ sich in den Studien von Mokhtari et al. 2005 und Bouvier et al. 2003 feststellen, dass die Expressionsstärke invers mit dem Tumorgrad des Astrozytomes korrelierte. Sie fanden die höchste Expression des Olig2-Genes in pilozytischen Astrozytomen und eine kontinuierliche Abnahme der Expressionsstärke in den diffusen Astrozytomen, die geringste Expression fand sich laut dieser Studien in Glioblastomen. Dies entspricht den in unseren Array-Studien gefundenen Ergebnissen, jedoch konnte keine Bestätigung durch eine RT-PCR erreicht werden. Die bisherigen Erkenntnisse von Mokhtari et al. 2005 und Bouvier et al. 2003 würden auch den Thesen von Fukuda et al. 2004 entsprechen, da sie in Versuchen zeigten, dass OLIG2 als Transkriptionsfaktor auf die Entwicklung von Astrozyten aus neuronalen Vorläuferzellen Einfluss nimmt (siehe Abbildung 21). Olig 2 verhindert in diesen neuronalen Stammzellen die Komplexbildung des Proteins p300 mit dem Signaltransducer STAT. Aufgrund dieser fehlenden Komplexbildung wird die Astrozytendifferenzierung gefördert (Fukuda et al. 2004, Setoguchi und Kondo et al. 2004). Da gerade ein Verlust der Differenzierung zu Astrozyten ein charakteristisches Merkmal der zunehmenden Malignität in der Gliomreihe ist, könnte eine Mindereexpression des OLIG2 eine ursächliche Rolle in der Malignisierung von astrozytären Tumoren einnehmen. Jedoch konnte eine Beteiligung dieses Gens an der Onkogenese dieser Malignome bis jetzt nicht bewiesen werden (Riemenschneider et al. 2004).

Es konnte aber gezeigt werden, dass OLIG2 möglicherweise eine Rolle in der Onkogenese einnimmt. Es konnte bei der Entstehung der akuten Leukämie gezeigt werden, dass OLIG2 (auch BHLHB1 genannt) verstärkt in T-Zell Lymphoblasten mit einer Translokation t(14; 21)

(q11.2; q22) exprimiert wird. OLIG2 führt dadurch zu einer funktionalen Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2A, der in die T-Zellreifung involviert ist (Wang et al. 2000).

IL13RA2

Das Gen IL13RA2 ist lokalisiert auf dem Chromosom Xq24. Die Expression dieses Genes konnte in zahlreichen Geweben bisher nachgewiesen werden, darunter Testis und in humanen soliden Tumoren wie Gliome, Halstumore, ovarielle Karzinome, Kaposi-Sarkom und Nierenzelltumoren. Jedoch konnte eine Expression dieses Genes nicht oder in nur geringem Maße in normalem ZNS-Gewebe festgestellt werden (Donaldson et al. 1998, Han et al. 2005, Kawakami et al. 2005).

Das IL13RA2-Gen kodiert für ein 65-70 kDa großes dimeres Protein, an das IL13 spezifisch bindet. Es ist neben seiner Isoformen IL13RA1 und IL4Ra einer der drei möglichen Bestandteile des IL-13 Rezeptors. Interleukin 13 ist ein pleiotropes immunregulatorisches Protein, das vornehmlich von Mastzellen und Th2-Zellen produziert wird.

IL13 bindet an zwei verschiedene Rezeptorketten: Die IL13RA1-Kette bindet IL13 mit niedriger Affinität, bildet aber zusammen mit der IL4RA ein Heterodimer, das IL13 mit hoher Affinität zu binden vermag. IL13 wirkt nach Bindung an diesen Rezeptorkomplex über eine phosphorylierungsabhängige Aktivierung der Janus-Kinase 1 und 2, Tyk2 und Stat6 proliferationsfördernd (Donaldson et al. 1998, Murata et al. 1998).

IL13RA2 ist in der Lage IL13 mit hoher Affinität zu binden ohne ein Heterodimer mit einer weiteren Kette zu bilden oder eine Signaltransduktionskette zu initialisieren. Nach der Bindung des IL13 an die IL13RA2-Kette ist diese in der Lage den gebundenen Liganden in die Zelle aufzunehmen. Allerdings ist bei der Bindung von IL134 an diese Kette keine Aktivierung der oben genannten Signaltransduktionskette wahrnehmbar (Kawakami et al. 2005, Caput et al. 1996, Han et al. 2005).

Über die Bindung an seine Rezeptoren bewirkt IL13 als ein immunregulatorisches Zytokin eine Vielzahl an Prozessen. Es stellt sich auch in Bezug auf die Tumorgenese als ein pleiotropes Zytokin dar, das sowohl antitumoröse als auch prokanzerogene Funktionen beinhaltet. Kawakami et al. 2005 konnten zeigen, dass die Überexpression von IL13RA2-Ketten einen antiproliferativen Effekt auf Mamma- und Pankreaskarzinome immundefizienter Mäuse hat. Trotzdem kann IL13 auch die Tumorgenese begünstigen. So verhindern IL13, IL4 und das durch die Rezeptorbindung aktivierte STAT6 die Immunantwort der TH1-Zelle auf die Tumorzellen. Oshima et al. 2001 konnten im Falle der chronisch lymphatischen Leukämie zeigen, dass IL13 die entarteten B-Zellen vor einer Apoptose schützte. Es wurde zugleich die

Vermutung geäußert, dass IL13 über die Bindung an den IL13-Rezeptor zu einer Proliferation von Hodgkin-Lymphomen führen könnte (Oshima et al. 2001). David et al. 2003 zeigten das IL13 und IL4 die IL13Ra2 Expression in Keratozyten über den ERK und p38/MAPK – Signaltransduktionsweg in Ergänzung zum STAT6 Signaltransduktionsweg induzieren konnten.

Die Tatsache, dass zahlreiche Tumore, wie Gliome eine Überexpression des IL13RA2 zeigen, führte zu einer Reihe von Studien (Kawakami et al. 2005). Es wurde die Hypothese erstellt, dass IL13 von NK-Zellen über den STAT6-Signaltransduktionsweg vermehrt exprimiert wird. Es ist notwendig für eine Verminderung der Immunresistenz der Tumorzellen. Spätere Studien zeigten auf, dass der Transforming Growth Factors (TGF) in myeloischen Zellen essentiell ist für die Runterregulierung der Immunresistenz von Tumorzellen mit demselben System (Kawakami et al. 2005).

Man nutzte die Tatsache, dass IL13 eine Tumorregression erzeugen konnte, indem IL13 in einer mutierten Form des Pseudomonas-Exotoxin gebunden wurde und in das Tumorgewebe injiziert wurde. Über die Bindung dieses chimere Proteins an den IL13-Rezeptor kommt es zu einem zytotoxischen Effekt (Kawakami et al. 2005). Kawakami et al. 2005 zeigten in verschiedenen Versuchen, dass humane Gliome und Hirntumore eine verstärkte Expression der IL13-Rezeptoren aufweisen können. Mit Hilfe des IL13/Pseudomonas-Exotoxin Komplex war es ihnen möglich die Apoptose dieser Tumorzellen in vitro und in vivo anhand von Mausmodellen zu erzeugen, mit zum Teil kompletten Tumorregressionen. In ihren Versuchen mit humanen Glioblastomzellen zeigte sich, dass diese eine hohe Sensitivität (80%) für IL13 besaßen. Es zeigte sich aber auch, dass das IL13 Zytokin keine Apoptose dieser Zellen in vivo und in vitro vermitteln konnte, wenn diese nicht die IL13RA2 Kette exprimierten (Kawakami et al. 2005).

Zum gleichen Zeitpunkt konnten Kawakami et al. 2005 zeigen, dass die Expression von IL13RA2 in IL13RA2 negativen Mamma-Karzinomzellen durch Plasmide induziert werden kann und somit das chimere IL13/Pseudomonas-Exotoxin Protein seinen zytotoxischen Effekt entfalten konnte.

Kawakami et al. 2005 zeigten weiter in immundefizienten Mäusen mit subkutanen oder intrakraniellen Glioblastomen, dass nach der Transfektion dieser Tumore mit der IL13RA2-Kette, und gleichzeitig durch die Infusion des IL13/ Pseudomonas-Exotoxin eine statistisch signifikante Tumorregression beobachtet werden konnte im Vergleich zu nur mit IL13RA2 Plasmiden behandelten Tumoren. Allerdings induzierten die IL13 Infusionen ebenfalls eine vermehrte Expression der IL13-Rezeptoren. Diese Ergebnisse verleiteten zu der Hypothese,

dass der IL13 Gentransfer und die gleichzeitige IL13 Zytotoxin Therapie genutzt werden könnte, für die Behandlung von Glioblastomen. Dies konnten auch Han et al. 2005 mittels Mikroarray und Real-Time an behandelten Glioblastomzellen (mit Gentransfer der IL13RA2-Kette und anschließend mit IL13/Pseudomonas-Exotoxin) zeigen. Sie teilten ihre Untersuchungen in drei hierarchische Gruppen auf. Die erste Gruppe repräsentierte Gene die durch die Behandlung der Zellen mit IL13 vermindert exprimiert wurden. Die zweite Gruppe zeigte die Gene auf, welche nach der Behandlung mit IL13 vermehrt exprimiert wurden und die dritte Gruppe umfasste den Vergleich der Gene nach IL13 Behandlung in Glioblastomzellen und Fibroblasten. Die meisten herunterregulierten Gene gehörten zu Genfamilien, die involviert sind in der Zelladhäsion (CDKN1A, CD44, LAMC, CNN1), Zellmotilität, Angiogenese (END1), DNA-Reparatur und metabolischen Prozessen (PKP2, CYR61). Hingegen ließen sich die hochregulierten Gene Genfamilien zuordnen, deren Funktionen in Zellzyklusarrest, Apoptose (Gadd45), Signaltransduktion (IL13RA2) und metabolischen Prozessen zuzuordnen sind (Han et al. 2005).

In unserer durchgeführten Studie fand sich in den eine verminderte Expression der Glioblastomen eine verstärkte Expression des IL13RA2-Genes in den durchgeführten Array-Analysen. Das Ergebnis konnte nicht durch eine RT-PCR bestätigt werden. Es fand sich in der Real-Time PCR eine verminderte Expression des IL13RA2 Genes in der Gruppe der Glioblastome.

Allerdings fand sich in der Literatur bisher kein Anhalt dafür, dass explizit die Expressionsstärke innerhalb der malignen Gliome untersucht worden ist. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass IL13RA2 in den malignen Gliomen im Vergleich zu normalen ZNS-Gewebe (kaum nachweisbar) vermehrt exprimiert wird und zeigt auf dass es im Verlauf der Malignisierung zu einer Steigerung der IL13RA2 Expression kommt, es entspricht einer prokanzerogenen Wirkung. Dies zeigt auch eine Analyse der Gene im Array, deren Exprimierung von IL13 und dessen Rezeptoren abhängig ist. In den von Han et al. 2005 durchgeführten Analysen mit IL13 stellte sich das Zelladhäsionsgen COL4A2 als verstärkt exprimiert nach der Behandlung mit IL13 dar, ebenso fand sich in deren Analysen eine verstärkte Expression der IL13RA2 und eine verminderte Expression des Zelladhäsionsgen MACF1. Dies spricht für den Erfolg der bisher nur in Tierexperimenten und präklinischen Studien Phase I/II durchgeführten Behandlungen der Glioblastome mit IL13. Es lässt sich vermuten, dass IL13RA2 durch seine vermehrte Expression auf Tumorzellen seine Verwendung nicht nur als Tumormarker finden könnte, insbesondere aufgrund seiner Expression in Gliomen und seine fehlenden Expression in normalem ZNS-Gewebe. Es wäre

vorstellbar dass durch den Nachweis seiner Expression und antitumorösen Aktivität ein genaues Behandlungsschema für Gliompatienten erstellt werden könnte (Kawakami et al. 2005). Basierend auf den bisher sehr erfolgsversprechenden präklinischen Studien wurden drei Phase I/II klinische Behandlungen in Patienten mit rezidivierenden Glioblastomen nach chirurgischer Therapie und anschließender Radiatio initiiert (Kawakami et al. 2005, Husain et al. 2003). Die Histopathologie dieser behandelten Patienten zeigte nur Nekrosen und kein Tumorgewebe mehr (Husain et al. 2003). Es zeigte sich, dass die Therapie mit dem Zytotoxin IL13 abhängig ist von der Expression der IL13RA2-Kette auf Gliomen und nur in Zusammenhang mit diesem Rezeptor zu einer Verlängerung des Überlebens durch Tumorregression führt. Diese Erkenntnisse könnten genutzt werden für die Behandlung von Gliomen mit einer nicht hohen Expressionsrate der IL13RA2-Kette (Kawakami et al. 2005).

RAB34

Die für die RAB-Proteine kodierenden Gene gehören zu den Ras-Genen, einer großen Onkogenfamilie. Sie umfassen zahlreiche Protoonkogene, welche für G-Proteine kodieren (H-Ras, K-Ras, K-RasB, N-Ras).

Die heute bekannten Protoonkogene können aufgrund der Funktionen ihrer Proteine eingeteilt werden in:

1. Wachstumsfaktoren, für die Initiierung der intrazellulären Signaltransduktion
2. Wachstumsfaktor-Rezeptoren, für die Initiierung der intrazellulären Signaltransduktion
3. G-Proteine, für die intrazelluläre Signaltransduktion
4. Proteinkinasen, für die intrazelluläre Signaltransduktion
5. Nukleäre Proteine, Transkriptionsfaktoren
6. Tumorspezifischen Chromosomenrearrangements
7. Virale Onkogene

Zahlreiche Mutationen wurden bisher in den RAB-GTPasen oder in den Genen, der mit ihnen agierenden Proteine gefunden. Diese Mutationen sind verantwortlich für Krankheitssyndrome wie das Griscelli Syndrom, dem Charcot-Marie-Tooth Syndrom mit mentaler Retardierung und Neuropathie, der Amaurosis. Zudem wurden Mutationen in der Ras-Familie in zahlreichen Karzinomen beschrieben. Es korrelierte der Krankheitsverlauf positiv mit der verstärkten Expression der RAB-GTPasen (www.dfg.de/leitlinien 2004).

Die RAB-Proteine gehören zu einer bereits sehr früh identifizierten Proteingruppe, welche unter anderem die Membranhafung und –fusion kontrollieren (Chen et al. 2003).

Die RAB-Proteine kontrollieren die Transportwege durch die Zellmembran hinweg, indem sie als molekulare Schalter zwischen der aktiven GTPgebundenen und inaktiven GDP

gebundenen Form der transmembranösen Proteinkomplexe agieren. Die RAB-Proteine erfüllen ihre Funktion durch Kontrolle bei Vesikelformationen, der intrazellulären Bewegung von Organellen und auch durch Kontrolle von Membranfusionen und –spaltungen durch die Rekrutierung von Effektorproteinen (Chen et al. 2003).

RAB-Proteine nehmen wichtige Funktionen innerhalb verschiedener Pathways der Endo- und Exozytose von Zellen ein. Sie regeln unter anderem über den Vesikeltransport zahlreiche biologische Mechanismen wie der Freisetzung von Neurotransmittern, der Intelligenzentwicklung, der Fertilität und des Knochenwachstums. RAB-Proteine überwachen durch die Kontrolle der intrazellulären Signaltransduktion die Entstehung, aber auch Fusion von intrazellulären Kompartimenten. Das RAB34 Protein gehört zu der Ras-Superfamilie. Es ist eine GTPase mit einem molekularen Gewicht von 23.7kDa. Die Synonyme für RAB34 sind Rah, Rab39 und Ras-related Protein. Bei dem Rab39 Protein handelt es sich nach den Analysen von Chen et al. 2003 möglicherweise auch um eine kurze Splicevariante des RAB34 Proteins. Eines der Charakteristika der Rab-Proteine ist ihre Bindung von GTP und dessen Hydrolyse zu GDP, dies kontrolliert die Knospung von Vesikeln und deren Fusion mit anderen Zellorganellen oder der Zellmembran.

Bereits Wang et al. 2002 konnten in ihren Analysen eine Assoziation des Rab39/34 mit dem Golgi-Apparat nachweisen. Expression des Wildtyps von RAB34/39 bzw. seine GTP-gebundene Form verursachten in Zellen Neuverteilungen von Lysosomen aus der Peripherie in die Nähe des Golgi-Apparates (Wang et al. 2002).

Die Regulation der lysosomalen Morphologie und deren Positionierung erfolgt über das Effektorprotein RILP (rab interacting lysosomal protein), welches als chimäres Protein die Fähigkeit verfügt die lysosomale Morphologie zu regulieren (Colucci et al. 2005). Eine Überexpression des RILP verursachte in den Analysen von Wang et al. 2002 vergrößerte und zentral positionierte Lysosomen.

Den Expressionsnachweis des RAB34 in verschiedenen Geweben führten Chen et al. 2003. Sie wiesen mittels Real-Time PCR die Expression des RAB34 vor allem in epithelialen Zelllinien nach. In ihren Analysen fand sich eine Expression dieses Proteins in vielen Geweben und Zelllinien. Hierzu gehörten Leukämiezelllinien, epitheliale Zelllinien. Eine moderate Expression fand sich in Milz, Mucosa des Kolons, Herz, Plazenta, Lunge Muskel und Niere. Eine verminderte Expression ließ sich nachweisen in Prostata, Testis, Ovar, Dünndarm, in Leukozyten und Pankreas. Nicht nachweisen ließ sich RAB34 mittels Real-Time PCR in normalem ZNS-Gewebe (Chen et al. 2003). Interessanterweise fand diese Arbeitsgruppe eine verstärkte Expression dieses Proteins in Karzinomzelllinien und

Leukämiezelllinien, während im normalen Gewebe bzw. in normalen Leukozyten nur eine geringe Expression nachweisbar war. In diesen Analysen von Chen et al. 2003 war diese RAB34 Überexpression mit einer gesteigerten Endozytose verbunden. In unseren Studien fand sich eine gesteigerte Expression des RAB34 in den Mikroarray-Analysen in der Gruppe der Glioblastome, in den anschließend durchgeführten Real-Time PCR's fand sich ebenfalls eine vermehrte Expression des RAB34 in der Gruppe der Glioblastome. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch die Analyse von Chen et al. 2003. Sie wiesen nach, dass die bekannteren RAB-GTPasen Rab5 und Rab8 unter der Kontrolle von der Proteinkinase C, der Proteinkinase B und ERK die Regulation der intrazellulären Vesikel mit der Zellmembran und dem Golgi-Apparat vollziehen.

Diese Kinasen sind alle involviert in Signaltransduktionswege, dessen zentrales Protein Ras darstellt (siehe Abbildung 23). Expressionsveränderung dieser Kinasen durch Mutationen sind bereits die Proteinkinase B und den MAPK/ERK Signaltransduktionsweg beschrieben, sie führen zu einem Verlust der Zellzyklusregulation und einer verstärkten Expression von Zielgenen durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.

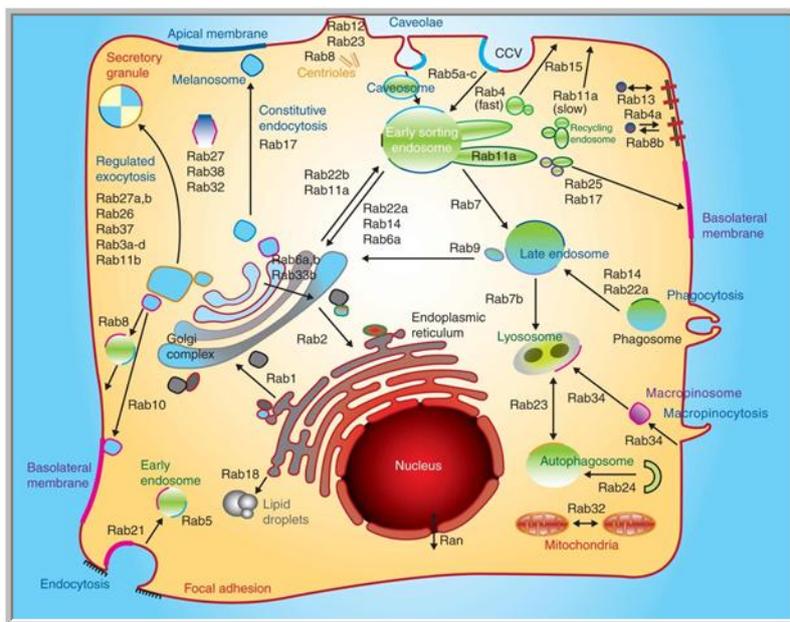


Abbildung 22 Intrazelluläre Funktion der RAB GTPasen (modifiziert nach Schwartz et al. 2007)

(Beispielsweise ist für die oftmals in malignen Tumoren gefundene autokrine Stimulation mit Wachstumsfaktoren eine intrazelluläre Bildung, Einschleusung der Wachstumsfaktoren in den Golgi-Apparat zu korrekter Entstehung der tertiären Proteinstruktur bekannt. Diese ist verantwortlich für die Funktion des Proteins, sowie dessen Verteilung und Ausschleusung aus der Zellmembran essentiell. Hierfür ist ein gesteigert korrekter intrazellulärer Vesikeltransport notwendig, dieser gesteigerte Transport kann aber nur von einer gesteigerten Anzahl von Rab-Proteinen bewältigt werden.)

Es lässt sich vermuten, dass eine Regulation der RAB-GTPasen unter anderem über die Kontrolle der Transkription ihrer Gene erfolgen könnte.

Dies würde bedeuten, dass es wie bei den in Mikroarray-Analysen Glioblastome gefundenen Ergebnissen zu einer vermehrten Expression des RAB34 kommt. Zudem verfügen maligne Zellen über einen gesteigerten zellulären Stoffwechsel. Beispielsweise ist für die oftmals in malignen Tumoren gefundene autokrine Stimulation mit Wachstumsfaktoren eine intrazelluläre Bildung, Einschleusung der Wachstumsfaktoren in den Golgi-Apparat zu korrekten Entstehung der tertiären Proteinstruktur bekannt. Diese ist verantwortlich für die Funktion des Proteins, sowie dessen Verteilung und Ausschleusung aus der Zellmembran essentiell. Hierfür ist ein gesteigerter korrekter intrazellulärer Vesikeltransport notwendig, dieser gesteigerte Transport kann aber nur von einer gesteigerten Anzahl von Rab-Proteinen bewältigt werden. Blespug et al. 2005 konnten in ihrer Studie auch eine verstärkte Expression des RAB34 in verschiedenen Geweben feststellen. Sie bestrahlten Mäuse chronisch mit einer niedrigen Strahlendosis oder akut mit einer höheren Strahlendosis und beobachteten den Expressionswechsel der Protoonkogene, der Onkogene, der Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, der Proteinkinasen, der G-Proteine und Transkriptionsfaktoren in der Muskulatur, Leber und Milz dieser bestrahlten Mäuse. Ziel dieser Studie war es eine onkogenes Genexpressionsmuster zu finden, welches mitverantwortlich für die kanzerogene Wirkung von Strahlen ist (Blespug et al. 2005).

Es ließen sich in diesen Geweben Expressionsveränderungen der Ras-Superfamilie finden (N-Ras, Rab2, RAB34), Veränderungen der Expressionstärke zeigten auch die Proteinkinase C, Komponenten des AP1- und WNT-Signaltransduktionsweges. Anhand der geführten Diskussion lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen den Tatsachen, einer vermehrten Expression des RAB34 in der Gruppe anplastische Astrozytome und den primären Glioblastomen, entsprechen.

4.3 Ausblick und Zukunft der Mikroarray-Technologie

Primäre Hirntumore, insbesondere die malignen infiltrativ wachsenden Astrozytome, unterscheiden sich durch ihre hohe Letalität von allen anderen Karzinomen. Bedingt ist diese hohe Letalität durch eine fehlende/ geringe Ansprechbarkeit dieser Tumore auf die bisher bekannten und angewendeten Therapieformen. Eine Vielzahl von neuentwickelten Therapieformen erlaubt inzwischen eine bessere Behandlung von Patienten mit Gliomen. Der Hauptwechsel in der Optimierung einer Therapie sollte zukünftig jedoch darin liegen, eine Therapie zu etablieren, die den größten Nutzen für den individuellen Patienten verspricht. Die auf DNA-Mikroarray-Analysen basierenden Technologien erlauben die simultane

Expressionsanalyse tausender von Genen in Kombination mit einer immensen Zeitersparnis. Sie sollten genutzt werden um bisher unbekannte Subsets von Patienten zu identifizieren, die sich bisher nur in ihrer Ansprechrate auf bestimmte Therapieformen und in ihrem mittleren Überleben unterschieden haben (Mischel et al. 2004).

Die Zukunft der Therapie von Hirntumoren sollte zunächst auf einer individuellen, molekularen Klassifikation dieser Tumore und auf einer der molekularen Klassifikation entsprechenden, spezifischen Therapie beruhen.

Genechniken wie die Mikroarray-Analysen akzelerieren diesen Entwicklungsprozess in diese Richtung. Die Suche nach Genpolymorphismen, der Verlust an Heterozygotie, die Analyse von chromosomalen Verlusten, die Feststellung des Methylierungs- und Acetylierungsstatus von Genpromotoren und die Identifizierung von charakteristischen Proteinprofilen durch unterschiedliche Arten von Array-Untersuchungen könnten möglicherweise einen wichtigen Part in der neuen, molekularen Diagnostik einnehmen. Sie dürften die Entwicklung spezifischer Therapien für den individuellen Patienten ermöglichen und somit eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit oder gar eine Heilung zur Folge haben (Mischel et al. 2004). Die Genexpressionsprofile durch die Mikroarray-Analysen werden dabei eine zentrale Rolle einnehmen. Anzumerken ist jedoch auch die dadurch zustande kommende Datenflut, welche zukünftig nur noch mit Computern und intelligenter Software zu bewältigen sein wird.

Ein erster möglicher Schritt in diese Richtung wäre die Erstellung von Genomic Single Cases. Dabei sollte stets beachtet werden, dass die Darstellung und Aufarbeitung des genetischen Materials aus dem Tumor eines einzelnen Patienten nur Einblicke in die genetische Natur dieses individuellen Tumors zu einem bestimmten Zeitpunkt gewährt. Zur Erstellung von Subgruppen und zur Erfassung molekularer Marker muss die Erfassung dieser über die Untersuchung größerer Tumorgruppen erfolgen.

5 Zusammenfassung

Maligne Astrozytome des World Health Organization Grad III und IV haben eine stark reduzierte mediane Überlebenszeit. Zahlreiche möglichen molekularen Transduktionswege wurden bisher für die Progression des anaplastischen Astrozytoms zum Glioblastom beschrieben, jedoch ist die molekulare Basis der malignen Astrozytomprogression bisher noch sehr unerforscht. Mikroarray-Analysen erlauben den Vergleich von tausenden Genen in diesen Tumoren und dienen damit der Identifizierung von möglichen Schlüsselgenen und können dazu beitragen die molekularen Mechanismen der malignen Progression zu verstehen.

Es erfolgte der Vergleich des Transkriptionslevel von 4608 Genen in den Tumoren von 14 Patienten (6 anaplastische Astrozytome und 8 Glioblastome WHO Grad IV) mittels Mikroarray-Analysen. Die Mikroarray-Daten sollten validiert werden durch die RT Real-Time PCR an drei ausgewählten Genen. Bei dem Gen RAB34 is eine erfolgreiche Validierung erfolgt.

Wir identifizierten 166 Genexpressionsänderungen mit einem Fold change >2 . Die mRNA-Level dieser Gene differierten signifikant in den beiden malignen Gliomgruppen (absoluter Wert der T-Statistik 1,96). Die Mikroarray-Analysen und Real-Time PCR Quantifizierungen zeigten gegensätzliche Transkriptionsrichtungen für OLIG2 und IL13RA2 in den anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III im Vergleich zum Glioblastom. Homogene Ergebnisse der beiden Analysen fanden sich beim RAB34.

Mikroarray-Analysen mit einer geschlossenen binären Fragestellung erlauben in histologisch gesicherten anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen eine Identifizierung von Genen verschiedener Expression. RAB34, OLIG2 und IL13RA2 scheinen interessante Gene zu sein, die durch ihre unterschiedliche Expression eine wichtige Rolle in der malignen Progression der Astrozytome spielen könnten.

6 Summary

Malignant astrocytomas of World Health Organization (WHO) grade III or IV are indicated by a significantly reduced median survival time. Several possible pathways have been described for the progression of anaplastic astrocytomas and glioblastomas, but the molecular basis of malignant astrocytoma progression has not been analysed entirely. Microarray analysis provides the chance to accelerate studies by comparison of thousands of genes in these tumours and consequently identify targeting genes and this might help to understand the malignant development.

We compared the transcriptional profile of 4608 genes in tumours of 14 patients, including six (6) anaplastic astrocytomas (WHO grade III) and eight (8) glioblastomas (WHO grade IV) using microarray analysis. The microarray data should be validated by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of 3 selected genes. A successful validation took place with gen RAB34.

We identified 166 gene alterations with a fold change of 2 and higher whose mRNA levels differed considerably (absolute value of the t-statistic of 1.96) between the two malignant glioma groups. Further analyses confirmed oppositional transcription directions for OLIG2 and IL13RA2 in WHO grade III astrocytomas as compared to glioblastomas. Homogeneous results of both analyses were found on RAB34

In anaplastic astrocytomas and glioblastomas, which are histologically confirmed, microarray analyses with a closed binary question allow an identification of genes of different expression. RAB34, IL13RA2 and OLIG2 have been identified to be interesting candidate genes whose differential expression likely plays a role in malignant progression of astrocytomas.

7 Literaturverzeichnis

MessageAmp aRNA Kit Handbook
Ambion 2003.

Cy Script postlabeling Kit Handbook
Amersham Handbook 2003.

Aguirre-Cruz L, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Marie Y, Criniere E, Taillibert S, Lopes M, Delattre JY, Sanson M
Analysis of the bHLH transcription factors Olig1 and OLIG2 in brain tumors
J Neurooncol. 2004 May, 67(3):265-71.

Balabanov R, Popko B
Myelin repair: development myelination redux?
Nature Neuroscience 8, 262-264(2005).

Beetz C, Brodoehl S, Patt S, Kalff R, Deufel T
Low expression but infrequent genomic loss of the putative tumour suppressor DBCCR1 in astrocytoma
Oncol Rep. 2005 Feb, 13(2):335-40.

Berger A, Santic R, Almer D, Hauser-Kronberger C, Huemer M, Humpel C, Stockhammer G, Sperl W, Kofler B
Galanin and galanin receptors in human gliomas
Acta Neuropathol (Berl). 2003 Jun, 105(6):555-60.

Berlit P, Röther J
Klinische Neurologie, Kapitel 31 Hirntumore
Springer Verlag, 1. Auflage 1999.

Biotechniques Amersham 2003, 34.

van den Boom J, Wolter M, Kuick R, Misek DE, Youkilis AS, Wechsler DS, Sommer C, Reifenberger G, Hanash SM
Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chainreaction
Am J Pathol. 2003 Sep, 163(3):1033-43.

Böcker, Denk, Heitz
Pathologie 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag.

Bozinov O, Köhler S, Samans B, Benes L, Miller D, Ritter M, Sure U, Bertalanffy H
Candidate genes for the progression of malignant gliomas identified by microarray analysis.
Neurosurg Rev. 2008 Jan, 31(1):83-9; discussion 89-90.
Erratum in: Neurosurg Rev. 2008 Apr;31(2):247-8.

Bouvier C, Bartoli C, Aguirre-Cruz L, Virard I, Colin C, Fernandez C, Gouvernet J, Figarella-Branger D
Shared oligodendrocyte lineage gene expression in gliomas and oligodendrocyte progenitor cells
J Neurosurg. 2003 Aug, 99(2):344-50.

Brandt T, Dickgans J, Diener HC
Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen, Kapitel G 2. Primäre intrakranielle und spinale Tumore
Kohlhammer Verlag 4. Auflage.

Brat DJ, James CD, Jedlicka AE, Connolly DC, Chang E, Castellani RJ, Schmid M, Schiller M, Carson DA,
Burger PC
Molecular genetic alterations in radiation-induced astrocytomas
Am J Pathol. 1999 May, 154(5):1431-8.

Bruce JN, Kennedy B
Glioblastoma Multiforme
www.emedicine.medscape.com/article/283252.

Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald
DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN
Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic
oligodendrogliomas
J Natl Cancer Inst. 1998 Oct 7, 90(19):1473-9.

Caput D, Laurent P, Kaghad M, Lelias J, Lefort S, Vita N, Ferrara P
Cloning and Characterization of a Specific Interleukin (IL)-13 Binding Protein Structurally Related to the IL-5
Receptor α Chain
The Journal of Biological Chemistry 1996, 271: 16921-16926.

Chandrasekar N, Mohanam S, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS
Glial cell-induced endothelial morphogenesis is inhibited by interfering with extracellular signal-regulated
kinase signaling
Clin Cancer Res. 2003 Jun, 9(6): 2342-9.

Chen P, Aldape K, Wiencke JK, Kelsey KT, Miike R, Davis RL, Liu J, Kesler-Diaz A, Takahashi M, Wrensch
M
Ethnicity delineates different genetic pathways in malignant glioma
Cancer Res. 2001 May 15, 61(10):3949-54.

- Chen T, Han Y, Yang M, Zhang W, Li N, Wan T, Guo J, Cao X
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.
- Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G
Making and reading microarrays
Nat Genet. 1999 Jan, 21(1 Suppl):15-9.
- Clarke PA, Poole R, Wooster R, Workman P
Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology and drug development: progress and potential
Biochemical Pharmacology 62 2001:1311-1336.
- Colucci AM, Campana MC, Bellopede M, Bucci C
The Rab-interacting lysosomal protein, a Rab7 and RAB34 effector, is capable of self-interaction
Biochem Biophys Res Commun. 2005 Aug 19, 334(1):128-33.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D
In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain
J Neurosci. 1996 Apr 15, 16(8):2649-58.
- Debinski W, Slagle B, Gibo DM, Powers SK, Gillespie GY
Expression of a restrictive receptor for interleukin 13 is associated with glial transformation
J Neurooncol. 2000 Jun, 48(2):103-11.
- Dabdoub A, Donohue MJ, Brennan A, Wolf V, Montcouquiol M, Sassoon DA, Hsieh JC, Rubin JS, Salinas PC, Kelley MW
Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea
Development. 2003 Jun, 130(11): 2375-84.
- David MD, Bertoglio J, Pierre J
Functional characterization of IL-13 receptor alpha2 gene promoter: a critical role of the transcription factor STAT6 for regulated expression
Oncogene. 2003 May 29, 22(22):3386-94.
- Deng Y, Yao L, Chau L, Ng SS, Peng Y, Liu X, Au WS, Wang J, Li F, Ji S, Han H, Nie X, Li Q, Kung HF, Leung SY, Lin MC
N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation
Int J Cancer. 2003 Sep 1, 106 (3):342-7.

Ding H, Nagy A, Gutman D, Guha A

A review of astrocytoma models

Neurosurg Focus 2002, 8 (4): Article 1.

Diep DB, Hoen N, Backman M, Machon O, Krauss S

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.

Donaldson D, Whitters M, Fitz L, Neben T, Finnerty H, Henderson S, O'Hara R, Beier D, Turner K, Wood C, Collins M

The Murine IL-13 Receptor $\alpha 2$: Molecular Cloning, Characterization, and Comparison with Murine IL-13 Receptor $\alpha 1$

The Journal of Imm. 1998, 161:2317-2324.

Dreyfuss JM, Johnson MD, Park PJ

Meta-analysis of glioblastoma multiforme versus anaplastic astrocytoma identifies robust gene markers

Molecular Cancer 2009, 8:71.

Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP

Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo

Cancer Res. 1991 Apr 15, 51(8):2164-72.

Falchetti ML, Pierconti F, Casalbore P, Maggiano N, Levi A, Larocca LM, Pallini R

Glioblastoma induces vascular endothelial cells to express telomerase in vitro

Cancer Res. 2003 Jul 1, 63(13):3750-4.

Farmer JP, Montes JL, Freeman CR, Meagher-Villemure K, Bond MC, O'Gorman AM

Brainstem Gliomas. A 10-year institutional review

Pediatr Neurosurg. 2001 Apr, 34(4):206-14.

Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP

Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults

Cancer. 1993 Apr 15, 71(8):2585-97.

Fukuda S, Kondo T, Takebayashi H, Taga T

Negative regulatory effect of an oligodendrocytic bHLH factor OLIG2 on the astrocytic differentiation pathway

Cell Death Differ. 2004 Feb, 11(2):196-202.

Fuller GN, Hess KR, Rhee CH, Yung WK, Sawaya RA, Bruner JM, Zhang W
Molecular Classification of Human Diffuse Gliomas by Multidimensional Scaling Analysis of Gene Expression
Profile Parallels Morphology –Based Classification, Correlates with Survival and Reveals Clinically-Relevant
Novel Glioma Subsets
Brain Pathol. 2002, 12:108-116.

Fricker-Gates RA, Winkler C, Kirik D, Rosenblad C, Carpenter MK, Bjorklund A
EGF infusion stimulates the proliferation and migration of embryonic progenitor cells transplanted in the adult
rat striatum
Exp Neurol. 2000 Oct, 165(2):237-47.

Furnari F.B, Fenton T, Bachoo RM, et al
Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and path to treatment
Genes Dev. 2007, 21: 2683-2710.

Gabig M, Wegrzyn G
An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis
Acta Biochimica Pol. 2001, 48:3 .

Gante D, Ruckpae K
Erkrankungen des zentralen Nervensystemes, Springer Verlag 1999
Kapitel Gliale Neoplasien von Reifenberger G

Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, Nozaki M, Diserens AC, Hamou MF,
Dietrich PY, Regli L, Janzer RC, Bucher P, Stupp R, de Tribolet N, Domany E, Hegi ME Classification of
human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity
emerges as a strong predictor of subtypes
Cancer Res. 2003 Oct 15, 63(20): 6613-25.

Golub TR, Slomin DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR,
Cakigiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES
Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Glass Prediction by Gene Expression Monitoring
Science 1999 Oct 15, 284 .

Gonzalez-Fernandez F, Lopes MB, Garcia-Fernandez JM, Foster RG, De Grip WJ, Rosenberg S, Newman SA,
VandenBerg SR
Expression of developmentally defined retinal phenotypes in the histogenesis of retinoblastoma
Am J Pathol. 1992 Aug, 141(2): 363-75.

Gu CC, Rao DC, Stormo G, Hicks C, Province MA

Role of Gene Expression Microarray Analysis in Finding Complex Disease Genes

Genetic Epid. 2002, 23:37-56.

Guilietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Buoillon R, Mathieu Ch

An Overview of Real-Time Quantitative PCR:

Applications to Quantify Cytokine Gene Expression

Methods 2001, 25:386-401.

Habuchi T, Yoshida O, Knowles MA

A novel candidate tumor suppressor locus at 9q32-33 in bladder cancer: localization of the candidate region within a single 840 kb YAC

Hum. Mol. Gen. 1997, 6(6).

Han C, Lin X

Shifted from Wnt to Hedgehog signaling pathways

Mol Cell. 2005 Feb 4, 17(3):321-2.

Harkin DP

Uncovering functionally relevant signaling pathways using microarray-based expression profiling

Oncologist. 2000, 5(6):501-7.

He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L

BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling

Nat Genet. 2004 Oct, 36(10):1117-21.

Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermarck B, Heldin CH, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A, Nister M

Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas

Cancer Res. 1996 Jan 1, 56(1):164-71.

Hess KR

Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas

J Neurooncol. 1999 May, 42(3):227-31.

Hoang-Xuan K, Aguirre-Cruz L, Mokhtari K, Marie Y, Sanson M

OLIG-1 and 2 gene expression and oligodendroglial tumours

Neuropathol Appl Neurobiol. 2002 Apr, 28(2):89-94.

Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN

Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice
Nat Genet. 2000 May, 25(1):55-7.

Holland EC

Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models

Nat Rev Genet. 2001 Feb, 2(2):120-9.

Holland EC, Hively WP, Gallo V, Varmus HE

Modeling mutations in the G1 arrest pathway in human gliomas: overexpression of CDK4 but not loss of INK4a-ARF induces hyperploidy in cultured mouse astrocytes

Genes Dev. 1998 Dec 1, 12(23):3644-9.

Holzmann KH

DNA-Chip Technologie in Ulm-ein integraler Bestandteil moderner, klinischer Grundlagenforschung

Biospectrum 02/2006, Jahrgang 12.

Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J

A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities

Nature. 1999 Apr 1, 398(6726):431-6.

Husain SR, Puri RK

Interleukin-13 receptor-directed cytotoxin for malignant glioma therapy: from bench to bedside

J Neurooncol. 2003 Oct, 65(1):37-48.

Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP

Deregulation of the p14ARF/MDM2/TP53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities

Cancer Res. 2000 Jan 15, 60(2):417-24.

Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP

Molecular pathogenesis of astrocytic tumours

J Neurooncol. 2004 Nov, 70(2):137-60.

Ilyas M

Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development

J Pathol. 2005 Jan, 205(2):130-44.

Ikeya M, Lee SM, Johnson JE, McMahon AP, Takada S

Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors

Nature. 1997 Oct 30, 389(6654):966-70.

Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, Yan H, Adamson C
Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways
Clin Med Oncol 2009, April 8, 3: 39-52.

Kauffmann GW, Moser E, Sauer R
Radiologie
2. Auflage Urban & Fischer 2001.

Kawakami K, Taguchi J, Murata T, Puri RK
The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway
Blood. 2001 May 1, 97(9):2673-9.

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

Kawakami K, Kawakami M, Puri R, Takahashi S, Abe M
Analysis of Interleukin-13 Receptor $\alpha 2$ Expression in Human Pediatric Brain Tumors
Cancer 2004, 101:1036-1042 .

Kawakami K, Kawakami M, Puri R
Specifically targeted killing of interleukin-13 (IL-13) receptor expressing breast cancer by IL-13 fusion cytotoxin in animal model of human disease
Mol Cancer Ther. 2004, 3:137-147.

Kawakami K, Kawakami M, Puri R, Joshi B
Interleukin-13 Receptor-targeted Cancer Therapy in an Immunodeficient Animal Model of Human Head and Neck Cancer
Cancer Res. 2001, 61: 6194-6200.

Kawakami M, Kawakami K, Puri R
Intratumor Administration of Interleukin 13 Receptor targeted Cytotoxin Induces Apoptotic Cell Death in Human Malignant Glioma Tumor Xenografts
Mol Cancer Ther. 2002, 1: 999-1007.

Kawakami K, Taguchi J, Murata T, Puri R
The interleukin-13 receptor $\alpha 2$ chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway
Blood 2001, 97: 2673-2679.

Levin VA, Silver P, Hannigan J, Wara WM, Gutin PH, Davis RL, Wilson CB
Superiority of post-radiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic gliomas: NCOG 6G61 final report
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1990 Feb, 18(2):321-4.

Ligon AH, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Steck PA
Identification of a novel gene product, RIG, that is down-regulated in human glioblastoma
Oncogene. 1997 Mar , 14(9):1075-81.

Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH
The Oligodendroglial Lineage Marker OLIG2 Is Universally Expressed in Diffuse Gliomas
Journal of Neuropathology & Experimental Neurology:
May 2004, Vol. 63/5, 499–509.

Li CM, Kim CE, Margolin AA, Guo M, Zhu J, Mason JM, Hensle TW, Murty VV, Grundy PE, Fearon ER, D'Agati V, Licht JD, Tycko B
CTNNB1 mutations and overexpression of Wnt/beta-catenin target genes in WTI-mutant Wilms' tumors
Am J Pathol. 2004 Dec, 165(6):1943-53.

Löffler G, Petrides P
Biochemie und Pathobiochemie
Springerverlag 2000, 5.Auflage.

Lui ET, Karuturi KR
Microarray and Clinical Investigations
N Engl J Med 2004 April, 350: 16.

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA
Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter
Genes Dev. 2001 Jun, 15(11):1311-33.

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

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

Medical Research Council Brain Tumor Working Party

Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial
J Clin Oncol. 2001 Jan 15, 19(2):509-18.

Meir van EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ

Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Gliomas
A Cancer Journal for Clinicians, May 13, 2010.

Merlo A

Genes and pathways driving glioblastomas in humans and murine disease models
Neurosurg Rev. 2003 Jul, 26(3):145-58.

Mischel PS, Shai R, Shi T, Horvath S, Lu KV, Choe G, Seligson D, Kremen TJ, Palotie A, Liao LM, Cloughesy TF, Nelson SF

Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling
Oncogene. 2003 Apr, 22(15):2361-73.

Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K, Nakafuku M

Combinatorial Roles of OLIG2 and Neurogenin2 in the Coordinated Induction of Pan-Neuronal and Subtype-Specific Properties of Motoneurons
Neuron 2001, 31: 757-771.

Mokhtari K, Paris S, Aguirre-Cruz L, Privat N, Criniere E, Marie Y, Hauw JJ, Kujas M, Rowitch D, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Sanson M

OLIG2 expression, GFAP, p53 and 1p loss analysis contribute to glioma subclassification
Neuropathol Appl Neurobiol. 2005 Feb, 31(1):62-9.

Murata T, Husain S, Mohri H, Puri R

Two different IL-13 receptor chains are expressed in normal human skin fibroblasts, and IL-4 and IL-13 mediate signal transduction through a common pathway
International Immunology 1998, 10: 1103-1110.

Novitsch B, Chen A, Jessell T

Coordinate Regulation of Motor Neuron Subtype Identity and Panneuronal Properties by the bHLH Repressor Olig2
Neuron 2001, 31: 773-789.

Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, Hartmann C, McLaughlin ME, Batchelor TT, Black PM, von Deimling A, Pomeroy SL, Golub TR, Louis DN

Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification

Cancer Res. 2003 Apr , 63(7):1602-7.

Ohgaki H

Genetic pathways to glioblastomas.

Neuropathol. 2005 Mar, 25(1):1-7.

Ohgaki H, Kleihues P

Genetic alteration and signaling pathways in the evolution of gliomas

Cancer Science, Dec 2009, 200, 12: 2235-2241.

Ohgaki H, Kleihues P

Genetic pathways to primary and secondary Glioblastoma

Am J Pathol 2007 May,170(5): 1445-1453

Ohigashi T, Mizuno R, Nakashima J, Marumo K, Murai M

Inhibition of Wnt signaling downregulates Akt activity and induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells

Prostate. 2005 Jan, 62(1):61-8.

Oshima Y, Puri RK

Suppression of an IL-13 autocrine growth loop in a human Hodgkin/Reed-Sternberg tumor cell line by a novel IL-13 antagonist

Cell Immunol. 2001 Jul 10, 211(1):37-42.

Ohshima K, Akaiwa M, Umeshita R, Suzumiya J, Izuhara K, Kikuchi M

Interleukin-13 and interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis

Histopath. 2001, 38: 368-375.

Ohnishi A, Sawa H, Tsuda M, Sawamura Y, Itoh T, Iwasaki Y, Nagashima K

Expression of the oligodendroglial lineage-associated markers Olig1 and OLIG2 in different types of human gliomas

J Neuropathol Exp Neurol. 2003 Oct, 62(10):1052-9.

Palmer TD, Takahashi J, Gage FH

The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells

Mol Cell Neurosci. 1997, 8(6):389-404.

Critical Factors for Successful Real-Time PCR
Qiagen Handbook 2004.

RNeasy Lipid Tissue Mini Handbook
Qiagen Handbook 2003.

Omniscript Reverse Transkription Handbook
Qiagen Handbook 2004.

QuantiTect SYBR Green PCR Handbook
Qiagen Handbook 2004.

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

Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP
Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without TP53
mutations
Cancer Res. 1993 Jun , 53(12):2736-9.

Reifenberger G, Collins VP
Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas
J Mol Med. 2004 Oct, 82(10):656-70.

Rickman DS, Bobek MP, Misek DE, Kuick R, Blai vas M, Kurnit DM, Taylor J, Hanash SM
Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray
analysis
Cancer Res. 2001 Sep, 61(18):6885-91.

Rickman DS, Tyagi R, Zhu XX, Bobek MP, Song S, Blai vas M, Misek DE, Israel MA, Kurnit DM, Ross DA,
Kish PE, Hanash SM
The gene for the axonal cell adhesion molecule TAX-1 is amplified and aberrantly expressed in malignant
gliomas
Cancer Res. 2001 Mar , 61(5):2162-8.

Riemenschneider MJ, Koy TH, Reifenberger G
Expression of oligodendrocyte lineage genes in oligodendroglial and astrocytic gliomas
Acta Neuropathol (Berl). 2004 Mar, 107(3):277-82.

Roy NS, Wang S, Harrison-Restelli C, Benraiss A, Fraser RA, Gravel M, Braun PE, Goldman SA
Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the
adult human subcortical white matter
J Neurosci. 1999 Nov, 19(22):9986-95.

Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuan K
Molecular changes in gliomas
Curr Opin Oncol. 2004 Nov, 16(6):607-13.

Sarkar C, Chattopadhyay P, Ralte AM, Mahapatra AK, Sinha S
Loss of heterozygosity of a locus in the chromosomal region 17p13.3 is associated with increased cell
proliferation in astrocytic tumors
Cancer Genet Cytogenet. 2003 Jul, 144(2):156-64.

Saxena A, Shriml LM, Dean M, Ali IU
Comparative molecular genetic profiles of anaplastic astrocytomas/glioblastomas multiforme and their
subsequent recurrences
Oncogene 1999 Feb, 18(6):1385-90.

Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A
Rab GTPases at a glance
Journal of Cell Science 120, 3905-3910, 2007.

Setoguchi T, Kondo
Nuclear export of OLIG2 in neural stem cells is essential for ciliary neurotrophic factor-induced astrocyte
differentiation
J Cell Biol. 2004 Sep 27, 166(7):963-8.

Shai R, Shi T, Kremen TJ, Horvath S, Liao LM, Cloughesy TF, Mischel PS, Nelson SF
Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas
Oncogene. 2003 Jul, 22(31):4918-23.

Southern E., Mir K., Shchepinov M
Molecular interaction on microarrays
Nature Genetics Supplement 1999, 21.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group
Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma
N Engl J Med. 2005 Mar, 352(10):987-96.

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

Vandessompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F,
Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes
Genome Biol. 2002, 3: 7.

Wang T, Hong W
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
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.

Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R
Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors
Nature. 2003 May 22, 423(6938):448-52.

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
WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer
Pathol. 2003 Oct, 201(2):204-12.

Wright KO, Messing EM, Reeder JE
DBCCR1 mediates death in cultured bladder tumor cells
Oncogene. 2004 Jan 8, 23(1):82-90.

Wong ET, Hess KR, Gleason MJ, Jaeckle KA, Kyritsis AP, Prados MD, Levin VA, Yung WK
Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials
J Clin Oncol. 1999 Aug, 17(8):2572-8.

Wu CJ, Chen Z, Ullrich A, Greene MI, O'Rourke DM
Inhibition of EGFR-mediated phosphoinositide-3-OH kinase (PI3-K) signaling and glioblastoma phenotype by
signal-regulatory proteins (SIRPs)
Oncogene. 2000 Aug, 19(35):3999-4010.

Wynn T
IL-13 Effector Functions
Annu. Rev. Immunol. 2003, 21: 425-456.

www.antibiotikamonitor.at 2012

www.csiro.au/2006.

www.cgr.otago.ac.nz.2005.

www.colombia.medica.univalle.edu.co 2012

www.genome.ad.jp/kegg/pathway 2005.

www.genome.ucsc.edu

www.dgn.de/leitlinien 2005.

www.dgn.de/leitlinien 2004.

www.dgho.de 2005.

www.Pathologie-online.de 2007

www.stress-genomics.org 2006.

www.transcriptome.ens.fr 2003.

www.imtek.de

www.rki.de/krebsregister2010

Yang T, Witham TF, Villa L, Erff M, Attanucci J, Watkins S, Kondziolka D, Okada H, Pollack IF, Chambers WH

Glioma-associated hyaluronan induces apoptosis in dendritic cells via inducible nitric oxide synthase: implications for the use of dendritic cells for therapy of gliomas
Cancer Res. 2002 May, 62(9):2583-91.

Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP

Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation
Nucleic Acids Res. 2002, 30:15.

Yu J, Zhang H, Gu J, Lin S, Li J, Lu W, Wang Y, Zhu J

Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma
BMC Cancer. 2004 Sep, 4:65.

Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W, Glantz M, Greenberg H, Selker RG, Vick NA, Rampling R, Friedman H, Philipps P, Bruner J, Yue N, Osoba D, Zaknoen S, Levin VA

A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse
Br J Cancer. 2000 Sep, 83(5):588-93.

Yung WK, Prados MD, Yaya-Tur R, Rosenfeld SS, Brada M, Friedman HS, Albright R, Olson J, Chang SM, O'Neill AM, Friedman AH, Bruner J, Yue N, Dugan M, Zaknoen S, Levin VA

Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group
J Clin Oncol. 1999 Sep, 17(9):2762-71.

Zhou Q, Wang S, Anderson D

Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors
Neuron 2000, 25: 331-343.

Zhou Q, Choi G, Anderson D

The bHLH Transcription Factor OLIG2 Promotes Oligodendrocyte Differentiation in Collaboration with Nkx2.2
Neuron 2001, 31: 791-807.

Zhou Q, Anderson D

The bHLH Transcription Factors OLIG2 and OLIG1 Couple Neuronal and Glial Subtype Specification
Cell 2002, 109: 61-73.

Zuber MA, Krupp W, Holland H, Froster UG

Characterization of chromosomal aberrations in a case of glioblastoma multiforme combining cytogenetic and molecular cytogenetic techniques

Cancer Genet Cytogenet. 2002 Oct, 138(2):111-5.

8 Abkürzungen

ACNU	- Carmustin Chemotherapeutikum
aRNA	- amplifizierte RNA
Astro III	- Anaplastisches Astrozytom
BCNU	- Carmustin Chemotherapeutikum
CCNU	- Carmustin Chemotherapeutikum
CDK	- Cyclin-Dependent Kinase
cDNA	- Copy DNA
COL4A2	- Collagen, Type IV, alpha
COT1	- placentare DNA
CT	- Computertomographie
DBCCR1	- Deleted in Bladder Cancer Chromosome Region Candidate 1
DEPC	- Diethylpyrocarbonat
DEPC-H ₂ O	- Diethyl Pyrocarbonat Wasser
DNA	- desoxynucleotide acid
DTT	- Dithiocarbonat
EGF	- Epidermal Growth Factor
EGFR	- Epidermal Growth Factor
GAPDH	- Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GAPDH	- Glyceinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	- Glioblastoma multiforme
GBM	- Glioblastoma multiforme
GFAP	- Saures Gliafaserprotein
GY	- Gray
IL13RA2	- Interleukin 13 Receptor, Alpha 2
LTF	- Lactotransferrin
MAPK	- Mitogen Activated Protein Kinase
MAPK	- Mitogen-Activated Protein Kinase
MDM2	- Transformed 3T3 Cell Double Minute 2; TP53 Binding Protein
MRT	-Magnetresonanztomographie
OLIG2	- oligodendrocyte transcription factor 2
PCR	- Polymerase Chain Reaction

PCR	- Polymerase Chain Reaction
PDGF	- plated derived growth factor
PDGFR	- plated derived growth factor receptor
PI3K	- Phosphoinositide-3-Kinase
PRB1	- proline rich protein 1
PTEN	- Phosphatase and Tensin
RAB34	- Member of Ras Oncogene Family
RAS	- Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
RB	- Retinoblastoma Gen
RT Real-Time PCR	- Reverse Transcription Real Time PCR
RT-PCR	- Real Time PCR
SDS	- sodium dodecyl sulfat
STAT6	- Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF	- Transforming Growth Factor
TGFB1	- Transforming Growth Factor, Beta 1
VEGF	- Vascular Endothelial Growth Factor
WIF1	- WNT Inhibitory Factor 1
WNT	- Wingless-Type

9 Tabellenanhang

(zeigt die Gesamtergebnisse der Mikroarrays aus dem Gruppenvergleich anaplastische Astrozytome versus Glioblastome. GenID-Spot: Genidentifizierungsnummer auf dem Array, MW1-Mittelwert der Genexpressionsstärke Astro III vs. Astro I, MW2-Mittelwert der Genexpressionsstärke GBM vs. Astro I, Differenz GBM/Astro III, $\text{abs}(MW1/MW2)$ -Berechnung der Mittelwerte der Genexpressionsstärke zwischen Astro III und Glioblastom, FC- fold change, Richtung- zeigt die vermehrte oder verminderte errechnete Expressionsstärke, Accession No- internationale Identifizierungsnummer der Gene.)

Tabelle 16 Mikroarrays aus dem Gruppenvergleich anaplastische Astrozytome versus Glioblastome

GenID Spot1	MW 1	MW 2	Astro III/ prim. Glioblastom	$\text{abs}(MW1/MW2)$	FC	Richtung	Symbol	Accession No
7755	-0,29	3,97	-4,3	4,26	19,10	down	LTF	AA677706
8010	-3,14	-0,24	-2,9	2,89	7,44	down	LGALS3	AA630328
623	0,34	3,19	-2,8	2,84	7,18	down	RAM2	W04713
2946	-0,18	2,37	-2,5	2,55	5,85	down	IL13RA2	R52796
7301	-2,53	-0,05	-2,5	2,48	5,59	down	C1R	T69603
3087	2,61	0,12	2,5	2,48	5,59	Up	SEZ6L	H29013
1892	0,25	2,72	-2,5	2,47	5,53	down	HS3ST3B1	W95041
6626	-0,47	1,90	-2,4	2,38	5,19	down	RIS1	AA127069
3952	-0,30	2,07	-2,4	2,37	5,18	down		T61649
2404	0,22	2,54	-2,3	2,33	5,02	down	NNAT	R63918
5899	1,38	-0,93	2,3	2,32	4,98	Up	ZDHH22	AA011100
5482	-0,07	2,20	-2,3	2,27	4,81	down	LZTS1	N31948
7398	1,04	-1,20	2,2	2,24	4,72	Up	CHGB	W37769
5710	-2,06	0,18	-2,2	2,24	4,71	down	OCIAD2	AA464688
2731	-0,82	1,40	-2,2	2,21	4,64	down	BF	AA401441
2058	-0,51	1,61	-2,1	2,12	4,34	down	MGC17301	T60926
3752	-2,13	-0,04	-2,1	2,09	4,27	down	FABP7	W72051
103	-1,92	0,17	-2,1	2,09	4,25	down	RAB34	AA485449
8011	-2,31	-0,23	-2,1	2,08	4,22	down	IDH2	AA679907
7493	0,19	2,26	-2,1	2,07	4,19	down	COL4A2	AA430540
9124	0,09	-1,94	2,0	2,03	4,09	Up	MACF1	AA047436
7522	0,03	2,06	-2,0	2,03	4,08	down	DPP4	W70234
5638	-1,35	0,65	-2,0	2,00	3,99	down	PTRF	AA443119
2466	0,63	-1,35	2,0	1,99	3,96	Up	OLIG2	H50086
4558	0,46	2,44	-2,0	1,98	3,96	down	PPP1R14A	AA458487
5642	-0,28	1,68	-2,0	1,97	3,91	down		N69049
7626	0,11	-1,80	1,9	1,91	3,75	Up	RIPX	R94511
6082	-3,04	-1,14	-1,9	1,90	3,73	down	VMP1	AA485373
6344	0,10	1,95	-1,9	1,85	3,61	down	HEYL	R27319
8322	-2,06	-0,22	-1,8	1,84	3,58	down	PLOD2	H99816
968	-1,38	0,45	-1,8	1,83	3,56	down	T1A-2	AA149827
5039	0,44	-1,38	1,8	1,82	3,52	Up		W73371
2864	-0,17	1,64	-1,8	1,81	3,50	down	AQP1	H24316
4934	-1,81	-0,01	-1,8	1,80	3,49	down	LOC54103	T66902
3949	1,70	-0,08	1,8	1,78	3,42	Up		T55407
1449	-0,02	1,76	-1,8	1,77	3,42	down		W46629
7462	-1,39	0,38	-1,8	1,77	3,41	down	CHI3L2	AA668821

GenID Spot1	MW 1	MW 2	Astro III/ prim. Glioblastom	abs(MW1/MW2)	FC	Richtung	Symbol	Accession No
208	-0,21	1,56	-1,8	1,77	3,40	down	F2RL2	AA041482
2660	-1,09	0,65	-1,7	1,75	3,35	down	SLC16A3	AA129777
7691	-0,46	1,28	-1,7	1,74	3,33	down	LAMA2	AA034939
5508	1,73	3,47	-1,7	1,74	3,33	down	ROBO2	R67886
3599	0,93	2,65	-1,7	1,72	3,30	down	STK17A	H65942
5578	-3,30	-1,59	-1,7	1,71	3,27	down		R95691
5351	-1,17	0,54	-1,7	1,71	3,27	down		AA431571
5454	-2,18	-0,48	-1,7	1,70	3,25	down		AA043551
5603	-1,74	-0,04	-1,7	1,70	3,25	down	PLOD2	AA136707
3713	-1,57	0,12	-1,7	1,70	3,24	down	DSCR1	AA629707
7397	-2,12	-0,45	-1,7	1,66	3,17	down	SERPING1	AA481438
8112	-0,56	1,09	-1,7	1,65	3,15	down		AA099138
8641	0,77	-0,85	1,6	1,62	3,08	Up		H20814
5070	-0,09	1,53	-1,6	1,62	3,06	down	DKFZp762A217	AA055447
8973	-1,20	0,40	-1,6	1,60	3,03	down	ACSL3	H29215
111	-0,09	1,51	-1,6	1,60	3,02	down	SLC16A10	W32409
2032	-1,56	0,02	-1,6	1,58	3,00	down	ALOX5AP	T49652
7339	-0,30	1,28	-1,6	1,58	3,00	down	ADAMTS1	R76553
4163	2,08	0,50	1,6	1,57	2,97	Up	TIGA1	T71353
900	-0,04	1,52	-1,6	1,55	2,94	down	CENTD3	AA458491
967	0,20	1,75	-1,6	1,55	2,93	down		N95621
8974	-1,99	-0,45	-1,5	1,54	2,91	down	ABCA5	R53428
686	-1,22	0,31	-1,5	1,54	2,90	down		AA404352
8265	-0,13	1,40	-1,5	1,53	2,89	down	MCPH1	AA156424
3847	0,72	2,24	-1,5	1,52	2,87	down		H20717
8971	-1,29	0,23	-1,5	1,52	2,87	down		R52786
8523	-1,32	0,20	-1,5	1,52	2,87	down	CTRL	AA427778
3405	0,12	1,62	-1,5	1,51	2,85	down	LZTS1	H09757
2096	-1,46	0,05	-1,5	1,51	2,85	down	CKLFSF3	AA486561
1388	0,60	-0,91	1,5	1,51	2,85	Up	C9orf125	W56790
7137	-0,52	0,99	-1,5	1,51	2,85	down	PBXIP1	AA074535
6404	0,12	1,62	-1,5	1,51	2,84	down	GPR116	N95226
5386	-1,00	0,51	-1,5	1,51	2,84	down		N34799
2918	0,74	2,23	-1,5	1,49	2,82	down	ENPEP	AA102107
4900	-0,61	0,88	-1,5	1,49	2,80	down	COPZ2	W70230
1954	-0,50	-1,98	1,5	1,49	2,80	Up	GRIA4	N52193
5326	-0,12	1,35	-1,5	1,48	2,78	down	ELTD1	W72803
1635	1,91	0,44	1,5	1,47	2,77	Up		W93120
7333	-2,45	-0,98	-1,5	1,47	2,76	down	C4A	AA664406
7597	-2,33	-0,86	-1,5	1,46	2,76	down	FAM46A	R71627
7526	-1,05	0,41	-1,5	1,46	2,76	down	CP	H86554
2790	-0,76	-2,23	1,5	1,46	2,75	Up	GSTT1	H99813
3750	-2,61	-1,16	-1,5	1,45	2,74	down	LYPDC1	AA419229
7815	-0,92	-2,36	1,4	1,44	2,72	Up		R44603
1121	0,13	1,57	-1,4	1,43	2,70	down	LPHN2	W74533

GenID Spot1	MW 1	MW 2	prim. Glioblastom/Astro III	abs(MW1/MW2)	FC	Richtung	Symbol	Accession No
4333	-0,60	-2,02	1,4	1,42	2,67	Up	CPXM2	AA148685
7850	-3,24	-1,83	-1,4	1,42	2,67	down	LYZ	N63943
9123	0,12	-1,29	1,4	1,41	2,66	Up	TUSC3	H13424
8135	0,29	1,70	-1,4	1,40	2,65	down	ANGPT2	AA125872
7942	-0,13	-1,53	1,4	1,40	2,64	Up	STXBP6	H15408
1479	-0,63	0,77	-1,4	1,40	2,64	down	RHBDL7	AA453994
1484	-0,77	-2,15	1,4	1,38	2,60	Up		N62952
2437	-1,21	0,16	-1,4	1,38	2,59	down	MT1F	T56281
3119	2,20	0,83	1,4	1,37	2,59	Up	NMNAT2	R38865
8006	1,39	0,02	1,4	1,37	2,59	Up	FREM3	H09749
7595	-0,25	1,11	-1,4	1,36	2,57	down	PTGFRN	T87069
7300	-2,68	-1,32	-1,4	1,36	2,57	down	CYP27A1	N66957
5540	-0,69	0,67	-1,4	1,36	2,57	down		AA142842
2764	-1,66	-0,31	-1,4	1,35	2,55	down	AQP4	N46843
2533	-2,10	-0,75	-1,3	1,35	2,55	down	MATN2	AA071473
6851	0,02	1,36	-1,3	1,34	2,53	down	SMC4L1	N90779
8323	-1,55	-0,21	-1,3	1,34	2,53	down	MEIS2	R59167
7464	-1,58	-0,25	-1,3	1,33	2,52	down	CSTA	W72207
8903	-0,29	1,04	-1,3	1,33	2,51	down	PLOD3	AA459305
8648	-0,45	-1,77	1,3	1,33	2,51	Up	PDK4	T61792
3018	-1,60	-0,27	-1,3	1,32	2,50	down	FGFR1	R54846
5281	-1,28	0,04	-1,3	1,32	2,50	down	LOC92689	AA126862
9095	-0,28	-1,60	1,3	1,32	2,49	Up	SERPINA5	W86431
7817	-1,16	0,15	-1,3	1,32	2,49	down	HLA-C	AA464246
492	-1,34	-0,02	-1,3	1,31	2,48	down	HIC	N79548
1359	-0,72	0,59	-1,3	1,31	2,48	down	APXL2	N48057
1996	-0,46	0,84	-1,3	1,30	2,47	down		AA461174
2248	1,12	-0,18	1,3	1,30	2,46	Up		R93543
2284	1,12	-0,18	1,3	1,29	2,45	Up	NOL4	AA430033
1292	-0,33	-1,62	1,3	1,29	2,45	Up	VGCNL1	N49852
6510	0,20	-1,08	1,3	1,29	2,44	Up		AA448003
7937	-1,09	-2,36	1,3	1,27	2,40	Up		R44530
2152	1,04	-0,21	1,3	1,26	2,39	Up	CNTN3	N50845
776	0,02	-1,24	1,3	1,25	2,38	Up	BEX2	AA464180
41	-0,64	-1,89	1,2	1,25	2,38	Up	BSPRY	W38022
3851	1,39	0,17	1,2	1,22	2,34	Up		T51592
141	-0,41	-1,63	1,2	1,22	2,33	Up		N24715
3943	1,61	0,39	1,2	1,22	2,33	Up	LOC157627	H28997
4290	-0,78	-1,99	1,2	1,21	2,31	Up	ERBB4	H22956
422	-0,49	-1,69	1,2	1,20	2,30	Up	GABBR1	N70841
202	-0,48	-1,68	1,2	1,19	2,29	Up		N59441
7460	2,03	0,85	1,2	1,19	2,28	Up		AA430367
8482	-0,80	-1,99	1,2	1,19	2,28	Up	KIAA1906	R41754
3792	0,16	-1,02	1,2	1,18	2,27	Up		N59075
3075	-0,30	-1,48	1,2	1,18	2,27	Up		H10387
2920	1,85	0,69	1,2	1,16	2,23	Up	FBL	AA663986

GenID Spot1	MW 1	MW 2	Astro III/ prim. Glioblastom	abs(MW1/MW2)	FC	Richtung	Symbol	Accession No
4742	1,21	0,06	1,2	1,15	2,23	Up	RPS23	N73091
6125	0,66	-0,49	1,1	1,15	2,21	Up	C10orf83	AA056580
3688	0,74	-0,39	1,1	1,13	2,19	Up	GSTA4	AA152347
8719	0,62	-0,51	1,1	1,12	2,18	Up	SREBF2	T78906
7182	0,55	-0,57	1,1	1,12	2,18	Up	SEPHS1	W80692
3786	1,08	-0,05	1,1	1,12	2,18	Up	EEF1B2	R94601
7723	2,05	0,94	1,1	1,11	2,16	Up	LAMR1	AA629897
7308	-0,62	-1,72	1,1	1,10	2,15	Up	OACT2	R40970
4556	0,38	-0,72	1,1	1,09	2,13	Up	Sep 08	N50853
4552	1,16	0,07	1,1	1,09	2,13	Up	KIF1B	AA417247
4142	-0,57	-1,66	1,1	1,09	2,13	Up	SGCD	T57920
2209	0,10	-0,99	1,1	1,09	2,12	Up	ULK2	AA047289
2736	0,71	-0,37	1,1	1,08	2,12	Up	ATP5C1	AA644234
1134	0,47	-0,61	1,1	1,08	2,12	Up	TOX	AA404337
7852	-0,18	-1,26	1,1	1,08	2,11	Up	IL1B	AA150507
6856	0,77	-0,30	1,1	1,08	2,11	Up		H70140
8515	0,57	-0,49	1,1	1,06	2,08	Up	JMJD1C	H09113
2540	0,43	-0,62	1,0	1,05	2,07	Up	MRPL43	AA040752
2154	1,80	0,75	1,0	1,05	2,07	Up		AA461309
361	0,27	-0,78	1,0	1,04	2,06	Up		H73973
5544	-0,21	-1,25	1,0	1,04	2,06	Up	TMEM23	AA459293
4493	0,66	-0,38	1,0	1,04	2,06	Up	C10orf70	AA431199
1167	-0,28	-1,31	1,0	1,04	2,05	Up	FBI4	N47522
782	1,56	0,53	1,0	1,03	2,05	Up		W89071
364	0,48	-0,55	1,0	1,03	2,04	Up	ADK	H94605
9131	0,78	-0,24	1,0	1,03	2,04	Up	PARP2	H23985
5225	0,11	-0,91	1,0	1,02	2,03	Up	SLC16A9	W16424
5190	0,90	-0,12	1,0	1,02	2,03	Up	HKR1	AA007370
2447	1,32	0,30	1,0	1,02	2,02	Up		R74478
6633	0,65	-0,37	1,0	1,02	2,02	Up	EIIs1	N35592
5072	0,32	-0,70	1,0	1,01	2,02	Up	SYNPO2L	W73753
1360	0,33	-0,69	1,0	1,01	2,02	Up	PDE8B	N49949
3942	0,81	-0,20	1,0	1,01	2,01	Up		R38261
6160	0,21	-0,79	1,0	1,00	2,00	Up	C9orf78	W80591
5255	0,33	-0,67	1,0	1,00	2,00	Up	RBP4	AA005202

10 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Dr. med. Oliver Bozinov und Prof. Dr. med. Helmut Bertalanffy für die Bereitstellung des Themas. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Oliver Bozinov für die sehr gute Betreuung der Arbeit, für die sehr gute Zusammenarbeit und für die, trotz zahlreicher widriger Umstände, erfolgreiche Durchführung dieser Doktorarbeit.

Besonderer Dank gilt auch den Herren Professoren Dr. med. H. Bertalanffy und Dr. med. Ulrich Sure für die Bereitstellung der molekularen neurochirurgischen Labors und der Nutzung der Geräte und für die zahlreiche, besonders finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Michael Krause und Frau Angelika Filmer aus dem Institut für molekulare Tumorforschung für die tatkräftige Unterstützung und die zahlreichen Tipps, gerade als einige Situationen aussichtslos erschienen sowie für die selbstverständliche Nutzung ihrer DNA-Laboratorien und Gerätschaften. Ohne sie wäre eine Durchführung der Arbeit unmöglich geworden.

Desweiteren gilt mein Dank Frau Dr. Dana Kattmann, Herrn Dr. Markus Ritter, Herrn Prof. Andreas Neubauer und Dagmar Schwell aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie. Ich danke Ihnen für die für sie selbstverständliche Überlassung von Geräten zur Durchführung der PCR- und RT-PCR-Techniken. Gerade Frau Dagmar Schwell zeigte unermüdlichen Einsatz in der Durchführung der Real-Time PCR und stand stets bei auftretenden Fragen zur Verfügung. Abschließend danke ich meiner Großmutter und meinen Eltern für Ihre Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dieter Hellwig aussprechen, da ohne ihn kein Abschluss der Arbeit möglich geworden wäre.

12 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren Damen/ Herren

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

13 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

„ Genetische Analyse maligner Gliome mittels Mikroarray-Technologie “

in der Klinik für Neurochirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. med. H. Bertalanffy mit Unterstützung durch Dr. med. O. 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 den folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Candidate genes for the progression of malignant gliomas identified by microarray analysis.

Bozinov O, Köhler S, Samans B, Benes L, Miller D, Ritter M, Sure U, Bertalanffy H.

Neurosurg Rev. 2008 Jan;31(1):83-9; discussion 89-90

Erratum in: Neurosurg Rev. 2008 Apr;31(2):247-8.