

Molekulare Grundlagen der malignen Progression von Gliomen

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jörg van den Boom

aus Duisburg

Düsseldorf 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Guido Reifenberger
Korreferent: Prof. Dr. Cornelis P. Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2004

Für Maria

Experience is what you get
when you were expecting something else.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Tumoren des zentralen Nervensystems	1
1.2	Astrozytäre Gliome	2
1.3	Molekulargenetische Grundlagen astrozytärer Gliome	4
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der eigenen Arbeit	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Tumorproben	11
2.1.2	Geräte	12
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Kits	13
2.1.4	Oligonukleotide	15
2.1.5	Antikörper	21
2.1.6	Lösungen und Puffer	21
2.2	Methoden	23
2.2.1	DNA und RNA Isolierung aus Tumorproben	23
2.2.2	DNA und RNA Isolierung aus Zellen	24
2.2.3	Detektion von Allelverlusten	24
2.2.4	Mutationsanalyse	25
2.2.5	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	25
2.2.6	Suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH)	26
2.2.7	Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte	30
2.2.8	Mikroarray-Analysen	31
2.2.9	Statistische Auswertung der Mikroarrays	32
2.2.10	<i>Real-time</i> Reverse Transkription (RT)-PCR	34
2.2.11	Kultivierung von Glioblastomzellen	36
2.2.12	RNA-Interferenz in Glioblastomzellen	36
2.2.13	Überprüfung der Zellproliferation	37
2.2.14	Überprüfung der Zellvitalität	37
	2.2.14.1 Kristallviolett-färbung	37
	2.2.14.2 Messung der mitochondrialen Aktivität	37
2.2.15	Proteinbestimmung	38
2.2.16	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analyse	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Molekulargenetische Analysen von Kandidatengen und -regionen	39

3.2	Herstellung subtraktiver cDNA Populationen und Identifizierung differentiell exprimierter Gene	43
3.3	Validierung ausgewählter Kandidatengene aus den SSH Experimenten	45
3.4	Expressionsprofilerstellung mittels Mikroarray-Analysen	50
3.4.1	Vergleich zwischen genetischen Befunden und Mikroarray-Daten	59
3.4.2	Vergleich von SSH- und Mikroarray-Daten	59
3.5	Validierung ausgewählter Kandidatengene	61
3.6	Funktionelle Analysen von FOXM1 und MGP in Glioblastomzelllinien	65
4	Diskussion	75
4.1	Molekulargenetische Befunde in den untersuchten Tumoren	75
4.2	Identifizierung von neuen Gliomprogressions-assoziierten Kandidatengenens mittels suppressiver Subtraktionshybridisierung	76
4.3	Identifizierung von neuen Gliomprogressions-assoziierten Kandidatengenens mittels DNA-Chip-Technologie	79
4.4	Vergleich der mittels SSH- und Mikroarray-Analysen erreichten Ergebnisse	84
4.5	Funktionelle Analysen von FOXM1 und MGP in Gliomzelllinien	86
5	Zusammenfassung	88
6	Literaturverzeichnis	90
7	Abkürzungsverzeichnis	103
8	Danksagung	106

1 Einleitung

1.1 Tumoren des zentralen Nervensystems

Die Gehirntumoren gehören mit ca. 2-3 % zu den selteneren Tumorarten, stellen aber im Kindesalter nach den Leukämien die zweithäufigste Tumorerkrankung dar. Sie umfassen eine heterogene Gruppe unterschiedlicher Tumorentitäten, die gemäß der WHO (*World Health Organization*)-Klassifikation histologisch eingeordnet werden. Die größte Gruppe bilden dabei die Gliome, d.h. Tumoren, die von den sog. Stützzellen des zentralen Nervensystems ausgehen, gefolgt von Tumoren der Hirnhäute, den Meningeomen (Abbildung 1). Bei der Tumorklassifikation gemäß der WHO-Klassifikation wird nicht nur eine Artdiagnose, sondern auch eine Dignitätsbeurteilung, das sog. "Grading" durchgeführt, wodurch die Tumoren in die verschiedenen Malignitätsgrade von WHO-Grad I (benigne) bis WHO-Grad IV (maligne) unterteilt werden. Dabei werden zelluläre Kriterien wie Zell- und Kernatypien, mitotische Aktivität, Gefäßproliferation oder Nekrosen zugrunde gelegt. Generell gilt, dass die Tumorklassifikation sich

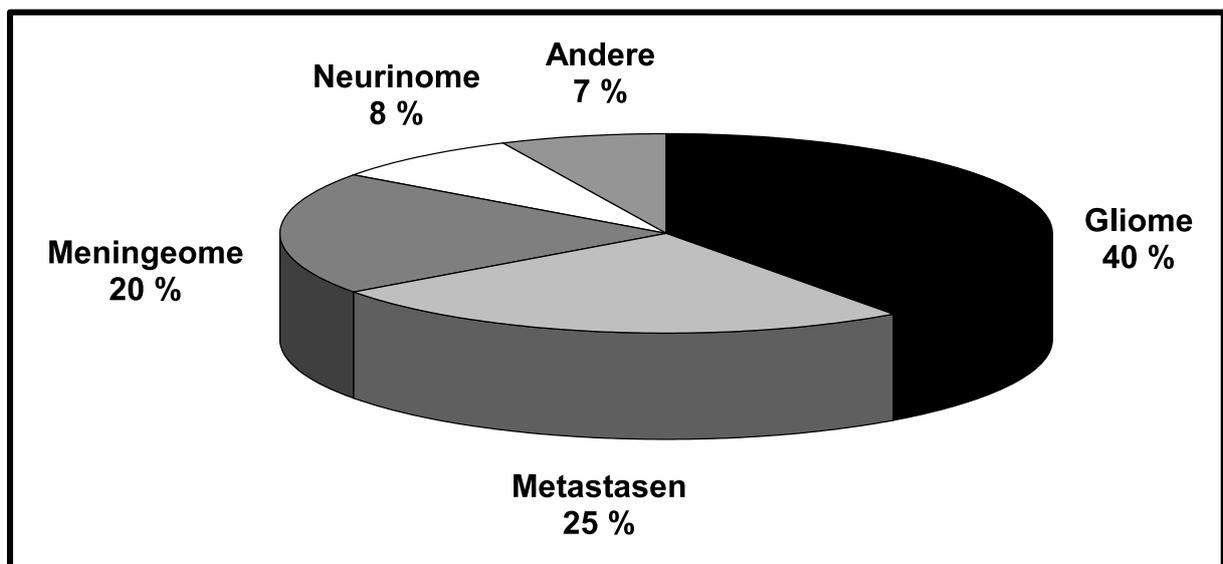


Abbildung 1: Ungefähre Häufigkeit der wichtigsten intrakraniellen Neoplasien.

auf Bereiche mit den stärksten Anaplasiezeichen bezieht. Tumoren des WHO-Grades I wachsen langsam und können im allgemeinen durch eine operative Entfernung geheilt werden. Tumoren des WHO-Grades II haben eine geringe Proliferationsrate, neigen jedoch zur Rezidivbildung und malignen Progression. WHO-Grad III Tumoren zeigen eine verstärkte mitotische Aktivität, erhöhte Zelldichte, aber auch zelluläre und nukleäre Pleomorphien. Die WHO-Grad IV Tumoren zeigen die stärksten Anaplasiezeichen und eine in der Regel infauste Prognose. Hier können zusätzlich Tumornekrosen und pathologische Gefäßproliferationen beobachtet werden [1, 6].

Die Gliome, als wichtigste Gruppe primärer Hirntumoren, sind neuroglialen Ursprungs und werden in astrozytäre, oligodendrogliale und ependymale Tumoren unterteilt. Zu den astrozytären Gliomen gehört der bösartigste Gehirntumor, das Glioblastom, das auch heute noch

eine mediane postoperative Überlebenszeit von weniger als zwölf Monaten hat [4, 6, 7]. Eine Sonderstellung nehmen die Oligoastrozytome (Mischgliome) ein. Sie bestehen aus einem Gemisch von astrozytären und oligodendroglialen Tumorzellen. Die Meningeome gehen von den Hirnhäuten (Meningen) aus, die sich in die Dura mater (harte Hirnhaut) und die Leptomeninge (weiche Hirnhaut) unterteilen lassen. Sie sind mehrheitlich benigne Tumoren, die relativ langsam und verdrängend wachsen. Atypische und anaplastische Meningeome (WHO-Grad II bzw. III) finden sich in ca. 10 % bzw. 2 % der Patienten und haben eine schlechtere Prognose. Die benignen Neurinome (oder: Schwannome) sind die wichtigsten Tumoren des peripheren Nervensystems, wobei unter den intrakraniellen Tumoren insbesondere Neurinome des achten Hirnnervens, sog. Akustikusneurinome, dominieren. Gewöhnlich sind diese Tumoren eingekapselt und bestehen aus neoplastischen Schwannzellen [1].

1.2 Astrozytäre Gliome

Die astrozytären Tumoren bilden eine biologisch und histologisch heterogene Gruppe von glialen Neoplasien, die an unterschiedlichen Stellen im zentralen Nervensystem (ZNS) vorkommen können.

Tabelle 1: Klassifizierung und Gradierung der astrozytären Tumoren anhand der WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems [1].

Tumorentität	WHO-Grad
<ul style="list-style-type: none"> Varianten 	
Diffuses Astrozytom	II
<ul style="list-style-type: none"> Fibrilläres Astrozytom Protoplasmisches Astrozytom Gemistozytisches Astrozytom 	II
Anaplastisches Astrozytom	III
Glioblastom	IV
<ul style="list-style-type: none"> Riesenzell-Glioblastom Gliosarkom 	IV
Pilozytisches Astrozytom	I
Pleomorphes Xanthoastrozytom	II
<ul style="list-style-type: none"> Pleomorphes Xanthoastrozytom mit Anaplasiezeichen 	nicht bestimmt

Je nach Tumorentität können Faktoren wie Erkrankungsalter, Wachstums- und Invasionspotential, morphologische Merkmale und klinischer Verlauf erheblich variieren. Gemäß der WHO-Klassifikation werden im wesentlichen zwei Gruppen unterschieden. Die erste Grup-

pe, die diffus infiltrierenden Astrozytome, werden unterteilt in das diffuse Astrozytom (WHO-Grad II), das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) und das Glioblastom (WHO-Grad IV). Die zweite Gruppe umfasst das pilozytische Astrozytom (WHO-Grad I) und das pleomorphe Xanthoastrozytom (WHO-Grad II), d.h. gutartige Tumoren, die vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen auftreten (Tabelle 1) [1].

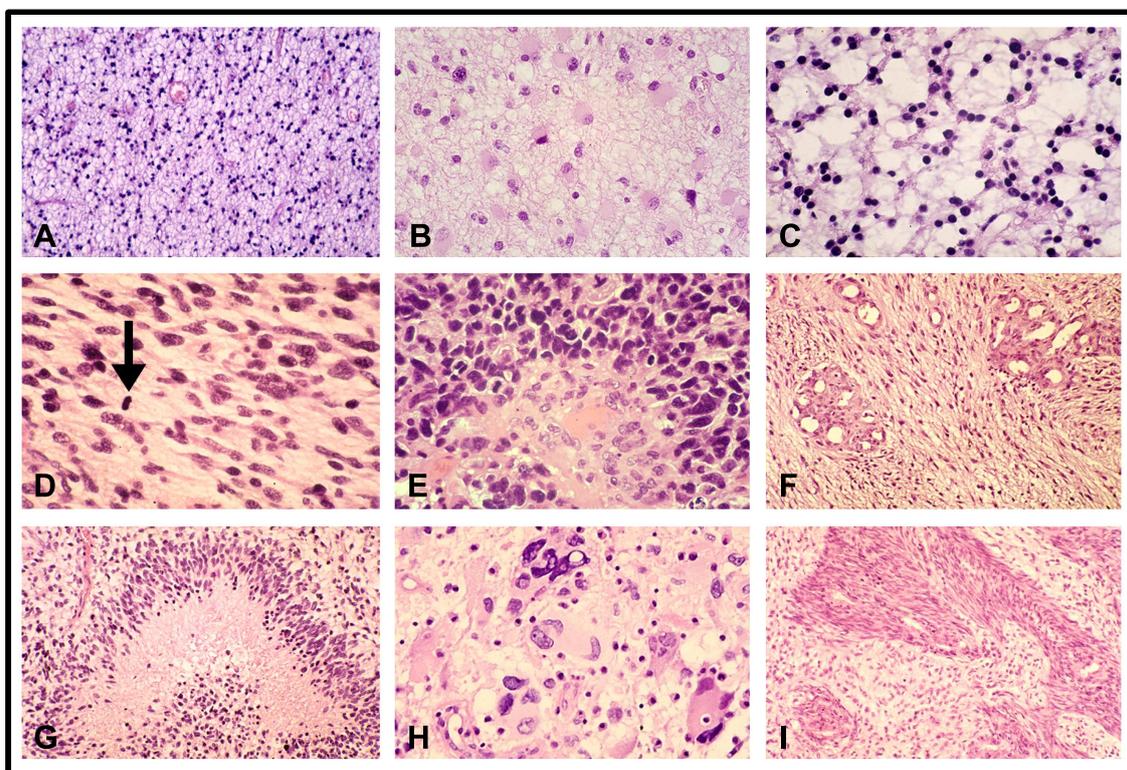


Abbildung 2: Hämalaun und Eosin gefärbte Histologieschnitte astrozytärer Gliome. A-C: Histopathologie der diffusen Astrozytome des WHO-Grades II. Dargestellt sind typische Beispiele eines fibrillären (A), eines gemistozytischen (B) und eines protoplasmatischen (C) Astrozytoms. D: Anaplastisches Astrozytom des WHO-Grades III mit erhöhter Zelldichte, nukleärer Pleomorphie und mitotischer Aktivität (Pfeil). E: Ein sehr zellreiches Glioblastom des WHO-Grades IV mit mitotischer Aktivität und pathologischen Tumorgefäßen. F: Pathologische mikrovaskuläre Proliferate mit glomerulumartigen Kapillaren in einem Glioblastom. G: Typische Nekrose mit perinekrotischen Pseudopalisaden eines Glioblastoms. H: Riesenzellglioblastom des WHO-Grades IV mit zahlreichen multinukleären Riesenzellen. I: Gliosarkom des WHO-Grades IV mit biphasischem Muster, das durch gliale und sarkomatöse Tumorbereiche entsteht.

Diffus infiltrierende Astrozytome können überall im ZNS entstehen, bevorzugen jedoch die zerebralen Hemisphären und manifestieren sich gewöhnlich im Erwachsenenalter. Mit mehr als 60 % sind sie die häufigsten primären Gehirntumoren. Aufgrund ihres diffus infiltrativen Wachstums in das angrenzende Hirngewebe ist eine vollständige operative Entfernung in der Regel unmöglich. Diese Tatsache bedingt, dass es bei diffusen Astrozytomen nahezu immer zu einem Lokalrezidiv kommt. Wegen einer inhärenten Tendenz zur malignen Progression kommt es dabei nicht selten zur Entstehung eines höhergradigen Rezidivtumors. Die typischen me-

dianen Überlebenszeiten von Patienten mit einem diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) liegen bei sechs bis acht Jahren [2], mit einem anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) bei zwei bis drei Jahren [4, 5] und mit einem Glioblastom (WHO-Grad IV) bei weniger als einem Jahr [4, 6, 7]. Astrozytome des WHO-Grades II treten typischerweise während des 35. bis 45. Lebensjahres als makroskopisch unscharf begrenzte und sich diffus in der weißen Substanz ausdehnende Tumoren auf. Histologisch handelt es sich um mäßig zellreiche, isomorphe, infiltrativ im Nervengewebe wachsende Tumoren (Abbildung 2 A-C). Die meisten Astrozytome durchlaufen früher oder später eine Progression zum anaplastischen Astrozytom oder Glioblastom [8]. Das anaplastische Astrozytom des WHO-Grades III tritt vor allem zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr auf. Im Vergleich zum diffusen Astrozytom findet man Anaplasiezeichen in Form einer erhöhten Zelldichte, gesteigerten Zell- und Kernpolymorphie und einer verstärkten mitotischen Aktivität (Abbildung 2 D). Das Glioblastom tritt hauptsächlich zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr auf. Es ist infiltrativ wachsend, zellreich und teilungsaktiv und zeigt außerdem charakteristische mikrovaskuläre Proliferate in Form von glomerulumartigen oder girlandenförmigen Kapillarproliferationen sowie Tumornekrosen (Abbildung 2 E-I). Die Glioblastome werden unterteilt in das primäre Glioblastom (pGBM), welches *de novo* entsteht, und das sekundäre Glioblastom (sGBM), das sich aus einem vorbestehenden, niedriggradigen Gliom des WHO-Grades II oder III entwickelt.

1.3 Molekulargenetische Grundlagen astrozytärer Gliome

In den letzten Jahren sind zahlreiche molekulargenetische Untersuchungen veröffentlicht worden, die sich mit der Entwicklung und Progression astrozytärer Gliome beschäftigen. Diese zeigen, dass die Anzahl der genetischen und chromosomalen Veränderungen vom Astrozytom (WHO-Grad II) über das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) zum Glioblastom (WHO-Grad IV) signifikant zunimmt, d.h. dass der histologischen Progression offenbar eine Akkumulation zusätzlicher molekularer Aberrationen zugrunde liegt (Abbildung 3). Auf funktioneller Ebene führen die Alterationen meist zu einer gestörten Expression bzw. Funktion wichtiger Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene (Tabelle 2). Im folgenden sollen kurz die wichtigsten genetischen Veränderungen in den diffusen astrozytären Gliomen vorgestellt werden.

DIFFUSES ASTROZYTOM (WHO-GRAD II). Ein Gewinn von Chromosom 7 (Trisomie 7) oder 7q wurde in 50 % aller Astrozytome nachgewiesen und ist somit die häufigste zytogenetische Veränderung in diesen Tumoren [9, 10]. Dieser Befund lässt vermuten, dass ein oder mehrere Protoonkogene auf diesem Chromosom kartieren. Neben chromosomalen Gewinnen wurden Verluste auf 13q, 17p und 22q nachgewiesen. Bei einem Verlust von 13q ist im allgemeinen die Region des *RBI*-Gens betroffen, wobei *RBI*-Mutationen bislang allerdings in diffusen Astrozytomen noch nicht nachgewiesen wurden [11, 12]. Mehr als die Hälfte aller Astrozytome zeigt Verluste auf 17p. In der Mehrheit dieser Fälle konnte eine Mutation im verbliebenen Allel des auf 17p13.1 lokalisierten *TP53*-Gens nachgewiesen werden [13, 14]. Immunhistochemische

Tabelle 2: Protoonkogene und Tumorsuppressorgene, für die genetische und epigenetische Veränderungen in astrozytären Gliomen beschrieben wurden.

Gen	Locus	Alteration	Proteinfunktion	Häufig verändert in:
Protoonkogene				
<i>EGFR</i>	7p11	Amplifikation und Überexpression, genomische Rearrangements	Tyrosinkinase Wachstumsfaktorrezeptor	Glioblastomen
<i>PDGFR</i>	4q12	Amplifikation und Überexpression	Tyrosinkinase Wachstumsfaktorrezeptor	Glioblastomen
<i>MET</i>	7q31	Amplifikation und Überexpression	Tyrosinkinase Wachstumsfaktorrezeptor	Glioblastomen
<i>CDK4</i>	12q13	Amplifikation und Überexpression	Cyclin-abhängige Kinase, Übergang G1/S-Phase	Glioblastomen
<i>CDK6</i>	7q21-q22	Amplifikation und Überexpression	Cyclin-abhängige Kinase, Übergang G1/S-Phase	Glioblastomen
<i>CCND1</i>	11q13	Amplifikation und Überexpression	Cyclin D1, Übergang G1/S-Phase	Glioblastomen
<i>CCND3</i>	6p21	Amplifikation und Überexpression	Cyclin D3, Übergang G1/S-Phase	Glioblastomen
<i>MDM2</i>	12q15	Amplifikation und Überexpression	Inhibitor von p53	Glioblastomen
<i>MDM4</i>	1q32	Amplifikation und Überexpression	Inhibitor von p53	Glioblastomen
<i>MYCC</i>	8q24	Amplifikation und Überexpression	Transkriptionsfaktor	Glioblastomen
Tumorsuppressorgene				
<i>TP53</i>	17p13	Mutation, Deletion	Transkriptionstransaktivator (Apoptose, Zellzyklusprogression, DNA Reparatur)	Diffusen Astrozytomen Anaplastischen Astrozytomen Glioblastomen (sekundäre > primäre)
<i>RB1</i>	13q14	Mutation, Deletion, Hypermethylierung	nukleäres Phosphoprotein (Zellzyklusregulation)	Glioblastomen Anaplastischen Astrozytomen
<i>CDKN2A</i>	9p21	Homozygote Deletion, Hypermethylierung	CDK4 und CDK6 Inhibitor	Glioblastomen Anaplastischen Astrozytomen
<i>p14^{ARF}</i>	9p21	Homozygote Deletion, Hypermethylierung	Mdm2 Inhibitor	Glioblastomen Anaplastischen Astrozytomen
<i>PTEN</i>	10q23	Mutation	Protein- und Lipidphosphatase, Inhibitor des Pi3-Kinase/Akt-Signalweges	Glioblastomen

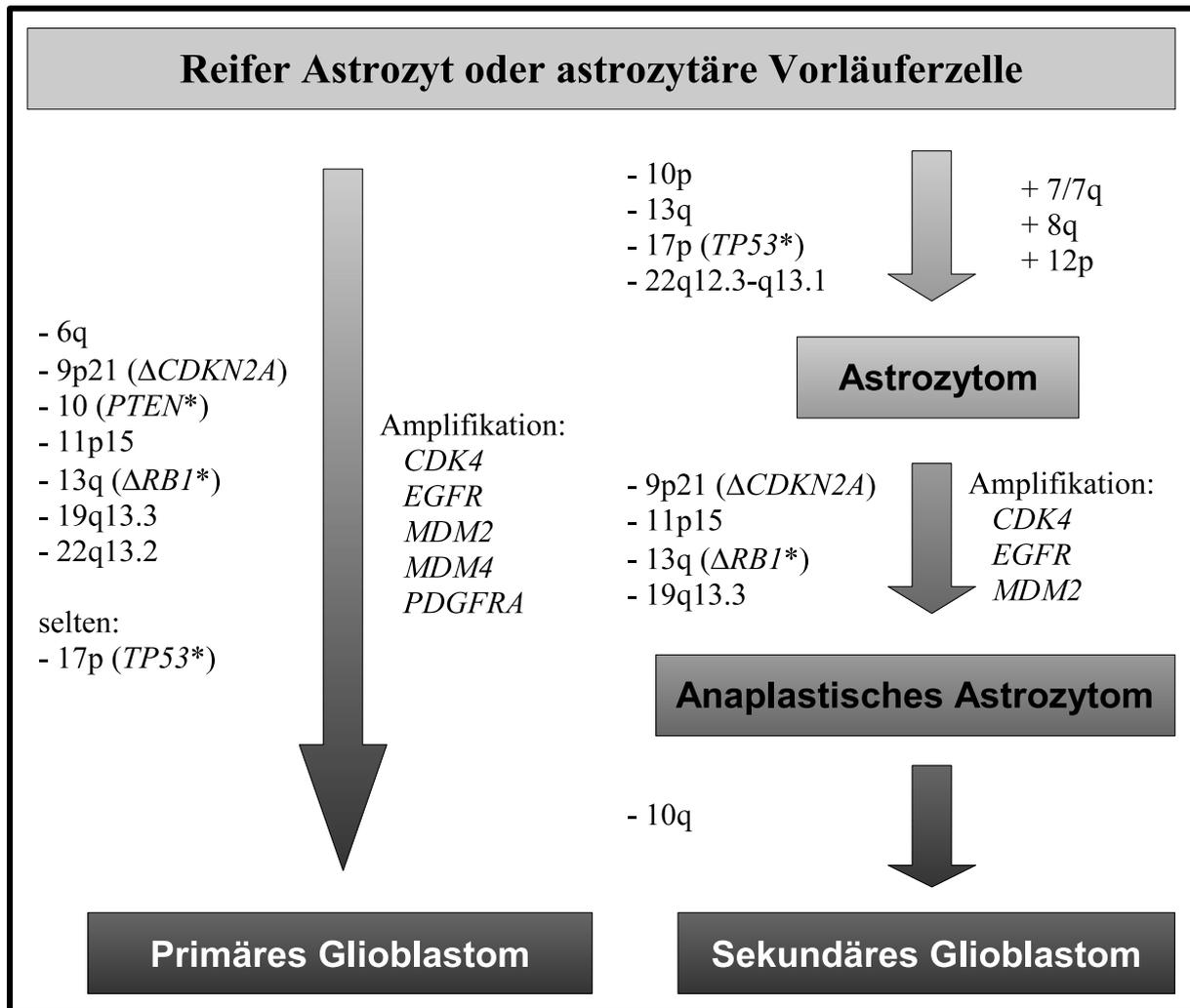


Abbildung 3: Molekulargenetische Veränderungen in diffusen astrozytären Gliomen. Bei der Entwicklung zum sekundären Glioblastom verstehen sich die Veränderungen kumulativ. -/+ : Verlust bzw. Gewinn von chromosomalem Material; *: Mutation; Δ : Deletion; Δ *: Deletion oder Mutation.

Untersuchungen von p53 zeigten, dass es in Astrozytomen häufig auch zu einer Akkumulation des Proteins kommt, die jedoch nicht zwingenderweise mit einer Mutation des Gens korreliert sein muss [14]. Astrozytome mit akkumuliertem p53, aber ohne Mutation, zeigen häufig eine verstärkte Expression des Apoptoseinhibitors Bcl-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*) [15]. Weiterhin konnte eine verstärkte Expression von PDGFR- α (*platelet derived growth factor receptor alpha*) mit Allelverlusten auf 17p positiv korreliert werden [16]. Der häufige Verlust von 22q legt die Vermutung nahe, dass hier eine Mutation des auf 22q12 lokalisierten NF2-Gens (*neurofibromatosis type 2*) vorliegen könnte. Dies konnte jedoch bisher in keiner Arbeit bestätigt werden, so dass anzunehmen ist, dass ein anderes, bislang noch unbekanntes Gen das Ziel der 22q-Verluste in Astrozytomen ist [17, 18, 19].

ANAPLASTISCHES ASTROZYTOM (WHO-GRAD III). Neben den in Astrozytomen beschriebenen Veränderungen weisen die anaplastischen Astrozytome zusätzliche Allelverluste

auf 9p [20], 11p [21, 22, 23] und 19q [24] auf. Das auf 9p21 gelegene Tumorsuppressorgen *CDKN2A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) kodiert für den Cdk4 (*cyclin dependent kinase 4*)- und Cdk6 (*cyclin dependent kinase 6*)-Inhibitor p16 und ist in ca. 20 % der anaplastischen Astrozytome homozygot und in 28 % hemizygot deletiert [12]. In 10-15 % der anaplastischen Astrozytome konnte eine Amplifikation und Überexpression von *CDK4* nachgewiesen werden [12, 25]. Bei den Tumoren, die keine Veränderungen in *CDKN2A* oder *CDK4* zeigten, wurden gehäuft Allelverluste auf 13q gefunden, die mit Mutationen des *RBI*-Tumorsuppressorgens einhergingen [12, 11]. Die einzelnen Arbeiten deuten darauf hin, dass der Übergang von der G₁- zur S-Phase der Zellzyklusprogression eine entscheidende Bedeutung bei der Entwicklung des anaplastischen Astrozytoms hat. In ungefähr 40 % der Tumoren konnten Veränderungen der Gene *CDKN2A*, *CDK4* und *RBI* nachgewiesen werden, deren Produkte miteinander interagieren und bei der Zellzykluskontrolle eine wesentliche Rolle spielen. Allelverluste auf 19q treten zu etwa 50 % auf und deuten auf ein weiteres Tumorsuppressorgen hin, das bislang noch nicht identifiziert werden konnte. Die Lokalisation dieses Gens ist auf einen Abschnitt von etwa 900 kb im Bereich 19q13.3-q13.4 eingegrenzt worden [26]. Außer Amplifikationen des *CDK4*-Gens konnten auch Amplifikationen des *MDM2* (*murine double minute 2*)- (8-10 %) und des *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*)-Gens (< 10 %) in anaplastischen Astrozytomen nachgewiesen werden [27].

GLIOBLASTOM (WHO-GRAD IV). Die Glioblastome stellen die häufigsten und zugleich bösartigsten Gehirntumoren dar und sind zytogenetisch zumeist durch komplexe Veränderungen des Karyotyps mit multiplen, numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen charakterisiert [28, 29, 30, 31, 23]. Etwa 40 % der Glioblastome zeigen eine homozygote Deletion des *CDKN2A*-Gens auf 9p21 [25, 12, 11]. Eine Hypermethylierung der im Exon 1 gelegenen CpG-Insel dieses Gens wird als alternativer Mechanismus diskutiert, der allerdings ebenso wie Punktmutationen auf einen kleinen Teil der Glioblastome beschränkt ist [34, 35, 36, 37]. Ungefähr ein Drittel der Glioblastome zeigt einen Verlust von 13q und damit einhergehend Deletionen oder Mutationen des *RBI*-Gens [38, 12, 11]. In einer weiteren Subgruppe der Glioblastome (ca. 15 % der Fälle) ist das *CDK4*-Gen auf 12q14 amplifiziert und überexprimiert [12, 11]. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass in der Mehrheit der Glioblastome entweder Veränderungen von *CDK4* oder *CDKN2A* oder von *RBI* vorliegen, die alle die Zellzykluskontrolle beim Übergang von der G₁- zur S-Phase einschränken. Die Tumorzellen können konsekutiv nicht mehr in den G₁-Arrest übergehen, was letztendlich eine unkontrollierte Proliferation zur Folge hat.

Allelverluste auf 17p und Mutationen des dort lokalisierten *TP53*-Gens finden sich in insgesamt etwa 30 % der Glioblastome [32, 33]. Der Verlust eines Chromosoms 10 (Monosomie 10) ist in 60-70 % der Tumoren nachweisbar, wobei in ca. 30-40 % der Fälle Mutationen im *PTEN* Tumorsuppressorgen vorliegen [9, 39, 40, 41]. In 30-40 % der Glioblastome ist ein Verlust von 11p15 detektierbar, eine Region, in der potentielle Tumorsuppressorgene wie das *RIG* (*regulated in glioma*)-Gen lokalisiert sind [21, 22]. Während *RIG* in normalem Hirngewebe konstitutiv

Diffuses Astrozytom WHO Grad II	Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III	Glioblastom WHO Grad IV
Veränderung der p53 vermittelten Kontrolle von Apoptose, Zellzyklusprogression und DNA Reparatur		
<i>TP53</i> Mutation <i>p14^{ARF}</i> Hypermethylierung	<i>TP53</i> Mutation <i>p14^{ARF}</i> Hypermethylierung / homozygote Deletion	<i>TP53</i> Mutation <i>p14^{ARF}</i> homozygote Deletion <i>MDM2</i> Amplifikation <i>MDM4</i> Amplifikation
Aktivierung der Signaltransduktion von Wachstumsfaktorrezeptoren		
<i>PDGFRA</i> Überexpression	<i>PDGFRA</i> Überexpression	<i>EGFR</i> Amplifikation / Rearrangement <i>PDGFRA</i> Amplifikation <i>MET</i> Amplifikation
Veränderung der pRB1 abhängigen Zellzykluskontrolle		
<i>CDKN2A</i> / <i>CDKN2B</i> homozygote Deletion <i>RB1</i> Mutation / Hypermethylierung <i>CDK4</i> / <i>CDK6</i> Amplifikation <i>CCND1</i> / <i>CCND3</i> Amplifikation		
Aktivierung des Pi3K/Akt Signalwegs		
<i>PTEN</i> Mutation <i>CTMP</i> -Hypermethylierung <i>EGFR</i> Amplifikation / Rearrangement <i>PDGFRA</i> Amplifikation <i>MET</i> Amplifikation		

Abbildung 4: Schematische Darstellung der bei der Initiation und Progression von diffusen astrozytären Gliomen involvierten molekulargenetischen Veränderungen. Eines der ersten Ereignisse in der Entstehung diffuser Astrozytome (WHO-Grad II) ist ein durch *TP53*- oder *p14^{ARF}*-Inaktivierung verursachter Verlust der p53-abhängigen Wachstumskontrolle. Häufig zeigen diese Tumoren zusätzlich eine Überexpression von *PDGF α* und seinem Rezeptor *PDGFRA*, was zu einer Aktivierung der mitogen aktivierten Proteinkinasekaskade führt. In anaplastischen Astrozytomen (WHO-Grad III) wird zusätzlich ein Funktionsverlust der pRb1-abhängigen Zellzykluskontrolle gefunden, verursacht durch Inaktivierung der Gene *CDKN2A*, *CDKN2B*, *RB1*, *CDK4*, *CDK6*, *CCND1* oder *CCND3*. Die Glioblastome (WHO-Grad IV) demonstrieren weiterhin Alterationen des Phosphoinositol-3-kinase (Pi3k)/Proteinkinase B (Akt) Signalwegs, die durch verschiedene genetische Veränderungen, wie z.B. *PTEN*-Mutation oder *CTMP*-Hypermethylierung, sowie Amplifikationen und Überexpressionen von Wachstumsfaktorrezeptoren, ausgelöst werden können [56].

hoch exprimiert ist, konnte eine Expression in Glioblastomzellen nur selten festgestellt werden [42].

Genetische Veränderungen in Glioblastomen betreffen nicht nur Genverluste bzw. Mutationen von Tumorsuppressorgenen, sondern auch Amplifikationen von verschiedenen Protoonkogenen. Am häufigsten ist dabei das *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*)-Gen amplifiziert und auf mRNA- und Proteinebene überexprimiert [27, 43]. In den meisten Glioblastomen wird zu der erhöhten *EGFR*-Expression auch eine Überexpression der Liganden *TGF α* (*transforming growth factor alpha*) und/oder EGF gefunden [43]. In 50 % der Tumoren mit *EGFR*-Amplifikation wird eine sog. Typ-III-Deletion des Gens detektiert. Diese Deletion von Teilen der extrazellulären Domäne resultiert in einem konstitutiv aktiven Rezeptormolekül [44, 45, 46]. Ungefähr 15 % der Glioblastome zeigen Amplifikationen von Genen in der Region 12q13-q15, darunter die Gene *CDK4*, *SAS*, *MDM2*, *GADD153*, *GLI1*, *RAP1B*, *IFNG* und *A2MR*, [47, 48]. Eine *MDM2*-Amplifikation und Überexpression findet sich dabei nur in Tumoren mit intaktem *TP53* [49].

PRIMÄRES UND SEKUNDÄRES GLIOBLASTOM. Histologisch können primäre und sekundäre Glioblastome nicht unterschieden werden, jedoch gibt es einige genetische Veränderungen, die mit unterschiedlichen Häufigkeiten in den beiden Tumorentitäten gefunden werden. Primäre Glioblastome zeigen in nur 25-30 % eine Mutation des *TP53*-Gens (70-80 % bei sekundären) und weisen wesentlich häufiger eine Amplifikation und Überexpression der Gene *EGFR*, *MDM2*, *MDM4*, sowie eine Mutation des *PTEN*-Gens auf. Ebenfalls seltener als in sekundären Glioblastomen treten Allelverluste auf 19q und 13q, Promotorhypermethylierung des *RBI*-Gens und Überexpression von *PDGFRA* auf [32, 33, 52, 53, 55, 54, 56]. Außerdem wurden in primären Glioblastomen häufiger homozygote *CDKN2A*-Deletionen, aber seltener Expressionsverluste des *DCC* (*deleted in colorectal carcinoma*)-Gens gefunden [50, 51]. Primäre und sekundäre Glioblastome tragen somit unterschiedliche genetische Veränderungen, deren funktionelle Konsequenzen jedoch dieselben Signalwege betreffen. Dabei handelt es sich um den p53-, den pRb1-, den Pten/Pi3k/Akt- und den mitogen aktivierten Proteinkinase Signalweg (Abbildung 4).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der eigenen Arbeit

Diffus infiltrierende astrozytäre Gliome sind die häufigsten Gehirntumoren bei Erwachsenen [1]. Ihr infiltratives Wachstum macht eine vollständige Resektion in der Regel unmöglich. Gewebeanvasion und eine inhärente Tendenz zur spontanen malignen Progression verursachen nach Monaten bis Jahren eine Rezidivbildung. Ein signifikanter Anteil der WHO-Grad II Astrozytome rezidiert spontan als anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III) oder sekundäres Glioblastom (WHO-Grad IV). Diese maligne Progression ist von großem klinischen Interesse, da sie die Haupttodesursache von Tumorpatienten darstellt. Die molekularen Mechanismen, die der malignen Progression zugrunde liegen, sind bislang allerdings nur sehr schlecht

verstanden. Bisherige Studien haben sich hauptsächlich mit Alterationen auf chromosomaler und/oder genetischer Ebene beschäftigt. Daher war es Ziel dieser Arbeit, Expressionsprofile zu erstellen, die neue Einsichten in die maligne Progression astrozytärer Gliome erlauben. Hierzu dienten zwei verschiedene experimentelle Ansätze. Im ersten Ansatz wurden subtraktive cDNA-Bibliotheken von WHO-Grad II Gliomen im Vergleich zu Glioblastomen (WHO-Grad IV) mittels suppressiver Subtraktionshybridisierung (SSH) generiert. Mit dieser Methode wurden zwei cDNA-Populationen voneinander subtrahiert, mit dem Ziel, Transkripte anzureichern, die in einer cDNA-Population stärker als in der anderen exprimiert werden. Im zweiten Ansatz wurden Expressionsprofile mittels der Mikroarray-Methode erstellt. Hierzu wurden die jeweiligen Tumor-RNAs auf Hu6800FL cDNA-Arrays der Firma Affymetrix hybridisiert. Die erhaltenen Expressionsprofile der verschiedenen Tumoren konnten verglichen und differentiell exprimierte Gene bestimmt werden. Mit einer unabhängigen zweiten Methode, der *real-time* RT-PCR, wurden die differentiell exprimierten Kandidatengene aus beiden Ansätzen an den untersuchten Tumoren und an einer unabhängigen Serie bestehend aus primären Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen und primären und sekundären Glioblastomen verifiziert. Die gefundenen und verifizierten Kandidatengene, die in Glioblastomen eine Überexpression zeigten, wurden dann mit Hilfe der RNA-Interferenz in Glioblastomzellen experimentell herunterreguliert, um eine mögliche funktionelle Bedeutung der entsprechenden Genprodukte in Glioblastomzellen abzuklären. Ziel dieser umfangreichen Untersuchungen war es letztendlich, neue Gene zu identifizieren, die für die spontane maligne Progression von astrozytären Gliomen verantwortlich sind und deshalb möglicherweise neue Ansatzpunkte für eine molekulare Diagnostik und eine gezielte, Pathogenese-orientierte Therapie liefern können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tumorproben

Die Tumorproben wurden operativ entfernt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Es wurden nur solche Tumorproben verwendet, die histologisch mindestens einen 80 %igen Tumoranteil aufwiesen. Die folgenden Tabellen (3 und 4) geben eine Übersicht über das in den eigenen Untersuchungen verwendete Tumormaterial.

Tabelle 3: Histologische Diagnosen der untersuchten Primär- und Rezidivgliome.

Patient	Tumor-Nr.	Diagnose	WHO-Grad
1	A72	Astrozytom	II
	GB239	Glioblastom	IV
2	A128	Astrozytom	II
	GB119	Glioblastom	IV
3	A201	Astrozytom	II
	GB240	Glioblastom	IV
4	A8	Astrozytom	II
	AA106	Anaplastisches Astrozytom	III
5	A181	Astrozytom	II
	AOA54	Anaplastisches Oligoastrozytom	III
6	A145	Astrozytom	II
	AA142	Anaplastisches Astrozytom	III
7	OA23	Oligoastrozytom	II
	GB175	Glioblastom	IV
8	OA31	Oligoastrozytom	II
	AOA38	Anaplastisches Oligoastrozytom	III
9	O21	Oligodendrogliom	II
	AO40	Anaplastisches Oligodendrogliom	III
10	AA93	Anaplastisches Astrozytom	III
	GB229	Glioblastom	IV
11	A180	Astrozytom	II
	AA164	Anaplastisches Astrozytom	III
12	A207	Astrozytom	II
	GB748	Glioblastom	IV
13	A188	Astrozytom	II
	GB234	Glioblastom	IV

Tabelle 4: Histologische Diagnosen der zusätzlich untersuchten 43 Gliome bestehend aus 9 Astrozytomen (A), 10 anaplastischen Astrozytomen (AA), 17 primären (p) und 7 sekundären (s) Glioblastomen (GB).

Tumor-Nr.	Diagnose	WHO-Grad	Tumor-Nr.	Diagnose	WHO-Grad
A21	Astrozytom	II	GB18	Glioblastom (p)	IV
A2	Astrozytom	II	GB19	Glioblastom (p)	IV
A3	Astrozytom	II	GB26	Glioblastom (p)	IV
A4	Astrozytom	II	GB33	Glioblastom (p)	IV
A78	Astrozytom	II	GB50	Glioblastom (p)	IV
A113	Astrozytom	II	GB77	Glioblastom (p)	IV
A99	Astrozytom	II	GB81	Glioblastom (p)	IV
A135	Astrozytom	II	GB83	Glioblastom (p)	IV
A143	Astrozytom	II	GB103	Glioblastom (p)	IV
AA1	Anaplastisches Astrozytom	III	GB137	Glioblastom (p)	IV
AA71	Anaplastisches Astrozytom	III	GB130	Glioblastom (p)	IV
AA188	Anaplastisches Astrozytom	III	GB136	Glioblastom (p)	IV
AA115	Anaplastisches Astrozytom	III	GB140	Glioblastom (p)	IV
AA103	Anaplastisches Astrozytom	III	GB191	Glioblastom (p)	IV
AA117	Anaplastisches Astrozytom	III	GB4	Glioblastom (s)	IV
AA134	Anaplastisches Astrozytom	III	GB15	Glioblastom (s)	IV
AA143	Anaplastisches Astrozytom	III	GB238	Glioblastom (s)	IV
AA187	Anaplastisches Astrozytom	III	GB237	Glioblastom (s)	IV
AA186	Anaplastisches Astrozytom	III	GB235	Glioblastom (s)	IV
GB1	Glioblastom (p)	IV	GB236	Glioblastom (s)	IV
GB6	Glioblastom (p)	IV	GB234	Glioblastom (s)	IV
GB8	Glioblastom (p)	IV			

2.1.2 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte mit Angabe der entsprechenden Hersteller sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Modellbezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Firma
Sequenzierer	ABI PRISM 377	Applied Biosystems
<i>Real-time</i> PCR-Thermocycler	GeneAmp 5700 SDS	Applied Biosystems

Gerät	Modell	Firma
Phosphoimager	Fujifilm BAS-1800 II	Raytest
Imaging Plates	Fujifilm BAS-MS	Raytest
Hybridisierungsöfen	APT Line	Biometra
Hybridisierungsöfen	OV 5	Biometra
Hybridisierungskammer	GeneChip Hybridization Oven 640	Affymetrix
Fluidics Station	GeneChip Fluidics Station 400	Affymetrix
Chip Reader	HP GeneArray Scanner	Affymetrix
Microarray Glasslides	Hu6800FL Chip	Affymetrix
PCR Thermocycler	Trio-Thermoblock	Biometra
PCR Thermocycler	UNO-Thermoblock	Biometra
ELISA Reader	Saphire	Tekan
Zellinkubator	6000	Heraeus
Zellinkubator	CB 150	Binder
Spectrophotometer	DU 640	Beckman
Tischzentrifuge	Rotofix 32	Hettich
Tischzentrifuge	5417	Eppendorf
Kühlzentrifuge	EBA 12R	Hettich
Ultrazentrifuge	L8-M	Beckman
Geldokumentationssystem	GelDoc 1000 System	BioRad
Gelkammern für Agarosegele	Sub-Cell	BioRad
Gelkammern für Polyacrylamidgele	P10DS	PeqLab
Gelkammern für SDS-PAGE	Criterion Cell	BioRad
Geltrockner	583	BioRad
Netzgerät	Power PAC 3000	BioRad
Zentrifugenröhrchen	SW41.1 Polyallomer	Beckman
Vakuumpumpe	Labport	KMF
Szintillationszähler	6500	Beckman
Rotator	Testtube Rotator	Labinco
Blotting Kammer	Trans Blott Cell	BioRad
Gelentwicklung	SCOPIX LR 5200	Agfa

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von den Firmen BioRad, Roche, Fluka, Invitrogen, Merck, PeqLab, Qiagen, Riedel de Haen, Roth, Serva oder Sigma bezogen und sind in den Tabellen 6 und 7 zusammengefasst.

Tabelle 6: Chemikalien und Enzyme.

Substanz	Firma
[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (10 Mbq/25 μl)	Hartman Analytic
[^3H]-Thymidin	Hartman Analytic
Taq Polymerase (5 U/ μl)	Sigma
HotStar Taq Polymerase (5 U/ μl)	Qiagen
HotStar Taq Polymerase (5 U/ μl)	Eurogentec
Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/ μl)	Invitrogen
<i>Rsa</i> I Restriktionsendonuklease (10 U/ μl)	Roche
DNase I (RNase frei; 10 U/ μl)	Roche
Proteinase K	Sigma
MMLV Reverse Transkriptase	BD Clontech
RNasin	Promega
100 bp-DNA Leiter	PeqLab
1 kb-DNA Leiter	PeqLab
Röntgenfilme (Biomax MR)	Kodak
Hyperfilm ECL	Amersham
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham
Tris HCl Criterion Gele (12,5 %)	Amersham
Magermilchpulver	Oxoid
Tween 20	Serva
Triton X-100	Fluka
OligofectAMINE Transfektionsreagenz	Invitrogen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma

Tabelle 7: Kits.

Kit	Firma
Advantage 2 PCR Kit	BD Clontech
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Jet Quick Gel Extraction Kit	Genomed
NucleoSpin Nucleic Acid Purification Kit	BD Clontech
PCR Product Purification Kit	Roche
PCR-Select cDNA Subtraction Kit	BD Clontech
qPCR Core Kit for SYBR Green	Eurogentec
RNA Transcript Labeling Kit	Enzo
RNeasy Mini Kit	Qiagen

Kit	Firma
SMART PCR cDNA Synthesis Kit	BD Clontech
Superscript Choice System	Gibco/BRL
Wizard DNA Clean-up System	Promega

2.1.4 Oligonukleotide

In der vorliegenden Arbeit wurden Oligonukleotide für verschiedene PCR-basierende Analysen und die siRNA-Experimente verwendet. Primer für die Duplex-PCR sind in Tabelle 8, für die *real-time* RT-PCR in Tabelle 9, für die SSCP-Analysen in den Tabellen 10 und 11 und für die Mikrosatellitenanalysen in Tabelle 12 zusammengefasst. Die siRNA-Sequenzen sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 8: Duplex-PCR Primer.

Name	Sequenz	Amplikonlänge	GenBank Annotation
9qSTS-F	aggccttgggagcctcagg	179 bp	AC001227
9qSTS-R	atttctgcctggagacagtgg		
APRT-1F	cagggaacacattcctttgc	134 bp	AC092384
APRT-2R	gtgggaaagctgtttactgcg		
APRT-5F	ctgggacacctgctctctgc	211 bp	AC092384
APRT-6R	gccctgtggtcactcactactgc		
CDK4 gen. F	gactgctaccttatatcccttc	102 bp	AC025165
CDK4 gen. R	ctcccatgttggtcacttac		
CDKN2A-exon1a/F	gaagaaagaggaggggctg	340 bp	AC000048
CDKN2A-exon1a/F	gcgctacctgattcaatc		
CDKN2B-exon1/F	aagagtgtcgtaagtttacg	315 bp	AL449423
CDKN2B-exon1/R	acatcggcgatctaggttcca		
CENPF-Taq-F	ccgcagaagcaaacacagaag	216 bp	NM_016343
CENPF-Taq-R	gaagttcatgagaaatcttctgcttag		
COL4A-Taq-F	ggcctgtatggcgagattg	315 bp	NM_001846
COL4A-Taq-R	cccttcagacctggtattcc		
EGFR gen. F	cactgcctcatctctcaccatc	110 bp	AC073324
EGFR gen. R	gactcaccgtagctccagac		
FOXM1 gen. F	gaggcagctaagtggggtgttg	123 bp	AC005841
FOXM1 gen. R	ccagtccatcagaactcatctttcg		
gINF-F	agtgatggctgaactgtcgc	85 bp	AC007458
gINF-R	ctgggatgctcttcgacctc		
MDM2 gen. F	gcgatgaattgatgctaataatg	99 bp	AC025423

Name	Sequenz	Amplikonlänge	GenBank Annotation
MDM2 gen. R	caggatcttcttcaaataaatctg		
p14ARF-exon1 β /F1	gtcccagctctgcagttaagg	192 bp	AC000049
p14ARF-exon1 β /R1	tgagccgcgggatgtgaac		
TOP2A gen. F	ctagatttctgatagatcccttc	123 bp	AF071738
TOP2A gen. R	gacttgggccttaaacttcac		

Tabelle 9: *Real-time* RT-PCR Primer.

Name	Sequenz	Amplikonlänge	GenBank Annotation	Konzentration
ABLIM-TAQ/F	ctcgaacagaaagagactgattg	102 bp	NM_002313	300 nM
ABLIM-TAQ/R	ggacagagatacagcaaatgag			300 nM
ADD3-TAQ/F	gtgcaactagcctgtgagattc	116 bp	NM_016824	300 nM
ADD3-TAQ/R	gacgctgctacagtgttaagt			900 nM
APOD-TAQ/F	caggccaactactactaatgg	121 bp	NM_001647	50 nM
APOD-TAQ/R	caggctctgtgaggtaactg			50 nM
ARF1-F	gaccacgatcctctacaagc	111 bp	XM_047545	300 nM
ARF1-R3	tcccacacagtgaagctgatg			300 nM
ATP1B2-TAQ/F	gagaaccttgatgtcattgtcaatg	93 bp	NM_001678	50 nM
ATP1B2-TAQ/R	gtcgttgaaggctccaagaac			50 nM
CAMK2G-TAQ/F	gccatggagccacaacc	136 bp	XM_044349	300 nM
CAMK2G-TAQ/R	gcaccgagctgccattcc			300 nM
CENPF-TAQ/F	ccgcagaagcaaacacagaag	127 bp	NM_016343	900 nM
CENPF-TAQ/R	gaagttcatgagaaatcttctgcttag			50 nM
COL4A2-TAQ/F	ggcctgtatggcgagattg	122 bp	NM_001846	50 nM
COL4A2-TAQ/R	cccttcagacctgttattcc			300 nM
DMXL1-TAQ/F	ctggtaggcctgtagaagttag	146 bp	NM_005509	50 nM
DMXL1-TAQ/R	ccaacatgaacctctgttgac			50 nM
FOXM1-TAQ/F	caatggcaaggtctccttctg	129 bp	NM_021953	300 nM
FOXM1-TAQ/R	cgtttctgctgtgattccaagt			900 nM
HDAC3-TAQ/F	cttctgctatgtcaacgacattg	123 bp	NM_003883	50 nM
HDAC3-TAQ/R	gtgaggtagaaagcttcttgaac			50 nM
IGFBP4-TAQ/F	catgtggagacactcctataag	93 bp	NM_001552	300 nM
IGFBP4-TAQ/R	gtcaaggtacatgtctctctc			300 nM
KIAA0942-TAQ/F	gctctgtacaactcaatcaagaatg	131 bp	AB023159	50 nM
KIAA0942-TAQ/R	ccaatacactgatggctcttgg			50 nM
MGP-TAQ/F	ggatccgagaacgctctaag	104 bp	NM_000900	50 nM
MGP-TAQ/R	ggcagcattgtatccataaac			300 nM

Name	Sequenz	Amplikonlänge	GenBank Annotation	Konzentration
OR2W3P-TAQ/F	cagcatcaggaaggcagaag	146 bp	AF399491	900 nM
OR2W3P-TAQ/R	gtagaagagcatgaggaacatg			50 nM
RYR1-TAQ/F	gcacacagccgcatgtatc	107 bp	NM_000540	50 nM
RYR1-TAQ/R	cagcaagcctctcctgttg			50 nM
SELL-TAQ/F	gattctgccgagacaattacac	112 bp	NM_000655	50 nM
SELL-TAQ/R	cggattcctatccagtagtaag			50 nM
TOP2A-TAQ/F	ctgaagatgatgctgctatcag	120 bp	NM_001067	900 nM
TOP2A-TAQ/R	cctcaggaagccaagtaac			300 nM
TPI1-TAQ/F	cctactgcctatatcgacttc	135 bp	NM_000365	300 nM
TPI1-TAQ/R	ggctccgcagctcttgatc			900 nM
TU3A-TAQ/F	caaggactcgacctgagaag	102 bp	NM_007177	50 nM
TU3A-TAQ/R	ctatccacagttccacaactg			50 nM
VEGFA-TAQ/F	ccttgccttgctgctctac	123 bp	NM_003376	50 nM
VEGFA-TAQ/R	cagtagctgcgctgatagac			50 nM

Tabelle 10: SSCP Primer für die *PTEN*-Mutationsanalyse.

Name	Sequenz	Amplikonlänge	GenBank Annotation
PTEN Ex 1a F	gcatcagctaccgccaagtc	220 bp	AC022016;
PTEN Ex 1a R	gtaaagaggagcagccgcag		AF143315
PTEN Ex 2b F	gtttgattgctgcatatttcagatatttc	201 bp	
PTEN Ex 2b R	ctaaatgaaaacacaacatgatattaaacatc		
PTEN Ex 3a F	ctcatttttgtaatggtggc	191 bp	
PTEN Ex 3a R	gtatctttaaactctacctcac		
PTEN Ex 4a F	gattcaggcaatgttgtag	195 bp	
PTEN Ex 4a R	acagtaagatacagtctatc		
PTEN Ex 5b F	gcaacatttctaaagttacactctg	211 bp	
PTEN Ex 5b R	tccagctttacagtgaattgctg		
PTEN Ex 5c F	gctaagtgaagatgacaatcatg	204 bp	
PTEN Ex 5c R	cagatccaggaagaggaaag		
PTEN Ex 6b F	gctacgaccagttacatag	176 bp	
PTEN Ex 6b R	gtgccactggtctataatccagatg		
PTEN Ex 6c F	gctatgtgtattattatagctacctg	147 bp	
PTEN Ex 6c R	catggaaggatgagaatttcaagc		
PTEN Ex 7b F	gaaataaactggtatgtatttaaccatg	141 bp	
PTEN Ex 7b R	ggtaacggctgagggaac		
PTEN Ex 7c F	cgggaagacaagttcatgtac	135 bp	
PTEN Ex 7c R	ggatatttctcccaatgaaag		
PTEN Ex 8a F.1	gcaaattgtaacataggtgacag	233 bp	
PTEN Ex 8a R.1	ctgcacgctctatactgc		
PTEN Ex 8a R.2	cactatcatacaagtcaccaac	193 bp	
PTEN Ex 8a F.2	ctatgtgatcaagaaatcgatagc		
PTEN Ex 9b F	gtttaagatgagtcattttgtgggttttc	197 bp	
PTEN Ex 9b R	gttcattctctggatcagagtcag		
PTEN Ex 9c F	ctgtaacaccagatgtagtgac	187 bp	
PTEN Ex 9c R	agggtccatttccagttattcaag		

Tabelle 11: SSCP Primer für die *TP53*-Mutationsanalyse.

Name	Sequenz	Amplikonlänge	GenBank Annotation
TP53 Ex 4 F	acttctgaaaacaacgttct	183 bp	AF136270;
TP53 Ex 4.1 R	gtgaaccattgttcaatcgc		AF136271

Name	Sequenz	Amplikonlänge	GenBank Annotation
TP53 Ex 4.2 F	gccgtccaagcaatggatg	228 bp	
TP53 Ex 4.2 R	agacggaaaccgtagctgc		
TP53 Ex 4.3 F	tcccttcccagaaaacctac	174 bp	
TP53 Ex 4 R	gaatcccaaagtccaaaca		
TP53 Ex 5.1F	tcaactctgtctccttctc	155 bp	
TP53 Ex 5.1R	ctgtgactgctttagatgg		
TP53 Ex 5.2 F	gcagctgtgggttgattccac	177 bp	
TP53 Ex 5 R	accctgggcaagcagccctgt		
TP53 Ex 6 F	gtccccaggcctctgattc	166 bp	
TP53 Ex 6 R	cagttgcaaaccagacctcag		
TP53 Ex 7 F	ctcatcttgggcctgtgttacc	179 bp	
TP53 Ex 7 R	gcacagcaggccagtgtg		
TP53 Ex 8 F	gagtagtggtaatctactgggac	172 bp	
TP53 Ex 8 R	ctccaccgcttctgtcctg		
TP53 Ex 9 F	gcagttatgcctcagattca	186 bp	
TP53 Ex 9 R	cggcattttgagtgttagact		
TP53 Ex 10 F	ggtactgtgtatatacttac	228 bp	
TP53 Ex 10 R	atgagaatggaatcctatgg		

Tabelle 12: Primer für die Mikrosatellitenanalyse.

Primernamen	Satellitenmarker	Sequenz
D1S468F	D1S468	aattaaccgttttggctct
D1S468R		gcgacacacacttccc
D1S2893F	D1S2893	aaaacatcaactctcccctg
D1S2893R		ctcaaaccccaataagcct
D1S2642F	D1S2642	gcgatgctgccgttcaa
D1S2642R		cagactgtgtgcagagtg
D1S496F	D1S496	tctctatgcatctatgcatctatct
D1S496R		gcatttctctgggttctt
D1S515R	D1S515	tccatgaaagagtatgtatgc
D1S515F		taggggatgaggctgt
D1S235F	D1S235	cagcaagagttcatggga
D1S235R		aacagtcaattacaaaatatgtgtg
D9S1689F	D9S1689	tctgggtgataggcg
D9S1689R		gggcttgtgattggca
D9S1748F	D9S1748	cacctcagaagtcagtgagt

D9S1748R		gtgcttgaatacacctttcc
D9S178F	D9S178	gaataaaacagggtttggg
D9S178R		tttcttaagaactttgggg
D9S157F	D9S157	agcaaggcaagccacatttc
D9S157R		tggggatgccagataactatc
D9S162F	D9S162	gcaatgaccagttaaggttc
D9S162R		aattcccacaacaaatctcc
D9S171F	D9S171	agctaagtgaacctcatctctgtct
D9S171R		atctttgcattgttcaaggg
D10S215F	D10S215	tggcatcattctgggga
D10S215R		gctttacgtttcttcacatggt
D10S541F	D10S541	aagcaagtgaagtcttagaaccacc
D10S541R		ccacaagtaacagaaagcctgtctc
D10S209F	D10S209	caaatgtgctcatatcctgc
D10S209R		cccatcagtagtaaagggggc
D10S587F	D10S587	cccagattcatggctttc
D10S587R		ttctgctgacacggggc
D10S212F	D10S212	gaagtaaagcaagttctatccacg
D10S212R		tctgtgtacgttgaaaatccc
D17S796F	D17S796	caatggaaccaaagtgggtc
D17S796R		agtcggataatgccaggatg
D17S786F	D17S786	tacagggataggtagccgag
D17S786R		ggatttgggctcttttgtaa
D17S938CA	D17S938	ccggattgctacacctaata
D17S938GT		aacagtctctnctggagcag
D17S947F	D17S947	tgtcccagagtttcgata
D17S947R		gacaagaatttccaagatag
D17S936F	D17S936	atttgaaccacaacagca
D17S936R		aggtatatgccacccc
D17S933F	D17S933	actcactggggctcctgg
D17S933R		tgtggtttccttatagactgtaga
D19S210F	D19S210	tcacactcactggtctctca
D19S210R		ggtgtgcctgtgtgtaaaag
D19S572F	D19S572	atttgggtgtgctgacacg
D19S572R		gggccacatcctatcccc
D19S219F	D19S219	gtgagccaagattgtgcc
D19S219R		gactatttctgagacagattcca
D19S217F	D19S217	gggggtgattgaagttgggt
D19S217R		caagaccataccatga

Tabelle 13: siRNA Sequenzen.

Name	<i>Sensestrang</i>	<i>Antisensestrang</i>	Region (nt)	Gen
<i>FOXi1</i>	5'-CCUUUCCUGCACGACAUG-3'	5'-CAUGUCGUGCAGGGAAAGG-3'	931-953	<i>FOXMI</i>
<i>FOXi2</i>	5'-GAUCCUGCUGGACAUCAGC-3'	5'-GCUGAUGUCCAGCAGGAUC-3'	2266-2288	<i>FOXMI</i>
<i>FOXiS</i>	5'-CCGUUCACUUCACGACCUG-3'	5'-CAGGUCGUGAAGUGAACGG-3'		<i>FOXMI</i>
<i>MGPi1</i>	5'-AGCAUGGAAUCUUAUGAAC-3'	5'-GUUCAUAAGAUUCCAUGCU-3'	117-139	<i>MGP</i>
<i>MGPi2</i>	5'-GCCUGUGAUGACUACAGAC-3'	5'-GUCUGUAGUCAUCACAGGC-3'	258-280	<i>MGP</i>
<i>MGPiS</i>	5'-GCAUGCGAUGAUUCCAGAC-3'	5'-GUCUGGAAUCAUCGCAUGC-3'		<i>MGP</i>

Die siRNAs bestehen aus jeweils 19 Ribonukleotiden und zwei Desoxyribothymidinen (dT) am 3'-Ende. In der Auflistung sind nur die RNA-Sequenzen angegeben. Die *Sensestränge* sind am 3'-Ende an Fluorescein gekoppelt. Alle siRNAs wurden bei der Firma Eurogentec bestellt.

2.1.5 Antikörper

Die gegen β -Aktin und Foxm1 gerichteten Primärantikörper, sowie die an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Primär- und Sekundärantikörper.

Antikörper	Klonalität	Spezies	Verdünnung	Hersteller
β -Aktin	polyklonal	Kaninchen	1:50000	Abcam
Foxm1 (Mpp2)	monoklonal	Maus	1:5000	Santa Cruz
anti Kaninchen Peroxidase gekoppelt	polyklonal	Ziege	1:10000	Pierce
anti Maus Peroxidase gekoppelt	polyklonal	Ziege	1:10000	Pierce

2.1.6 Lösungen und Puffer

PBS:

- 140 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 1,5 mM KH_2PO_4
- 1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Phosphatpuffer:

- 750 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- 0,34 % (v/v) Phosphorsäure

Church-Puffer:

- 1 % (w/v) BSA
- 1 mM EDTA
- 0,5 M Phosphatpuffer
- 7 % (w/v) SDS

Lösungen oder Puffer für die Arbeiten mit RNA wurden mit Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser angesetzt.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA und RNA Isolierung aus Tumorproben

Lösungen:

GITC-Lösung:

- 4 M Guanidinisothiocyanat (BRL)
- 25 mM Natriumcitrat pH7,0
- 0,8 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
- pH7,0 (Einstellung mit NaOH oder Zitronensäure)

RNasin-Mix:

- 0,44 U/ μ l RNasin (Promega/SDS)
- 2,7 mM Dithiothreitol
gelöst in 10 mM Natriumacetat
- pH5,2

1x Proteinase K-Puffer:

- 10 mM Tris/Cl pH7,8
- 5 mM EDTA pH8,0
- 0,5 % (w/v) SDS

Caesiumchlorid-Lösung:

- 5,7 M CsCl
- 25 mM Natriumacetat pH5,0

Proteinase K-Lösung:

- 20 mg/ml Proteinase K in Wasser
gelöst

Die Tumorproben wurden mit einem Ultra-Turrax T25 (Janke und Kunkel IKA Labortechnik) in 6 ml GITC-Lösung homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 min bei Raumtemperatur (RT) in einer Hettich Rotina 46 R Zentrifuge mit 2500 rpm (Ausschwingrotor; 1300 g) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig auf 4 ml Cäsiumchlorid-Lösung in SW41.1 Polyallomer-Röhrchen geschichtet. Durch Ultrazentrifugation (Beckman L8-M Ultrazentrifuge) bei 32000 rpm und 15°C für 16 h in einem SW41 TI Ausschwingrotor (Beckman; 175273 g) wurde die RNA pelletiert und somit von der DNA, den Proteinen und den Lipiden getrennt. Die Lipidschicht wurde verworfen und die DNA- und Proteinfractionen separat bei -20 bzw. -80°C eingefroren. Das RNA-Pellet wurde in 200 μ l RNasin-Mix resuspendiert und mit 20 μ l 3 M Na-Acetat und 500 μ l eiskaltem 95 % Ethanol bei -80°C für 30 min präzipitiert. Die RNA wurde dann für 15 min bei 14000 rpm und 4 °C mit einer Hettich EBA 12 R Kühlzentrifuge pelletiert und in 70 % Ethanol gewaschen. Abschließend wurde die RNA in RNasin-Mix gelöst und die Konzentration photometrisch in einem Beckman DU 640 Spectrophotometer bestimmt. Die RNA-Lagerung erfolgte bei -80°C.

Ungefähr 5 ml CsCl-Lösung mit DNA wurden mit 350 μ l 7,5 M Ammoniumacetat gemischt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem 95 % Ethanol wurde für 20 min mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen, in 5 ml Proteinase K-Puffer (+ 50 μ l Proteinase K-Lösung) resuspendiert und über Nacht bei 50°C inkubiert. Es wurden 2,5 ml Phenol und 2,5 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, 20 min bei RT in einem Testtube Rotator (Labinco) gemischt und 15 min mit 4000 rpm bei RT zentrifugiert. Die DNA-haltige obere Phase wurde in ein frisches 15 ml Gefäß überführt, nach Zugabe von 5 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) für

nicht länger als 10 min in einem Testtube Rotator (Labinco) gemischt und 10 min mit 4000 rpm bei RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein frisches 50 ml Gefäß überführt und mit vier Volumenprozent 5 M NaCl und 2,5 Volumen eiskaltem 95 % Ethanol gemischt. Die DNA wurde durch 20 min Zentrifugation mit 4000 rpm bei 4°C pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 500 µl TE resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Die DNA-Proben lagerten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

2.2.2 DNA und RNA Isolierung aus Zellen

Die verwendeten Glioblastomzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert und anschließend mit einer entsprechenden Menge Trizol Reagenz (PeqLab) für 5 min inkubiert. Durch mehrmaliges Homogenisieren in einer Pipettenspitze wurden die Zellen lysiert und dann bei -20°C eingefroren. Das Homogenat wurde mit 0,2 Volumen Chloroform gemischt, für 10 min bei RT inkubiert und 15 min mit 13000 rpm zentrifugiert. Von den zwei entstandenen Phasen enthielt die obere die RNA und die untere die DNA (Isolierung der DNA wie in 2.2.1 beschrieben). Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit einem Volumen Isopropanol gemischt und für drei Stunden bei -20°C inkubiert. Die RNA wurde für 30 min bei 4°C mit 14000 rpm pelletiert, einmal mit absolutem Ethanol gewaschen und in 20 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Die RNA-Proben lagerten bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

2.2.3 Detektion von Allelverlusten

Zur Identifizierung von Allelverlusten im Tumorgewebe wurden Mikrosatellitenmarker untersucht, die aus kurzen, sich wiederholenden DNA-Sequenzen bestehen und in ca. 30 kb-Abständen über das menschliche Genom verteilt sind. Bei der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Technik wurden bevorzugt Di-, Tri- und Tetranukleotidwiederholungen benutzt. Als besonders geeignet wurden solche Mikrosatellitenmarker eingestuft, deren Anzahl an Wiederholungseinheiten in der Population stark variieren, d.h. eine hohe Heterozygotenfrequenz aufweisen [60, 61]. Bei der Analyse des Heterozygotieverlustes (*loss of heterozygosity*; LOH) werden die durch PCR amplifizierte chromosomalen Abschnitte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für die PCR werden Oligonukleotide aus den flankierenden Bereichen des jeweiligen Mikrosatelliten gewählt. Wenn die Mikrosatellitenmarker von mütterlich und väterlich vererbten Allelen eine unterschiedliche Anzahl von Wiederholungseinheiten aufweisen, werden normalerweise vier Banden im Polyacrylamidgel sichtbar und man spricht von einem informativen Marker (heterozygote Allelverteilung). Treten hingegen nur zwei Banden (väterliches und mütterliches Allel haben dieselbe Anzahl Wiederholungseinheiten) auf, ist der betreffende Marker als nicht informativ zu werten (homozygote Allelverteilung). Bei einem Vergleich von Tumor- und Referenz-DNA (aus Blut isoliert) desselben Patienten, können im Tumor vorkommende chromosomale Deletionen durch den Verlust eines Allels in der Tumor-

DNA mittels Mikrosatellitenanalyse nachgewiesen werden, vorausgesetzt der jeweilige Patient ist für den untersuchten Marker heterozygot, d.h. informativ. Im Normalfall würden dann in der Blut-DNA vier Banden und in der Tumor-DNA nur zwei Banden detektiert.

Nach erfolgter Amplifikation der Mikrosatellitenabschnitte wurden die Proben mit 5 μ l La-depuffer (80 % (v/v) Formamid, 20 % (v/v) Bromphenolblau/Xylencyanol-Lösung) gemischt, 10 min bei 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und auf 10-12 % Polyacrylamidgele (40 % Polyacrylamid und 2 % Bisacrylamid) geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 1 bis 6 Stunden bei 45 W. Die Amplikons wurden durch Silberfärbung visualisiert [62].

2.2.4 Mutationsanalyse

Für die Mutationsanalyse wurde die Einzelstrangkonnformationspolymorphismus-Analyse (SSCP; *single-strand conformation polymorphism*) verwendet. Sie basiert auf der Grundlage, dass einzelsträngige DNA sequenzabhängig unterschiedliche Sekundärstrukturen ausbildet, die sich different in nativen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch auftrennen. Die Sekundärstruktur kann bereits durch Substitution einer Base verändert vorliegen. Dies ermöglicht die Unterscheidung von einzelsträngiger Wildtyp- und mutierter Sequenz. Für die Analyse wird die kodierende Region eines Gens idealerweise durch 150-250 bp lange überlappende PCR-Fragmente amplifiziert. Kürzere Fragmente bilden oft keine Sekundärstrukturen aus, während die Empfindlichkeit zur Detektion von Ein-Basenpaar-Substitutionen mit zunehmender PCR-Amplikonlänge nachlässt. Die genomisch interessanten Bereiche wurden durch PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch über native Polyacrylamidgele (40 % Acrylamid/Bisacrylamid; 19:1) getrennt. Dazu wurden mindestens zwei verschiedene Elektrophoresebedingungen, die in Temperatur und Gelzusammensetzung variierten, verwendet. Amplifikationsprodukte, die ein verändertes Laufverhalten zeigten, wurden anschließend sequenziert, um die Art und Position der Mutation zu identifizieren.

2.2.5 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit dem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) sequenziert. Hierzu wurden ca. 250 ng DNA mit 10 pmol Primer und 2 μ l Premix (Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) versetzt und in einem Trio-Thermoblock (Biometra) nach folgendem Programm amplifiziert:

25x	96°C	10 Sekunden (Denaturierung)
	50°C	5 Sekunden (Primer-Anlagerung)
	60°C	4 Minuten (Primer-Verlängerung)
	4°C	∞

Die Probenaufbereitung erfolgte durch Ethanolpräzipitation. Hierzu wurden die PCR-Produkte mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat pH4,6 und 2,5 Vol. 95 % Ethanol gemischt und 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Es schloss sich zweimaliges Waschen mit 70 % Ethanol an. Die luftgetrockneten Proben wurden in 4 µl Ladungspuffer (80 % (v/v) Formamid; 5 mM EDTA, pH8,0; 50 mg/ml Blue Dextran) resuspendiert und über ein Harnstoff-Polyacrylamidgel (46 % (w/v) Harnstoff; 16,5 % (v/v) 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1); 10 % (v/v) 10x TBE) auf einem ABI Prism 377 DNA Sequencer elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung der Sequenziergele erfolgte mit der ABI Prism Sequencing Analysis Software (Version 3.4.1).

2.2.6 Suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH)

Das Prinzip der subtraktiven Hybridisierung beruht darauf, gemeinsame Transkripte zweier mRNA-Populationen zu entfernen und differentiell exprimierte Transkripte anzureichern. Die Population, deren differentiell exprimierte Transkripte angereichert werden, wird als *Tester* und die Population, mit der gemeinsame Transkripte aus der Hybridisierung eliminiert werden, wird als *Driver* bezeichnet. Die Subtraktion der zwei RNA-Populationen und die Amplifikation der differentiellen *Tester*-Transkripte wird in sieben Schritten vollzogen:

1. cDNA-Synthese (*Tester* und *Driver* RNAs werden in cDNA transkribiert)
2. *RsaI* Restriktion (die cDNAs werden zu kleineren, *blunt-end* Fragmenten verdaut)
3. Adapterligation (die *Tester*-Population wird geteilt und mit zwei verschiedenen Adaptern ligiert)
4. 1. Hybridisierung (Angleichung und Anreicherung der differentiell exprimierten Transkripte)
5. 2. Hybridisierung (Generierung von Templates für die PCR-Amplifikation aus den differentiell exprimierten Transkripten)
6. 1. PCR-Amplifikation (Suppressionsschritt, nur differentiell exprimierte Sequenzen werden exponentiell amplifiziert)
7. 2. PCR-Amplifikation (Amplifikation der differentiell exprimierten Sequenz und Reduktion des Hintergrunds).

Die transkribierten *Tester*- und *Driver*-RNAs werden mit der Restriktionsendonuklease *RsaI* verdaut, was zur Entstehung von kleineren, *blunt-end* Fragmenten führt. An die Fragmente der *Tester*-Population werden zwei verschiedene Adapter (1 und 2R) ligiert, die anschließend jeweils mit einem Überschuß an *Driver* (ohne Adapter) hybridisiert werden. Dies führt zum einen zu einer Hybridisierung von Fragmenten, die in der *Tester*- und *Driver*-Population äquimolar repräsentiert sind (Abbildung 5, Moleküle b) und, zum anderen, zu einer Reduktion von stark

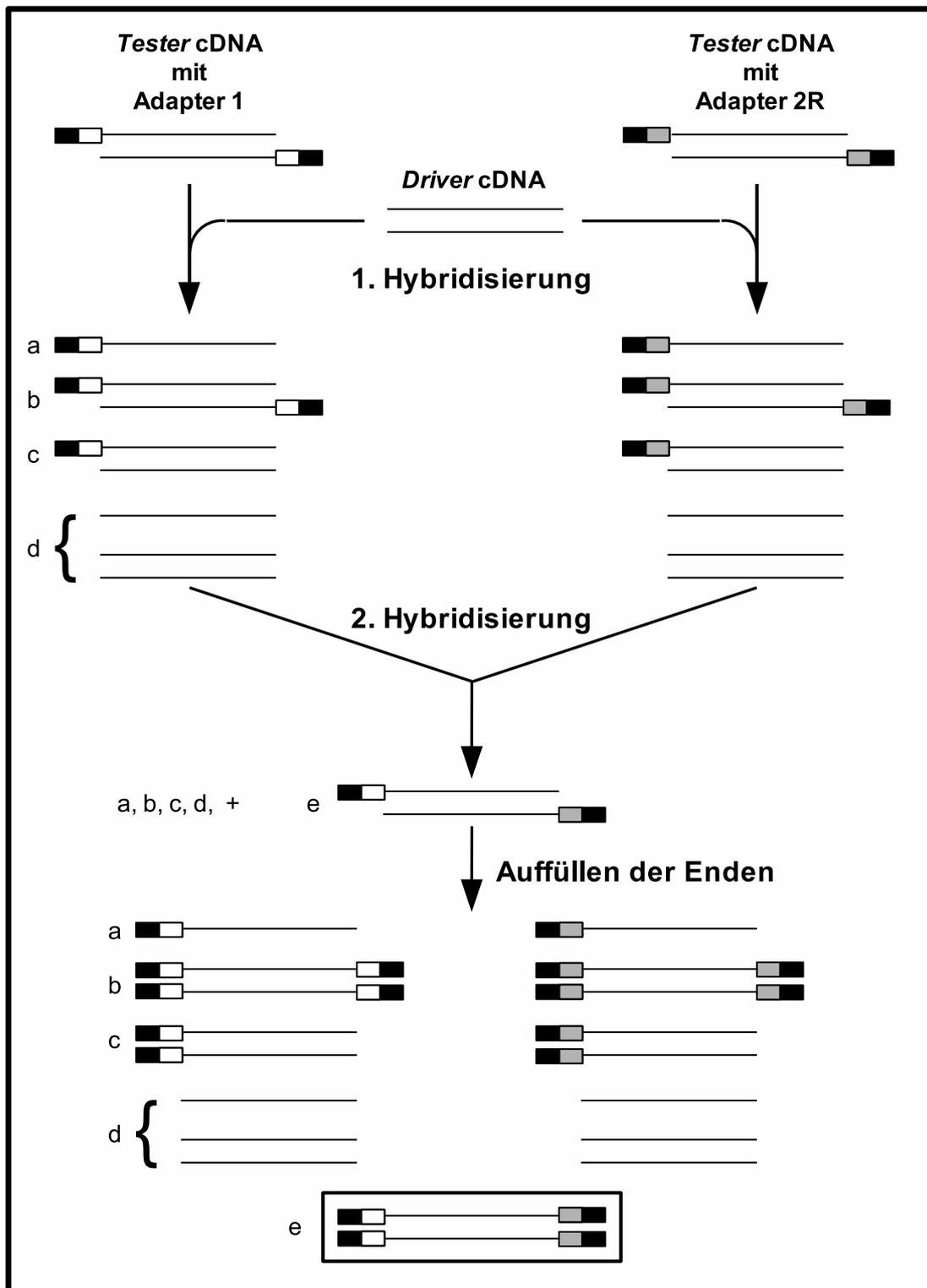


Abbildung 5: Schematische Darstellung der suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH). a-d bezeichnen die möglichen Einzel- bzw. Doppelstrangmoleküle. Nach der ersten Hybridisierung repräsentiert das Molekül a differentielle Transkripte, nach der zweiten Hybridisierung und der Auffüllreaktion werden sie durch Molekül e dargestellt. Die Adapter 1 (schwarzweiße Boxen) und 2R (schwarzgraue Boxen) haben am 5'-Bereich identische und, weiter 3' liegend, unterschiedliche Sequenzen, die eine *nested* PCR ermöglichen.

überexprimierten Transkripten aus der *Tester*-Population. Die beiden Hybridisierungsansätze werden unter Zugabe von frischem Driver vereinigt und erneut hybridisiert. Dies führt in der Hauptsache zur Generierung von Templates für die PCR-Amplifikation (Abbildung 5 unterer Teil: Moleküle a-c und e), aber reduziert auch den Hintergrund (repräsentiert durch äquimolare Transkripte aus *Tester* und *Driver*; Abbildung 5 unterer Teil: Molekül c) und vermindert stark überexprimierte Sequenzen aus der *Tester*-Population. Die Zugabe von frischem *Driver* in beiden Hybridisierungsschritten führt zur Reduktion stark überexprimierter Transkripte aus der *Tester*-Population und somit zur Anreicherung von seltenen Transkripten [57, 58].

Die Adapter 1 und 2R haben 5' identische Sequenzen und ermöglichen die PCR-Amplifikation mit nur einem Primer. Während dieser ersten PCR werden die differentiell exprimierten Sequenzen aus der *Tester*-Population (repräsentiert durch Molekül e; Abbildung 5) exponentiell amplifiziert und die äquimolaren Transkripte aus *Tester* und *Driver* (repräsentiert durch Molekül b; Abbildung 5 unterer Teil) nicht angereichert. Die doppelsträngigen b-Moleküle (siehe Abbildung 5 unterer Teil) haben durch ihre Adapter komplementäre 5' bzw. 3' Sequenzen. Während des Denaturierungsschritts der PCR-Reaktion ist eine Loopbildung dieser Moleküle wegen ihrer räumlichen Nähe kinetisch gegenüber der Primeranlagerung begünstigt. Daher findet hier die Suppression statt. Die zweite PCR-Amplifikation wird mit weiter 3' gelegenen, sog. *nested* Primern durchgeführt und dient der weiteren Anreicherung differentiell exprimierter Transkripte und der Reduktion des Hintergrunds.

Praktisch wurde 1 μg RNA aus den Tumorproben mit dem SMART PCR cDNA Synthesis Kit (BD Bioscience) gemäß den Herstellerangaben in cDNA transkribiert und in 50 μl destilliertem Wasser resuspendiert. Für alle weiteren Schritte wurde das PCR-Select cDNA Subtraction Kit (BD Bioscience) verwendet. Die Restriktion erfolgte nach Versetzung von 43,5 μl cDNA mit 5 μl 10x *RsaI* Restriktionspuffer und 1,5 μl *RsaI* (10 Units/ μl) bei 37°C für 1,5 h. Die Zugabe von 2,5 μl 20x EDTA/Glykogen-Mix stoppte die Restriktion. Die Aufreinigung der verdauten cDNA fand über eine Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Extraktion und anschließende Ethanolpräzipitation statt. Zu den Restriktionsansätzen wurde 1 Vol Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben, gut durchmischt, 10 min mit 14000 rpm bei RT zentrifugiert und die obere Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Ethanolfällung erfolgte durch Zugabe von 0,5 Vol 4 M Ammoniumacetat, 4 Vol 95 % Ethanol und anschließender Zentrifugation für 20 min mit 14000 rpm bei RT. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 200 μl 80 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 5,5 μl destilliertem Wasser resuspendiert. Die Adapterligation erfolgte nur mit der *Tester*-Population, die hierzu in zwei Portionen geteilt wurde. An den einen Teil wurde der Adapter 1 und an den anderen Teil der Adapter 2R ligiert. Folgende Ansätze wurden pipettiert:

	<i>Tester 1</i>	<i>Tester 2R</i>
verdaute <i>Tester</i> -cDNA (1:6 verdünnt)	2 μ l	2 μ l
Adapter 1	2 μ l	/
Adapter 2R	/	2 μ l
5x Ligationspuffer	2 μ l	2 μ l
T4 DNA Ligase (400 U/ μ l)	1 μ l	1 μ l
steriles Wasser	3 μ l	3 μ l
Gesamtvolumen	10 μ l	10 μ l

Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht und wurde durch Zugabe von 1 μ l Glykogen/EDTA-Mix und 5 min Inkubation bei 72°C gestoppt. Für die erste Hybridisierung wurden folgende Ansätze pipettiert:

	HS1	HS2R
verdaute <i>Driver</i> -cDNA	1,5 μ l	1,5 μ l
Adapter 1-ligierter <i>Tester</i>	1,5 μ l	/
Adapter 2R-ligierter <i>Tester</i>	/	1,5 μ l
4x Hybridisierungspuffer	1,0 μ l	1,0 μ l
Gesamtvolumen	4,0 μ l	4,0 μ l

Die Ansätze wurden in einem UNO-Thermoblock (Biometra) 1,5 min bei 98°C denaturiert und 8 h bei 68°C hybridisiert. Für die zweite Hybridisierung wurde zunächst 1 μ l frischer *Driver* mit 1 μ l 4x Hybridisierungspuffer und 2 μ l sterilem, destilliertem Wasser gemischt und 1,5 min bei 98°C denaturiert. Es folgte die Vereinigung der beiden ersten Hybridisierungsansätze (HS1 und HS2R) unter Zugabe des frisch denaturierten *Drivers* und die Inkubation bei 68°C über Nacht. Die Reaktion wurde durch Verdünnung mit 200 μ l Verdünnungspuffer und Inkubation bei 68°C für 7 min gestoppt. Für die erste PCR-Amplifikation wurden folgende Komponenten gemischt und sich anschließendes Programm verwendet:

	Menge
verdünnter Hybridisierungsansatz	1,0 μ l
10x PCR Reaktionspuffer	2,5 μ l
dNTP Mix (10 mM)	0,5 μ l
PCR Primer 1 (10 μ M)	1,0 μ l
50x Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5 μ l
steriles Wasser	19,5 μ l
Gesamtvolumen	25,0 μ l

	Temperatur	Zeit
	94°C	25 s
27 Zyklen:	94°C	10 s
	66°C	30 s
	72°C	1,5 min

Für die zweite PCR-Amplifikation wurden die Produkte aus der Primär-PCR 1:10 verdünnt und folgende Komponenten gemischt und das sich anschließende Programm verwendet:

	Menge
verdünntes Amplifikationsprodukt	1,0 μ l
10x PCR Reaktionspuffer	2,5 μ l
dNTP Mix (10 mM)	0,5 μ l
<i>nested</i> PCR Primer 1 (10 μ M)	1,0 μ l
<i>nested</i> PCR Primer 2R (10 μ M)	1,0 μ l
50x Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5 μ l
steriles Wasser	18,5 μ l
Gesamtvolumen	25,0 μ l

	Temperatur	Zeit
12 Zyklen:	94°C	10 s
	68°C	30 s
	72°C	1,5 min

Die amplifizierten, differentiell exprimierten Transkripte wurden bei -20°C gelagert.

2.2.7 Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte

Die in der SSH angereicherten, differentiell exprimierten Transkripte wurden mit dem Megaprime Labeling Kit (Amersham) gemäß den Herstellerangaben mit radioaktivem [α^{32} P]-dCTP markiert und als Sonde für die Sichtung von cDNA-Bibliotheken verwendet. Dabei handelt es sich um "Human UniGene Filtersets" (350-2-504, 350-2-505, 350-2-519, 350-2-520, 350-3-529, 350-3-530, 350-6-129, 350-6-130; Ressourcenzentrum und Primäre Datenbank (RZPD), Berlin), die aus jeweils 36000 Klonen bestehen. Die Filter wurden drei Stunden in Church-Puffer (mit humaner Plazenta-DNA) bei 65 °C prähybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde wurde über Nacht bei 65 °C hybridisiert und dreimal 20 min bei 68 °C gewaschen. Die radioaktiven Signale der [α^{32} P]-dCTP markierten Sonde wurden durch ein- bis dreitägige Exposition bei -80 °C von Biomax MR Röntgenfilmen (Kodak) detektiert und mit dem Auge ausgewertet. Es wurden nur die stärksten Signale ausgewählt. Die Signalkoordinaten wurden entsprechend den Angaben des RZPD bestimmt und mit dem Programm dnsfa.py (Michael Gutmann, Multimediazentrum, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) dem entsprechenden Imageclone bzw. Gen zugeordnet. Alternativ wurden die hybridisierten Filter auf Fujifilm Imaging Plates (BAS-MS, Raytest) über Nacht exponiert, in einem Fujifilm BAS-1800 II Phosphoimager (Raytest) ausgelesen und die Signalintensitäten mit der AIDA Array Matrix Software V3.1 (Raytest) ausgewertet.

2.2.8 Mikroarray-Analysen

Lösungen:

12x MES:

- 360 mM MES freies Säuremonohydrat (Sigma)
- 890 mM MES Natriumsalz (Sigma)

2x Hybridisierungspuffer:

- 8,3 ml 12x MES
- 17,7 ml 5 M NaCl
- 4 ml 500 mM EDTA
- 0,1 ml 10 % Tween 20 (Pierce Chemical)
- 19,9 ml steriles destilliertes Wasser

5x Fragmentierungspuffer:

- 200 mM Tris-acetat, pH8,1
- 500 mM Kaliumacetat
- 150 mM Magnesiumacetat

20x SSPE:

- 3 M NaCl
- 200 mM NaH₂PO₄
- 20 mM EDTA

Nicht-stringenter Waschpuffer:

- 300 ml 20x SSPE (Bio Whittaker)
- 1 ml 10 % Tween 20 (Pierce Chemical)
- 698 ml steriles destilliertes Wasser
- Filterung durch einen 0,2 µm Filter
- Zugabe von 1 ml Antifoam 0-30 (Sigma)

Stringenter Waschpuffer:

- 83,3 ml 12x MES
- 5,2 ml 5 M NaCl
- 1 ml 10 % Tween 20 (Pierce Chemical)
- 910,5 ml steriles destilliertes Wasser
- Filterung durch einen 0,2 µm Filter

2x Stain Puffer:

- 41,7 ml 12x MES
- 92,5 ml 5 M NaCl
- 2,5 ml 10 % Tween 20 (Pierce Chemical)
- 112,8 ml steriles destilliertes Wasser

Die Tumor RNA wurde wie in Abschnitt 2.2.2. beschrieben isoliert. Für jedes Experiment wurden 5 µg Gesamt-RNA verwendet. In einem ersten Amplifikationsschritt wurde die RNA in cDNA und in einem zweiten Schritt anschließend in cRNA transkribiert. Für die cDNA Synthese wurde das Superscript Choice System (Gibco/BRL) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die entstandenen Doppelstränge wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und mit sog. "Phase Lock Gel Heavy Tubes" (Eppendorf) durch Zentrifugation von der proteinhaltigen Phenol-Chloroform-Phase befreit. Für die *in vitro* Transkription der cDNA wurde das RNA Transcript Labeling Kit (Enzo) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Bei der Transkription wurde die RNA durch Inkorporation von biotinyliertem CTP und UTP markiert. Die Proben wurden über das RNeasy Mini Kit (Qiagen) gereinigt und anschließend mit Ethanol prä-

zipitiert. Hierfür wurden zu der cRNA 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen absoluter Ethanol gegeben und für eine Stunde bei -20°C gelagert. Es wurde 30 min bei 4°C mit 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet zweimal mit 80 % eiskaltem Ethanol gewaschen. Die cRNA wurde in DEPC behandeltem Wasser resuspendiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Zur Fragmentierung der Proben wurden $15\ \mu\text{g}$ cRNA und $8\ \mu\text{l}$ 5x RNA Fragmentierungspuffer auf ein Endvolumen von $40\ \mu\text{l}$ aufgefüllt, für 35 min bei 94°C inkubiert und abschließend auf Eis abgekühlt. Die Fragmentierung in kleinere Stücke dient einer effizienteren Bindung an die auf die Chips gebundenen Oligonukleotide. Für die Hybridisierung wurden die Hu6800FL Chips (Affymetrix) mit $200\ \mu\text{l}$ Hybridisierungspuffer für zehn Minuten bei 45°C präinkubiert. Die markierte cRNA wurde mit folgenden Substanzen gemischt:

- $5\ \mu\text{l}$ Kontroll Oligonukleotide B2 (3 nM; Affymetrix)
- $15\ \mu\text{l}$ 20 x Eukaryotische Hybridisierungskontrollen (GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit; Affymetrix)
- $3\ \mu\text{l}$ Heringssperma DNA (10 mg/ml; Promega/Fisher Scientific)
- $3\ \mu\text{l}$ Acetyliertes BSA (50 mg/ml; Gibco/BRL)
- $150\ \mu\text{l}$ 2 x Hybridisierungspuffer
- Auffüllen auf $300\ \mu\text{l}$ mit sterilem destilliertem Wasser

Der Ansatz wurde 5 min auf 99°C erhitzt, 5 min bei 45°C abgekühlt, 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend in die Hu6800FL Chips gefüllt. Die Hybridisierung erfolgte in einem GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix) bei 45°C und 60 rpm für 16 h. Die Arrays wurden mit nicht-stringentem Waschpuffer bei 25°C und anschließend mit stringentem Waschpuffer bei 50°C gewaschen. Zur Visualisierung wurde mit Streptavidin-Phycoerythrin (Molecular Probes) gefärbt, mit 6x SSPE gewaschen, mit biotinyliertem Anti-Streptavidin Immunglobulin G (Vector Laboratories) und zur Signalverstärkung mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt und ein letztes Mal mit 6x SSPE gewaschen. Die Pixelintensitäten wurden mit einem GeneArray Scanner und der Microarray Suite 4.0 Software (beides von Affymetrix) ausgewertet.

2.2.9 Statistische Auswertung der Mikroarrays

Ein Probenet auf dem Hu6800FL Array setzt sich aus 20 Oligonukleotiden (25 bp), die komplementär zu einer spezifischen cDNA Sequenz sind, dem sog. "Perfect Match" (PM), und aus 20 dazu identischen Sequenzen, die zentral einen Basenpaaraustausch haben, dem sog. "Mismatch" (MM), zusammen (Abb. 6). Die 20 Oligonukleotide sind vom 3'- zum 5'-Ende mit jeweils einer 1 bp-Überlappung ausgewählt und umspannen somit einen Bereich von 240 bp der Zielsequenz.

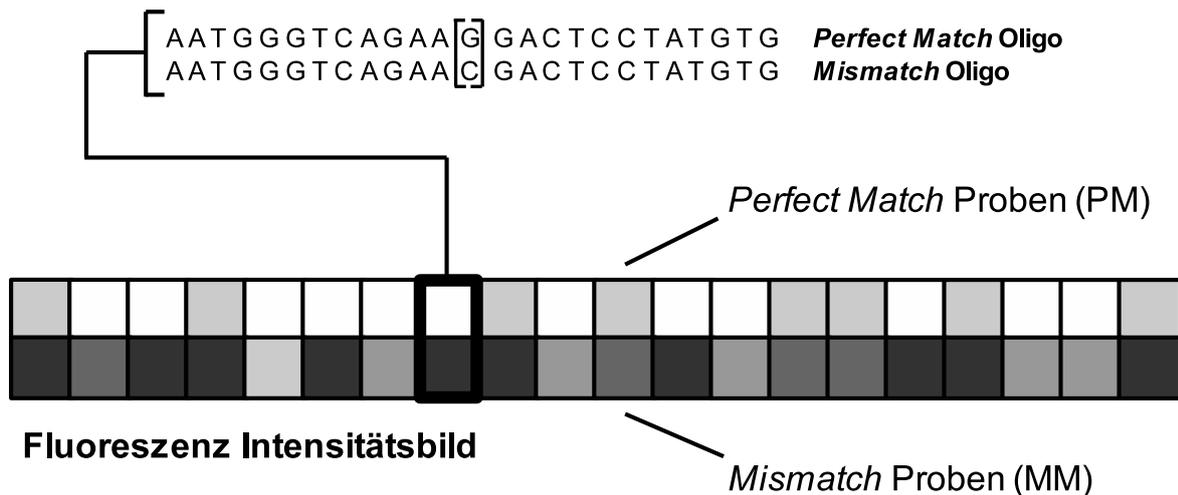


Abbildung 6: Genrepräsentation auf dem Hu6800FL Chip von Affymetrix.

Ein Probenpaar setzt sich aus den zwei Proben "Perfect Match" und "Mismatch" zusammen, die jeweils einen $24 \times 24 \mu\text{m}$ Bereich auf dem Chip einnehmen. Beim Scannen der Probe wird ein 1 Pixelrand ignoriert und der 75. Prozentanteil bei einer Auflösung von $3 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ gespeichert. Nachdem die Rohdaten aller Hu6800FL Chips vorlagen, wurde ein Chip (hybridisiert mit der cRNA von Tumor A201), der eine homogene Verteilung der Pixelintensitäten aufwies, als Standard ausgewählt. Dieser Referenzchip hatte die hellsten Signale und den geringsten Hintergrund. Von diesem Chip wurden die PM-MM Werte, die kleiner als -200 und solche PM- bzw. MM-Werte, die gesättigt waren, ausgeschlossen. Die Intensitäten eines Probensets wurden durch Mittelung der PM-MM Werte nach Ausschluß der 25 % höchsten und 25 % niedrigsten Differenzen errechnet. Die Probenintensitäten des Standardchips wurden durch Multiplikation mit einer Konstanten auf einen Durchschnittswert von 1500 Units skaliert. Im weiteren wurde jeder Chip durch eine Quantilnormalisierung mit 99 äquidistanten Quantilen auf den Standardchip normalisiert. Die Quantil normalisierten Mittelwerte wurden nach folgender Formel logarithmiert: $\log(\max(x+100,0)+100)$. Die logarithmierten Mittelwerte wurden für die T-Test Analysen verwendet. Die Expressionsänderungen für ein Gen zwischen zwei verschiedenen Tumorentitäten wurde durch Berechnung des Expressionsverhältnisses ($\text{EV} = \text{Expression im Rezidiv} / \text{Expression im Primärtumor}$) ermittelt. Zusätzlich wurden die Daten nach der Methode der schrumpfenden Zentroide analysiert [59]. Für jede Probenklasse wurde ein separates Zentroid (Mittelvektor/Genexpression) generiert. Jedes Zentroid wurden dann - proportional zur Standardabweichung der Genexpression geteilt durch die Proben der Zentroidklassen - gegen Null reduziert. Alle Gene, die dadurch einen Mittelwert von 0 oder <0 erhielten, wurden vom Zentroid ausgeschlossen. Dieses geschrumpfte Zentroid kann dann für die Klassifizierung verwendet werden. Dabei werden die Abstände zwischen jeder Probe und dem Zentroid festgelegt. Die optimale Schrumpfstärke wird dabei durch Kreuzvalidierung der Proben durchgeführt und erlaubt gleichzeitig die Gütebestimmung der Klassifikation. Eine detaillierte mathematische Ausarbeitung der Methode ist in Referenz [59] zusammengefasst. Praktisch wurden die

Expressionsdaten mit dem Programm PAM (*prediction analysis of microarrays*), das als Implement für Microsoft Excel zur Verfügung stand, ausgewertet.

2.2.10 *Real-time* Reverse Transkription (RT)-PCR

Die *Real-Time* RT-PCR (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription von RNA) basiert auf einer normalen PCR Reaktion in Anwesenheit eines Fluoreszenzfarbstoff, der in die doppelsträngige DNA interkaliert. Am Ende eines PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz der gebildeten DNA-Doppelstränge gemessen. Dies ermöglicht eine kontinuierliche Aufzeichnung der Produktbildung über die Zeit. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Produktmenge und wird als sog. R_n -Wert (*normalized reporter*; Verhältnis von Reportersignal zu mittlerer Grundintensität der passiven Referenz) angegeben. Die PCR-Reaktion wurde für alle Experimente nach denselben Bedingungen durchgeführt. Nach einer 10 min Inkubation

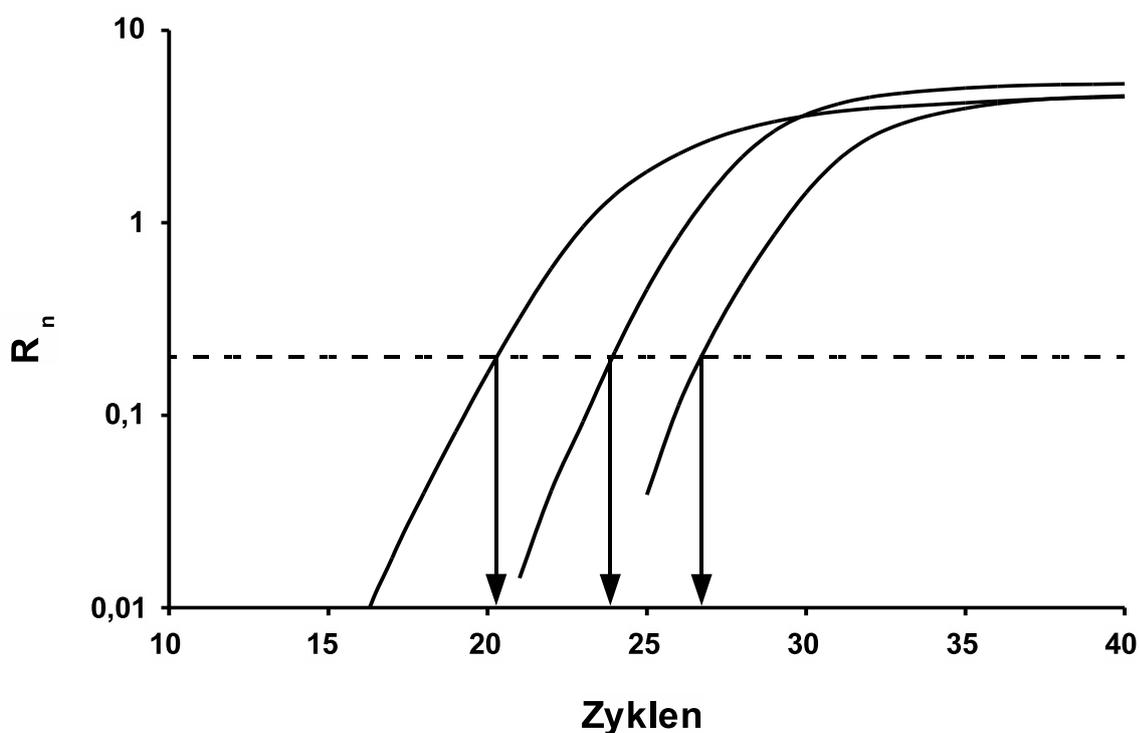


Abbildung 7: Produktamplifizierung bei der *real-time* RT-PCR. Dargestellt sind fiktive Kurvenverläufe mit von links nach rechts abnehmender Expressionstärke. Bei den zu höheren Zyklenzahlen gelegenen Kurven (durch Pfeile indiziert) wird dieselbe Fluoreszenzintensität (R_n) erst später erreicht.

bei 95°C (Aktivierung der HotStar Taq-Polymerase durch Denaturierung eines Inhibitorproteins) folgten 40 Zyklen mit 15 s bei 95°C und 60 s bei 60°C. Die Reaktionen wurden mit dem qPCR Core Kit (Eurogentec) angesetzt. Hierzu wurden 5 μ l einer 1:50 verdünnten cDNA mit 20 μ l PCR-Reaktionsmix (2,5 μ l 10x Reaktionspuffer, 3,5 mM Magnesiumchlorid, jeweils 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0,75 μ l 1:2000 SYBR Green-Lösung, 0,025 U AmpliTaq Gold Polymerase und 50, 300 oder 900 nM des Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primers)

gemischt. Die Darstellung der Produktamplifizierung erfolgte graphisch durch Auftragung der R_n -Werte (Ordinate) gegen die Zyklenzahl (Abszisse) (Abbildung 7). Zur Qualitätskontrolle wurde eine Dissoziationskurve des Amplikons in einem Bereich von 60 bis 100 °C erstellt. Die Auswertung erfolgte durch die Analyse von C_T -Werten (*threshold cycle*: Schwellenwert; mathematisch: $C_T = \frac{dR_n}{dZyklen}$) für alle erhaltenen Kurven. Hierzu wurde ein konstanter R_n -Wert festgelegt, der alle Kurven im logarithmischen Amplifikationsbereich schneidet. Die zu diesem R_n -Wert gehörigen Zyklenzahlen (C_T -Werte) wurden als Abszissenwerte der jeweiligen Schnittpunkte der Kurven abgelesen und tabellarisch zusammengestellt.

Da bei der *real-time* RT-PCR immer dasselbe PCR-Programm benutzt wurde, mussten die optimalen Primerverhältnisse ausgetestet werden. Hierzu wurde eine 3x3 Primermatrix für jedes Oligonukleotidpaar erstellt, bei der 50, 300 und 900 μ M des Vorwärtsprimers mit jeweils 50, 300 und 900 μ M des Rückwärtsprimers in einer PCR-Reaktion mit SYBR Green getestet wurden. Für die anschließende Genexpressionsanalyse an den Tumorserien wurden die Verhältnisse ausgewählt, die in der Dissoziationskurve nur einen Peak bei der errechneten Schmelztemperatur zeigten und den niedrigsten C_T -Wert aufwiesen (die Primersequenzen und die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 9 zusammengefasst).

Tabelle 15: Beispielrechnung für die *real-time* RT-PCR.

Probe	C_T	C_T	$\bar{m}(C_T)$	$\bar{m}(C_T)$	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
	Zielgen	Referenzgen	Zielgen	Referenzgen			
NB1	22,75	20,01	22,75	20,01	2,74	0,00	1,00
	22,85	20,11					
	22,65	19,91					
NB2	22,65	19,91	22,75	20,01	2,74	0,00	1,00
	22,75	20,01					
	22,85	20,11					
Bsp1	18,32	19,25	18,32	19,35	-1,03	-3,77	13,64
	18,37	19,35					
	18,27	19,45					
Bsp2	23,59	20,65	23,49	20,75	2,74	0,00	1,00
	23,39	20,85					
	23,49	20,75					
Bsp3	24,59	20,33	24,59	20,37	4,22	1,48	0,36
	24,78	20,37					
	24,40	20,41					

NB: nicht neoplastisches Gehirngewebe, Bsp1: Beispiel einer verstärkten Expression im Vergleich zu $(NB1 + NB2)/2$, Bsp2: Beispiel einer ähnlich starken Expression wie $(NB1 + NB2)/2$, Bsp3: Beispiel einer verminderten Expression im Vergleich zu $(NB1 + NB2)/2$; \bar{m} : Mittelwert; C_T : Schwellenwert; Δ : Differenz.

Um die Expressionsstärke zu quantifizieren, wurde das jeweilige Zielgen auf ein ubiquitär exprimiertes Referenzgen (*ARF1*; ADP Ribosylierungsfaktor 1) normalisiert. Als Referenzge-

webe wurden Proben aus nicht neoplastischen Gehirnarealen (temporaler Kortex und weiße Substanz) von zwei verschiedenen Patienten verwendet.

Für die Auswertung der Expression (Tabelle 15) wurde von jeder cDNA eine Dreifachbestimmung sowohl für das Zielgen als auch für das Referenzgen durchgeführt. Von jedem dieser Triplets wurde der Mittelwert gebildet und die Differenz des Mittels von Ziel- und Referenzgen errechnet (ΔC_T). Die ΔC_T -Werte der beiden nicht neoplastischen Gehirnproben wurden gemittelt und von den ΔC_T -Werten der Tumorproben subtrahiert ($\Delta\Delta C_T$ -Wert). Um eine übersichtlichere Darstellung zu erlangen, wurden die $\Delta\Delta C_T$ -Werte invers zur Basis 2 potenziert ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), so dass Werte > 1 einer stärkeren und Werte < 1 einer schwächeren Expression im Vergleich zum Referenzgewebe entsprechen.

2.2.11 Kultivierung von Glioblastomzellen

Für alle Zellkulturexperimente wurden CCF-STTG1 (American Type Culture Collection) und T98G (American Type Culture Collection) Glioblastomzellen verwendet. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zugabe von 1 % Penicillin (PAA Laboratories), 1 % Streptomycin (PAA Laboratories) und 10 % fetalem Kälberserum (FCS; PAA Laboratories) bei 37°C und 5 % Kohlendioxidatmosphäre kultiviert. Bei Passagierung wurde einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1,5 ml Trypsin (Gibco BRL) durch zweiminütige Inkubation bei 37°C vom Gefäßboden abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DMEM abgestoppt und die Zellen wurden auf die entsprechende Anzahl Gefäße verteilt. Überschüssige Zellen wurden bei 90 % Konfluenz trypsiniert, 5 min bei 1500 rpm pelletiert, in Einfriermedium (60 % DMEM mit 32 % FCS, 8 % DMSO) resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.12 RNA-Interferenz in Glioblastomzellen

Die RNA-Einzelstränge wurden in Annealing-Puffer (100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES-KOH pH7,4, 2 mM Magnesiumacetat) auf eine Endkonzentration von 200 μM verdünnt. Zur Herstellung einer 100 μM Arbeitslösung doppelsträngiger siRNA wurden gleiche Volumina der 200 μM Einzelstranglösungen gemischt, für zwei Minuten auf 98°C erhitzt und eine Stunde bei 37°C abgekühlt.

Die Transfektionen wurden in 6-well Gewebekulturplatten durchgeführt. Hierzu wurden je Zelllinie (CCF-STTG1 und T98G) 110000 Zellen pro well ausgesät, um nach 24 h 50 % Konfluenz zu erhalten. Die Zellen wurden in PBS und zweimal mit serum- und antibiotikafreiem Medium (OptiMEM; Invitrogen) gewaschen. Es wurden separat 100 pmol siRNA mit OptiMEM auf ein Volumen von 200 μl aufgefüllt, 4 μl OligofectAMINE (Invitrogen) mit 16 μl OptiMEM gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Beide Ansätze wurden vereinigt und 20 bis 30 min ebenfalls bei RT inkubiert. Es wurde 800 μl OptiMEM zu den Zellen gegeben und anschließend mit den 200 μl Transfektionsansatz gemischt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und

5 % Kohlendioxidatmosphäre wurden die Zellen entweder als 24 h-Wert oder nach Durchmischung mit 1 ml DMEM (mit 2 x FCS und 2 x P/S) als 48-, 72- bzw. 96 h-Wert verwendet.

2.2.13 Überprüfung der Zellproliferation

CCF-STTG1- und T98G-Zellen wurden wie oben beschrieben mit den siRNAs gegen *FOXM1* und *MGP* transfiziert. Nach 72 h Inkubation wurde der Effekt der RNA Interferenz auf die Zellproliferation durch Inkorporation von radioaktiv markiertem Thymidin ($[^3\text{H}]$ -Thymidin) bei der DNA-Neusynthese überprüft. Hierzu wurden die Zellen 24 h in DMEM (mit 1x FCS und 1x P/S) mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]$ -Thymidin kultiviert, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und zur Fixierung über Nacht in 1 ml 10 % Trichloressigsäure inkubiert. Es wurde zweimal mit eiskalter 10 % Trichloressigsäure gewaschen und 1 h bei RT in 0,4 ml 0,1 M NaOH zum Zellaufschluß geschüttelt. Die 0,4 ml Zelllysate wurden mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler 6500 (Beckman) aufgezeichnet. Alle Werte wurden als Vierfachbestimmung ermittelt und die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

2.2.14 Überprüfung der Zellvitalität

2.2.14.1 Kristallviolett-Färbung Zur Detektion lebender Zellen wurde die Einlagerung des Farbstoffs Kristallviolett in die Zellmembranen überprüft. Die mit den siRNAs transfizierten Zellen wurden 72 h in 96-*well* Gewebekulturplatten kultiviert. Das Medium wurde entfernt und 20 min bei Raumtemperatur in 50 μl Kristallviolettlösung (0,5 % (w/v) Kristallviolett in 20 % Methanol (v/v)) pro *well* inkubiert. Unspezifische Färbungen wurden durch mehrmaliges Waschen mit Wasser entfernt und die Platten luftgetrocknet. Nach Zugabe von 50 μl Natriumcitratlösung (0,1 M Natriumcitrat in 50 % Ethanol (v/v)) pro *well* wurde die Absorption bei 550 nm (Referenzwellenlänge: 630 nm) in einem Sapphire ELISA Reader (Tekan) gemessen. Es wurden jeweils Vierfachbestimmung angefertigt.

2.2.14.2 Messung der mitochondrialen Aktivität Die Aktivität des mitochondrialen Enzyms Succinatdehydrogenase, das nur in vitalen Zellen aktiv ist, wurde durch Metabolisierung des Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT; Sigma) überprüft. Die Zellen wurden wie in 2.2.14.1 beschrieben in 96-*well* Gewebekulturplatten kultiviert. 200 μl Medium wurden mit 20 μl MTT-Lösung (5 mg/ml MTT in PBS) vermischt und 2 h bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde entfernt und zur Zellyse mit 100 μl Lysispuffer (99,4 ml DMSO, 0,6 ml 100 % Essigsäure, 10 g SDS) 5 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 min geschüttelt. Die Absorption bei 570 nm (Referenzwellenlänge: 630 nm) wurde mit einem Sapphire ELISA Reader (Tekan) gemessen. Es wurden jeweils Vierfachbestimmung angefertigt.

2.2.15 Proteinbestimmung

Proteine aus den Zelllysaten wurden nach der Lowry-Methode [63] bestimmt. Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

2.2.16 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analyse

Lösungen:

5x Ladepuffer:

- 250 mM Tris-Cl pH6,8
- 500 mM Dithiothreitol
- 10 % (w/v) SDS
- 0,5 % Bromphenolblau
- 50 % (v/v) Glycerin

1x Laufpuffer:

- 25 mM Tris
- 250 mM Glycin pH8,3
- 0,1 % (w/v) SDS

10x TBS:

- 1,37 M NaCl
- 26,8 mM KCl
- 248 mM Tris Base

TBST:

- 1x TBS
- 0,1 % (v/v) Tween 20

TBSTM:

- 1x TBST
- 10 % (w/v) Magermilchpulver

1x Transferpuffer:

- 24 mM Tris Base
- 192 mM Glycin
- 20 % (v/v) Methanol

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden 12,5 % (w/v) diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele (12,5 % Resolving Criterion Tris-HCl Gel, BIO-RAD) verwendet. Die Proben wurden mit einem fünftel Volumen 5x Ladepuffer gemischt, 5 min auf 95°C erhitzt, 3 min auf Eis abgekühlt und auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden bei 100 V für 2 h elektrophoretisch aufgetrennt und in einer Trans Blott Cell-Apparatur (BioRad) auf eine Nitrocellulosemembran (Protran; Schleicher & Schuell) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 4 °C und 300 mA für 4 h. Die Membranen wurden über Nacht in TBSTM blockiert, viermal 10 min mit TBST gewaschen und 1,5 h mit in TBST verdünntem Primäantikörper inkubiert. Nach vier Waschstritten mit TBST wurde für 1,5 h mit in TBST verdünntem, Peroxidase gekoppeltem Sekundäantikörper inkubiert, gefolgt von viermaligem Waschen in TBST. Anschließend wurden pro cm² Membranfläche 0,1 ml Lösung 1 (Luminol) und 2 (Verstärker) des ECL Western Blotting Detection Reagents Kit (Amersham) gemischt, mit der Membran in Haushaltsfolie eingeschweißt und im Dunkeln für 10 s bis 15 min auf einem Chemilumineszenzfilm (Hyperfilm ECL; Amersham) exponiert. Die Filme wurden in einem SCOPIX LR 5200 (Agfa) entwickelt und die Proteinsignale mit dem Geldoc 1000 System (BioRad) densitometrisch ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Molekulargenetische Analysen von Kandidatengen und -regionen

Die für die SSH- und Mikroarray-basierenden Genexpressionsanalysen verwendeten Tumorpaa-re, bestehend aus acht niedriggradigen Primärtumoren (6 Astrozytome und 2 Oligoastrozytome) und den zugehörigen hochgradigen Rezidivtumoren (4 Glioblastome, 2 anaplastische Astrozytome und 2 anaplastische Oligoastrozytome), wurden zunächst eingehend molekulargenetisch auf Veränderungen von Gliom-assoziierten Kandidatenregionen und -genen hin analysiert (Tabelle 16). Zum Nachweis von Allelverlusten auf den Chromosomen 1p, 9p, 10q, 17p und 19q wurden Mikrosatellitenanalysen durchgeführt. Zur Mutationsanalyse der Gene *PTEN* und *TP53* wurde die Einzelstrangkonnformationspolymorphismus Methode (SSCP; *single strand conformation polymorphism*) verwendet. Die Tumorproben, in der SSCP-Analyse ein aberrantes Bandenmuster aufwiesen, wurden anschließend zur Lokalisation und Bestimmung der Mutation sequenziert. Homozygote Deletionen bzw. Amplifikationen der Gene *CDKN2A*, *p14^{ARF}*, *CDKN2B*, *EGFR*, *CDK4* und *MDM2* wurden mittels Duplex-PCR bestimmt.

In den Tumoren der Patienten 1-3 wurden Mutationen des auf 17p13.1 gelegenen *TP53*-Gens nachgewiesen, die in allen drei Fällen bereits im Primärtumor vorhanden waren. Bei Patient 1 führte dies zur Deletion einer 5'-Spleißstelle und bei den Patienten 2 und 3 zu Missense-Mutationen mit Austausch jeweils einer Aminosäure (Tabelle 16; Abbildung 8). Sechs Tumorpaa-re zeigten Allelverluste auf 17p, darunter die drei Paare mit *TP53*-Mutationen (Tabelle 16). Die Rezidive der Patienten 1-3 (GB239, GB119 und GB240) hatten Allelverluste auf 9p, während die entsprechenden Primärtumoren dies nicht aufwiesen (Abbildung 8B). Zusätzlich hatten die Tumoren GB239 und GB119 homozygote Deletionen der auf 9p lokalisierten Gene *p14^{ARF}*, *CDKN2A* und *CDKN2B* (Abbildung 8C). Das Rezidiv von Patient 7 (GB175) hatte ebenfalls homozygote Deletionen der Gene *p14^{ARF}* und *CDKN2A*, aber nicht des *CDKN2B*-Gens. Allelverluste auf 9p konnten für GB175 nicht nachgewiesen werden (Tabelle 16; Abbildung 8B). Eine Amplifikation des *CDK4*-Gens fand sich im Rezidivtumor (AOA38) von Patient 8. Allelverluste auf 1p wurden im Rezidiv von Patient 2 (GB119) gefunden. Primärtumor und Rezidiv von Patient 2 und 3 zeigten Allelverluste auf 10q (Abbildung 8B). Für Patient 8 traten diese nur im Rezidiv auf. Die Tumoren der Patienten 1 und 8 hatten Allelverluste auf 19q, die sowohl im Primär- als auch Rezidivtumor nachweisbar waren. Keiner der Tumoren zeigte eine Amplifikation der Gene *EGFR* und *MDM2* oder eine *PTEN*-Mutation.

Zusätzlich zu den Primär- und Rezidivtumor-Paaren wurde eine unabhängige Gliomserie aus 43 astrozytären Tumoren (9 Astrozytome, 10 anaplastische Astrozytome, 17 primäre Glioblastome und 7 sekundäre Glioblastome) untersucht. Auch in dieser Serie fanden sich diverse molekulargenetische Alterationen. So zeigten 6/9 Astrozytomen, 5/10 anaplastischen Astrozytomen, 4/17 primären Glioblastomen und 4/7 sekundären Glioblastomen *TP53*-Mutationen (Tabelle 17).

PTEN-Mutationen konnten lediglich in 4 der 17 primären Glioblastome nachgewiesen wer-

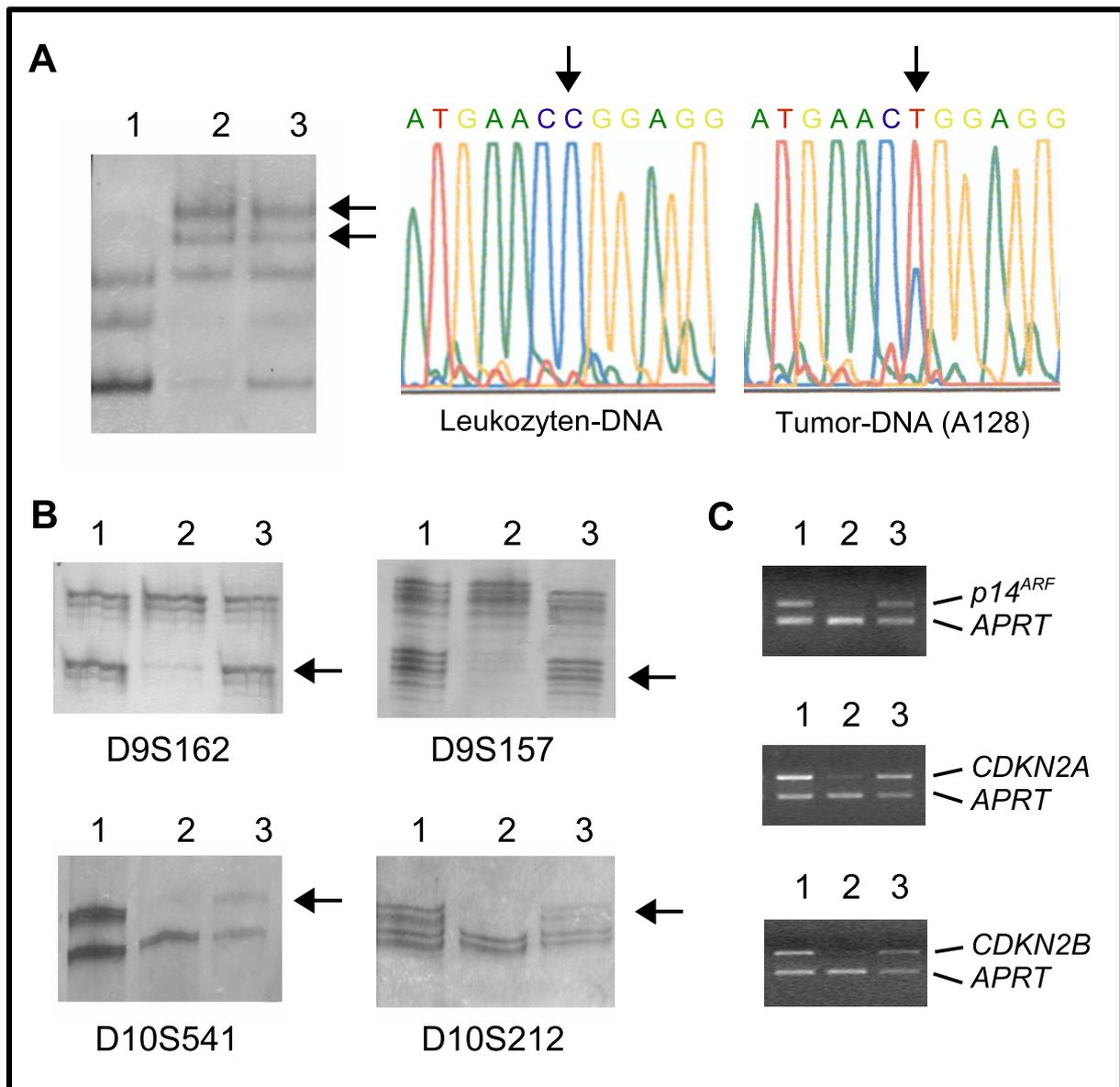


Abbildung 8: Darstellung ausgewählter molekulargenetischer Befunde. Dargestellt sind die Ergebnisse am Primär (A128)- und Rezidivtumor (GB119) des Patienten 2 (1: Leukozyten-DNA; 2: GB119 Tumor-DNA; 3: A128 Tumor-DNA). A: Die SSCP-Analyse des *TP53*-Gens zeigte identische aberrante Bandenmuster (Pfeile) für den Primärtumor und das Rezidiv. Durch Sequenzierung wurde dieselbe somatische *TP53*-Mutation (g.14070C>T; R248W) in beiden Tumoren nachgewiesen, die in der Wildtypsequenz (Leukozyten-DNA) nicht auftrat (Pfeile). B: Mikrosatellitenanalyse polymorpher Marker auf 9p (D9S162 und D9S157) und 10q (D10S541 und D10S212). Zu erkennen ist ein Allelverlust (Pfeile) in GB119 (Spur 2) aber nicht in A128 (Spur 3). Allelverluste auf 10 q (D10S541 und D10S212) fanden sich dagegen in beiden Tumoren. C: Duplex-PCR-Analysen zeigten eine homozygote Deletion der Gene *p14^{ARF}*, *CDKN2A* und *CDKN2B* in GB119 (Spur 2), die in A128 (Spur 3) noch nicht vorhanden war. Als Referenzen wurde *APRT* (adenine phosphoribosyltransferase) verwendet.

Tabelle 17: Genetische Alterationen in der unabhängigen Serie von 43 Gliomen.

Diagnose	Fallnr.	Mutation		Homozygote Deletion		Amplifikation		
		<i>TP53</i>	<i>PTEN</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>CDK4</i>	<i>EGFR</i>	<i>MDM2</i>	
AII	A3	c.817C>T; R273C	n.d.	-	-	-	-	
AII	A4	c.413C>T; A138V	n.d.	-	-	-	-	
AII	A135	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
AII	A2	-	n.d.	-	-	-	-	
AII	A21	-	n.d.	-	-	-	-	
AII	A78	c.817C>T; R273C	n.d.	-	-	-	-	
AII	A113	-	n.d.	-	-	-	-	
AII	A99	c.377A>G; Y126C	n.d.	-	-	-	-	
AII	A143	c.817C>T; R273C	n.d.	-	-	-	-	
AA III	AA1	-	n.d.	-	-	-	-	
AA III	AA71	-	n.d.	-	-	-	+	
AA III	AA188	-	n.d.	-	-	-	-	
AA III	AA103	-	n.d.	-	-	+	-	
AA III	AA117	c.733G>A; G245S	n.d.	-	-	-	-	
AA III	AA134	-	n.d.	-	+	-	-	
AA III	AA143	c.524G>A; R175H	n.d.	-	-	-	-	
AA III	AA186	c.374C>T; T125M	n.d.	-	-	-	-	
AA III	AA115	c.817C>T; R273C	n.d.	-	-	-	-	
AA III	AA187	-	n.d.	-	-	-	-	
pGBIV	GB77	-	c.594del3; M198del	-	-	-	-	
pGBIV	GB81	-	IVS4+5G>T; c210del44; L70fsX76	-	-	-	-	
pGBIV	GB83	-	-	-	-	-	-	
pGBIV	GB50	-	c.523G>A; V175M	-	-	-	+	
pGBIV	GB103	-	-	-	-	-	-	
pGBIV	GB137	c.481G>A; A161T	c.404delT; I135fs X146	-	-	-	-	
pGBIV	GB1	-	-	-	-	+	-	
pGBIV	GB6	-	-	+	-	+	-	
pGBIV	GB8	-	-	-	-	+	-	
pGBIV	GB18	-	-	-	-	+	-	
pGBIV	GB19	-	-	-	-	+	-	
pGBIV	GB26	-	-	-	+	+	-	
pGBIV	GB33	-	-	+	-	+	-	
pGBIV	GB130	g.13340-13344delCTTAT; L194fsX206	-	-	-	+	-	
pGBIV	GB136	-	-	-	-	-	-	
pGBIV	GB140	-	-	-	-	-	-	
pGBIV	GB191	-	-	+	-	-	-	
sGBIV	GB234	-	-	+	-	-	-	
sGBIV	GB15	c.817C>T; R273C	-	-	+	-	-	
sGBIV	GB235	c.637C>T; R213X	-	+	-	-	-	
sGBIV	GB236	c.487T>C; Y163H	-	+	-	-	-	
sGBIV	GB4	-	-	+	-	-	-	
sGBIV	GB237	c.586C>T; R196X	-	-	-	-	-	
sGBIV	GB238	-	-	+	-	-	-	

+: Alteration nachgewiesen; -: keine Alteration nachgewiesen; AII: diffuses Astrozytom WHO-Grad II, AAIII: anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III; p/sGBIV: primäres bzw. sekundäres Glioblastom WHO-Grad IV; n.d.: nicht durchgeführt.

den (Tabelle 17). Homozygote *CDKN2A*-Deletionen zeigten sich in 3/17 primären und 5/7 sekundären Glioblastomen (Tabelle 17). Eines der zehn anaplastischen Astrozytome und 8/17 primären Glioblastomen hatten eine *EGFR*-Amplifikation (Tabelle 17). *CDK4* lag in jeweils einem anaplastischen Astrozytom, einem primären und einem sekundären Glioblastom amplifiziert vor (Tabelle 17). Für *MDM2* konnte eine Amplifikation in einem anaplastischen Astrozytom und einem primären Glioblastom nachgewiesen werden (Tabelle 17).

3.2 Herstellung subtraktiver cDNA Populationen und Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Mit der suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH) wurden cDNA-Populationen von vier Gliompaaren (Patienten 1, 2, 7 und 13) miteinander verglichen, um neue, mit der Gliomprogression assoziierte Gene zu identifizieren. Hierzu wurde zunächst die aus den Tumoren isolierte RNA in cDNA transkribiert. Unter Verwendung der SSH-Methode wurden stärker exprimierte Transkripte des Primärtumors durch die Vorwärtssubtraktion (cDNA Population des Primärtumors minus cDNA Population des Rezidivs) 500-1000fach angereichert. Überexprimierte Transkripte des Rezidivs wurden durch die Rückwärtssubtraktion (cDNA Population des Rezidivs minus cDNA Population des Primärtumors) amplifiziert. Die so erzeugten subtraktiven cDNA Bibliotheken wurden radioaktiv markiert und zur Durchsicht von humanen cDNA Banken verwendet. Die vom RZPD (Ressourcenzentrum und Primäre Datenbank; Berlin) erhaltenen *Human UniGene Sets* (Library 950) repräsentieren 36000 in der Unigene Datenbank aufgeführte humane Gene und ESTs (*expressed sequence tags*), verteilt auf zwei *high-density* Nylonfiltern. Die Hybridisierung der subtrahierten cDNA Populationen auf die *Human UniGene* Filter (Abbildung 9), führte zur Identifizierung von 463 Kandidatengenen, die differentiell zwischen mindestens einem der Primär- und Rezidivtumor-Paare exprimiert waren. Dieser Genpool enthielt Kandidaten, die an diversen zellregulatorischen Prozessen beteiligt sind. Hierunter waren u.a. Gene, die an der Zellzyklusprogression (*CCND2*, *CCNF*), der Transkriptions- und Translationskontrolle (*CEBPA*, *CHD3*, *FOXO1A*, *FOXF1*, *IFI16*, *HNRPA1*, *IREB2*), der Apoptose (*CARD12*, *CASP4*), der Angiogenese (*FLT1*), der Zellproliferation (*FSTL1*, *IGFBP5*, *MCRS1*, *SFRS3*), der Zytoskelettorganisation (*ACF7*, *MAP1A*, *MAP1B*, *TUBA1*, *TUBA2*) oder der Signaltransduktion (*AKAP10*, *AKL3L*, *AP4B1*, *AXIN2*, *GRB2*, *FYB*, *IFNAR2*, *RGS6*) beteiligt sind. Um die Liste von 463 Kandidatengenen zu verkleinern, wurde nach solchen Genen gesucht, die in mehr als einem Tumorkörper eine differentielle Expression zeigten. Hierdurch fanden sich 41 Gene, die in mindestens zwei Tumorkörpern differentiell exprimiert waren (Tabelle 18), von denen 15 im Rezidivtumor stärker und 26 schwächer exprimiert waren. Acht Gene zeigten eine differentielle Expression in drei Tumorkörpern (Tabelle 18). Hiervon waren zwei (*HDAC3*, und *TPI1*) in den Rezidivglioblastomen stärker und sechs schwächer exprimiert (*APOD*, *AMOG*, *DMXL1*, *KIAA0942*, *OR2W3P* und *DRR1*). Interessanterweise zeigte kein einziges Gen eine differentielle Expression in allen vier Tumorkörpern.

Tabelle 18: Kandidatengene, die durch die SSH-Analyse von vier Gliompaaren (jeweils ein Gliom des WHO-Grades II, das zum Glioblastom des WHO-Grades IV rezidierte) identifiziert wurden.

Genname	Genlokus	Gentitel
<i>APOD*</i>	3 q26.2-qter	apolipoprotein D
<i>ATP1B2*</i>	17 p13.1	Na,K-ATPase beta 2 subunit (<i>AMOG</i> , adhesion molecule on glia)
<i>DMXL1*</i>	5 q23.1	Dmx-like 1
<i>KIAA0942*</i>	8 pter-p23.3	KIAA0942 protein
<i>OR2W3P*</i>	1	olfactory receptor, family 2, subfamily W, member 3 pseudogene
<i>TU3A*</i>	3 p14.2	TU3A protein (<i>DRRI</i> , downregulated in renal cell carcinoma 1)
<i>C22ORF3</i>	22 q12.1-q12.2	chromosome 22 open reading frame 3
<i>CCND2</i>	12 p13	cyclin D2
<i>CHD3</i>	17 p13.1	chromodomain helicase DNA binding protein 3
<i>FLJ22004</i>	2	hypothetical protein FLJ22004
<i>G0S2</i>	1 q32.2-q41	putative lymphocyte G0/G1 switch gene
<i>GFAP</i>	17 q21	glial fibrillary acidic protein
<i>HLA-DQA1</i>	6p21.3	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
<i>ICB-1</i>	1 pter-p33	basement membrane-induced gene
<i>KIAA0118</i>	12 q15-12q21.1	KIAA0118 protein
<i>KIAA0640</i>	11 p15	SWAP-70 protein
<i>KIAA0970</i>	13 q12.2-q13.3	KIAA0970 protein
<i>KIAA1458</i>	4	KIAA1458 protein
<i>LOC51701</i>	17 q11.2	nemo-like kinase
<i>LUC7L</i>	16 p13.3	LUC7 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)-like
<i>MAP1A</i>	16	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3
<i>MASP1</i>	3 q27-q28	mannan-binding lectin serine protease 1
<i>NAP4</i>	1	Nck, Ash and phospholipase C binding protein
<i>NCALD</i>	8 q22-q23	neurocalcin delta
<i>PRO0641</i>	3 q13.11-3q13.13	PRO0641 protein
<i>SAT</i>	11 q13	spermidine/spermine N1-acetyltransferase
<i>HDAC3*</i>	5 q31.3	histone deacetylase 3
<i>TPI1*</i>	12 p13.31	triosephosphate isomerase 1
<i>CTL2</i>	19	CTL2 gene
<i>HSF1</i>	8 q24.3	heat shock transcription factor 1
<i>B2M</i>	15 q21-q22.2	beta-2-microglobulin
<i>CSNK1A1</i>	13 q13	casein kinase 1, alpha 1
<i>DKFZP564A122</i>	3	DKFZP564A122 protein
<i>FLJ12619</i>	6	hypothetical protein FLJ12619
<i>IFI16</i>	1 q12-qter	interferon, gamma-inducible protein 16
<i>MCRS1</i>	12	microspherule protein 1
<i>MGC5618</i>	6 q25	hypothetical protein MGC5618 (mangano-superoxide dismutase)
<i>PRKWNK1</i>	12p13	protein kinase, lysine deficient 1
<i>PTN</i>	7 q33-q34	pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)
<i>RGS12</i>	4p16.2	regulator of G-protein signalling 12
<i>TLE1</i>	19 p13.3	transducin-like enhancer of split 1

Gene mit erniedrigter Expression im Rezidiv sind im oberen Teil und solche mit erhöhter Expression im Rezidiv im unteren Teil der Tabelle dargestellt. Die aufgelisteten Gene waren entweder in 2/4 bzw. 3/4(*) Gliompaaren differentiell zwischen Primär- und Rezidivtumor exprimiert.

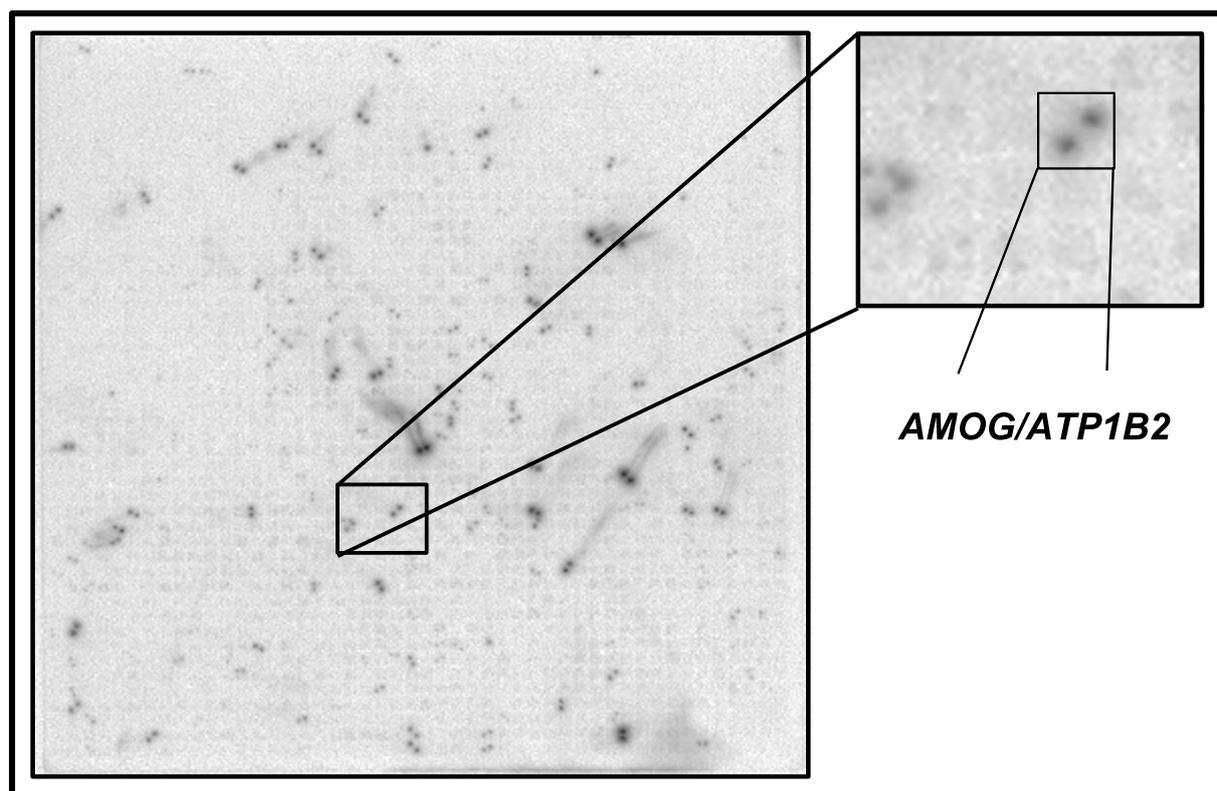


Abbildung 9: Hybridisierung einer subtrahierten cDNA Population (A72 - GB239) auf einen *Human UniGene* Filter. Der markierte Doppelspot repräsentiert das *AMOG/ATP1B2*-Gen.

3.3 Validierung ausgewählter Kandidatengene aus den SSH Experimenten

Zur Validierung der mit der SSH-Analyse identifizierten Kandidatengene wurde die *real-time* RT-PCR als unabhängige Methode verwendet. Hierzu wurden die acht Gene überprüft, die in drei Gliompaaren differentiell exprimiert waren. Für die *real-time* RT-PCR Analyse wurden drei der vier Tumorkaare aus der SSH-Analyse (A72 und GB239; A128 und GB119; OA23 und GB175; von A188 und GB234 war die RNA Konzentration für weitere Experimente zu gering), sieben zusätzliche Primär- und Rezidivtumorkaare, sowie 43 unabhängige Gliome (9 Astrozytome WHO-Grad II, 10 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III, 17 primäre Glioblastome WHO-Grad IV und 7 sekundäre Glioblastome WHO-Grad IV) verwendet. Die Produktamplifikation wurde durch den Farbstoff SYBR Green, der nur in doppelsträngige DNA interkaliert, quantitativ in Echtzeit bestimmt. Die Expressionslevel der acht Kandidatengene wurden dabei auf das ubiquitär exprimierte Referenzgen *ARF1* (*ADP ribosylation factor 1*) normalisiert und relativ zu nicht-neoplastischem Gehirngewebe bestimmt (Tabelle 19 und 20). Die mit der SSH-Analyse detektierte verminderte Expression der Gene *APOD*, *ATP1B2* (*AMOG*) und *TU3A* (*DRRI*) in den sekundären Glioblastomen wurde in 3/3 Fällen durch die *real-time* RT-PCR verifiziert (Tabelle 21). Für *TP11* wurde die differentielle Expression in 2/3 Fällen und

für *DMXL1* in 1/3 Fällen bestätigt (Tabelle 21). *HDAC3*, *KIAA0942* und *OR2W3P* konnten in keinem der drei Rezidivpaare verifiziert werden (Tabelle 21). Interessanterweise zeigte *HDAC3* bei der *real-time* RT-PCR-Analyse sogar eine verminderte Expression in den Glioblastomen, während in der SSH-Analyse eine verstärkte Expression detektiert wurde.

Tabelle 19: Relative mRNA-Expression von acht Kandidatengenen in 10 Primär- und Rezidivgliompaaren.

Patient	Fallnr.	Tumor	Relative Genexpression							
			<i>APOD</i>	<i>ATP1B2</i>	<i>DMXL1</i>	<i>HDAC3</i>	<i>KIAA0942</i>	<i>OR2W3P</i>	<i>TPI1</i>	<i>TU3A</i>
1*	A72	A II	0,26	1,31	1,23	0,96	0,23	0,27	2,05	0,26
	GB239	GB IV	0,02	0,22	0,47	0,48	0,23	0,17	0,74	0,01
2*	A128	A II	0,47	0,79	1,60	0,92	0,33	0,03	0,65	0,19
	GB119	GB IV	0,03	0,44	1,61	0,58	0,41	0,01	2,86	0,05
7*	OA23	OA II	2,09	4,37	1,17	0,78	0,30	0,15	1,43	0,61
	GB175	GB IV	0,09	2,32	1,91	0,39	0,35	0,07	3,77	0,36
3	A201H	A II	0,41	0,82	1,40	0,80	0,08	0,01	1,15	0,49
	GB240H	GB IV	0,09	1,84	0,73	0,48	0,30	0,03	1,54	0,67
4	A8	A II	0,32	1,86	1,19	0,66	0,45	0,21	1,27	0,55
	AA106	AA III	0,04	0,44	0,96	0,69	0,22	0,16	3,68	0,12
5	A181H	A II	0,39	1,67	0,51	0,67	0,15	0,03	1,06	0,64
	AOA54H	AOA III	0,06	1,09	1,13	0,99	0,24	0,04	0,95	0,16
6	A145	A II	0,06	2,72	2,49	1,73	0,62	0,07	1,31	0,29
	AA142	AA III	0,07	1,66	0,89	0,41	0,18	0,10	0,96	0,25
8	OA31	OA II	0,21	0,88	1,24	0,42	0,44	0,17	0,99	0,15
	AOA38	AOA III	0,07	0,29	1,34	1,01	0,45	0,06	1,9	0,01
11	A180H	A II	0,07	0,7	2,48	0,35	0,60	0,09	1,07	0,91
	AA164H	AA III	0,11	0,94	1,43	0,99	0,23	0,08	1,47	0,06
12	A207H	A II	0,33	0,37	0,88	0,31	0,15	0,06	1,09	3,96
	GB748H	GB IV	0,06	1,08	1,59	0,85	0,38	0,01	2,14	0,29

Die *real-time* RT-PCR Analyse wurde mit *ARF1* als Referenzgen durchgeführt. Die Werte sind relativ zu nicht-neoplastischem Gehirngewebe. *: Patienten, deren Tumoren für die SSH-Analyse eingesetzt wurden. Werte > 1 entsprechen einer stärkeren und Werte < 1 einer schwächeren Expression im Vergleich zum Referenzgewebe.

Bei der Untersuchung der sieben zusätzlichen Gliompaare wurde eine differentielle Expression der Gene *APOD*, *TPI1* und *TU3A* (*DRR1*) in 5 von 7 Fällen, des Gens *ATP1B2* (*AMOG*) in 4 von 7 Fällen und der Gene *DMXL1*, *HDAC3* und *KIAA0942* in 3 von 7 Fällen gefunden (Tabelle 21). Für *OR2W3P* konnte keine differentielle Expression gezeigt werden (Tabelle 21).

Um die differentielle Expression der 8 ausgewählten Kandidatengene in Abhängigkeit des WHO-Grades astrozytärer Gliome zu überprüfen wurde eine unabhängige Serie von 43 Tumoren untersucht (Tabelle 20 und Abbildung 10). Eine signifikant niedrigere Expression in primären Glioblastomen im Vergleich zu diffusen Astrozytomen wurde für *ATP1B2* (*AMOG*; $p=0,0129$), *HDAC3* ($p<0,0001$), *KIAA0942* ($p=0,0468$) und *TU3A* (*DRR1*; $p<0,0001$) nachge-

Tabelle 20: Relative mRNA-Expression von acht Kandidatengenen in der unabhängigen Serie von 43 astrozytären Gliomen.

Fallnr.	Tumor	Relative Genexpression							
		<i>APOD</i>	<i>ATP1B2</i>	<i>DMXL1</i>	<i>HDAC3</i>	<i>KIAA0942</i>	<i>OR2W3P</i>	<i>TPI</i>	<i>TU3A</i>
A 3	AII	1,81	2,62	1,26	0,74	1,05	1,28	1,49	2,15
A 4	AII	0,31	1,35	1,53	0,50	0,48	0,18	0,39	2,20
A 135	AII	0,13	1,24	1,24	0,46	0,11	0,18	1,97	1,87
A 2	AII	0,10	1,67	1,36	0,57	0,41	0,09	0,48	1,08
A 21	AII	0,36	2,28	1,35	0,66	0,30	0,20	0,63	0,70
A 78	AII	0,21	5,24	2,59	0,74	0,16	0,27	0,38	0,41
A 113	AII	0,39	1,80	0,88	0,58	0,29	0,48	0,87	1,98
A 99	AII	0,24	3,23	1,60	1,10	0,38	0,34	0,66	0,30
A 143	AII	0,04	4,20	1,65	1,26	0,27	0,07	0,25	0,69
AA 1	AA III	0,03	0,01	0,74	0,06	0,01	0,01	1,46	0,01
AA 71	AA III	0,09	0,51	1,87	0,15	0,13	0,10	1,35	0,30
AA 188	AA III	1,56	3,10	0,58	0,14	0,07	4,63	0,57	0,10
AA 103	AA III	0,03	2,76	2,21	0,76	0,13	0,34	0,51	1,15
AA 117	AA III	0,27	5,39	2,15	0,11	0,07	0,55	2,07	1,39
AA 134	AA III	0,18	1,54	0,99	0,61	0,48	1,54	0,97	1,82
AA 143	AA III	0,02	0,78	0,80	0,46	0,31	0,19	0,68	0,35
AA 186	AA III	0,35	0,51	1,00	0,84	0,30	0,46	0,57	0,32
AA 115	AA III	0,55	3,42	0,50	1,58	0,42	4,59	0,05	13,29
AA 187	AA III	0,00	1,52	1,19	0,63	0,17	0,05	1,08	1,05
GB77	pGB IV	1,68	1,28	1,58	0,25	0,16	0,20	0,95	0,18
GB81	pGB IV	0,06	0,48	1,04	0,38	0,07	0,04	0,78	0,03
GB83	pGB IV	0,30	1,37	0,67	0,27	0,20	0,71	0,38	0,54
GB50	pGB IV	0,02	0,58	1,81	0,29	0,15	0,11	4,00	0,10
GB103	pGB IV	0,20	0,83	0,65	0,25	0,61	0,97	0,74	0,67
GB137	pGB IV	0,12	0,91	0,33	0,38	0,52	0,06	0,54	0,34
GB1	pGB IV	0,20	1,97	1,54	0,33	0,22	0,14	0,39	0,32
GB6	pGB IV	0,39	2,25	1,44	0,20	0,20	0,27	1,85	0,12
GB8	pGB IV	0,44	1,22	1,54	0,36	0,18	0,24	2,01	0,33
GB18	pGB IV	0,09	0,84	1,45	0,22	0,17	0,18	3,83	0,17
GB19	pGB IV	0,11	0,44	1,00	0,29	0,18	0,08	0,52	0,34
GB26	pGB IV	0,26	1,66	2,25	0,35	0,10	0,28	3,20	0,34
GB33	pGB IV	0,06	1,15	1,11	0,29	0,13	0,22	2,72	0,14
GB130	pGB IV	0,01	5,09	2,84	0,50	0,26	0,27	6,81	0,07
GB136	pGB IV	0,09	1,37	1,26	0,21	0,10	0,44	0,44	0,20
GB140	pGB IV	0,04	3,80	1,42	0,30	0,24	0,04	0,92	0,28
GB191	pGB IV	0,02	1,21	1,30	0,17	0,18	0,10	0,71	0,14
GB234	sGB IV	0,12	0,50	0,78	0,47	0,08	0,90	2,21	0,12
GB15	sGB IV	0,05	0,53	0,46	0,19	0,14	0,04	7,20	0,10
GB235H	sGB IV	0,01	0,26	0,55	0,39	0,19	0,63	0,45	-
GB236	sGB IV	0,06	1,59	0,89	0,39	0,08	0,04	1,60	0,01
GB4	sGB IV	0,06	1,68	1,07	0,55	0,25	0,03	0,96	0,44
GB237	sGB IV	0,44	-	1,17	1,24	0,37	0,08	-	-
GB238	sGB IV	0,02	1,62	0,50	0,62	0,17	0,11	0,82	0,20

Die *real-time* RT-PCR Analyse wurde mit *ARF1* als Referenzgen durchgeführt. Die Werte sind relativ zu nicht-neoplastischem Gehirngewebe. Werte >1 entsprechen einer verstärkten, Werte <1 einer verminderten Expression relativ zu Normalgewebe. A II: Astrozytom WHO-Grad II, AA III: anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III, pGB IV: primäres Glioblastom WHO-Grad IV, sGB IV: sekundäres Glioblastom WHO-Grad IV, -: nicht nachweisbar.

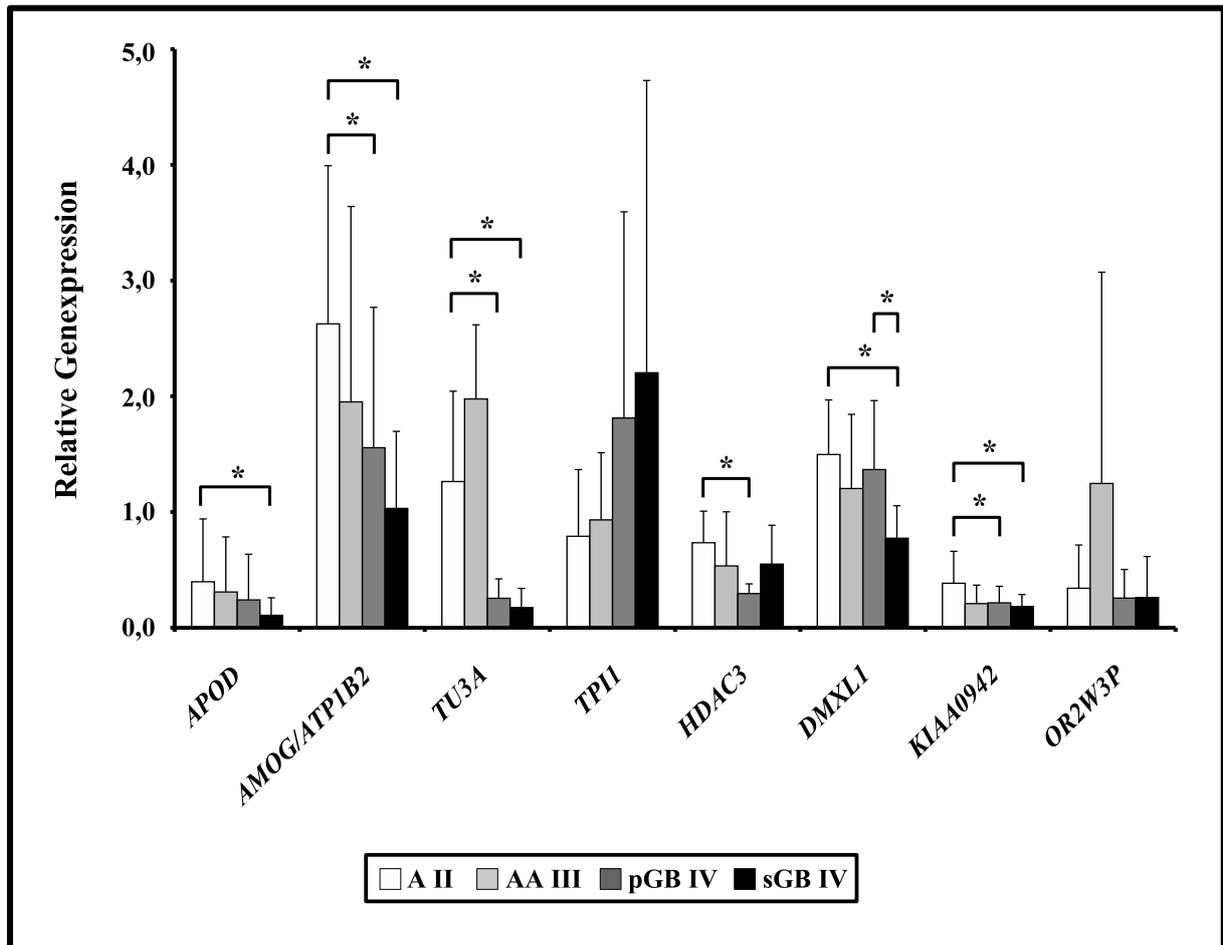


Abbildung 10: Expression von 7 Kandidatengenen in 43 astrozytären Gliomen verschiedener WHO-Grade. Dargestellt sind die mittleren Expressionswerte in jeder Tumorgruppe mit Standardabweichung. *: Signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Tumorentitäten.

Tabelle 21: Validierung der in der SSH-Analyse in 3/4 Tumorpaaen differentiell exprimierten 8 Gene mittels *real-time* RT-PCR-Analyse.

Genname	SSH Gliompaare	7 zusätzliche Gliompaare
<i>APOD</i>	3/3	5/7
<i>ATP1B2 (AMOG)</i>	3/3	4/7
<i>TU3A (DRR1)</i>	3/3	5/7
<i>TPI1</i>	2/3	5/7
<i>DMXL1</i>	1/3	3/7
<i>HDAC3</i>	0/3	3/7
<i>KIAA0942</i>	0/3	3/7
<i>OR2W3P</i>	0/3	0/7

Angegeben ist der Anteil der Tumorpaaen, in denen mittels *real-time* RT-PCR-Analyse eine differentielle Expression des jeweiligen Gens zwischen Primär- und Rezidivtumor gefunden wurde.

Tabelle 22: Zusammenfassung der *real-time* RT-PCR-Analysen zur Expression der 8 ausgewählten Kandidatengen in einer unabhängigen Serie von 43 astrozytären Gliomen.

Genname	Mittelwerte jeder diagnostischen Gruppe						p-Werte					
	AII (n = 9)		AAIII (n = 10)		pGBIV (n = 17)		sGBIV (n = 7)		AII vs. AIII		AII vs. pGBIV	
	AII	AAIII	AII	AAIII	pGBIV	sGBIV	AII vs. AIII	sGBIV	AII vs. pGBIV	sGBIV	pGBIV vs. sGBIV	
<i>APOD</i>	0,40	0,31	0,24	0,11	0,11	0,11	>0,2	>0,1	0,0343	>0,2	>0,2	>0,2
<i>ATP1B2 (AMOG)</i>	2,63	1,95	1,56	1,03	1,03	1,03	>0,1	0,0129	0,0216	>0,2	>0,2	>0,2
<i>TU3A (DRRI)</i>	1,26	1,98	0,25	0,18	0,18	0,18	>0,1	<0,0001	0,0200	>0,2	>0,2	>0,2
<i>TPI</i>	0,79	0,93	1,81	2,20	1,37	2,20	>0,2	0,0606	>0,1	>0,1	>0,2	>0,2
<i>DMXL1</i>	1,50	1,20	1,37	0,77	0,77	0,77	>0,1	>0,2	0,0021	>0,2	0,0130	>0,2
<i>HDAC3</i>	0,73	0,53	0,30	0,55	0,30	0,55	0,0771	<0,0001	>0,1	>0,2	0,0551	>0,2
<i>KIAA0942</i>	0,39	0,21	0,22	0,18	0,22	0,18	0,0683	0,0468	0,0391	>0,2	>0,2	>0,2
<i>OR2W3P</i>	0,34	1,25	0,26	0,26	0,26	0,26	>0,2	>0,2	>0,2	>0,2	>0,2	>0,2

Angegeben sind die Mittelwerte der mRNA Expressionslevel in jeder Tumorgruppe (AII, AAIII, pGBIV, sGBIV). Zusätzlich wurden mittels eines 2-Gruppen T-Tests die p-Werte für den Vergleich zwischen verschiedenen Gliomgruppen (AII vs. AAIII, AII vs. pGBIV, AII vs. sGBIV, AAIII vs. pGBIV, AAIII vs. pGBIV vs. sGBIV) berechnet. Signifikante Werte sind fett markiert.

wiesen (Tabelle 22 und Abbildung 10). Der Vergleich von Astrozytomen mit sekundären Glioblastomen zeigte einen signifikanten Unterschied in der Expression der Gene *APOD* ($p=0,0343$), *ATP1B2* (*AMOG*; $p=0,0216$), *DMXLI* ($p=0,0021$), *KIAA0942* ($p=0,0391$) und *TU3A* (*DRRI*; $p=0,0200$) (Tabelle 22 und Abbildung 10). Für die Tumorgruppen Astrozytome vs. anaplastische Astrozytome und anaplastische Astrozytome vs. primäre Glioblastome ergaben sich keine signifikanten Expressionsunterschiede, wohl aber bei einem Vergleich von primären mit sekundären Glioblastomen für das *DMXLI*-Gen ($p=0,0130$) (Tabelle 22 und Abbildung 10).

3.4 Expressionsprofilerstellung mittels Mikroarray-Analysen

Für die Erstellung von Expressionsprofilen wurden Hu6800FL Oligonukleotidarrays (Affymetrix) verwendet, die eine simultane Transkriptanalyse von 6800 verschiedenen humanen Genen, repräsentiert durch 7129 Probensets, ermöglichen. Die mRNA-Level wurden von acht Tumorpaaaren, bestehend aus primären WHO-Grad II Gliomen, die spontan zu WHO-Grad III oder IV Gliomen rezidierten, analysiert. Die Transkription von 5 μg Gesamt-RNA in cDNA und anschließende Retranskription in cRNA, ermöglichte eine Verfünffachung der Ausgangskonzentration. Die Hybridisierung der Hu6800FL Arrays mit 15 μg fragmentierter, markierter cRNA, ergab eine auswertbare Pixelintensität. Der mit der cRNA des Astrozytoms A201 hybridisierte Chip lieferte eine homogene Pixelintensität mit den hellsten Signalen und dem geringsten Hintergrund. Er diente als Referenz für die Auswertung aller anderen Arrays.

Der Originaldatensatz von 7129 Probensets wurde zunächst mit unüberwachten Klassifizierungsmethoden wie der Hauptkomponenten- (PCA; *principal component analysis*) und der Clusteranalyse [66, 64, 65] untersucht. Die PCA führt eine Dimensionsreduzierung von Datensätzen durch, um komplexe Daten anhand von wenigen Variablen zu unterscheiden [64, 65]. Mit der Methode des hierarchischen Clusters werden Datensätze anhand ihrer Ähnlichkeit untereinander ohne Vorabinformation über die jeweilige Tumorgruppenzugehörigkeit des einzelnen Datensatzes angeordnet (unüberwachtes Klassifizieren) [66]. Die Zahlenwerte der resultierenden Ähnlichkeitsmatrix werden in eine Falschfarbendarstellung umgewandelt, in der überexprimierte Gene in roten und unterexprimierte Gene in grünen Farbtönen dargestellt sind. Die Farbintensitäten korrelieren mit den absoluten Werten der Datensätze. Zur Überprüfung, ob die Expressionsunterschiede über alle Gene eine Klassifizierung in Primär- bzw. Rezidivtumor erlauben, wurden 1400 variable Probensets ausgewählt, die mit der PCA und der Clusteranalyse analysiert wurden (Abbildung 11). Die Rezidive der Patienten 1, 2 und 6-8 (GB239, GB119, AA142, GB175 und AOA38) wurden als Gruppe von den übrigen Gliomen abgegrenzt (Abbildung 11 A und B). Die Rezidivgliome der Patienten 3, 4 und 5 (GB240H, AA106 und AOA54H) bildeten zusammen mit den Primärtumoren die andere Gruppe (Abbildung 11 A und B). Bei Betrachtung der beiden ersten Hauptkomponenten lokalisierte der Tumor AA142 (Patient 6) am nächsten zu den Primärtumoren (Abbildung 11 A). Die Analyse der Expressionsmuster dieses großen unspezifischen Datensatzes führte somit nicht zur vollständigen Trennung der Primär-

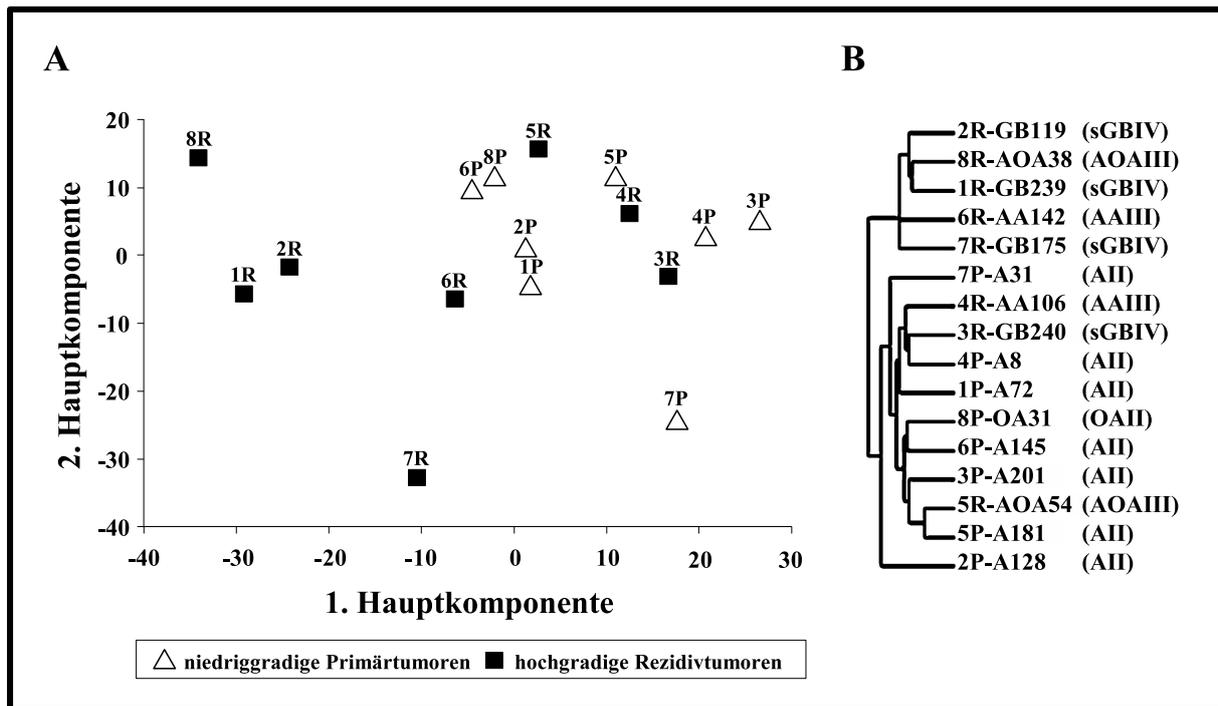


Abbildung 11: Hauptkomponenten- und Clusteranalyse der Mikroarrayexpression für die acht untersuchten Gliompaare. A: 1400 Probensets mit einem Mittelwert >200 und einem Variationskoeffizienten (Standardabweichung/Mittelwert) $>0,5$ wurden durch Subtraktion des Mittelwertes und Division durch die Standardabweichung für jedes Probenset standardisiert. Abgebildet sind die ersten beiden Hauptkomponenten. B: Dendrogramm der Tumoren nach hierarchischem Clustern. Die Expressionsverhältnisse (EV) jedes Rezidivpaars wurden für dieselben 1400 Probensets logarithmiert und gemittelt. Jeder Tumor ist mit seiner zugehörigen Patientenummer und dem Zusatz P (Primärtumor) oder R (Rezidivtumor) dargestellt. Zusätzlich ist in B noch die Tumornummer mit entsprechender Diagnose (in Klammern) angegeben.

und Rezidivtumoren in zwei Gruppen. Um die für diese Arbeit medizinisch relevante Fragestellung - die Unterscheidung zwischen primär niedriggradigen und sekundär hochgradigen Gliomen - interessanten Gene heraus zu filtern, wurde anschließend der Originaldatensatz unter Verwendung von T-Tests und unüberwachten Klassifizierungsmethoden wie PAM (*prediction analysis of microarrays*; [59]) weiter analysiert. Paarweise T-Tests mit den log-transformierten Werten der acht Primär- und Rezidivgliome ergaben 262 Probensets mit einem p-Wert $<0,01$. Bei diesem Signifikanzniveau werden statistisch ca. 71 Probensets ($7129 \cdot 0,01 = 71,29$) als zufällig positiv erwartet. Um die Stringenz zu erhöhen wurden die 262 Probensets auf solche Kandidaten eingengt, die mindestens einen zweifachen Expressionsunterschied zeigten. Dies führte zur Identifizierung von 70 Probensets, die 66 zwischen Primär- und Rezidivgliomen differentiell exprimierten Genen entsprachen. Um den Anteil von falsch positiven Datensätzen unter den verbleibenden 70 Probensets abzuschätzen, wurden aus dem Originaldatensatz durch Permutation der Tumorbezeichnungen 127 ähnliche Datensätze (2 Tumorgruppen mit je 8 Tumoren $\Rightarrow n-1=127$ Datensätze ($16 \cdot 8 - 1 = 127$)) erzeugt. Im Mittel ergaben T-Tests für diese permutierten Datensätze nur 5,9 Probensets, die den Auswahlkriterien ($p < 0,01$ und $EV \geq 2$) ge-

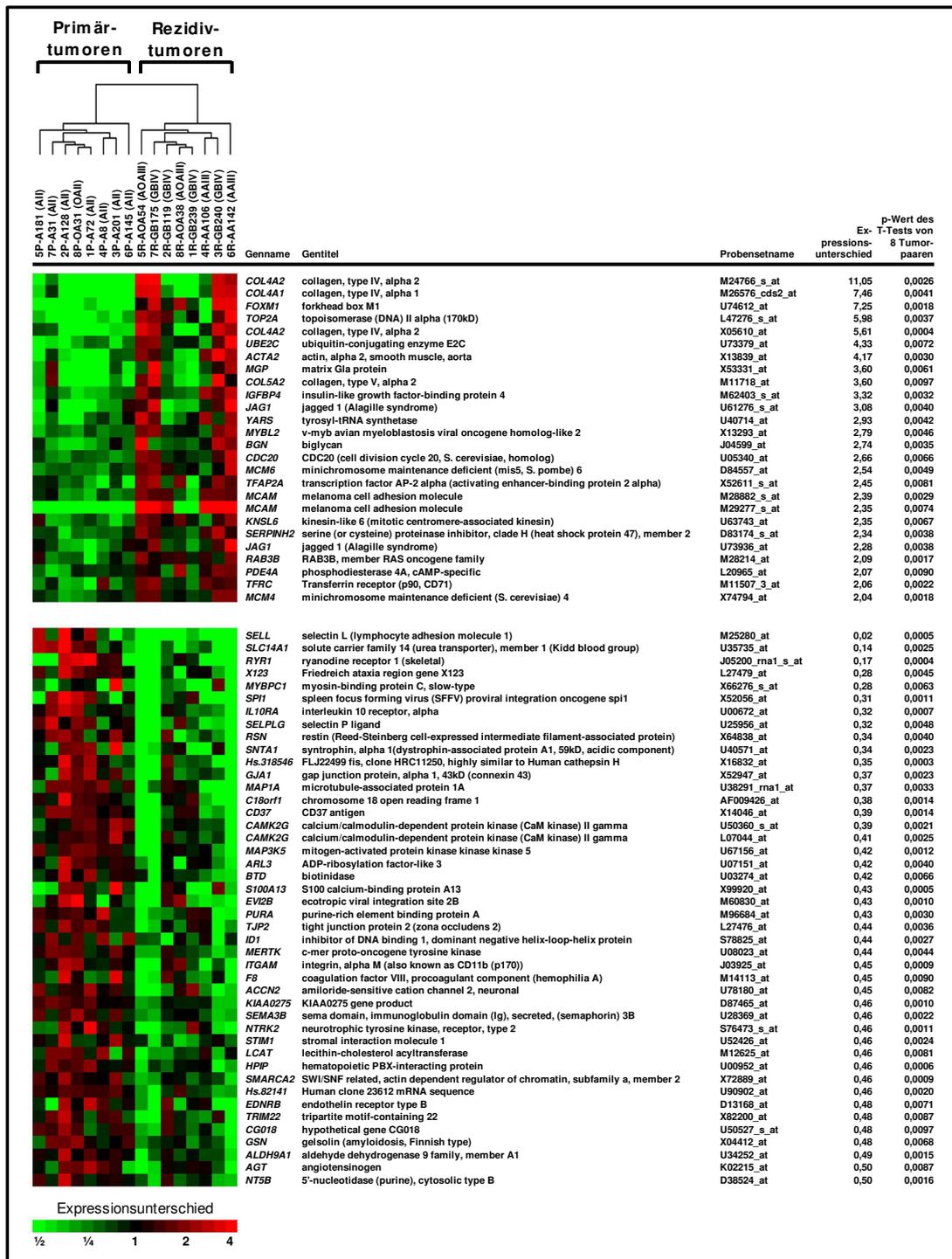


Abbildung 12: Heat map von 66 Kandidatengenen (repräsentiert durch 70 Probensets), die nach einer gepaarten T-Testanalyse von 8 Tumorpaaren einen p-Wert <0,01 hatten und einen Expressionsunterschied >2. Die jeweiligen Fallnummern und Diagnosen, sowie ein Verwandtschafts-dendrogramm der 70 Probensets sind oben in der Abbildung dargestellt. 1-8P: Primärtumor von Patient 1-8; 1-8R: Rezidivtumor von Patient 1-8. Die heat map wurde mit dem Programm Treeview [66] erstellt.

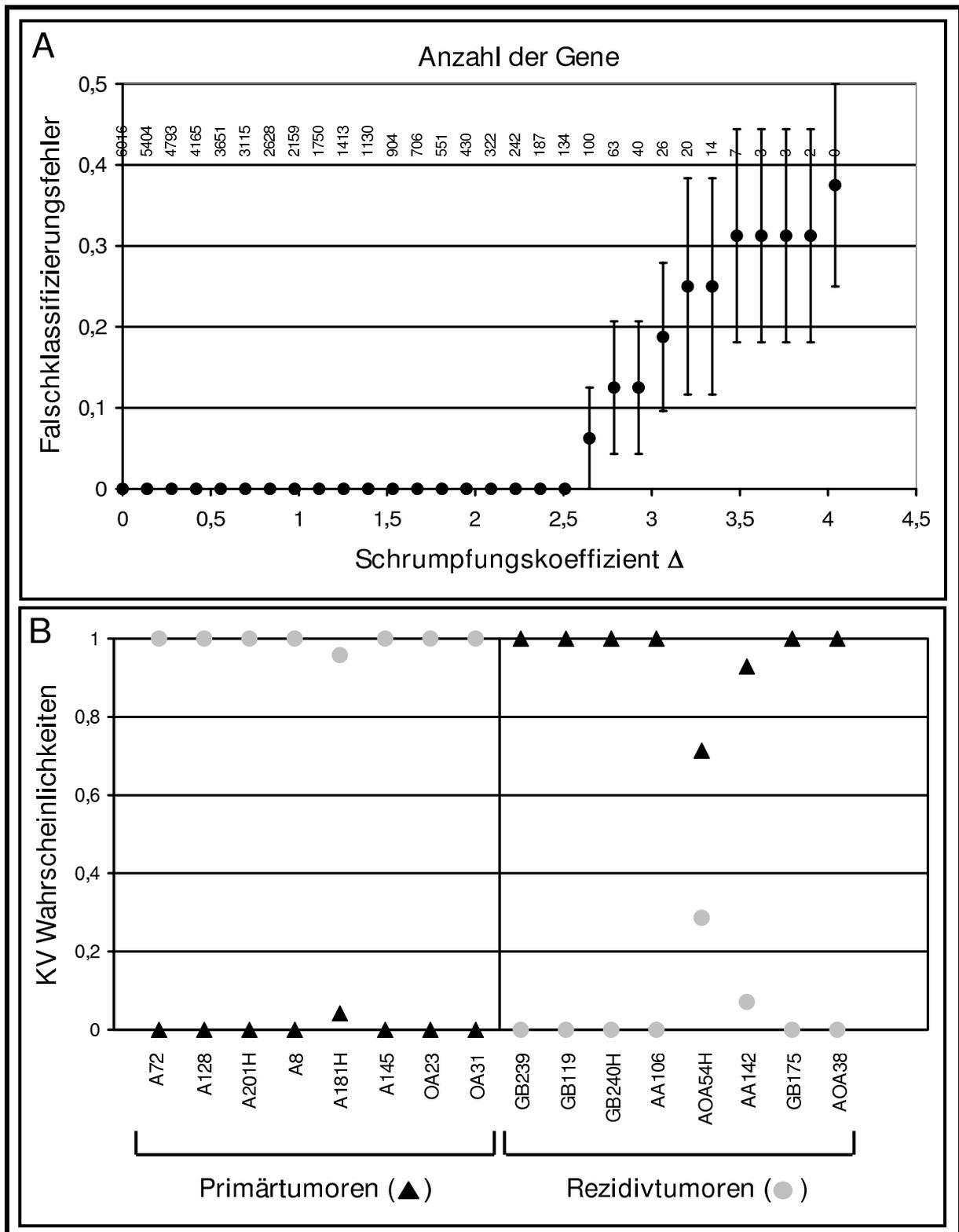


Abbildung 13: Klassifizierung der Tumorserie mittels der GC-Analyse nach Tibshirani *et al.* [59]. A: Ermittlung des optimalen Schrumpungskoeffizienten ($SK=2,5$) bei geringstem Falschklassifizierungsfehler durch Kreuzvalidierung (KV). B: Klassenaufteilung von Primär- und Rezidivgliomen bei $SK=2,5$ (ca. 134 Gene). Die X-Achse repräsentiert die histologische Klassifizierung der Tumoren während auf der Y-Achse jeweils die Vorhersagewahrscheinlichkeiten aufgetragen sind.

nügten. Daher würden unter den 70 selektionierten Probensets näherungsweise 6 falsch positive erwartet. Die hinter den 70 Probensets stehenden Gene sowie eine *heat map* der Daten sind in Abbildung 12 zusammengefasst. Die *heat map* zeigt hinsichtlich der Expressionsmuster eine ähnliche Gruppierung der Tumoren wie bei der PCA (Abbildung 11) ersichtlich war. Die Rezidive der Patienten 3-6 wiesen geringere Unterschiede zu den Primärtumoren auf als die anderen vier Rezidivtumoren.

Von den 66 differentiell exprimierten Genen wiesen 23 eine erhöhte und 43 eine erniedrigte Expression in den Rezidivtumoren auf (Abbildung 12). Die Gene, die während der Gliomprogression überexprimiert wurden, kodieren u.a. für Proteine, die an der Zellproliferation (*CDC20*, *FOXM1*, *KNSL6*, *MCM4*, *MCM6*, *TFRC* und *TOP2A*) beteiligt oder mit der extrazellulären Matrix und/oder Angiogenese (*ACTA2*, *BGN*, *COL4A1*, *COL4A2*, *COL5A2*, *JAG1* und *MGP*) assoziiert sind. Die während der Gliomprogression herunterregulierten Gene sind von ihrer Funktion her eine heterogenere Gruppe. Sie kodieren u.a. für Proteine mit Funktion für die extrazelluläre Matrix, für Zelladhäsion und/oder Zellmotilität (*CD37*, *GSN*, *ITGAM*, *SELL*, *SELPLG* und *TJP2*) oder für Signaltransduktion (*ACCN2*, *ARL3*, *CAMK2G*, *GJA1*, *MAP3K5* und *SI00A13*). Eine Verknüpfung mit Proteinen, die wichtig bei der Entwicklung des Nervensystems sind (*IDI*, *MAP1A*, *NTRK2* und *SEMA3B*), konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

Die interessante Gruppe der Astrozytome (WHO-Grad II), die als sekundäres Glioblastom (WHO-Grad IV) rezidierten, war durch drei Tumorpaaare vertreten (Patienten 1-3). Ein gepaarter T-Test über die 7129 Probensets der drei Gliompaare lieferte 88 Probensets mit einem p-Wert $< 0,01$. Ein Expressionsverhältnis ≥ 2 zeigten lediglich 19 der 88 Kandidaten, die somit statistisch nicht relevant waren.

Zusätzlich zu den paarweisen T-Tests wurde der Originaldatensatz noch mit der Klassifizierungssoftware PAM analysiert, die die Methode der geschrumpften Centroide (GC) benutzt und zu den überwachten Klassifizierungen gehört. Im Gegensatz zum hierarchischen Clustern verwendet die GC-Methode Vorabinformationen für die Klassifizierung. Basierend auf einer Gruppe von Tumoren mit bekannten Diagnosen oder Tumorgaden wird für jede Gruppe ein charakteristischer Klassifizierer für die Kategorisierung eines Testsets von Tumoren mit unbekannter Diagnose gebildet. Für jede Tumorklasse wird dabei durch die Berechnung des Mittelwerts der \log_2 Intensitätsverhältnisse für jedes Gen über alle zur Klasse gehörigen Tumoren ein Basiszentrum gebildet. Nach Standardisierung durch die klasseninterne Standardabweichung für jedes Gen werden diese Basiszentroiden anschließend zu einem für die jeweilige Tumorklasse spezifischen Gesamtzentrum geschrumpft (Abbildung 13 B). Diese Standardisierung hat den Effekt, dass Gene mit stabiler Expression innerhalb einer Klasse eine höhere Gewichtung erhalten. Durch anschließende Kreuzvalidierung, bei der der Originaldatensatz durch Permutation in verschiedene Trainings- und Testdatensätze aufgeteilt wird, wird der optimale Schrumpfkoeffizient (SK) ermittelt, der die Auswahl eines Minimums von Fehlklassifizierungen der Tumoren und von selektionierten Genen ermöglicht (Abbildung 13 A). Wie in Abbildung 13 B dargestellt, werden für jeden Tumor in Abhängigkeit von der Anzahl verschiedener Tumorguppen (hier:

zwei) Klassifizierungswahrscheinlichkeiten berechnet. Abbildung 13 A zeigt die Ergebnisse der Kreuzvalidierung (KV) zur Bestimmung des optimalen SK. Die Falschklassifizierungsfehlerkurve weist ein Minimum zwischen den SK-Werten 0 und 2,5 auf. Das bedeutet, dass bereits mit einem SK von 2,5 und einer Auswahl von 134 Genen eine 100 % Unterscheidung zwischen Primär- und Rezidivtumor möglich ist. Abbildung 13 B zeigt die KV-Wahrscheinlichkeiten für den SK-Wert 2,5. Für jeden Tumor sind hier zwei Wahrscheinlichkeiten dargestellt, mit der sie als niedrig- bzw. hochgradige Tumoren eingestuft werden. Für die Primärtumoren zeigte sich, dass alle bis auf Tumor A181H richtig in ihre Klassen eingeordnet wurden. Bei den Rezidivtumoren war ebenfalls eine eindeutige Zuordnung der Gliome möglich. Lediglich die Tumoren AOA54H und AA142 wichen von einer distinkten Klassifizierung ab. Die Liste der 134 für die Klassifizierung wichtigsten Gene ist in Tabelle 23 zusammengefasst. Von diesen Kandidaten wurden 51 Gene auch mit der T-Test-Analyse identifiziert.

Tabelle 23: 134 identifizierte Kandidatengene aus der PAM-Analyse mit 51 Übereinstimmungen aus den T-Test-Analysen (mit x markiert).

Genname	Gentitel	T-Test
<i>COL4A2</i>	collagen, type IV, alpha 2	x
<i>C18ORF1</i>	chromosome 18 open reading frame 1	
<i>TST</i>	thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)	
<i>IL10RA</i>	interleukin 10 receptor, alpha	x
<i>MLLT6</i>	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax (Drosophila) homolog); translocated to, 6	
<i>KIAA0275</i>	KIAA0275 gene product	x
<i>ITGAM</i>	integrin, alpha M	x
<i>HPIP</i>	hematopoietic PBX-interacting protein	x
<i>TOP2A</i>	topoisomerase (DNA) II alpha (170kD)	x
<i>JAG1</i>	jagged 1 (Alagille syndrome)	x
<i>FOXM1</i>	forkhead box M1	x
<i>NT5B</i>	5'-nucleotidase (purine), cytosolic type B	x
<i>MCM4</i>	minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 4	x
<i>SMARCA2</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	x
<i>PLAB</i>	prostate differentiation factor	
<i>CD37</i>	CD37 antigen	x
<i>SLC14A1</i>	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)	x
<i>MITF</i>	microphthalmia-associated transcription factor	
<i>MYBPC1</i>	myosin-binding protein C, slow-type	x
<i>MCAM</i>	melanoma adhesion molecule	x
<i>BGN</i>	biglycan	x
<i>EZH2</i>	enhancer of zeste (Drosophila) homolog 2	
<i>RSN</i>	restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein)	x
<i>HHCMA56</i>	putative oxidoreductase	
<i>MYBL2</i>	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2	x
<i>JAG1</i>	jagged 1 (Alagille syndrome)	x
<i>TFAP2A</i>	transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer-binding protein 2 alpha)	x
<i>WAS</i>	Wiskott-Aldrich syndrome (eczema-thrombocytopenia)	

Genname	Gentitel	T-Test
<i>PRSS11</i>	protease, serine, 11 (IGF binding)	
<i>IGFBP4</i>	insulin-like growth factor-binding protein 4	x
<i>STIM1</i>	stromal interaction molecule 1	x
<i>NCF2</i>	neutrophil cytosolic factor 2 (65kD, chronic granulomatous disease, autosomal 2)	
<i>KNSL6</i>	kinesin-like 6 (mitotic centromere-associated kinesin)	x
<i>MAP3K5</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	x
<i>COL4A2</i>	collagen, type IV, alpha 2	x
<i>RYR1</i>	ryanodine receptor 1 (skeletal)	x
<i>IDI1</i>	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	x
<i>CAMK2G</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II gamma	x
<i>ACTA2</i>	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	x
<i>SNTA1</i>	syntrophin, alpha 1(dystrophin-associated protein A1, 59kD, acidic component)	x
<i>ADD3</i>	adducin 3 (gamma)	
<i>ATPIA2</i>	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 2 (+) polypeptide	
<i>RAB3B</i>	RAB3B, member RAS oncogene family	x
<i>MCM6</i>	minichromosome maintenance deficient (mis5, S. pombe) 6	x
<i>KIAA0027</i>	KIAA0027 protein	
<i>SERPINH2</i>	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 2	x
<i>HSPG2</i>	heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan)	
<i>SEMA3B</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B	x
<i>TM4SF2</i>	transmembrane 4 superfamily member 2	
<i>TYMS</i>	thymidylate synthetase	
<i>POLD1</i>	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit (125kD)	
<i>MAPK4</i>	mitogen-activated protein kinase 4	
<i>UBCH10</i>	ubiquitin carrier protein E2-C	
<i>BARD1</i>	BRCA1 associated RING domain 1	
<i>ZNF37A</i>	zinc finger protein 37a (KOX 21)	
<i>BTD</i>	biotinidase	x
<i>PURA</i>	purine-rich element binding protein A	x
<i>VDUP1</i>	upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3	
<i>DMD</i>	dystrophin (muscular dystrophy, Duchenne and Becker types)	
<i>ARL3</i>	ADP-ribosylation factor-like 3	x
<i>CDC20</i>	CDC20 (cell division cycle 20, S. cerevisiae, homolog)	x
<i>MERTK</i>	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	x
<i>EPHX1</i>	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	
<i>PLK</i>	polo (Drosophila)-like kinase	
<i>CDC25B</i>	cell division cycle 25B	
<i>KDELR2</i>	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	
<i>MAP1A</i>	microtubule-associated protein 1A	x
<i>SNTA1</i>	syntrophin, alpha 1(dystrophin-associated protein A1, 59kD, acidic component)	x
<i>HMG2</i>	high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 2	
<i>HOXD4</i>	homeo box D4	
<i>COL5A2</i>	collagen, type V, alpha 2	x
<i>MFGES8</i>	milk fat globule-EGF factor 8 protein	
<i>ALDH9</i>	aldehyde dehydrogenase 9 (gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase, E3 isozyme)	
<i>FABGL</i>	FabG (beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase, E coli) like	
<i>STAT5A</i>	signal transducer and activator of transcription 5A	

Genname	Gentitel	T-Test
<i>MAPK10</i>	mitogen-activated protein kinase 10	
<i>LAMC1</i>	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	
<i>FOXD1</i>	forkhead box D1	
<i>GARP</i>	glycoprotein A repetitions predominant	
<i>SLC1A3</i>	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3	
<i>KRTHA3B</i>	keratin, hair, acidic,3B	
<i>NAP1L3</i>	nucleosome assembly protein 1-like 3	
<i>HS1-2</i>	putative transmembrane protein	
<i>CDC2LI</i>	cell division cycle 2-like 1 (PITSLRE proteins)	
<i>NINJI</i>	ninjurin 1	
<i>TOP2A</i>	topoisomerase (DNA) II alpha (170kD)	x
<i>ITGAX</i>	integrin, alpha X (antigen CD11C (p150), alpha polypeptide)	
<i>COL1A1</i>	collagen, type I, alpha 1	
<i>TIAF1</i>	TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1	
<i>CD34</i>	CD34 antigen	
<i>ATSV</i>	axonal transport of synaptic vesicles	
<i>PCNA</i>	proliferating cell nuclear antigen	
<i>PTAFR</i>	platelet-activating factor receptor	
<i>ZNF74</i>	zinc finger protein 74 (Cos52)	
<i>LCAT</i>	lecithin-cholesterol acyltransferase	x
<i>GJA1</i>	gap junction protein, alpha 1, 43kD (connexin 43)	x
<i>CTRC</i>	chymotrypsin C (caldecrin)	
<i>MGP</i>	matrix Gla protein	x
<i>NCAM1</i>	neural cell adhesion molecule 1	
<i>MST1</i>	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	
<i>TJP2</i>	tight junction protein 2 (zona occludens 2)	x
<i>F8</i>	coagulation factor VIII, procoagulant component (hemophilia A)	x
<i>SLC25A4</i>	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4	
<i>FLJ20746</i>	hypothetical protein	
<i>PRKCD</i>	protein kinase C, delta	
<i>PC</i>	pyruvate carboxylase	
<i>SLC21A2</i>	solute carrier family 21 (prostaglandin transporter), member 2	
<i>CSF3R</i>	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	
<i>NOS2A</i>	nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)	
<i>AXL</i>	AXL receptor tyrosine kinase	
<i>AKR1C1</i>	aldo-keto reductase family 1, member C1	
<i>GRAP</i>	GRB2-related adaptor protein	
<i>TAL1</i>	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	
<i>ADORA3</i>	adenosine A3 receptor	
<i>HOXC6</i>	homeo box C6	
<i>MAP4K1</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1	
<i>PDE4A</i>	phosphodiesterase 4A, cAMP-specific (dunce (Drosophila)-homolog phosphodiesterase E2)	x
<i>TIMP2</i>	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	
<i>X123</i>	Friedreich ataxia region gene X123	x
<i>COL4A1</i>	collagen, type IV, alpha 1	x
<i>ASAH</i>	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)	
<i>SLC15A2</i>	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	

Genname	Gentitel	T-Test
<i>TF</i>	transferrin	
<i>SPK</i>	symplekin; Huntingtin interacting protein I	
<i>KIAA0042</i>	KIAA0042 gene product	
<i>AKR1C3</i>	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	
<i>EPB72</i>	erythrocyte membrane protein band 7.2 (stomatins)	
<i>AIP-1</i>	abl-interactor 12 (SH3-containing protein)	
<i>CDK2</i>	cyclin-dependent kinase 2	
<i>SDC1</i>	syndecan 1	
<i>PRP18</i>	pre-mRNA splicing factor similar to S. cerevisiae Prp18	
<i>ITGB2</i>	integrin, beta 2	
<i>ANXA7</i>	annexin A7	
<i>TNNT3</i>	troponin T3, skeletal, fast	

3.4.1 Vergleich zwischen genetischen Befunden und Mikroarray-Daten

Um zu überprüfen, ob Ereignisse wie Amplifikationen oder Deletionen von chromosomalem Material einen Einfluß auf die Genexpression nehmen, wurden die molekulagenetischen Daten mit den Expressionsprofilen aus den Mikroarrays verglichen. Die beiden auf Mutationen untersuchten Gene *PTEN* und *TP53* zeigten in den Mikroarrays keine differentielle Expression. Die Amplifikation von *CDK4* im Rezidivtumor von Patient 8 (AOA38) ging mit einer starken Expressionserhöhung (8-fach) einher. Weitere Gene auf 12q13-q14, die in unmittelbarer Nachbarschaft von *CDK4* lokalisiert sind, demonstrierten ebenfalls eine verstärkte Expression im Tumor AOA38 (Tabelle 24). Unter ihnen das ebenfalls an der Zellzykluskontrolle beteiligte Gen *CDK2*, die an der Transkriptionskontrolle beteiligten Gene *HOXC5* und *HOXC6*, das an der Proteinbiosynthese beteiligte Gen *TSM*, das an der DNA Replikation beteiligte Gen *PRIM1* sowie das Methyltransferasegen *METTL1*. Ein schwacher Anstieg der *CDK4*-Expression und des Transkriptlevels einiger Nachbargene fanden sich bereits im Primärtumor von Patient 8 (OA31). Eine *CDK4* Genamplifikation in diesem Tumor wurde mittels Duplex-PCR jedoch nicht nachgewiesen.

Tabelle 24: Gene in Nachbarschaft zu *CDK4* auf 12q13-q14, die in Tumor AOA38 verstärkt exprimiert wurden.

Genname	Gentitel	Lokalisation	EV
<i>CDK2</i>	cyclin-dependent kinase 2	12q13	2,96
<i>CDK4</i>	cyclin-dependent kinase 4	12q14	8,42
<i>COL2A1</i>	collagen, type II, alpha 1	12q13.11-q13.2	2,32
<i>HOXC5</i>	homeo box C5	12q12-q13	3,18
<i>HOXC6</i>	homeo box C6	12q12-q13	3,79
<i>KIAA0167</i>	KIAA0167 gene product	12q13.11-12q14.3	7,34
<i>KRT4</i>	keratin 4	12q13	2,06
<i>KRT7</i>	keratin 7	12q12-q21	4,13
<i>METTL1</i>	methyltransferase-like 1	12q13	7,13
<i>OS4</i>	conserved gene amplified in osteosarcoma	12q13-q15	7,05
<i>PRIM1</i>	primase, polypeptide 1 (49kD)	12q13	2,79
<i>RARG</i>	retinoic acid receptor, gamma	12q13	2,08
<i>SAS</i>	sarcoma amplified sequence	12q13-q14	4,42
<i>TROAP</i>	trophinin associated protein (tastin)	12q12-12q14.3	2,07
<i>TSM</i>	Ts translation elongation factor, mitochondrial	12q13-q14	7,91

3.4.2 Vergleich von SSH- und Mikroarray-Daten

Durch die SSH-Analyse konnten 41 Gene identifiziert werden, die eine differentielle Expression in mindestens zwei Tumorkombinationen (8 Gene in drei Tumorkombinationen) aufwiesen. Von diesen 41 Genen waren 20 Gene auf den verwendeten Affymetrix-Arrays repräsentiert (Tabelle 25). Je die Hälfte dieser 20 Gene zeigten bei den SSH-Analysen eine verstärkte bzw. verminderte Ex-

Tabelle 25: Expressionsdaten aus den Mikroarray-Analysen für 20 mittels SSH identifizierte, differentiell exprimierte Gene.

Genname	Genntitel	Lokus	Mikroarrays	
			3 SSH-Paare	5 zusätzliche Rezidivpaare
<i>B2M</i>	beta-2-microglobulin	15q21-q22.2	1/3	2/5
<i>CSNK1A1</i>	casein kinase 1, alpha 1	13q13	2/3	1/5
<i>HDAC3</i>	histone deacetylase 3	5q31	0/3	0/5
<i>HSF1</i>	heat shock transcription factor 1	8q24.3	1/3	0/5
<i>IFI16</i>	interferon, gamma-inducible protein 16	1q22	0/3	0/5
<i>PRKWINK1</i>	protein kinase, lysine deficient 1	12p13.3	0/3	0/5
<i>PTN</i>	pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	7q33-q34	1/3	0/5
<i>RGS12</i>	regulator of G-protein signalling 12	4p16.3	0/3	0/5
<i>TLE1</i>	transducin-like enhancer of split 1, homolog of Drosophila E(sp1)	19p13.3	0/3	0/5
<i>TPI1</i>	triosephosphate isomerase 1	12p13	2/3	0/5
<i>APOD</i>	apolipoprotein D	3q26.2-qter	3/3	1/5
<i>AMOG/ATP1B2</i>	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2 polypeptide	17p13.1	1/3	0/5
<i>CCND2</i>	cyclin D2	12p13	0/3	0/5
<i>G0S2</i>	putative lymphocyte G0/G1 switch gene	1q32.2-q41	1/3	0/5
<i>GFAP</i>	glial fibrillary acidic protein	17q21	0/3	1/5
<i>HLA-DQA1</i>	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	6p21.3	0/3	0/5
<i>KIAA0118</i>	KIAA0118 protein	12q15-12q21.1	1/3	0/5
<i>MAP1A</i>	microtubule-associated protein 1A	15q13-qter	2/3	2/5
<i>MASPI</i>	mannan-binding lectin serine protease 1 (C4/C2 activating component of Ra-reactive factor)	3q27-q28	1/3	1/5
<i>SAT</i>	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	Xp22.1	0/3	0/5

Angegeben ist der Anteil der Tumorpaaare, in denen mittels Mikroarray-Analysen eine differentielle Expression des jeweiligen Gens zwischen Primär- und Rezidivtumor gefunden wurde. Dabei sind die Daten für drei Tumorpaaare aus der SSH-Analyse den acht untersuchten Tumorpaaaren aus den Mikroarray-Analysen gegenübergestellt. Bezogen auf den Rezidivtumor sind im oberen Teil Gene mit einer verstärkten Expression und im unteren Teil Gene mit einer verminderten Expression dargestellt.

pression in den Rezidivglioblastomen. Unter ihnen befanden sich 4/8 Genen (*APOD*, *HDAC3*, *ATP1B2/AMOG* und *TPII*), die eine differentielle Expression in drei SSH-Rezidivpaaren demonstrierten. Von den Tumoren der Patienten 1, 2 und 7 (A72 vs. GB239, A128 vs. GB119 und OA23 vs. GB175) lagen sowohl SSH- als auch Mikroarray-Daten vor. Die in den SSH-Analysen gefundenen Expressionsdaten konnten für die Gene *APOD* in 3/3 Fällen, *CSNK1A1* und *MAP1A* jeweils in 2/3 Fällen, sowie für *AMOG/ATP1B2*, *B2M*, *GOS0*, *HSF1*, *KIAA0118*, *PTN* und *MASP1* jeweils in 1/3 Fällen mittels Mikroarray-Analysen bestätigt werden (Tabelle 25). Die mit den Affymetrix-Arrays zusätzlich untersuchten fünf Tumorpaare zeigten eine differentielle Expression für die Gene *B2M* und *MAP1A* in 2/5 Fällen, sowie für *APOD*, *CSNK1A1*, *GFAP* und *MASP1* in 1/5 Fällen (Tabelle 25).

3.5 Validierung ausgewählter Kandidatengene

Die Mikroarray-Analyse der acht Rezidivgliome identifizierte 66 zwischen Primär- und Rezidivtumor differentiel exprimerte Gene mit einem p-Wert $<0,01$ und einem Expressionsverhältnis (EV) ≥ 2 . Aus diesem Genpool wurden acht Kandidaten ausgewählt, die eine signifikant erhöhte (*COL4A2*, *FOXM1*, *IGFBP4*, *MGP* und *TOP2A*) oder eine signifikant erniedrigte Expression (*CAMK2G*, *RYR1* und *SELL*) in den Rezidivtumoren aufwiesen (Tabelle 26 und 27). Die Gene *ABLIM* und *ADD3* hatten p-Werte $<0,01$, erreichten allerdings nicht ganz ein Expressionsverhältnis von ≥ 2 (EV=0,69 bzw. 0,55; Tabelle 26 und 27). Ihre interessante chromosomale Lokalisation auf 10q designierte sie jedoch zu Kandidaten für weitere Analysen. Zusätzlich war *ADD3* unter den Kandidatengenen der PAM-Analyse. Bei einer Betrachtung von Primärtumoren, die als sekundäres Glioblastom rezidierten, fielen außerdem die Gene *CENPF* und *VEGFA* (Tabelle 26 und 27) mit stark erhöhter Expression im Rezidiv (EV=5,64 bzw. 17,84) auf und wurden daher ebenfalls zur Validierung mittels *real-time* RT-PCR ausgewählt. Die Expression der genannten zwölf Kandidatengene wurde jeweils auf das Referenzgen *ARF1* (*ADP ribosylation factor 1*) normalisiert. Als Referenzgewebe diente nicht-neoplastische Gehirngewebe aus dem temporalen Kortex und der weißen Substanz von zwei verschiedenen Patienten. Die Expressionsdaten und ihre statistische Auswertung sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Die p-Werte des gepaarten T-Tests zeigten sowohl für die Mikroarray- als auch für die *real-time* RT-PCR-Daten, dass für alle Kandidaten bis auf die Gene *VEGFA* und *ABLIM* ein Signifikanzniveau von mindestens 95 % erreicht wurde ($p < 0,05$; Tabelle 27). Die Expressionsunterschiede der Gene *ADD3*, *COL4A2*, *IGFBP4*, *RYR1* und *SELL* waren zu ≥ 99 % signifikant (Tabelle 27). Der Vergleich der Ergebnisse beider Methoden (Mikroarray-Hybridisierung vs. *real-time* RT-PCR) ergab eine Übereinstimmung der Daten von 73-98 % der Fälle. Einzige Ausnahme stellte die Expression von *RYR1* dar (48 %; Tabelle 27). Um zu überprüfen, ob die differentielle Expression der 12 ausgewählten Gene abhängig vom WHO-Grad astrozytärer Gliome ist, wurde eine unabhängige Serie von 43 Gliomen (9 Astrozytome, 10 anaplastische Astrozytome, 17 primäre und 7 sekundäre Glioblastome) untersucht (Tabelle 28). Die Analyse der

Tabelle 26: Die 12 ausgewählten Kandidatengene für die Validierung mittels *real-time* RT-PCR.*

Genname	Gen-titel	Genlokus	Funktion
<i>CENPF</i>	centromere protein F	1q32-q41	DNA Replikation und Chromosomenzyklus
<i>VEGF</i>	vascular endothelial growth factor	6p12	Angiogenese
<i>MGP</i>	matrix Gla protein	12p13.1-p12.3	Extrazelluläre Matrix (Onkogenese)
<i>FOXM1</i>	forkhead box M1	12p13	Transkriptionsfaktor (Transkriptionsregulator)
<i>COL4A2</i>	collagen, type IV, alpha 2	13q34	Extrazelluläre Matrix
<i>TOP2A</i>	topoisomerase (DNA) II alpha	17q21-q22	DNA Replikation und Transkription
<i>IGFBP4</i>	insulin-like growth factor-binding protein 4	17q12-q21.1	Signaltransduktion und Proliferationskontrolle
<i>SELL</i>	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	1q23-q25	Zelladhäsion
<i>CAMK2G</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II gamma	10q22	Signaltransduktion
<i>ADD3</i>	adducin 3 (gamma)	10q24.2-q24.3	Zytoskelettorganisation der Zellemban
<i>ABLIM</i>	actin binding LIM protein 1	10q25	Zytoskelettorganisation (Aktinbindung)
<i>RYR1</i>	ryanodine receptor 1 (skeletal)	19q13.1	Signaltransduktion

* Die oberen 7 Gene zeigten laut Mikroarray-Analysen eine verstärkte und die unteren 5 Gene eine verminderte Expression in den malignen Rezidivgliomen im Vergleich zu den zugehörigen niedriggradigen Primärtumoren.

Tabelle 27: Vergleich der mittels Mikroarray-Methode erhaltenen Expressionsdaten mit den *real-time* RT-PCR Ergebnissen von 12 ausgewählten Kandidatengenen in acht Tumorpaaren, jeweils bestehend aus einem niedriggradigen Primär- und einem hochgradigen Rezidivgliom.

Genname	Probensetname (Affymetrix)	Mikroarray-Daten			<i>real-time</i> RT-PCR Daten			Korrelation		
		$\bar{m}(PT)$	$\bar{m}(RT)$	$\frac{\bar{m}(RT)}{\bar{m}(PT)}$	p-Wert*	$\bar{m}(PT)$	$\bar{m}(RT)$		$\frac{\bar{m}(RT)}{\bar{m}(PT)}$	p-Wert
<i>CENPF</i>	U30872_at	100	440	4,40	0,0276	12,00	153,00	12,75	0,0262	0,84
<i>COL4A2</i>	M24766_s at	561	6199	11,04	0,0026	6,10	48,00	7,87	0,0045	0,77
<i>COL4A2</i>	X05610_at	2318	13012	5,61	0,0004	6,10	48,00	7,87	0,0045	0,87
<i>FOXMI</i>	U74612_at	100	725	7,25	0,0018	2,20	4,80	2,18	0,0219	0,81
<i>IGFBP4</i>	M62403_s at	680	2258	3,32	0,0032	5,40	18,00	0,18	0,0084	0,86
<i>MGP</i>	X53331_at	1611	5804	3,60	0,0061	1,90	7,80	4,10	0,0129	0,80
<i>TOP2A</i>	L47276_s at	100	598	5,98	0,0037	97,00	1422,00	14,66	0,0276	0,89
<i>TOP2A</i>	J04088_at	138	1067	7,73	0,0211	97,00	1422,00	14,66	0,0276	0,96
<i>VEGFA</i>	M27281_at	163	2909	17,84	0,0485	1,60	6,30	3,94	0,1523	0,91
<i>ABLIM</i>	D31883_at	9316	6414	0,69	0,0044	3,50	1,80	0,51	0,0769	0,79
<i>ADD3</i>	U37122_at	5106	2809	0,55	0,0025	1,70	0,76	0,45	0,0013	0,88
<i>CAMK2G</i>	U50360_s at	1279	498	0,39	0,0021	0,75	0,34	0,45	0,0110	0,73
<i>CAMK2G</i>	L07044_at	2614	1066	0,41	0,0025	0,75	0,34	0,45	0,0110	0,84
<i>RYRI</i>	J05200_mal s at	868	145	0,17	0,0004	41,00	8,00	0,19	0,0008	0,48
<i>SELL</i>	M25280_at	4229	100	0,02	0,0005	88,00	6,60	0,07	0,0016	0,98

Beide Datensätze wurden miteinander korreliert. Die p-Werte wurden mit einem gepaarten T-Test berechnet, bei den Mikroarray-Daten gingen die logarithmisch transformierten Werte in die Berechnung ein (*). $\bar{m}(P/RT)$: Mittelwert der Primär- bzw. Rezidivtumoren.

Tabelle 28: Ergebnisse der *real-time* RT-PCR Analysen von zwölf Kandidatengenenen in der unabhängigen Serie von 43 astrozytären Gliomen.

Gene	Mittelwerte jeder diagnostischen Gruppe*				p-Werte der logarithmisch transformierten Daten			
	AII (n=9)	AAIII (n=10)	pGBIV n=17)	sGBIV (n=7)	AII vs. AAIII	AII vs. GBIV	AAIII vs. GBIV	pGBIV vs. sGBIV
	<i>FOXM1</i>	1,65	5,38	3,99	5,79	0,0118	0,0317	>0,2
<i>VEGFA</i>	1,21	2,34	9,33	5,77	>0,2	0,0004	0,0023	0,0590
<i>TOP2A</i>	7,82	22,47	22,36	193,53	0,0233	<0,0001	0,0140	0,0001
<i>COL4A2</i>	16,38	27,78	46,53	33,91	0,0402	0,0030	>0,2	>0,2
<i>IGFBP4</i>	4,91	8,93	16,58	10,00	>0,2	0,0073	0,0154	>0,2
<i>CENPF</i>	10,05	29,34	31,04	127,84	0,0332	<0,0001	0,0095	0,0040
<i>MGP</i>	2,43	6,66	11,19	9,91	0,0034	0,0004	>0,2	>0,2
<i>SELL</i>	15,07	5,36	2,81	6,09	>0,2	>0,2	>0,2	>0,2
<i>RYR1</i>	18,12	3,03	2,23	3,51	>0,1	>0,1	>0,2	>0,1
<i>ADD3</i>	1,52	0,84	0,95	0,37	0,0272	0,0113	>0,2	>0,2
<i>CAMK2G</i>	1,03	0,57	0,47	0,58	>0,1	0,0170	>0,2	>0,2
<i>ABLIM</i>	3,60	3,18	2,28	3,79	>0,2	>0,1	>0,2	0,0445

*Angabe sind jeweils die Mittelwerte der mRNA Expression in jeder Tumorgruppe. Die p-Werte wurden mit einem 2-seitigen T-Test für den Vergleich der Mittelwerte von vier Tumorgruppen berechnet (AII vs. AAIII; AII vs. alle Glioblastome; AAIII vs. alle Glioblastome; pGBIV vs. sGBIV)

mRNA-Expression fand mittels *real-time* RT-PCR statt. An die Mittelwertberechnung der einzelnen Genexpressionsdaten für jede Tumorgruppe schloss sich die Kalkulation eines 2-seitigen T-Tests an (Tabelle 28). Ein Vergleich der Astrozytome des WHO-Grades II mit den anaplastischen Astrozytomen und/oder den Glioblastomen des WHO-Grades III bzw. IV ergab für 9/12 Genen eine differentielle Expression (Tabelle 28). Lediglich die Gene *ABLIM*, *RYR1* und *SELL* lagen oberhalb des Signifikanzniveaus von 0,05 (Tabelle 28). Die Astrozytome unterschieden sich von den anaplastischen Astrozytomen und den Glioblastomen durch eine signifikant niedrigere Expression der Gene *CENPF*, *COL4A2*, *FOXMI*, *MGP* und *TOP2A* und eine signifikant höhere Expression des Gens *ADD3* (Tabelle 28). Die Transkriptlevel von *IGFBP4* und *VEGF* war nur in den Glioblastomen signifikant erhöht (Tabelle 28). Die *CAMK2G* mRNA Expression war im Vergleich zu den Astrozytomen in den Glioblastomen signifikant höher, für die anderen Gruppenvergleiche lag das Signifikanzniveau unterhalb von 90 % (Tabelle 28). Die vier Gene *CENPF*, *IGFBP4*, *TOP2A* und *VEGFA* zeigten eine signifikant höhere Expression in den Glioblastomen verglichen mit den anaplastischen Astrozytomen (Tabelle 28). Im Falle von *TOP2A* und *VEGF* entstand dieser Unterschied hauptsächlich durch die signifikant erhöhten mRNA-Level in sekundären verglichen mit primären Glioblastomen. Die Primärtumoren hatten fast identische Expressionsniveaus wie die anaplastischen Astrozytome (Tabelle 28). Die Daten der unabhängigen Gliomserie konnten die ursprünglich in den Gliompaaren gefundenen Expressionsunterschiede für die Gene *RYR1* und *SELL*, die per Mikroarrays nachgewiesen und per *real-time* RT-PCR bestätigt wurden, nicht validieren (Tabelle 28 und 27).

3.6 Funktionelle Analysen von *FOXMI* und *MGP* in Glioblastomzelllinien

Aus den mittels Expressionsanalysen identifizierten Kandidatengenen, die möglicherweise an der Progression maligner Gliome beteiligt sind, wurden zwei Gene für eine funktionelle Analyse in Glioblastomzelllinien ausgewählt. Die beiden Gene *FOXMI* und *MGP* waren nicht nur signifikant stärker in den Rezidivtumoren im Vergleich zu den zugehörigen Primärtumoren exprimiert ($EV(FOXMI)=7,25$ und $EV(MGP)=5,98$), sondern waren auch in Glioblastomen im Vergleich zu WHO-Grad II Astrozytomen signifikant stärker exprimiert ($p(FOXMI)=0,0371$ und $p(MGP)=0,0004$). Zusätzlich kartieren *FOXMI* und *MGP* in eine chromosomale Region (12p13 bzw. 12p13.1-p12.3), die in Gliomen häufig Zunahmen der Gendosis, d.h. chromosomale Gewinne bzw. Amplifikationen zeigt.

Für die funktionelle Charakterisierung der beiden Gene *FOXMI* und *MGP* in Bezug auf ihre mögliche Rolle für das Wachstum maligner Gliome wurden RNA-Interferenzanalysen in Glioblastomzelllinien durchgeführt. Dabei wurden zwei Zelllinien ausgewählt, die eine hohe Expression der beiden Kandidatengene zeigten. Die Zelllinie CCF-STTG1 weist eine 8,2-fache Überexpression der *MGP*-mRNA und die Zelllinie T98G eine 7,5-fache Überexpression des *FOXMI*-Transkripts im Vergleich zur Expression der beiden Gene in nicht-neoplastischem Gehirngewebe auf. Durch sog. siRNAs (*small interfering RNA*) gegen die beiden Gene *FOXMI*

und *MGP* sollte das mRNA-Level in den Zelllinien CCF-STTG1 und T98G *in vitro* reduziert werden. Dazu wurden jeweils zwei verschiedene siRNAs für die zu untersuchenden Gene verwendet. Als Negativkontrolle diente eine siRNA, die über kein Zielgen in der Zelle verfügt. Die Expressionsanalyse erfolgte über *real-time* RT-PCR Analysen auf Transkript- und über Westernblotanalysen auf Proteinebene.

Die *FOXMI* mRNA-Expression nahm für beide verwendeten siRNAs (FOXi1 und 2) in CCF-STTG1 und T98G Glioblastomzellen über vier Tage kontinuierlich bis zu einem Niveau von 4 % bzw. 9 % der Negativkontrolle (Abbildung 14 A und B) ab. In den CCF-STTG1 Zellen war die Transkriptmenge nach 24 h bei Transfektion mit *FOXi2* dreimal so stark reduziert wie mit *FOXi1*, was jedoch zum Zeitpunkt von 48 h wieder ausgeglichen war (Abbildung 14 A). In den T98G Zellen erreichten beide siRNAs bereits nach 24 h eine Expressionsreduktion auf ca. 20 % des Ausgangswertes, die bis zum Endpunkt von 9 % für siRNA1 und 14 % für siRNA2 nach 96 h nur noch wenig zunahm (Abbildung 14 B). Die Expressionsreduktion von *MGP* zeigte für beide Zelllinien ebenfalls eine kontinuierlichen Abnahme bis zu einem Minimum auf 1 % der Kontrolle in CCF-STTG1 und 2 % der Kontrolle in T98G (Abbildung 15 A und B). In den CCF-STTG1 Zellen zeigte die siRNA2 bis zum Zeitpunkt von 72 h eine stärkere Transkriptreduktion (Abbildung 15a). In der T98G Zelllinie war dieser Verlauf umgekehrt und etwas stärker ausgeprägt (Abbildung 15b).

Die Expression von *FOXMI* wurde zusätzlich auf Proteinebene mittels Westernblot analysiert. Hier demonstrierten beide Zelllinien eine im Verhältnis zur Kontrolle verminderte Expression (Abbildung 16 und 17). Nach 96 h war die Proteinexpression in CCF-STTG1 Zellen auf 42 % (siRNA1) bzw. 23 % (siRNA2) reduziert, wobei die siRNA2 nach 96 h einen stärkeren Effekt zeigte (Abbildung 16). Eine stärkere Reduktion der Proteinexpression bei Transfektion mit der siRNA2 demonstrierten auch die T98G Zellen (Abbildung 17). Hier erreichten die Zellen nach 48 h eine *FOXMI*-Expression von ca. 41 % verglichen mit der Kontrolle, die bis zum Zeitpunkt von 96 h relativ stabil bei diesem Wert blieb (Abbildung 17). Bei der Transfektion mit der siRNA1 zeigten die Zellen bereits bei 24 h ein Minimum (Abbildung 17). Die *FOXMI* Proteinexpression stieg jedoch wieder bis auf ca. 70 % zum Zeitpunkt 96 h an (Abbildung 17).

Nach der Feststellung, dass in beiden Zelllinien die Expression von *FOXMI* und *MGP* auf Transkript- wie auch auf Proteinebene bei Transfektion mit den entsprechenden siRNAs reduziert werden konnte, schlossen sich phänotypische Analysen der Glioblastomzellen an. Zur Überprüfung der Proliferationsaktivität wurde radioaktives [³H]-Thymidin in die DNA-Neusynthese eingebaut. Die Vitalität der Zellen wurde mit den Farbstoffen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) und Kristallviolett (KV) nachgewiesen. Das MTT wird in den Mitochondrien von der Succinatdehydrogenase (SDH) zu einem blauen Komplex metabolisiert, der ein Indikator für aktive Mitochondrien darstellt. Das Kristallviolett wird in die Zellmembran von lebenden Zellen eingebaut und dient zur Abgrenzung gegen abgestorbene Zellen.

Die Proliferationsaktivität von CCF-STTG1 Zellen war überraschenderweise signifikant

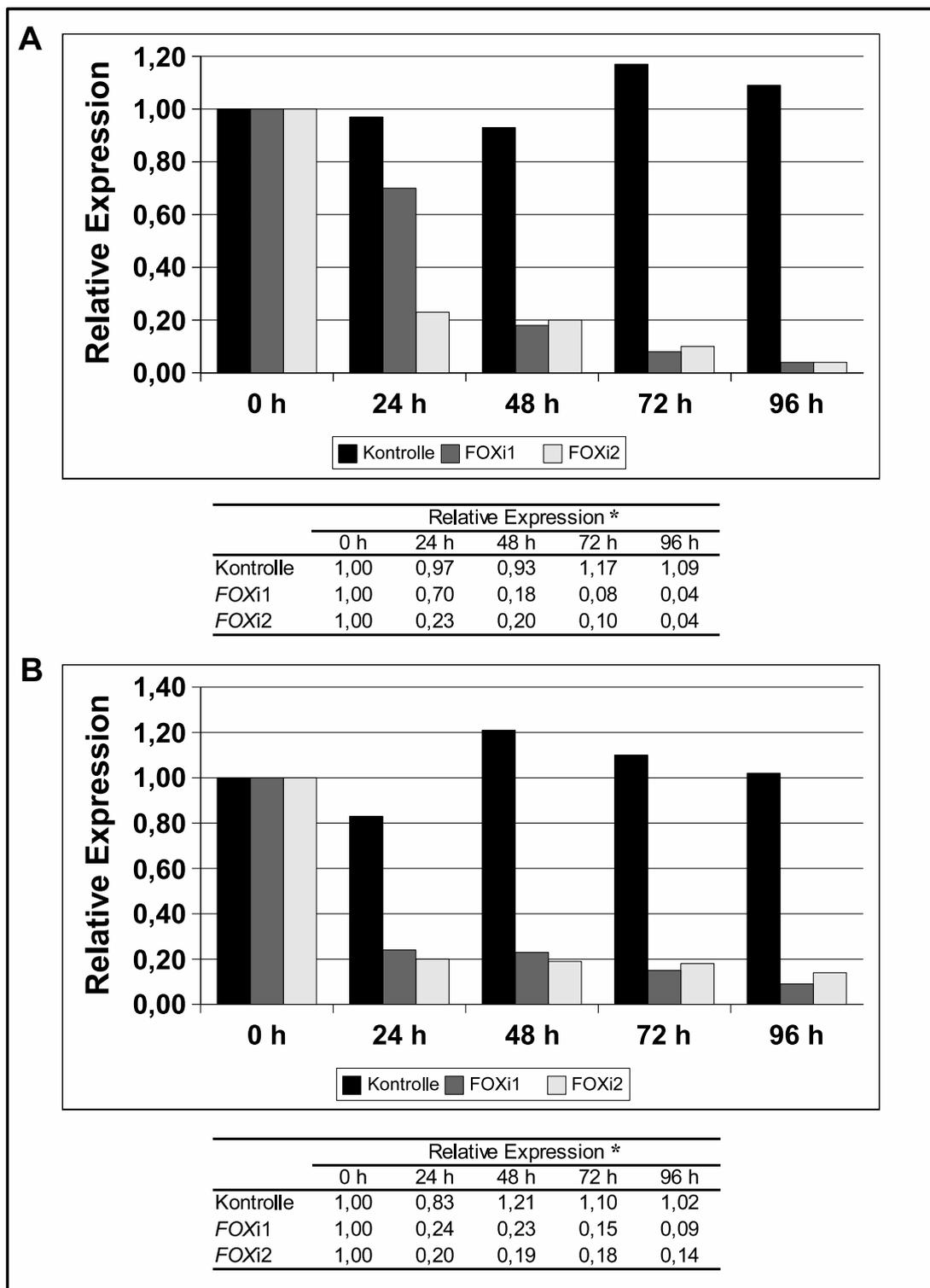


Abbildung 14: mRNA Expression von *FOXM1* in CCF-STTG1 (A) und T98G (B) Glioblastomzellen zu verschiedenen Zeitpunkten. FOXi1/2: siRNA1/2 gegen *FOXM1*, Kontrolle: Behandlung mit Kontroll-siRNA, die gegen kein spezifisches Gen gerichtet ist. * Relative Expression im Vergleich zum unbehandelten Kontrollwert bei 0 h.

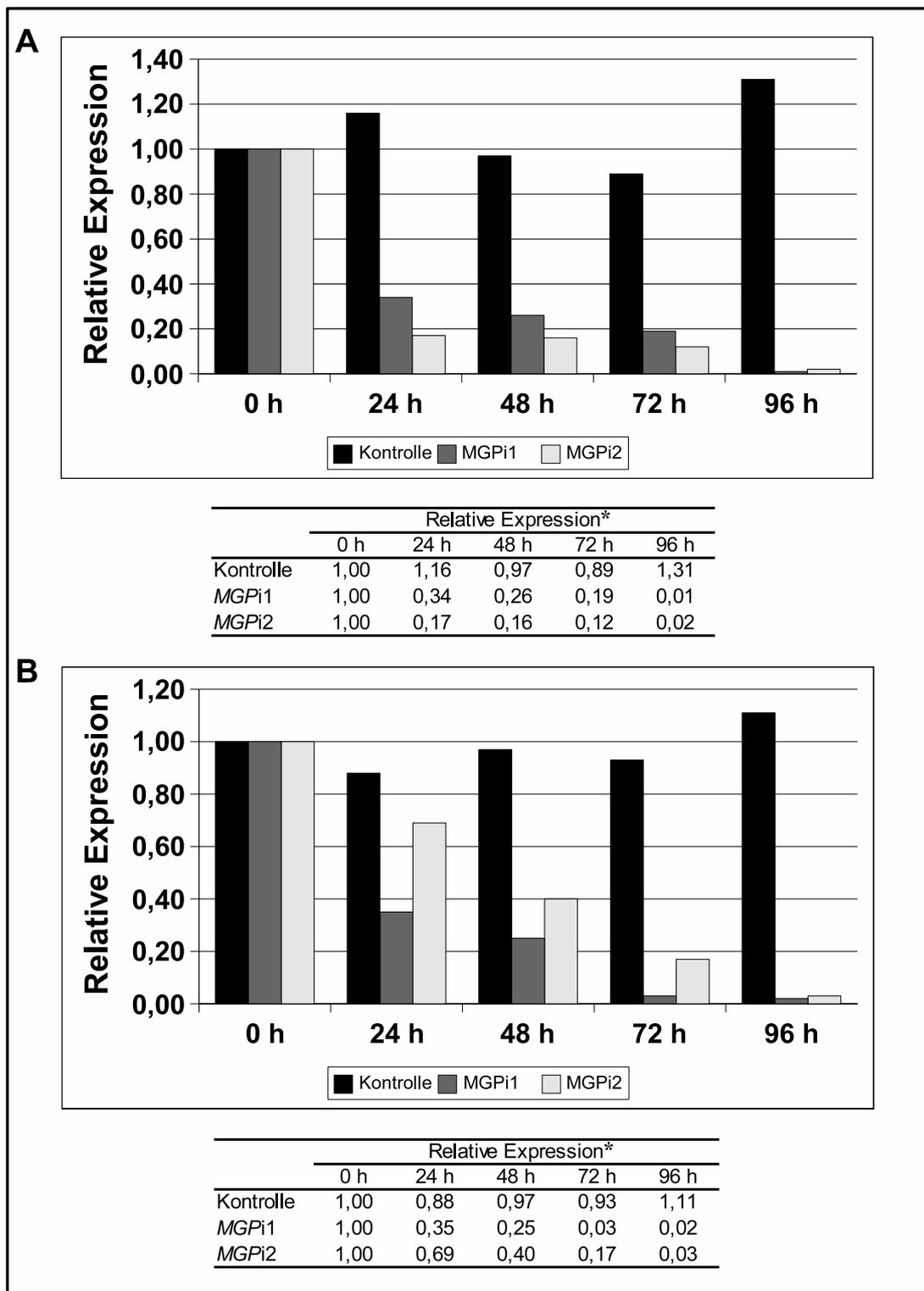


Abbildung 15: mRNA Expression von *MGP* in CCF-STTG1 (A) und T98G (B) Glioblastomzellen zu verschiedenen Zeitpunkten. MGPI1/2: siRNA1/2 gegen *MGP*, Kontrolle: Behandlung mit Kontroll-siRNA, die gegen kein spezifisches Gen gerichtet ist. * Relative Expression im Vergleich zum unbehandelten Kontrollwert bei 0 h.

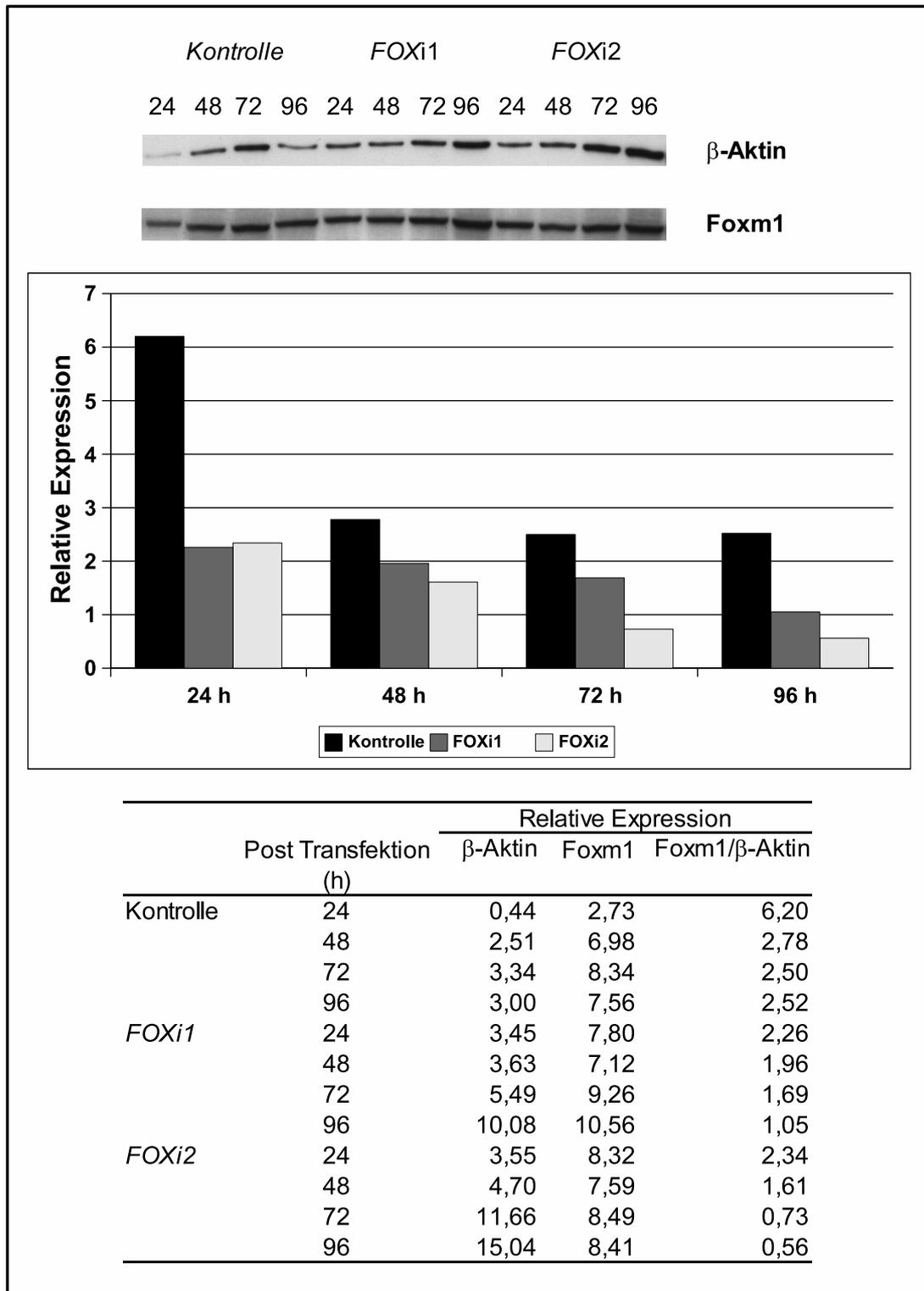


Abbildung 16: Westernblotanalyse von Foxm1 in CCF-STTG1 Glioblastomzellen zu verschiedenen Zeitpunkten. FOXi1/2: siRNA1/2 gegen *FOXMI*.

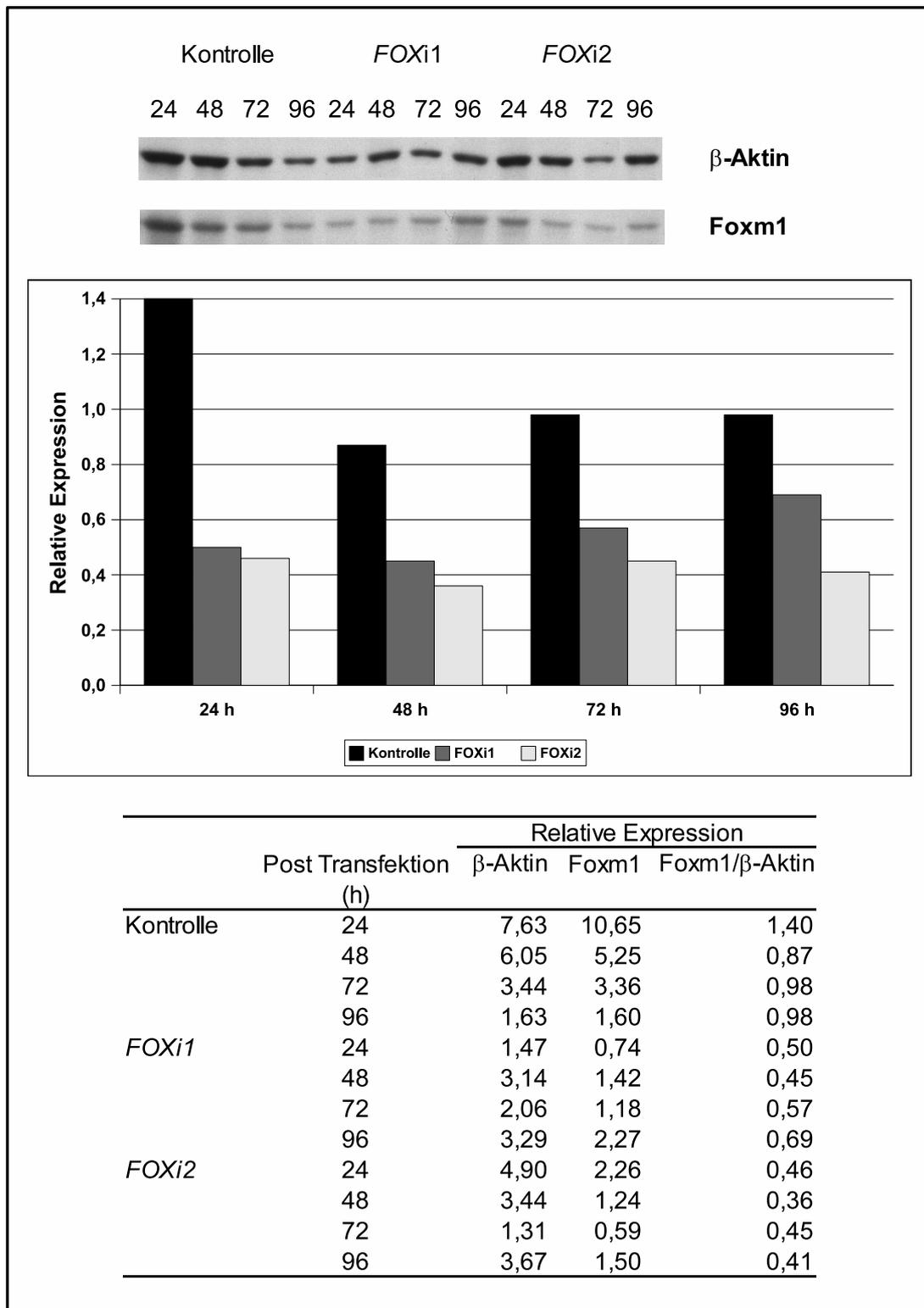


Abbildung 17: Westernblotanalyse von Foxm1 in T98G Glioblastomzellen zu verschiedenen Zeitpunkten. FOXi1/2: siRNA1/2 gegen *FOXMI*.

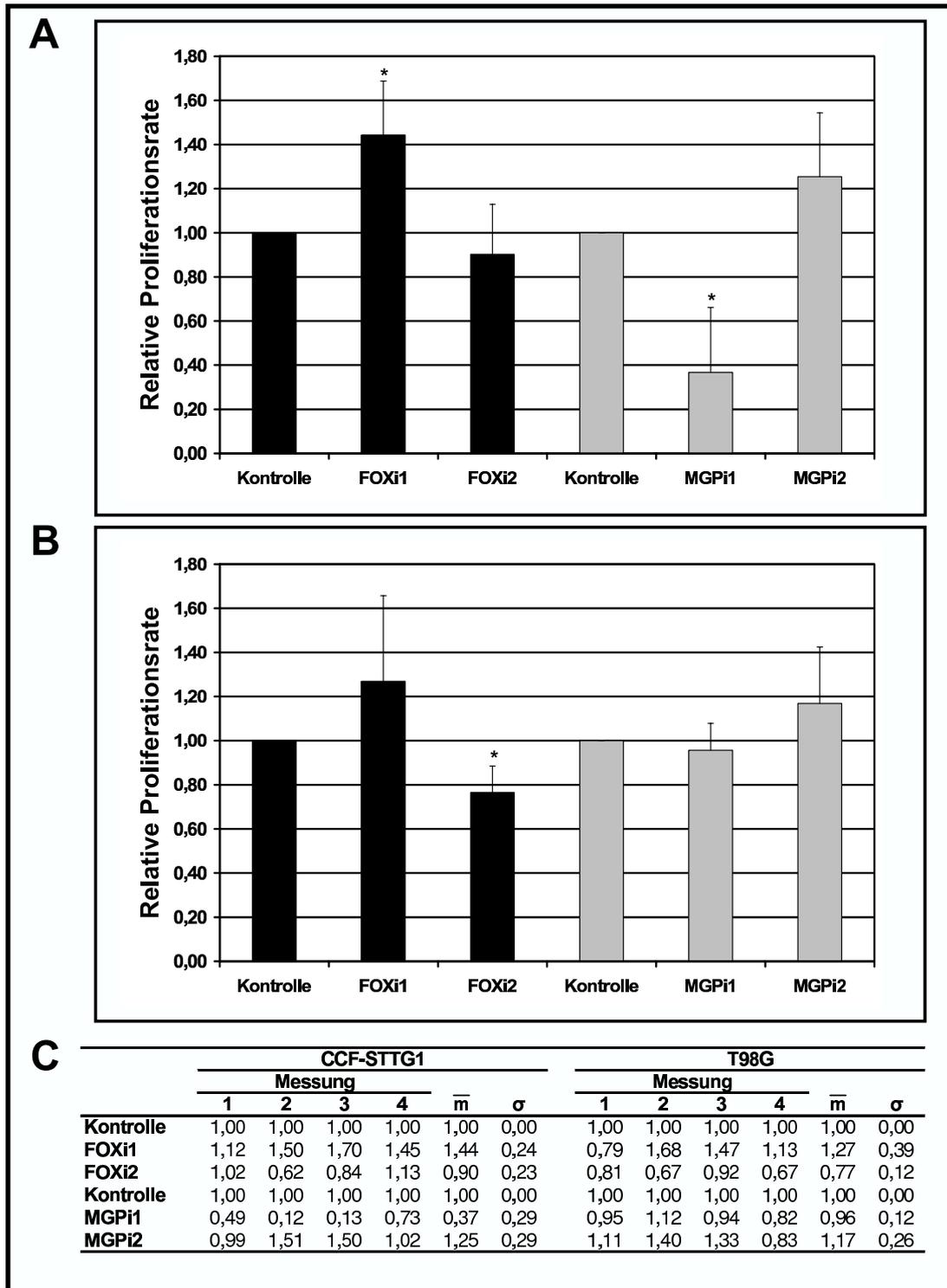


Abbildung 18: Proliferationsrate von CCF-STTG1 (A) und T98G (B) Glioblastomzellen nach Transfektion mit siRNAs gegen *FOXM1* und *MGP*. Die Unterschiede in der Proliferationsrate wurden auf die Kontrolle (1,00) bezogen. Werte >1 bedeuten eine Erhöhung, Werte <1 eine Erniedrigung der Proliferationsrate. Die Tabelle (C) fasst die Mittelwerte von vier Einzelexperimenten, mit jeweils einer Vierfachbestimmung zusammen. \bar{m} : Mittelwert; σ : Standardabweichung; *: signifikante Proliferationsänderung im Verhältnis zur Kontrolle.

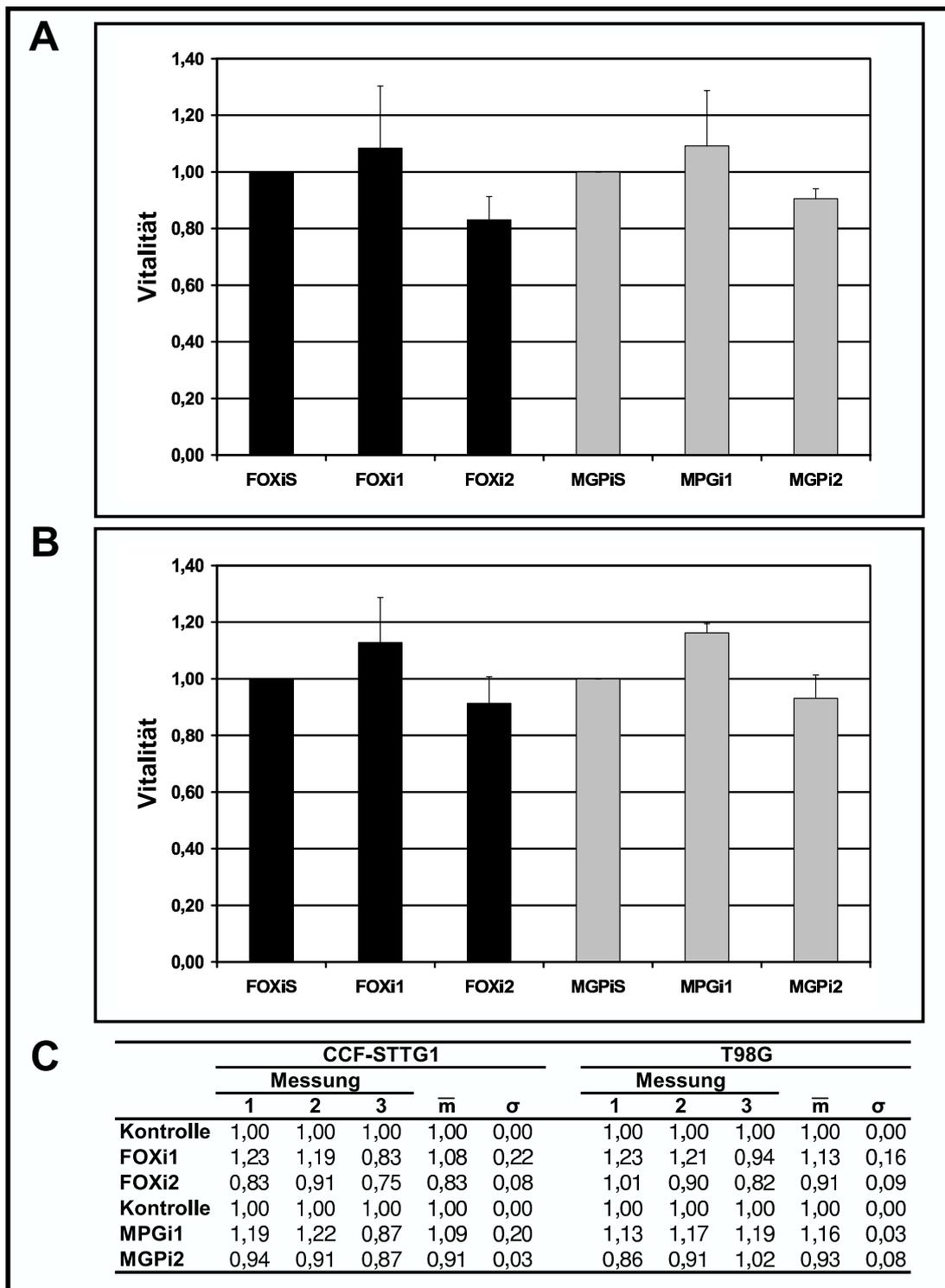


Abbildung 19: Bestimmung der Zellvitalität durch Metabolisierung des MTT-Farbstoffs in den Mitochondrien. CCF-STTG1 (A) und T98G (B) Glioblastomzellen wurden mit siRNAs gegen *FOXM1* und *MGP* transfiziert. Die Vitalitätsunterschiede wurden auf die Kontrolle (1,00) bezogen. Werte >1 bedeuten eine erhöhte, Werte <1 eine erniedrigte Vitalität. Die Tabelle (C) fasst die Mittelwerte von drei Einzelerperimenten, mit jeweils einer Vierfachbestimmung zusammen. \bar{m} : Mittelwert; σ : Standardabweichung. Man erkennt keine signifikanten Unterschiede in der Vitalitätsrate nach Behandlung mit den siRNAs, d.h. die reduzierte Expression von *FOXM1* und *MGP* führt nicht zum Zelltod der untersuchten Gliomzellen.

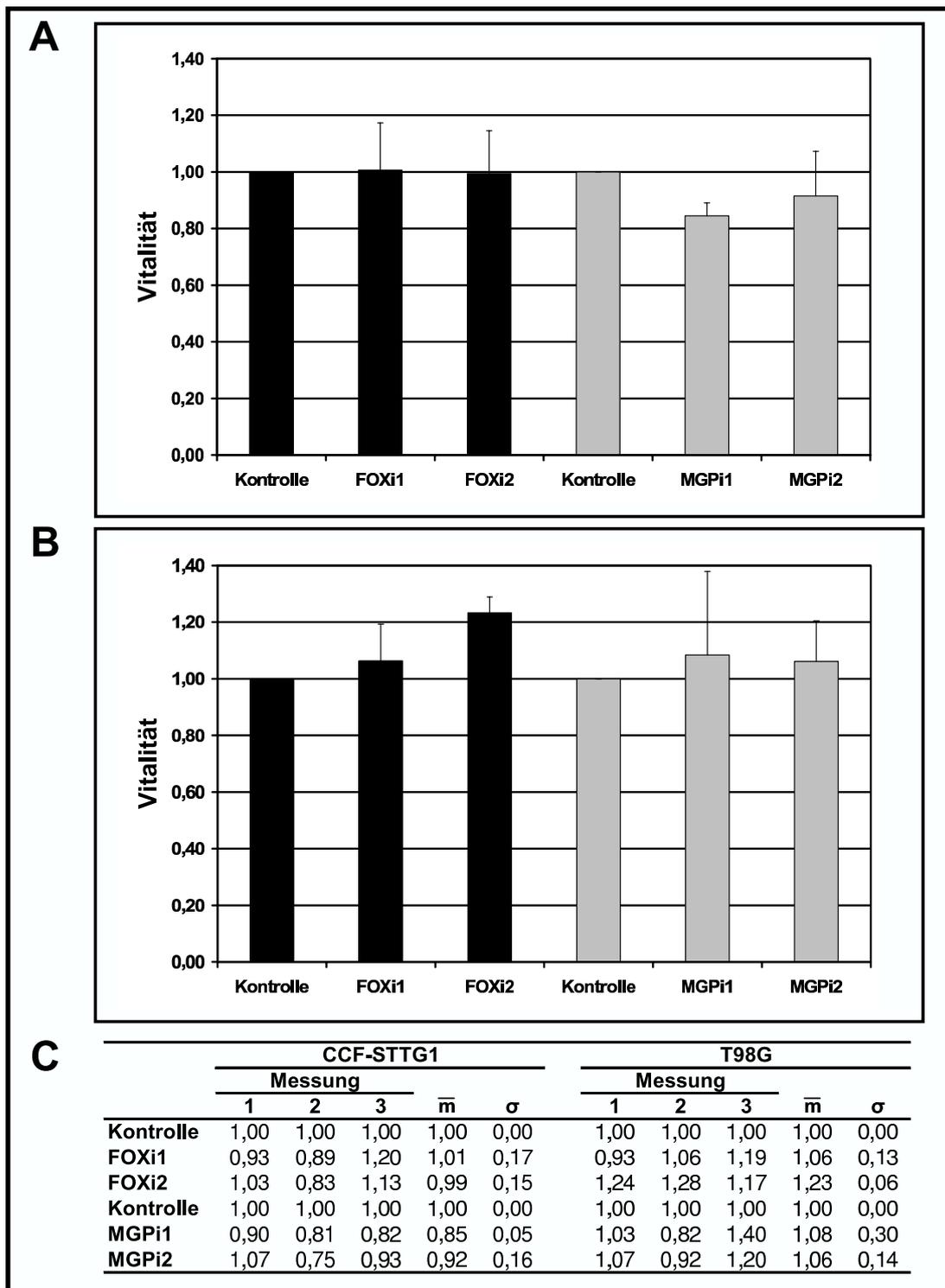


Abbildung 20: Bestimmung der Zellvitalität durch Einbau von Kristallviolett in die Zellmembran lebender Zellen. CCF-STTG1 (A) und T98G (B) Glioblastomzellen wurden mit siRNAs gegen *FOXMI* und *MGP* transfiziert. Die Vitalitätsunterschiede wurden auf die Kontrolle (1,00) bezogen. Werte >1 bedeuten eine erhöhte, Werte <1 eine erniedrigte Vitalität. Die Tabelle (C) fasst die Mittelwerte von drei Einzelexperimenten, mit jeweils einer Vierfachbestimmung zusammen. \bar{m} : Mittelwert; σ : Standardabweichung. Die Ergebnisse stimmen im wesentlichen mit den Resultaten des MTT-Assays überein, d.h. es kommt nach siRNA Behandlung nicht zum Zelltod der untersuchten Gliomzellen.

nach Transfektion mit der siRNA1 gegen *FOXM1* erhöht ($p=0,0110$), wohingegen T98G Zellen eine signifikante Erniedrigung ($p=0,0078$) der Proliferationsrate nach Transfektion mit siRNA2 demonstrierten (Abbildung 18). Bei der Reduktion der *MGP*-Expression zeigte sich lediglich in den CCF-STTG1 Zellen eine signifikante Proliferationserniedrigung ($p=0,0052$) für die siRNA1 (Abbildung 18). Bei der Analyse der Zellvitalität mit den Farbstoffen MTT und KV resultierte die Behandlung mit siRNAs gegen *FOXM1* und *MGP* weder in den CCF-STTG1 noch in den T98G Zellen in signifikanten Veränderungen (Abbildung 19 und 20).

4 Diskussion

Diffus infiltrierende astrozytäre Gliome sind die häufigsten Primärtumoren des zentralen Nervensystems bei Erwachsenen [1]. Wegen des infiltrativen Wachstumsverhaltens dieser Tumoren ist eine vollständige operative Entfernung zumeist nicht möglich, so dass eine Rezidivtumorbildung nahezu regelmäßig vorkommt. Ein signifikanter Anteil der WHO-Grad II Astrozytome rezidiert daher spontan als anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III) oder als sekundäres Glioblastom (WHO-Grad IV). Diese inhärente Tendenz zur malignen Progression ist von entscheidender klinischer Bedeutung, da sie eine der wichtigsten Todesursachen von Patienten mit astrozytären Gliomen darstellt [8, 2]. Die molekularen Mechanismen, die der Gliomprogression zugrunde liegen, sind bislang nur unzureichend verstanden. Frühere Studien haben sich hauptsächlich auf chromosomale und/oder genetische Veränderungen konzentriert [1, 3]. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Vorgang der spontanen malignen Progression von astrozytären Gliomen durch die Erstellung von Expressionsprofilen näher zu analysieren. Hierzu wurden zwei verschiedene methodische Ansätze verwendet. Zur raschen Identifizierung von bekannten Genen, die zwischen Primär- und Rezidivtumoren differentiell exprimiert werden, wurden Mikroarrayanalysen mit Hu6800FL-Chips (Affymetrix) durchgeführt. Die Verwendung dieser Mikroarrays erlaubt die gleichzeitige Analyse von 6800 verschiedenen humanen Genen. Das vollständige Transkriptom der jeweiligen Tumoren wird angereichert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf die Hu6800FL-Chips hybridisiert. Die Signalintensitäten, die für die relativen Expressionsstärken der Gene stehen, werden mittels Softwaretools registriert und ausgewertet. Anschließend können die Expressionsprofile der Primärtumoren (WHO-Grad II) mit denen der Rezidivtumoren (WHO-Grad III oder IV) verglichen und durch statistische Analysen solche Gene identifiziert werden, die zwischen den beiden Tumorgruppen differentiell exprimiert werden. Methodisch bedingt werden dabei hauptsächlich Kandidatengene detektiert, die mittel bis stark exprimiert sind und deutliche Expressionsunterschiede zwischen Primär- und Rezidivtumor zeigen. Zur Detektion von Expressionsunterschieden schwach exprimierter Gene ist die Mikroarray-Methode weniger gut geeignet. Deshalb wurde mit der suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH) ein weiterer methodischer Ansatz gewählt, der speziell seltene Transkripte anreichert [57, 58] und deren mögliche differentielle Expression zwischen Primär- und Rezidivtumoren erfassen kann. Zusätzlich erlaubt die SSH die Identifizierung von Genen, die auf den Hu6800FL-Chips nicht repräsentiert sind. Beide Ansätze lieferten zahlreiche differentiell exprimierte Transkripte, die neue Kandidaten für Tumorsuppressorgene bzw. Protoonkogene darstellen, welche potentiell für die maligne Progression astrozytärer Gliome wichtig sind.

4.1 Molekulargenetische Befunde in den untersuchten Tumoren

Alle für die Expressionsanalyse verwendeten Gliome wurden nicht nur histologisch klassifiziert sondern zusätzlich einer eingehenden molekulargenetischen Analyse unterzogen. Hierbei wur-

den die Tumoren auf solche Gen- bzw. Chromosomenaberrationen hin untersucht, die bekanntermaßen an der Entstehung und Progression von astrozytären und oligodendroglialen Tumoren beteiligt sind [1, 3]. Die ermittelten Ergebnisse stimmen mit Daten vorhergehender Studien überein [52, 32, 23]. *TP53*-Mutationen und/oder Allelverluste auf 17p waren die häufigsten initialen Veränderungen, die in 75 % (6/8) der Primärtumoren auftraten. Diese Alterationen waren ebenfalls in den entsprechenden Rezidiven nachweisbar. Die zwei in der Studie enthaltenen, primären Oligoastrozytome zeigten histologisch hauptsächlich astrozytäre Charakteristika und keine kombinierten Allelverluste auf den Chromosomen 1p und 19q, wie sie für Oligodendrogliome typisch sind. Diese beiden Tumoren gehören daher zu der genetischen Untergruppe der Oligoastrozytome, die eher mit den diffusen Astrozytomen als mit den Oligodendrogliomen verwandt sind [67].

Progressionsassoziierte genetische Veränderungen wurden in allen vier sekundären Glioblastomen (WHO-Grad IV) und in einem anaplastischen Rezidivtumor (WHO-Grad III) nachgewiesen. Homozygote *CDKN2A*- und *p14^{ARF}*-Deletionen waren die häufigsten progressionsassoziierten Veränderungen. Lediglich ein Rezidivtumor zeigte eine Amplifikation und Überexpression des *CDK4*-Gens. Diese Daten unterstützen andere Studien, die von einer häufigen Inaktivierung des *p16^{INK4a}/Cdk4/pRb*-abhängigen Signalwegs in malignen Gliomen, vor allem in Glioblastomen berichten [12, 25]. Das Fehlen von *EGFR*-Amplifikationen in sekundären Glioblastomen [52, 32] konnte in der eigenen Tumorserie bestätigt werden.

4.2 Identifizierung von neuen Gliomprogressions-assoziierten Kandidatengenens mittels suppressiver Subtraktionshybridisierung

Der Vergleich von zwei unabhängigen cDNA Populationen mit der suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH) ermöglicht die Identifizierung von differentiell exprimierten Transkripten. Hierbei reichert die Methode insbesondere auch solche differentiell exprimierten Transkripte an, die ein relativ schwaches Expressionsniveau zeigen [57, 58]. In der eigenen Arbeit wurde die SSH mit vier Rezidivgliompaaren, jeweils bestehend aus einem primären WHO-Grad II Gliom sowie einem zugehörigen sekundären Glioblastom (WHO-Grad IV) durchgeführt. Die subtrahierten cDNA Populationen erlaubten nach Hybridisierung auf cDNA-Filter die Identifizierung von 463 zwischen mindestens einem Primär- und Rezidivtumorkomplex differentiell exprimierten Genen. Unter diesen Kandidatengenens befanden sich zahlreiche Transkripte, deren Genprodukte an Signalwegen beteiligt sind, die mit der Tumorgenese verknüpft sind (u.a. Angiogenese, Apoptose, Signaltransduktion, Zellproliferation und Zellzykluskontrolle). Diese vergleichsweise große Genzahl wurde auf solche Kandidaten reduziert, die eine differentielle Expression in mindestens 3 von 4 Tumorkomplexen zeigten. Dieses Selektionskriterium erfüllten acht Gene. Von diesen konnte die differentielle Expression für *APOD*, *AMOG (ATP1B2)* und *DRR1 (TU3A)* mittels *real-time* RT-PCR in Paaren aus Primär- und Rezidivtumoren (3 SSH-Paare und 7 zusätzliche Rezidivgliompaare) bestätigt werden. Zusätzlich wurden diese drei Kandidaten in ei-

ner unabhängigen Serie von 43 Gliomen unterschiedlichen WHO-Grades verifiziert.

Das *APOD*-Genprodukt ist ein Mitglied der $\alpha(2\mu)$ -Mikroglobulin Superfamilie von Transportproteinen, die auch als Lipocaline bekannt sind [68]. Eine Untersuchung des Expressionsverhaltens und der prognostischen Signifikanz von Apolipoprotein D in Mammakarzinomen ergab, dass niedrige *APOD*-Level zur raschen Rezidivbildung und signifikanten Erniedrigung der Überlebensrate führen, während hohe *APOD*-Level zu einer wesentlich besseren Prognose beitragen [69]. Expressionsprofile von Onkozytomen der Schilddrüse zeigten im Vergleich zu normalem Schilddrüsengewebe reduzierte *APOD*-Transkriptlevel, die auf Proteinebene immunhistochemisch an Gewebeschnitten verifiziert wurden [101]. In humanen Fibroblasten ist die *APOD*-Expression spezifisch für nicht proliferierende Kulturen [70]. *In vitro* Experimente zeigten, dass die *APOD* Sekretion in Brust- und Prostatazellen durch Steroide stimuliert und gleichzeitig die Zellproliferation inhibiert wird [71, 72, 73, 74]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass *APOD* als Marker für Zelldifferenzierung und Wachstumsarrest in Betracht gezogen werden kann. Außerdem könnte Apolipoprotein D als nützlicher Indikator für die Gruppe der schwach proliferierenden, nicht infiltrativen und potentiell heilbaren primären Gehirntumoren Anwendung finden [75]. Die Arbeit von Hunter *et al.* [75] ergab nämlich in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen, dass Apolipoprotein D in gutartigen pilozytischen Astrozytomen deutlich stärker als in anaplastischen Astrozytomen exprimiert wird.

ATP1B2 (auch: *adhesion molecule on glia; AMOG*) kodiert für die β -Untereinheit der Na, K-ATPase. Der Genlocus kartiert auf 17p13.1, eine Region, die in bis zu 60 % der astrozytären Gliome Allelverluste zeigt [13, 14]. Das wichtigste Tumorsuppressorgen auf 17p ist das *TP53*-Gen (17p13), wobei jedoch noch weitere Tumorsuppressorgene auf Chromosom 17p vermutet werden [13, 14, 31, 12, 32]. *AMOG* wäre solch ein möglicher Kandidat, dessen Expression in astrozytären Gliomen ein inverses Verhältnis zum Grad der Malignität zeigt. *In vitro* Experimente demonstrierten zudem, dass *AMOG*-negative Gliomzellen eine erniedrigte Adhäsion und eine gesteigerte Migration aufwiesen [76]. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Verlust von *AMOG* das invasive Wachstumsverhalten maligner Gliome fördert. Im Mausmodell führt die Deletion von *AMOG* zu einem Anschwellen und einer Degeneration der astrozytären Endfüße im Gehirnstamm [80] sowie einem frühzeitigen postnatalen Sterben an Tag 17 oder 18 [81]. Die chromosomale Lokalisation, die Literaturdaten sowie die Resultate der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass *AMOG* als Kandidat für ein weiteres Tumorsuppressorgen auf 17p13 in Frage kommt. Weitergehende Untersuchungen zur Charakterisierung der Ursache einer verminderten *AMOG*-Expression in malignen Gliomen laufen zur Zeit, wobei erste eigene Ergebnisse auf eine mögliche Bedeutung einer aberranten Promotormethylierung hindeuten.

Ursprünglich wurde das *TU3A* (*Tohoko University cDNA clone A on chromosome 3*) bei einer Suche nach neuen Genen in der bei Nierenzellkarzinomen häufig deletierten Region 3p14.3-p14.2 identifiziert [82]. Etwas später berichtete eine zweite Arbeitsgruppe von einem Gen, dessen Expression in Nierenzellkarzinomen reduziert ist und nannten es *DRRI* (*downregulated in renal cell carcinoma 1*) [77]. Sie lokalisierten das Gen auf 3p14.2-p21.1. Das Gen umfasst ge-

nomisch etwa 10 kb und kodiert für ein Transkript von 3,5 kb Länge. Das reife Protein ist 144 Aminosäuren lang und hat ein Kernlokalisierungssignal sowie eine helikale Domäne [77]. Beide Arbeitsgruppen stellten zwar im Nierenkarzinom eine Expressionsverminderung fest, konnten diese aber nicht mit genetischen Aberrationen korrelieren, was epigenetische oder andere Ursachen für die Transkriptionsunterschiede vermuten läßt. Analysen der genomischen Verteilung von sog. miRNAs (mikro RNA; ~22 nt), d.h. kurze RNA-Transkripte mit vermuteten Funktionen u.a. in der Regulation von Zellproliferation und Apoptose, ergaben, dass eine miRNA in der Region 3p21.1-p21.2, die das *DRR1*-Gen einschliesst, lokalisiert ist [144].

Die Expressionswerte der übrigen fünf der acht ausgewählten Kandidatengene konnten in 2/3 (*TP11*), in 1/3 (*DMXL1*) bzw. in 0/3 (*HDAC3*, *KIAA0942*, *OR2W3P*) bei der SSH verwendeten Tumorpaaren bestätigt werden. Die Expressionsanalyse von sieben zusätzlichen Rezidivpaaren konnte die zwischen Primär- und Rezidivtumor differentielle Expression von *TP11* in der Mehrheit der Fälle bestätigen (5/7), während dies für die Gene *DMXL1*, *HDAC3* und *KIAA0942* (je 3/7) und *OR2W3P* (0/7) nicht gelang. Ein Grund hierfür könnte möglicherweise in der vom RZPD bezifferte Fehlerquote von ca. 25 % auf den verwendeten hochdichten Filtern sein, mit der die Genzuordnung auf diesen Filtern leider behaftet ist.

Bei einer vergleichenden Suche nach geschlechtsbestimmenden Genen der Mücke *Chironomus piger* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde das *DMX* (*D. melanogaster X chromosomal gene*) identifiziert [83]. Das in WHO-Grad IV Gliomen herunterregulierte humane Homolog *DMXL1* (*DMX-like 1*) ist auf Chromosom 5q23.1 lokalisiert und wird hauptsächlich im fetalen, jedoch nicht im adulten Gehirngewebe exprimiert. *DMXL1* gehört zu einer Proteinfamilie, die WD-Motive aufweisen, und an der Signaltransduktion, der Transkriptionsregulation, dem prä-mRNA Spleißen, der Zytoskelettorganisation sowie der Vesikelfusion beteiligt sind [84]. Die signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Astrozytomen des WHO-Grades II und sekundären Glioblastomen des WHO-Grades IV ($p < 0,0021$) sowie primären und sekundären Glioblastomen ($p < 0,0130$) deutet auf einen stärkeren Effekt in sekundären Glioblastomen hin, der möglicherweise mit einer Aberration auf Chromosom 5 korreliert. Bislang wurden jedoch noch keine Allelverluste auf Chromosom 5 in der Literatur beschrieben, die mit der malignen Progression assoziiert sind.

Das in Glioblastomen herunterregulierte Kandidatengen *KIAA0942* ist auch bekannt als *ARF6* (*ADP ribosylation factor 6*) oder *HCA67* (*hepatocellular carcinoma-associated antigen 67*). *ARF6* ist ein Klasse 3 ADP Ribosylierungsfaktor [85], der Teil des endosomalen und des Recycling-Signalwegs [86] und an der Modulation der kortikalen Aktinassemblierung beteiligt ist [87, 88, 89, 90, 91]. Bei der Suche nach neuen Antigenen, die mit Leberzellkarzinom-Zelllinien assoziiert sind, wurde das *HCA67* identifiziert [79]. Ein Vergleich von Darmkrebszellen mit normalen Darmzellen zeigte eine *HCA67*-Expression in den neoplastischen, aber nicht in den normalen Zellen [79].

Bei einem Vergleich von Glioblastomen mit niedriggradigen WHO-Grad II Gliomen konnte durch die SSH das *HDAC3*-Gen (*histone deacetylase 3*) mit einer erhöhten Expression in

den Rezidiven identifiziert werden. Dies ließ sich jedoch in keinem der mittels *real-time* RT-PCR untersuchten Tumorpaaare verifizieren. Statt dessen zeigten die Glioblastome bei einem Vergleich mit Astrozytomen sogar eine signifikant verminderte Expression ($p < 0,0001$). In Hefen und in Säugetieren führt die Deletion der Histondeacetylasen zur Expressionsveränderung vieler Gene [92, 93, 94]. Histonacetylierung reguliert die Genaktivität über die Modulation der Histonassemblierung und die Entfaltung der DNA [96]. Eine Histondeacetylierung hingegen ist mit einer transkriptionellen Geninaktivierung gekoppelt [95]. Ein Expressionsverlust von *HDAC3* während der malignen Progression von Gliomen könnte somit zu einer stärkeren Acetylierung des Euchromatins und einer erhöhten Genexpression führen. Dies könnte möglicherweise einen Wachstumsvorteil verschaffen, wenn hierdurch Protoonkogene verstärkt exprimiert würden. *In vitro* Experimente mit HeLa S3-Zellen ergaben allerdings eine verminderte Proliferation, Hyperacetylierung von Histonen und eine erhöhte Apoptoserate bei Transfektion mit siRNAs gegen *HDAC3*, die nachweislich dessen Transkript- und Proteinlevel reduzierten [100].

Ein weiteres Kandidatengen, das in Glioblastomen im Vergleich zu WHO-Grad II Gliomen eine Tendenz zu erhöhter Expression aufwies, war das an der Glykolyse beteiligte Genprodukt von *TP11* (*triosephosphate isomerase 1*). Die Triosephosphatisomerase 1 katalysiert die reversible Isomerisierung von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat durch Hydrogentransfer. Eine Expressionsstudie zur Unterscheidung von lobulären und duktaalen Brustkarzinomen zeigte eine signifikante Erhöhung von *TP11* in den duktaalen Tumoren [102]. Die eigenen Ergebnisse ergaben jedoch letztendlich keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den *real-time* RT-PCR Analysen von Gliomen unterschiedlicher WHO-Grade.

Zusammenfassend wurden die Gene *APOD*, *AMOG* (*ATP1B2*), und *DRR1* (*TU3A*) als interessante Kandidatengene identifiziert, deren verminderte Expression zur malignen Progression von Gliomen beitragen könnte. *APOD* wurde von anderen bereits als möglicher Marker für Zelldifferenzierung und Wachstumsarrest beschrieben [70, 71, 72, 74, 73]. Zusätzlich wurde es als ein Marker für die Gruppe der wenig proliferativen, nicht infiltrativen und potentiell heilbaren pilozytischen Astrozytome vorgeschlagen [75]. *AMOG* war im Vergleich zu WHO-Grad II Astrozytomen in primären und sekundären Glioblastomen signifikant niedriger exprimiert. Das *DRR1* (*TU3A*)-Gen wurde ursprünglich in Verbindung mit Nierenzellkarzinomen beschrieben [77], bislang aber nicht mit der malignen Progression von Gliomen assoziiert.

4.3 Identifizierung von neuen Gliomprogressions-assoziierten Kandidatengen mittels DNA-Chip-Technologie

Die DNA-Chip-basierte Expressionsprofilierung von primären WHO-Grad II versus sekundären WHO-Grad III und WHO-Grad IV Gliomen ergab 266 Probenets, die einen p-Wert $< 0,01$ (T-Test) hatten. Hiervon zeigten 70 einen mindestens zweifachen Expressionsunterschied zwischen primären und sekundären Tumoren. Die PAM-Analyse (*prediction analysis of microarrays*) zeigte, dass 134 von 7129 Probenets notwendig sind, um die Zuordnung eines bestimm-

ten Tumors in eine der beiden Tumorklassen (Primär- versus Rezidivtumor) durchzuführen. Dabei wiesen jedoch die Tumoren A181H, AOA54H und AA142 keine 100 % Zuordnung zu ihrer Tumorklasse auf, was wahrscheinlich an dem relativ kleinen Datensatz von 16 Tumoren lag. Von den 134 Genen fanden sich 51 unter den 70 Probensets der T-Test Analysen wieder. Die meisten der differentiell exprimierten Gene kodieren für Proteine, die möglicherweise von Bedeutung für die Entwicklung charakteristischer Anaplasie Merkmale im Rahmen der Gliomprogression sind. Dazu zählen erhöhte Proliferationsaktivität, verstärkte Migration und/oder Invasion, sowie gesteigerte Neoangiogenese. Bislang wurden nur einige dieser Gene im Zusammenhang mit der malignen Progression von Gliomen beschrieben. VEGF α wird beispielsweise in Glioblastomen verglichen mit Astrozytomen des WHO-Grades II oder III stärker exprimiert [103]. In der eigenen Serie von acht Primär- und Rezidivtumorpaaren, zeigten sieben der Rezidivtumoren höhere VEGFA Transkriptlevel als die entsprechenden Primärtumoren. Die *real-time* RT-PCR Analyse von 43 astrozytären Gliomen bestätigte, dass Glioblastome signifikant höhere VEGFA mRNA-Level aufweisen als Astrozytome und anaplastische Astrozytome. Interessanterweise zeigte sich eine höhere VEGFA Expression in primären als in sekundären Glioblastomen. Dies könnte möglicherweise durch die in den beiden Glioblastomformen unterschiedlichen genetischen Veränderungen erklärt werden kann. So ist es denkbar, dass PTEN Mutationen und EGFR Amplifikationen, die häufig in primären aber nur selten in sekundären Glioblastomen auftreten, eine verstärkte Expression von VEGFA durch die Aktivierung des Proteinkinase B/Akt Signalweges vermitteln [104, 105, 106]. Übereinstimmend mit diesen Annahmen fanden sich in primären Glioblastomen mit PTEN Mutation und EGFR Amplifikation höhere VEGFA Transkriptlevel als in sekundären Glioblastomen ohne diese genetischen Alterationen. Dieser Unterschied war jedoch in dem hier untersuchten Tumorkollektiv nicht signifikant. Neben der Hypoxie, die eigentlich der Hauptstimulus für die VEGF α Induktion ist, treten zusätzlich genetische Veränderungen auf, die VEGF α in Glioblastomen *in vivo* heraufregulieren. Eine neuere Studie untersuchte die Vorhersagbarkeit von astrozytären Gliomen anhand von Expressionsprofilen [138]. Hier wurde eine Gruppe von Genen identifiziert, die angiogenetisch aktiv sind und eine Unterscheidung von primären und sekundären Glioblastomen ermöglichen. Neben den Angiogenesefaktoren VEGF und *fms-related tyrosine kinase 1* war IGFBP2 unter diesen differentiell exprimierten Genen.

Topoisomerase II α (OMIM 162430) ist ein Schlüsselenzym zur Regulation der DNA Topologie und Replikation und zeigt eine erhöhte Expression in proliferierenden Zellen. Das Zentromerprotein F (CENPF; OMIM 600236) oder Mitosin ist zellzyklusabhängig exprimiert und zeigt die höchsten Transkriptlevel in der G2- und der M-Phase [107]. Immunhistochemische Studien haben bewiesen, dass die Expression von TOP2A und CENPF in Gliomen mit dem Malignitätsgrad ansteigt, was sie zu diagnostisch einsetzbaren Proliferationsmarkern macht [108, 109]. In den eigenen Mikroarrayanalysen astrozytärer Gliome bestätigte sich ein Expressionsanstieg mit zunehmendem Malignitätsgrad. In sekundären Glioblastomen waren die mRNA-Level von CENPF und TOP2A dabei signifikant höher als in primären Glioblastomen.

In der Literatur sind jedoch bislang keine Studien veröffentlicht worden, die ein schnelleres Wachstum von sekundären im Vergleich zu primären Glioblastomen beschrieben haben. Es besteht die Möglichkeit, dass die höhere *CENPF*- und *TOP2A*-Expression in sekundären Glioblastomen durch z.B. Genamplifikationen ausgelöst wird, wie sie bereits für beide Kandidaten in epithelialen Tumoren beschrieben wurden [111, 110]. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine *CENPF*- und *TOP2A*-Genamplifikationen in den untersuchten Gliomen nachgewiesen werden. Interessanterweise war die *TOP2A*-Expression in primären Glioblastomen mit *EGFR*-Amplifikation niedriger als in solchen ohne *EGFR*-Amplifikation. Dies läßt darauf schließen, dass die unterschiedlichen genetischen Veränderungen in primären und sekundären Glioblastomen die Expressionslevel von *CENPF* und *TOP2A* in den beiden Glioblastomentitäten verschieden beeinflussen.

Viele der mittels Mikroarrayanalyse identifizierten Gene sind bislang nicht mit der malignen Progression von Gliomen assoziiert worden. Hierzu gehören die Kollagengene *COL4A1* (OMIM 120130; 13q34), *COL4A2* (OMIM 120090; 13q34) und *COL5A2* (OMIM 120190; 2q31), die signifikant höhere Transkriptlevel in anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen aufwiesen als in WHO-Grad II Gliomen. Die *real-time* RT-PCR Analyse von *COL4A2* ergab signifikant höhere mRNA-Level in Rezidiv- versus Primärtumoren bzw. Gliomen höheren WHO-Grades. Die beiden Kollagene IV α 1 und 2 sind benachbart auf 13q34 lokalisiert, eine chromosomale Region, für die Amplifikationen in diesem Bereich mittels CGH (*comparative genomic hybridization*) in einzelnen sekundären Glioblastomen nachgewiesen wurden [23]. Die Duplex-PCR-Analyse der *COL4A2* Gendosis ergab jedoch keine Amplifikation in den untersuchten Gliomen der eigenen Serie. Immunhistochemisch zeigte sich hauptsächlich eine mit normalen und hyperplastischen Blutgefäßen assoziierte Expression der Kollagene IV und V in Gliomen [112]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die erhöhten Kollagen IV und V mRNA-Level wahrscheinlich mit einer verstärkten vaskulären Proliferation in hochgradigen Gliomen, hauptsächlich in Glioblastomen, einhergehen. Die immunhistochemische Färbung ausgewählter Fälle aus der eigenen Gliomserie bestätigte eine blutgefäßassoziierte Expression von Kollagen IV.

Die beiden Kandidatengene *FOXM1* (OMIM 602341; 12p13) und *MGP* (OMIM 154870; 12p13.1-p12.3) sind beide auf Chromosom 12p lokalisiert und zeigten in den untersuchten Gliomen mit zunehmender Malignität eine erhöhte Expression. Beide Gene waren von besonderem Interesse, da sie die stärksten Expressionsunterschiede zwischen Primär- und Rezidivtumoren aufwiesen und Amplifikationen bzw. Gewinne auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 bereits in einem Teil der hochgradigen Gliome beschrieben wurden [23]. Von anderen Autoren war beim Vergleich von pilozytischen Astrozytomen mit Glioblastomen ebenfalls höhere *FOXM1*-Transkriptlevel in den Glioblastomen detektiert worden [113]. Der *forkhead box M1* Transkriptionsfaktor ist ein wichtiger Regulator der Zellzyklusprogression und stimuliert die Expression der Zykline B und D1 [114]. Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Gli1, der das wichtigste Effektorprotein des *sonic hedgehog* Signalwegs darstellt, fungiert u.a. als transkriptioneller Akti-

vator von *FOXMI* [115]. Das *GLII*-Gen liegt auf 12q14 und ist mit *CDK4* in einem Teil der Glioblastome amplifiziert und überexprimiert [48]. Keines der acht untersuchten Gliompaare zeigte jedoch einen Anstieg der *GLII*-mRNA Expression beim Vergleich von WHO-Grad II zu WHO-Grad III oder WHO-Grad IV Gliomen, was dafür spricht, dass die gefundene Expressionserhöhung von *FOXMI* in diesen Fällen unabhängig von *GLII* ist. Eine interessante Frage in diesem Zusammenhang wäre, ob die malignitätsassoziierte *FOXMI* Expressionserhöhung in hochgradigen Gliomen eine Folge der im Vergleich zu WHO-Grad II Astrozytomen erhöhte Proliferationsaktivität ist oder die verstärkte Proliferation selbst mit verursacht. Die Analyse der *FOXMI* Gendosis in der eigenen Tumorserie einschließlich drei zusätzlich ausgewählte Gliome mit bekannter Amplifikation des *CCND2*-Gens (12p13) erbrachte zumindest keine *FOXMI*-Genamplifikation als mögliche Ursache des gefundenen Expressionsanstiegs. Daher kann *FOXMI* nicht als Zielgen der Amplifikation auf 12p13 in Gliomen angesehen werden.

Das Matrix Gla Protein (*MGP*) ist eine in verschiedenen Geweben exprimierte Vitamin K abhängige Komponente der extrazellulären Matrix. Keimbahnmutationen des *MGP*-Gens führen zu ektopischen Kalzifizierungen und Hypoplasien bei Patienten mit dem sog. Keutel-Syndrom [117]. Die Rolle von *MGP* in Neoplasien ist noch unklar. Eine im Verhältnis zum Normalgewebe erhöhte *MGP*-Expression wurde in Ovarialtumoren nachgewiesen [118]. Untersuchungen an Darm-, Prostata- und Nierenkarzinomen ergaben, dass das *MGP*-Transkriptlevel antiproportional zum Malignitätsgrad verläuft [120, 119]. Die eigenen Analysen zeigten einen signifikanten *MGP* mRNA-Anstieg von niedriggradigen zu hochgradigen astrozytären Gliomen. Eine *MGP*-Genamplifikation als mögliche Ursache der *MGP*-Überexpression ließ sich jedoch in keinem der untersuchten Gliome nachweisen.

Sowohl die Mikroarray-Untersuchung als auch die *real-time* RT-PCR Analysen ergaben, dass das IGF (*insulin-like growth factor*)-bindende Protein 4 (*IGFBP4*; OMIM 146733;17q12-q21) in Glioblastomen im Vergleich zu WHO-Grad II und III Gliomen stärker exprimiert wird. *IGFBP4* gehört zu einer Familie strukturell ähnlicher Proteine, die an der Regulation der IGF Funktion beteiligt sind, aber auch IGF unabhängig wirken [122, 121]. Im Rattengehirn wird *IGFBP4* in Astrozyten und oligodendrogialen Vorläuferzellen exprimiert, jedoch nicht in reifen Oligodendrozyten [123]. Die Funktion von *IGFBP4* in der Karzinogenese ist bislang wenig verstanden. Einzelne *in vitro* Studien berichten sowohl über wachstumshemmende Eigenschaften [124] als auch über antiapoptotische Effekte [125]. Ein Vergleich von niedriggradigen Gliomen mit Glioblastomen zeigte, dass ein weiteres IGF-bindendes Protein (*IGFBP2*) in Glioblastomen häufig überexprimiert wird [126]. In Übereinstimmung mit diesem Befund zeigten die eigenen Mikroarray-Daten für 4/8 Rezidivtumoren (2 sGBIV und 2 AAIII) eine erhöhte *IGFBP2*-Transkriptrate im Verhältnis zu den zugehörigen Primärtumoren. Dies reicht jedoch nicht aus, dass es *IGFBP2* in die Gruppe der 66 Kandidatengene mit statistisch signifikanter differentieller Expression mit mehr als zweifachem Expressionsunterschied schaffte.

Unter den Kandidatengen, die eine Expressionsreduktion in den malignen Rezidivtumoren zeigten, waren mehrere Gene auf dem langen Arm von Chromosom 10, wie *ABLIM* (OMIM

602330; 10q25), *ADD3* (OMIM 601568; 10q24.2-q24.3) und *CAMK2G* (OMIM 602123; 10q23). Deletionen auf 10q sind in der Mehrzahl der Glioblastome vorhanden [52]. Ungefähr 25-40 % der primären Glioblastome zeigen dabei Mutationen oder homozygote Deletionen des *PTEN* Tumorsuppressorgens auf 10q23. *PTEN* Alterationen in sekundären Glioblastomen sind dagegen selten [52]. Das deckt sich mit der Beobachtung, dass in der vorliegenden Serie von sekundären Glioblastomen keine *PTEN* Mutationen detektierbar waren. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auf Chromosom 10q noch ein oder mehrere glioblastomassoziierte Tumorsuppressorgene liegen müssen.

Adducin γ (*ADD3*) gehört zur Familie der ubiquitär exprimierten Adducin-Membranskelettproteine, die an den Spektrin-Aktin-Verzweigungen lokalisiert sind [128]. Veränderungen der Adducinexpression, des Phosphorylierungsgrades und der Lokalisation wurden bei zunehmender Malignität in Nierenkarzinomen beobachtet [129]. Ferner wurde gefunden, dass eine verminderte Expression von Adducin γ mit einer erhöhten migratorischen Aktivität humaner Gliomzellen *in vitro* verbunden ist [130]. Ein Vergleich mit nicht-neoplastischem Gehirngewebe zeigte für WHO-Grad II Astrozytome eine erniedrigte *ADD3*-Expression [131]. Der letztere Befund konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, jedoch nahmen die *ADD3*-Transkriptlevel in der Serie der acht Gliompaare mit zunehmender Malignität ab. Dieser Trend zeigte sich auch in der unabhängigen Serie von 43 Gliomen, obwohl nicht auf signifikantem Niveau. Es erscheint jedoch dennoch sinnvoll, die Bedeutung von *ADD3* als mögliches Tumorsuppressorgen in Gliomen näher zu untersuchen.

Das Aktin-bindende LIM Protein (*ABLIM*; Limatin) vermittelt die Interaktion von Aktinfilamenten mit Proteinen im Zytoplasma und verbindet dabei das Zytoskelett mit intrazellulären Signalwegen [132]. Die *ABLIM*-Expression war in malignen Rezidivgliomen signifikant niedriger als in den entsprechenden Primärtumoren. Die Expressionsanalyse der unabhängigen Serie von 43 Gliomen bestätigte die Expressionsabnahme mit zunehmendem Malignitätsgrad jedoch nicht.

Das dritte Kandidatengen auf 10q ist *CAMK2G*, das für die γ -Untereinheit der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) kodiert, die in Astrozyten und verschiedenen anderen Zelltypen exprimiert wird [133]. Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II ist ein wichtiger Effektor von Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen und scheint an der Zellzyklusprogression und der Apoptose beteiligt zu sein [134]. Ferner ist CaMKII am cytoplasmatischen Einstrom von Ca^{2+} über spannungsabhängige Kanäle bzw. Ryanodin- und IP3-sensitiven Kanälen beteiligt.

Das Gen für den Ryanodinrezeptor 1 (*RYR1*; OMIM 180901; 19q13.1) war ein weiterer Kandidat, dessen Expression in den hochgradigen Rezidivtumoren niedriger war als in den niedriggradigen Primärtumoren. *RYR1* liegt auf 19q13.1, eine Region, die mit Allelverlusten im Rahmen der malignen Progression von Gliomen einhergeht [24]. Das *RYR1*-Gen kodiert für einen intrazellulären Ca^{2+} -Transporter, der Ca^{2+} vom endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma transloziert. Eine reduzierte Ryr1-Aktivität führte in LNCaP-Prostatatumorzellen zur

Inhibierung der Apoptose [135]. Da die Ca^{2+} -vermittelten Signalwege über die CaMKII unter anderem von den Ryanodinrezeptoren abhängig sind, wäre es denkbar, dass bei einer Fehlregulation der Gene *CAMK2G* und *RYR1* ein additiver Effekt entsteht, der einen Wachstumsvorteil durch Inhibierung von Apoptose verschaffen könnte. Die *real-time* RT-PCR-Analysen verifizierten die Mikroarray-Ergebnisse für die acht Gliompaare. In der unabhängigen Serie von 43 Gliomen ließ sich jedoch keine signifikante *RYR1* mRNA-Reduktion mit zunehmender Malignität feststellen.

SELL (L-Selektin; OMIM 153240; 1q23-q25) kodiert für ein Adhäsionsmolekül, das an der Zelloberfläche von Leukozyten exprimiert wird. L-Selektin ist entscheidend an der Adhäsion von Leukozyten an das vaskuläre Endothel beteiligt. Neuere Studien zeigen, dass es im Mausmodell die Entwicklung von Metastasen vermittelt [136]. Die Expressionsanalysen in der vorliegenden Arbeit zeigten eine im Verhältnis zu nicht-neoplastischem Gehirngewebe erhöhte *SELL*-Expression in astrozytären Gliomen, die wahrscheinlich auf eine reaktive mononukleäre Infiltrationen des Tumorgewebes zurückzuführen ist. Schwieriger zu erklären ist die abnehmende Expression bei zunehmender Malignität der Tumoren. Die Behandlung mit Glucocorticoiden führt zu einer starken Reduktion von L-Selektin in Leukozyten [137]. Häufig wird vor der Operation eines Patienten mit einem malignen Gliom eine Glucocorticoidbehandlung durchgeführt, um das perifokale Ödem und damit Hirndruck-bedingte Symptom zu reduzieren. Bei Patienten mit niedriggradigen Astrozytomen des WHO-Grades II ist die Ödembildung meist gering, so dass Glucocortikoide selten eingesetzt werden. Daher ist es durchaus möglich, dass die gefundene verminderte *SELL*-Expression in hochgradigen Gliomen durch die unterschiedliche operative Vorbehandlung bedingt ist. Die Expressionsanalyse einer größeren Fallserie von 43 Gliomen ergab dann auch keine signifikante Reduktion der *SELL*-mRNA bei zunehmendem Malignitätsgrad mehr. Insgesamt sprachen die eigenen Ergebnisse und die Literaturdaten somit gegen eine signifikante Bedeutung von *SELL* für die spontane maligne Progression von Gliomen.

4.4 Vergleich der mittels SSH- und Mikroarray-Analysen erreichten Ergebnisse

Die Expressionsprofilerstellung mittels SSH und Mikroarray-Analysen lieferte zahlreiche Transkripte, die zwischen Primär- und Rezidivgliomen differentiell exprimiert waren. Mit der SSH-Methode wurden 41 Kandidatengene identifiziert, die eine differentielle Expression in mindestens 2 der 4 untersuchten Tumorpaare aufwiesen. Von diesen Genen waren 20 auf den Hu6800FL-Chips repräsentiert. Die Mikroarray-basierte Expressionsanalyse dieser Kandidaten in acht Tumorpaaren zeigte lediglich für das Gen *APOD* eine Übereinstimmung mit den Expressionsdaten der SSH. Drei der acht untersuchten Tumorpaare (1, 2 und 7) wurden auch mit der SSH-Methode analysiert. Die Berechnung des mittleren Expressionsverhältnisses dieser drei Tumorpaare aus den Daten der Mikroarray-Analyse, bezogen auf die 20 Kandidatengene, zeigte zusätzlich für die Gene *GOS0* und *APOD* eine mehr als zweifache differentielle Expressi-

on. Dies bedeutet somit, dass für 3 von 20 mittels SSH gefundenen Kandidaten eine Bestätigung durch die Mikroarray-Analysen erzielt wurde. Dieser geringe Prozentsatz kann durch verschiedene Tatsachen bedingt sein. Durch den suppressiven Effekt der SSH werden hauptsächlich seltene bzw. schwach überexprimierte Transkripte angereichert [57, 58], deren Expressionsunterschiede mit der Mikroarraymethode nicht zwingenderweise identifizierbar sind. Die *Human UniGene* Filtersets repräsentieren 36000 cDNA-Klone, die humane Gene und ESTs darstellen. Dahingegen beherbergen die Hu6800FL-Arrays lediglich 6800 humane Gene, die durch 20 Oligonukleotide repräsentiert sind, die von 3' nach 5' einen Bereich von 240 bp der cDNA-Sequenz abdecken. Insgesamt sind 4318 Gene auf beiden Arrays repräsentiert. Die unterschiedliche Anzahl der vorhandenen Gene und die unterschiedliche Gendarstellung auf dem jeweiligen Array kann zur Identifizierung von verschiedenen Kandidaten führen. Einige weitere methodisch bedingte Unterschiede zwischen den beiden Techniken können ebenfalls zu Unterschieden in der Kandidatengenidentifizierung führen. Für die SSH und die Mikroarrays wurde aus der Tumor-RNA zunächst cDNA synthetisiert, die dann im Falle der subtraktiven Hybridisierung durch die Restriktionsendonuklease *RsaI* an der Stelle GTAC gespalten wurde. Das führt zu kleineren cDNA-Fragmenten mit einer Größe zwischen 0,1-2 kb (durchschnittlich ~600 bp) statt 0,5-10 kb. Dieser Schritt hat zwei wichtige Vorteile. Erstens, kurze DNA-Fragmente rehybridisieren kinetisch bedingt schneller als lange DNA-Fragmente [57]. Zweitens, die Generierung kleinerer Fragmente ermöglicht die bessere Repräsentation eines jeden individuellen Gens [57]. cDNAs haben häufig kodierende Sequenzen, die mit Mitgliedern von ähnlichen Genfamilien kreuzhybridisieren können und daher in dem Subtraktionsschritt eliminiert werden [153]. Auf der anderen Seite können verschiedene Fragmente derselben cDNA bezüglich ihrer Hybridisierungs- und Amplifikationseigenschaften derart variieren, dass sie nicht hybridisiert oder amplifiziert werden [151, 152]. Einige differentiell exprimierte cDNAs können deshalb während der SSH verloren gehen, wohingegen andere Fragmente derselben cDNA angereichert und isoliert werden [57]. Schließlich besteht bei den in der eigenen Arbeit verwendeten Kombination von SSH mit Hybridisierung von *Human UniGene* Filtern des RZPD die Gefahr von falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnissen, da bekanntermaßen etwa ein Viertel der Spots auf den Filtern nicht korrekt annotiert ist.

Die statistische Analyse der Mikroarrays wurde zum einen anhand einer T-Test-Statistik und zum anderen anhand der geschrumpften Zentroide [59] durchgeführt. Beide Analysen identifizierten unterschiedliche Kandidatengensätze mit einer Übereinstimmung von 51 Genen, die in beiden Methoden hervortraten. Hier zeigt sich, dass verschiedene statistische Analysen unterschiedliche Resultate hervorbringen und Kandidaten, die spezifischen Kriterien gehorchen, nicht berücksichtigen. Durch den Prozeß der Datennormalisierung gehen bereits zu Beginn der Analyse solche Kandidaten verloren, die nur geringe Expressionsunterschiede aufweisen. Diese Gene können besser durch Verwendung der SSH-Methode angereichert und identifiziert werden.

4.5 Funktionelle Analysen von FOXM1 und MGP in Gliomzelllinien

Die beiden Kandidatengene *FOXM1* und *MGP* zeigten in den Mikroarray- und *real-time* RT-PCR-Analysen eine deutliche Expressionserhöhung in malignen Rezidivgliomen im Vergleich zu niedriggradigen Primärtumoren. Zusätzlich konnte in der unabhängigen Serie astrozytärer Gliome für beide Gene eine malignitätsassoziierte Expressionserhöhung nachgewiesen werden. Diese Befunde sowie ihre Lokalisation auf 12p13, eine Region, die in einem Teil der hochgradigen Gliome genomische Zugewinne aufweist [23], stellte die beiden Gene *FOXM1* und *MGP* als interessante Kandidaten für weiterführende Untersuchungen heraus.

Der proliferationsassoziierte Transkriptionsfaktor Foxm1 wurde bereits in der Literatur mit gesteigerten Expressionsleveln in Glioblastomen beschrieben [113]. Überexpressionsexperimente in Maushepatozyten steigerten die Proliferation und zeigten eine Expressionserhöhung von Cyclin B1 aber nicht Cyclin D1 [114]. Um die mögliche Bedeutung von *FOXM1* für das Wachstum von Gliomzellen näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Glioblastomzelllinien auf eine gesteigerte *FOXM1*-Expression hin analysiert. Glioblastomzelllinien mit erhöhtem Expressionslevel wurden dann mit spezifisch gegen *FOXM1* gerichteten siRNAs behandelt und die Auswirkungen auf die mRNA- und Proteinexpression sowie Proliferationsaktivität und Vitalität der Zellen hin analysiert. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Glioblastomzelllinie T98G wies konstitutiv erhöhte *FOXM1*-Expression auf, die durch spezifische siRNAs auf mRNA- und auf Proteinebene signifikant herunterreguliert werden konnten. Von den beiden verwendeten siRNAs wies dabei siRNA2 im Vergleich zu siRNA1 eine stärkere Proteinreduktion auf, was mit einer signifikant verminderten Proliferation ($p=0,0078$) einherging. In Analogie zu den eigenen Erfahrungen zeigten Scacheri *et al.*, dass verschiedene siRNAs gegen *MEN1* (*multiple endocrine neoplasia, type 1*) sowohl dessen Transkript- als auch Proteinlevel in HeLa-Zellen reduzierten, jedoch der Grad der Reduktion individuell von der jeweiligen siRNA abhing [142]. Weiterhin wurde über unspezifische Reaktionen berichtet, die die Genexpression von homologen mRNAs alterierten [140]. So konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte siRNAs nicht nur die Expression des Zielgens verändern, sondern auch die Transkriptmenge von solchen mRNAs reduzieren, die lediglich elf homologe Nukleotide zu dieser siRNA aufweisen [140]. Die an der RNA-Interferenz beteiligten Enzymkomplexe sind außer der akuten Immunantwort auch an der Generierung von sog. mikroRNAs (miRNAs) beteiligt. MikroRNAs sind 22 nt große doppelsträngige RNA Moleküle, die aus haarnadelstrukturartigen Vorläufern synthetisiert werden [143, 146]. Sie induzieren eine Translationsrepression und Inhibierung der Proteinbiosynthese und tragen somit zur verminderten Expression des jeweiligen Zielgens bei [150]. Es wäre denkbar, dass kurze RNA-Fragmente, die durch den enzymatischen Abbau der Ziel-mRNA entstanden sind, in die Maschinerie der miRNA vermittelten Translationsrepression integriert werden und somit die Proteinbiosynthese homologer mRNAs inhibieren und daher abweichende Effekte generieren.

Die mit den Farbstoffen MTT und Kristallviolett überprüfte Vitalität der Gliomzellen zeigte

keine signifikanten Veränderungen nach siRNA-Behandlung. Mögliche Effekte auf Migration oder Invasion der Zellen müssen zukünftige Experimente zeigen.

Das *MGP* ist eine Vitamin K abhängige Komponente der extrazellulären Matrix, deren Rolle in Neoplasien noch unklar ist. In Ovarialtumoren konnten gesteigerte *MGP*-Transkriptlevel im Verhältnis zu nicht-neoplastischem Gewebe nachgewiesen werden [118]. Untersuchungen an Darm-, Prostata- und Nierenkarzinomen berichteten über eine zum Malignitätsgrad antiproportionale *MGP*-Expression [119, 120]. Die Behandlung der CCF-STTG1 Glioblastomzelllinie, die eine konstitutiv gesteigerte *MGP*-Expression aufweist, mit siRNAs gegen *MGP* sollte Aufschlüsse über eine mögliche Bedeutung von *MGP* für Proliferation und Vitalität von Gliomzellen geben. Zwei geeignete siRNAs gegen *MGP* konnten dessen Transkriptlevel effektiv um bis zu 96 % reduzieren. Eine signifikante Reduktion ($p=0,0052$) der Proliferation zeigten jedoch nur die mit siRNA1 behandelten Zellen. Die Vitalität wies keine signifikanten Veränderungen auf.

Für die Expressionsanalysen standen zum Anfertigungszeitpunkt der Arbeit keine Antikörper gegen *MGP* zur Verfügung, so dass die Proteinmengen nicht quantifiziert werden konnten. Auch hier ist es möglich, dass die verwendeten siRNAs unterschiedliche Effekte auf die Translation des *MGP*-Transkripts hatten und dadurch die Proliferation verschiedenartig beeinflussten.

5 Zusammenfassung

Diffus infiltrierende astrozytäre Gliome sind die häufigsten primären Tumoren des zentralen Nervensystems im Erwachsenenalter. Nach operativer Entfernung treten wegen des infiltrativen Wachstumsverhaltens und der Resistenz gegenüber den derzeit verfügbaren adjuvanten Therapieverfahren (Bestrahlung und Chemotherapie) häufig Rezidive auf. Ein signifikanter Anteil der diffusen Astrozytome des WHO-Grades II rezidiert dabei spontan als anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III) oder als sekundäres Glioblastom (WHO-Grad IV), d.h. durchläuft eine maligne Progression. Dieses Phänomen ist von entscheidender klinischer Bedeutung, da es die Haupttodesursache von Patienten mit astrozytären Gliomen darstellt. Die molekularen Mechanismen, die der malignen Progression zugrunde liegen, sind bislang nur wenig verstanden. Frühere Studien haben sich hauptsächlich auf chromosomale und genetische Veränderungen konzentriert. Daher war es das Ziel der eigenen Arbeit, die molekularen Grundlagen der malignen Progression von astrozytären Gliomen anhand der Erstellung von Expressionsprofilen besser zu verstehen. Hierzu wurden zwei verschiedene methodische Ansätze verwendet. Zur raschen Identifizierung von bekannten Genen, die zwischen den niedriggradigen Primär- und malignen Rezidivgliomen differentiell exprimiert sind, wurden Mikroarray-Analysen mit Hu6800FL-Chips (Affymetrix) durchgeführt. Die Verwendung dieser Mikroarrays erlaubt die gleichzeitige Expressionsanalyse von 6800 verschiedenen humanen Genen. Mit diesem Ansatz wurden Primär- und Rezidivgliome von acht Patienten untersucht, wobei die Primärtumoren dem WHO-Grad II und die Rezidivgliome dem WHO-Grad III oder IV entsprachen. Alle untersuchten Tumoren wurden nicht nur histologisch, sondern auch eingehend molekular-genetisch charakterisiert. Zur Untersuchung schwach exprimierter Gene sowie weiterer Gene, die nicht auf dem Hu6800FL-Chip repräsentiert sind, wurde als zweiter methodischer Ansatz die suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH) mit nachfolgender Hybridisierung der SSH-Produkte auf *Human UniGene* Filter (RZPD Berlin) an vier Primär- und Rezidivgliompaaren durchgeführt. Beide Ansätze lieferten zahlreiche neue Kandidatengene, die potentiell an der malignen Progression astrozytärer Gliome beteiligt sein könnten. Aus diesem Kandidatengenpool wurden 20 Gene mittels *real-time* RT-PCR an 12 Rezidivgliompaaren und einer unabhängigen Serie von 43 Gliomen unterschiedlicher Malignität (9 Astrozytome, 10 anaplastische Astrozytome, 17 primäre und 7 sekundäre Glioblastome) validiert. Für 10 von 12 Genen, die mittels der Hu6800FL-Chips identifiziert wurden (*ADD3*, *CAMK2G*, *CENPF*, *COL4A2*, *FOXMI*, *IGFBP4*, *MGP*, *TOP2A* und *VEGFA*), konnte eine differentielle Expression in astrozytären Gliomen unterschiedlicher Malignität verifiziert werden, ebenso für drei von acht ausgewählten Kandidatengenen, die mittels des SSH-Ansatzes gefunden wurden (*AMOG*, *APOD* und *DRRI*). Für die beiden Gene mit der höchsten Expressionsdifferenz zwischen Primär- und Rezidivtumoren (*FOXMI* und *MGP*) wurden zusätzlich *in vitro* Untersuchungen durchgeführt. In Glioblastomzelllinien, die entweder den Transkriptionsfaktor FOXM1 (T98G) oder das extrazelluläre Matrixprotein MGP (CCF-STTG1) überexprimierten, wurde die RNA-Interferenz-Technologie zur

Reduktion der Expression der entsprechenden Transkripte eingesetzt. In *real-time* RT-PCR Analysen konnte hierdurch eine Verminderung der mRNA-Level beider Gene um 91 % (*FOXMI*) bzw. 99 % (*MGP*) erreicht werden. Western-Analysen zeigten auch auf Proteinebene eine verminderte Expression von Foxm1 nach siRNA-Behandlung. Anschließende Untersuchungen zur Vitalität und Proliferation der transfizierten Zellen konnten keine Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen feststellen, während die Proliferation durch *FOXMI*-siRNA und *MGP*-siRNA Behandlung signifikant erniedrigt wurde. Zusammengenommen konnten somit eine ganze Reihe neuer Kandidatengene identifiziert und verifiziert werden, deren differentielle Expression wahrscheinlich von grundlegender Bedeutung für die spontane maligne Progression astrozytärer Gliome ist. Die erzielten Ergebnisse bieten interessante Perspektiven sowohl im Hinblick auf weitergehende Untersuchungen zu den der gefundenen differentiellen Expression zugrunde liegenden genetischen oder epigenetischen Mechanismen als auch bezüglich der Entwicklung neuer diagnostischer und prognostischer Marker.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Cavenee WK, Furnari FB, Nagane M, Huang H-JS, Newcomb EW, Bigner DD, Weller M, Berens ME, Plate KH, Israel MA, Noble MD und Kleihues P (2000) Astrocytic Tumors. In: Kleihues P and Cavenee WK "World Health Organization Classification of Tumors - Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System", IARC Press, 2000
- [2] McCormack BM, Miller DC, Budzilovic GN, Voorhees GJ, and Ransohoff J (1992) Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults - 1977-1988. *Neurosurgery* 31: 636-642
- [3] Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK und DePinho RA (2001) Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15: 1311-1333
- [4] Burger PC, Vogel FS, Grenn SB, and Strike TA (1985) Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathological criteria and prognostic implications. *Cancer* 46: 1179-1186
- [5] Nelson DF, Nelson JS, Davis DR, Chang CH, Griffin TW, and Pajak TF (1985) Survival and prognosis of patients with astrocytoma with atypical or anaplastic features. *J Neurooncol* 3: 99-103
- [6] Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J and Kelly P (1988) Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62: 2152-2165
- [7] Kim TS, Halliday AL, Hedley W and Convery K (1991) Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. *J Neurosurg* 74: 27-37
- [8] Vertosick FT, Selker RG and Arena VC (1991) Survival of patients with well-differentiated astrocytomas diagnosed in the era of computed tomography. *Neurosurgery* 28: 496-501
- [9] Bigner SH and Vogelstein B (1990) Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastomas. *Brain Pathol* 1: 12-18
- [10] Schröck E, Blume C, and Meffert MC (1996) Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 15: 199-205
- [11] Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efrid JT, Deimling A von, and Louis DN (1996) *CDKN2/p16* or *RB* alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56: 150-153

- [12] Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, and Collins VP (1996) Human glioblastomas with no alterations of the *CDKN2A* ($p16^{\text{INK4a}}$, MTS1) and *CDK4* genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 13: 1065-1072
- [13] Collins VP and James CD (1993) Gene and chromosomal alterations associated with the development of human gliomas. *FASEB J* 7: 926-930
- [14] Böglér O, Huang HJS, Kleihues P, and Cavenee WK (1995) The *p53* gene and its role in human brain tumors. *Glia* 15: 308-327
- [15] Alderson LM, Castleberg RL, Harsh GR, Louis DN, and Henson JW (1995) Human gliomas with wild-type *p53* express *bcl-2*. *Cancer Res* 55: 999-1001
- [16] Hermanson M, Funa K, and Koopmann J (1996) Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res* 56: 164-171
- [17] Rubio M-P, Correa KM, and Ramesh V (1994) Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas. *Cancer Res* 54: 45-47
- [18] Hoang-Xuan K, Merel P, and Vega F (1995) Analysis of the *NF2* tumor-suppressor gene and chromosome 22 deletions in gliomas. *Int J Cancer* 60: 478-481
- [19] Watkins D, Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Poisson M, Delattre JY, and Roleau GA (1996) Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human gliomas does not inactivate the neurofibromatosis type 2 gene. *Cancer Genet Cytogenet* 92: 73-78
- [20] James CD, He J, Carlbom E, Nordenskjöld M, Cavenee WK, and Collins VP (1991) Chromosome 9 deletion mapping reveals interferon α and interferon β -1 gene deletions in human glial tumors. *Cancer Res* 51: 1684-1688
- [21] Fults D, Petronio J, Bradley DN, and Pedone CA (1992) Chromosome 11p15 deletions in human malignant astrocytomas and primitive neuroectodermal tumors. *Genomics* 14: 799-801
- [22] Sonoda Y, Iizuka M, and Yasuda J (1995) Loss of heterozygosity at 11p15 in malignant glioma. *Cancer Res* 55: 2166-2168
- [23] Weber RG, Sabel M, Reifenberger J, Sommer C, Oberstrass J, Reifenberger G, Kiessling M, and Cremer T (1996) Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. *Oncogene* 13: 983-994
- [24] Deimling A von, Bender B, and Jahnke R (1994) Loci associated with malignant progression in astrocytomas: a candidate on chromosome 19q. *Cancer Res* 54: 1397-1401

- [25] Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, and Collins VP (1994) *CDKN2 (p16/MTS1)* gene deletion or *CDK4* amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54: 6321-6324
- [26] Rosenberg JE, Lisle DK, Burwick JA, Ueki K, Deimling A von, Mohrenweiser HW, and Louis DN (1996) Refined deletion mapping of the chromosome 19q glioma tumor suppressor gene to the *D19S412-STD* interval. *Oncogene* 13: 2483-2485
- [27] Collins VP (1995) Gene amplification in human gliomas. *Glia* 15: 289-296
- [28] Muleris M, Almeida A, and Dutrillaux AM (1994) Oncogene amplification in human gliomas: a molecular cytogenetic analysis. *Oncogene* 9: 2717-2722
- [29] Schröck E, Thiel G, and Lozanova T (1994) Comparative genomic hybridisation of human malignant gliomas reveals multiple amplifications sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol* 144: 1203-1218
- [30] Kim DH, Mohapatra G, Bollen A, Waldman FM, and Feuerstein BG (1995a) Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme tumors and glioma cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 60: 812-819
- [31] Mohapatra G, Kim DH, and Feuerstein BG (1995) Detection of multiple gains and losses of genetic material in ten glioma cell lines by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 13: 86-93
- [32] Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers JM JL, Oberstrass J, An H-X, Niederacher D, Wechsler W, and Reifenberger G (1996) Analysis of *p53* mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 824-833
- [33] Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, and Ohgaki H (1996) Overexpression of EGF receptor and *p53* mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6: 217-223
- [34] Merlo A, Herman JG, and Mao L (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor *p16/CDKN2/MTS1* in human cancers. *Nat Med* 1: 686-692
- [35] Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Tornout JM van, and Jones PA (1995) Methylation of the 5'-CpG island of the *p16/CDKN2* tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 55: 4531-4535

- [36] Schmidt EE, Ichimura K, Messerle KR, Goike HM, and Collins VP (1997) *CDKN2 (p16/MTS1)* gene deletion or *CDK4* amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54: 6321-6324
- [37] Costello JF, Berger MS, Huang HJS, and Cavenee WK (1996) Silencing of *p16/CDKN2* expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 56: 2405-2410
- [38] James CD, Carlbom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjöld M, Collins VP, and Cavenee WK (1988) Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 48: 5546-5551
- [39] Steck PA, Pershouse MA, and Jasser SA (1997) Identification of a candidate tumor suppressor gene, *MMAC*, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15: 356-362
- [40] Li J, Yen C, and Liaw D (1997) *PTEN*, a putative protein tyrosin phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943-1947
- [41] Mollenhauer J, Wiemann S, and Scheurlen W (1997) *DMBT1*, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumors. *Nat Genet* 17: 32-39
- [42] Ligon AH, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WKA, and Steck PA (1997) Identification of a novel gene product, *RIG*, that is down-regulated in human glioblastoma. *Oncogene* 14: 1075-1081
- [43] Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, and Collins VP (1991) Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha and epidermal growth factor and their expression in human gliomas *in vivo*. *Cancer Res* 51: 2164-2172
- [44] Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, and Collins VP (1990) Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *PNAS USA* 87: 8602-8606
- [45] Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, Olson JJ, Liu L, Collins VP, and James CD (1994) Functional characterisation of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with *EGFR* gene amplification. *Oncogene* 9: 2313-2320
- [46] Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, and Huang HJS (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *PNAS USA* 91: 7727-7731

- [47] Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, and Collins VP (1994a) Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicon shows preferential involvement of *CDK4*, *SAS*, and *MDM2*. *Cancer Res* 54: 4299-4303
- [48] Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahloun AG, Meltzer PS, and Collins VP (1996a) Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests *CDK4/SAS* and *MDM2* as independent amplification targets. *Cancer Res* 56: 5141-5145
- [49] Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, and Collins VP (1993) Amplification and overexpression of the *MDM2* gene in a subset of human malignant gliomas without *p53* mutation. *Cancer Res* 53: 2736-2739
- [50] Reyes-Mugica M, Rieger-Christ K, and Ohgaki H (1997) Loss of *DCC* expression and glioma progression. *Cancer Res* 57: 382-386
- [51] Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, and Ohgaki H (1997) Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (*de novo*) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* 94: 303-309
- [52] Kleihues P and Ohgaki H (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neurooncol* 1: 44-51
- [53] Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, and Cavanee WK (2000) Glioblastoma. In: Kleihues P and Cavanee WK. *Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. WHO Classification of Tumors*. Lyon, France: IARC Press. 29-39
- [54] Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, and Ohgaki H (2000) Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 539-543
- [55] Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, and Ohgaki H (2001) Promoter hypermethylation of the *RBI* gene in glioblastomas. *Lab Invest* 81: 77-82
- [56] Reifenberger G and Collins VP (2004) *Pathology and Molecular Genetics of Astrocytic Gliomas*. *J Mol Med im Druck*
- [57] Diatchenko L, Lau Y-FC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED und Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci* 93: 6025-6030
- [58] Diatchenko L, Chenchik A und Siebert PD (1998) Suppression subtractive hybridization: A method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly (A⁺) or total

- RNA. In: Siebert PD and Larrick J "RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis" BioTechniques Books, MA: 213-239
- [59] Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B and Chu G (2002) Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 99: 6567-6572
- [60] Hamada H and Kagunaga T (1982) Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* 298: 396-398
- [61] Weber RG, Jones CR, Lohse MJ and Palacios JM (1990) Autoradiographic visualization of A₁ adenosine receptors in rat brain with [3H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine. *J Neurochem* 54: 1344-1353
- [62] Budowle B, Giusti AM, Wayne JS, Baechtel FS, Fournery RM, Adams DE, Presley LA, Deadman HA and Monson KL (1991) Fixed-bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci, for use in forensic comparison. *Am J Human Genet* 48: 841-855
- [63] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- [64] Joliffe IT (1986) *Principal Component Analysis*. Springer Verlag, New York
- [65] Model F, Koenig T, Piepenbrock C and Adorjan P (2002) Statistical process control for large scale microarray experiments. *Bioinformatics* 1: 1-9
- [66] Eisen MB, Spellma PT, Brown PO, and Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14863-14868
- [67] Mueller W, Hartmann C, Hoffmann A, Lanksch W, Kiwit J, Tonn J, Veelken J, Schramm J, Weller M, Wiestler OD, Louis DN und von Deimling A (2002) Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. *Am J Pathol* 161: 313-319
- [68] Fielding PE and Fielding CJ (1980) A cholesteryl ester transfer complex in human plasma. *Proc Nat Acad Sci* 77: 3327-3330
- [69] Diez-Itza I, Vizoso F, Merino AM, Sanchez LM, Tolivia J, Fernandez J, Ruibal A und Lopez-Otin C (1994) Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *Am J Pathol* 144(2): 310-320
- [70] Provost PR, Marcel YL, Milne RW, Weech PK und Rassart E (1991) Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. *FEBS Lett* 290(1-2): 139-141

- [71] Simard J, Dauvois S, Haagensen DE, Levesque C, Merand Y und Labrie F (1990) Regulation of progesteron-binding breast cyst protein GCDFP-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer. *Endocrinology* 126(6): 3223-3231
- [72] Simard J, Veilleux R, de Launoit Y, Haagensen DE und Labrie F (1991) Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 51(16): 4336-4341
- [73] Haagensen DE, Stewart P, Dilley WG and Wells SA (1992) Secretion of breast gross cystic disease fluid proteins by T47D breast cancer cells in culture - modulation by steroid hormones. *Breast Cancer Res Treat* 23(1-2): 77-86
- [74] Sugimoto K, Simard J, Haagensen DE und Labrie F (1994) Inverse relationships between cell proliferation and basal or androgen-stimulated apolipoprotein D secretion in LNCaP human prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 51(3-4): 167-174
- [75] Hunter S, Young A, Olson J, Brat DJ, Bowers G, Wilcox JN, Jaye D, Mendrinos S und Neish A (2002) Differential expression between pilocytic and anaplastic astrocytomas: identification of apolipoprotein D as a marker for low-grade, non-infiltrating primary CNS neoplasms. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(3): 275-281
- [76] Senner V, Schmidtpeter S, Braune S, Püttmann S, Thanos S, Bartsch U, Schachner M und Paulus W (2003) AMOG/ β 2 and glioma invasion: does loss of AMOG make tumor cells run amok? *Neuropathol App Neurobiol* 29: 370-377
- [77] Wang L, Darling J, Zhang J-S, Liu W, Qian J, Bostwick D, Hartmann L, Jenkins R, Bardenhauer W, Schutte J, Opalka B und Smith DI (2000) Loss of expression of the *DRR1* gene at chromosomal segment 3p21.1 in renal cell carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 27: 1-10
- [78] Rickman DS, Bobek MP, Misek DE, Kuick R, Blaiwas M, Kurnit DM, Taylor J und Hanash SM (2001) Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 61(18): 6885-6891
- [79] Wang Y, Han KJ, Pang XW, Vaughn HA, Qu W, Dong XY, Peng JR, Zhao HT, Rui JA, Leng XS, Cebon J, Burgess AW und Chen WF (2002) Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol* 169(2): 1102-1109
- [80] Molthagen M, Schachner M und Bartsch U (1996) Apoptotic cell death of photoreceptor cells in mice deficient for the adhesion molecule on glia (AMOG, the β 2-subunit of the Na,K-ATPase). *J Neurocytol* 25: 243-255

- [81] Magyar JP, Bartsch U, Wang Z-G, Howells N, Aguzzi A, Wagner EF und Schachner M (1994) Degeneration of neural cells in the central nervous system in mice deficient in the gene for the adhesion molecule on glia, the β 2-subunit of murine Na,K-ATPase. *J Cell Biol* 127: 835-845
- [82] Yamato T, Orikasa K, Fukushige S, Orikasa S und Horii A (1999) Isolation and characterization of the novel gene, TU3A, in a commonly deleted region on 3p14.3→p14.2 in renal cell carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* 87: 291-295
- [83] Kraemer C, Weil B, Christmann M und Schmidt ER (1998) The new gene *DmX* from *Drosophila melanogaster* encodes a novel WD-repeat protein. *Gene* 216: 267-276
- [84] Kraemer C, Enklaar T, Zabel B und Schmidt ER (2000) Mapping and structure of *DMXL1*, a human homologue of the *DmX* gene from *Drosophila melanogaster* coding for a WD repeat protein. *Genomics* 64: 97-101
- [85] Moss J und Vaughan M (1998) Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* 34: 21431-21434
- [86] Chavrier P und Goud B (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 11: 466-475
- [87] D'Souza-Shorey C, Boshans RL, McDonough M, Stahl PD und van Aelst L (1997) A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J* 16: 5445-5454
- [88] Radhakrishna H, Klausner RD und Donaldson JG (1997) ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol* 139: 49-61
- [89] Radhakrishna H, Al-Awar O, Khachikian Z und Donaldson JG (1999) ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci* 112: 855-866
- [90] Zhang Q, Calafat J, Janssen H und Greenberg S (1999) ARF6 is required for growth factor- and rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to rac membrane targeting. *Mol Cell Biol* 19: 8158-8168
- [91] Boshans RL, Szanto S, van Aelst L und D'Souza-Shorey C (2000) ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol* 20: 3685-3694
- [92] Rundlett SE et al (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci* 93: 14503-14508

- [93] Vidal M und Gaber RF (1991) RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 6317-6327
- [94] van Lint C, Emiliani S und Verdin E (1996) The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Exp* 5: 245-253
- [95] Durrin LK, Mann RK, Kayne PS und Grunstein M (1991) Yeast histone H4 N terminal sequence is required for promoter activation *in vivo*. *Cell* 65: 1023-1031
- [96] Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389: 349-352
- [97] Gray SG und Ekström TJ (2001) The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 262: 75-83
- [98] Deckert J und Struhl K (2001) Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol Cell Biol* 21: 2726-2735
- [99] Khochbin S, Verdel A, Lemercier C und Seigneurin-Berny D (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* 11: 162-166
- [100] Glaser KB, Li J, Staver MJ, Wei R-Q, Albert DH und Davidsen SK (2003) Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA.
- [101] Baris O, Savagner F, Nasser V, Loriod B, Granjeaud S, Guyetant S, Franc B, Rodien P, Rohmer V, Bertucci F, Birnbaum D, Malthiery Y, Reynier P und Houlgatte R (2004) Transcriptional profiling reveals coordinated up-regulation of oxidative metabolism genes in thyroid oncocytic tumors. *J Clin End Met* 89: 994-1005
- [102] Korkola JE, DeVries S, Fridlyand J, Hwang ES, Estep ALH, Chen Y-Y, Chew KL, Dairkee SH, Jensen RM und Waldman FM (2003) Differentiation of lobular *versus* ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. *Cancer Res* 63: 7167-7175
- [103] Machein MR und Plate KH (2000) VEGF in brain tumors. *J Neurooncol* 50: 109-120
- [104] Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M und Vogt PK (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 97: 1749-1753
- [105] Maity A, Pore N, Lee J, Solomon D und O'Rourke DM (2000) Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res* 60: 5879-5886

- [106] Huang J und Kontos CD (2002) Pten modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J Biol Chem* 277: 10760-10766
- [107] Liao H, Winkfein RJ, Mack G, Rattner JB und Yen TJ (1995) CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol* 130: 507-518
- [108] Holden JA und Townsend JJ (1999) DNA topoisomerase II-alpha as a proliferation marker in astrocytic neoplasms of the central nervous system: correlation with MIB1 expression and patient survival. *Mod Pathol* 12: 1094-1100
- [109] Korkolopoulou P, Patsouris E, Konstantinidou AE, Christodoulou P, Thomas-Tsagli E, Kouzelis K, Angelidakis D, Rologis D und Davaris P (2001) Mitosin and DNA topoisomerase II-alpha: two novel proliferation markers in the prognostication of diffuse astrocytoma patient survival. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9: 207-214
- [110] Varis A, Wolf M, Monni O, Vakkari ML, Kokkola A, Moskaluk C, Frierson HJr, Powell SM, Knuutila S, Kallioniemi A und El-Rifai W (2002) Targets of gene amplification and overexpression at 17q in gastric cancer. *Cancer Res* 62: 2625-2629
- [111] De la Guardia C, Casiano CA, Trinidad-Pinedo J und Baez A (2001) *CENPF* gene amplification and overexpression in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 23: 104-112
- [112] Bellon G, Caulet T, Cam Y, Pluot M, Poulin G, Pytlinska M und Bernard M (1985) Immunohistochemical localisation of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol* 66: 245-252
- [113] Rickman DS, Bobek MP, Misek DE, Kuick R, Blaiwas M, Kurnit DM, Taylor J und Hanash SM (2001) Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 61: 6885-6891
- [114] Wang X, Quail E, Hung NJ, Tan Y, Ye H und Costa RH (2001) Increased levels of forkhead box M1B transcription factor in transgenic mouse hepatocytes prevent age-related proliferation defects in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci* 98: 11468-11473
- [115] Teh MT, Wong ST, Neill GW, Ghali LR, Philpott MP und Quinn AG (2002) FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res* 62: 4773-4780
- [116] van den Boom J, Wolter M, Kuick R, Misek DE, Youkilis AS, Wechsler DS, Sommer C, Reifenberger G, and Hanash SM (2003) Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 163: 1033-1043

- [117] Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP, Van Maldergem L, Zierysen F, Yuksel B, Gardiner RM und Chung E (1999) Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* 21: 142-144
- [118] Hough CD, Cho KR, Zonderman AB, Schwartz DR und Morin PJ (2001) Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. *Cancer Res* 61: 3869-3876
- [119] Levedakou EN, Strohmeyer TG, Effert PJ und Liu ET (1992) Expression of the matrix Gla protein in urogenital malignancies. *Int J Cancer* 52: 534-537
- [120] Fan C, Sheu D, Fan H, Hsu KA, Chang C und Chan E (2001) Down-regulation of matrix Gla messenger RNA in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Lett* 165: 63-69
- [121] Hwa V, Oh Y und Rosenfeld RG (1999) The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20: 761-787
- [122] Fürstenberger G und Senn HJ (2000) Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol* 298-302
- [123] Mewar R und McMorris FA (1997) Expression of insulin-like growth factor-binding protein messenger RNAs in developing rat oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res* 50: 721-728
- [124] Drivdahl RH, Sprenger C, Trimm K und Plymate SR (2001) Inhibition of growth and increased expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and -6 in prostate cancer cells stably transfected with antisense IGFBP-4 complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 142: 1990-1998
- [125] Perks CM, Bowen S, Gill ZP, Newcomb PV und Holly JM (1999) Differential IGF-independent effects of insulin-like growth factor-binding proteins (1-6) on apoptosis of breast epithelial cells. *J Cell Biochem* 75: 652-664
- [126] Zhang W, Wang H, Song SW und Fuller GN (2002) Insulin-like growth factor-binding protein 2: gene expression microarrays and the hypothesis-generation paradigm. *Brain Pathol* 12: 87-94
- [127] Knobbe CB, Merlo A und Reifenberger G (2002) Pten signaling in gliomas. *Neurooncol* 4: 196-211
- [128] Matsuoka Y, Li X und Bennett V (2000) Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci* 57: 884-895
- [129] Fowler L, Everitt J, Stevens JL und Jaken S (1998) Redistribution and enhanced protein kinase C-mediated phosphorylation of alpha- and gamma-adducin during renal tumor progression. *Cell Growth Differ* 9: 405-413

- [130] Mariani L, Beaudry C, Mc Donough WS, Hoelzinger DB, Demuth T, Ross KR, Berens T, Coons SW, Watts G, Trent JM, Wei JS, Giese A und Berens ME (2001) Glioma cell motility is associated with reduced expression of proapoptotic and proliferation genes: a cDNA microarray analysis. *J Neurooncol* 53: 161-176
- [131] Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P und Ohgaki H (2000) Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res* 60: 6868-6874
- [132] Roof DJ, Hayes A, Adamian M, Chishti AH und Li T (1997) Molecular characterization of abLIM, a novel actin-binding and double zinc finger protein. *J Cell Biol* 138: 575-588
- [133] Vallano ML, Beaman-Hall CM, Mathur A und Chen Q (2000) Astrocytes express specific variants of CaMKII delta and gamma, but not alpha and beta, that determine their cellular localizations. *Glia* 30: 154-164
- [134] Heist EK, Schulman H (1998) The role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase within the nucleus. *Cell Calcium* 23: 103-114
- [135] Mariot P, Prevarskaya N, Roudbaraki MM, Le Bourhis X, van Coppenolle F, Vanoverberghe K und Skryma R (2000) Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells. *Prostate* 43: 205-214
- [136] Qian F, Hanahan D und Weissman IL (2001) L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 98: 3976-3981
- [137] Filep JG, Delalandre A, Payette Y und Foldes-Filep E (1997) Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. *Circulation* 96: 295-301
- [138] Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, Nozaki M, Diserens A-C, Hamou M-F, Dietrich P-Y, Regli L, Janzer RC, Bucher P, Stupp R, de Tribolet N, Domany E und Hegi ME (2003) 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* 63: 6613-6625
- [139] Soderling TR, Chang B und Brickey D (2001) Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 276: 3719-3722
- [140] Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G und Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotech* 21: 635-637

- [141] Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN und Fesik SW (2003) Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci* 100: 6347-6352
- [142] Scacheri PC, Rozenblat-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M und Collin FS (2004) Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 101: 1892-1897
- [143] Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297
- [144] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M und Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci* 101: 2999-3004
- [145] Auer H, Lyianarachchi S, Newsom D, Klisovic MI, Marcucci G und Kornacker K (2003) Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis. *Nature Gen* 35: 292-293
- [146] Chi J-T, Chang HY, Wang NN, Chang DS, Dunphy N und Brown PO (2003) Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci* 100: 6343-6346
- [147] Hutvagner G und Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297: 2056-2060
- [148] Pasquinelli AE und Ruvkun G (2002) Control of developmental timing by micrnas and their targets. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 495-513
- [149] Stark G, et al. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264
- [150] Dykxhoorn DM, Novina CD und Sharp PA (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Revs Mol Cell Biol* 4: 457-467
- [151] Hubank M and Schatz DG (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acid Res* 22: 5640-5648
- [152] Wang Z and Brown DD (1991) A gene expression screen. *Proc Natl Acad Sci* 88: 11505-11509
- [153] Ko MS (1990) An 'equalized cDNA library' by the reassociation of short doublestranded cDNAs. *Nucleic Acids Res* 18: 5705-5711

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAIII	Anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III)
AII	Astrozytom (WHO-Grad II)
AOIII	Anaplastisches Oligodendrogliom (WHO-Grad III)
AOAIII	Anaplastisches Oligoastrozytom (WHO-Grad III)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CA	Clusteranalyse
cDNA	Komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxy Nukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EV	Expressionsverhältnis (Expression im Rezidiv/Expression im Primärtumor)
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GBIV	Glioblastom (WHO-Grad IV)
GZ	Geschrumpfte Zentroide

kb	Kilobase(n), Kilobasenpaar
kD	Kilo-Dalton
KV	Kreuzvalidierung
KV	Kristallviolett
m	Milli
M	Mega
min	Minute
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
μ	Mikro
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Nano
OAI	Oligoastrozytom (WHO-Grad II)
OII	Oligodendrogliom (WHO-Grad II)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>Prediction analysis of microarrays</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerasekettenreaktion
pGBIV	Primäres Glioblastom
PS	Penicillin, Streptomycin
PT	Primärtumor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)

RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase/Transkription
RT	Rezidivtumor
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
sGBIV	Sekundäres Glioblastom
SK	Schrumpungskoeffizient
SSH	Suppressive Subtraktionshybridisierung
T	Thymin
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Einheit des enzymatischen Umsatzes)
U	Uracil
V	Volt
Vol.	Volumenteile
(v/v)	Volumen/Volumen
WD	Tryptophan, Asparaginsäure
WHO	Weltgesundheitsorganisation
(w/v)	Gewicht/Volumen

8 Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an...

... Herrn Prof. Dr. Guido Reifenberger für die Vergabe des äußerst interessanten Themas, die Eröffnung der Möglichkeit im Labor von Prof. Dr. S.M. Hanash an der *University of Michigan* zu forschen, seine ständige Diskussionsbereitschaft (*A professor is someone who speaks in someone elses sleep!*) und die vielen sinnvollen und exzellenten Tips nicht nur die Arbeit betreffend.

... Herrn Prof. Dr. Cornelis P. Hollenberg für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

... Frau Dr. Marietta Wolter, die mich in die Geheimnisse des Instituts und diverser Methoden eingeweiht hat, mir mit Rat und Tat permanent zur Seite stand, immer die richtigen kritischen Fragen gestellt hat und für einen lockeren und lustigen Laboralltag sorgte ("Ich muss heute mal wieder "rumgrotzen"!").

... Herrn Dr. Peter Roerig, dem ich dasselbe "anlasten" möchte wie Marietta.

... den Rest des Instituts, denn alle beim Namen zu nennen wäre doch ein wenig viel, für eine kompetente, freundschaftliche und lockere Arbeitsatmosphäre.

... Herrn Michael Gutmann für die Programme, die mir so oft die Arbeit erleichtert haben, seine Geduld bei Linux- und Lyxproblemen, aber vor allem für seine menschliche Seite.

... einige Ehemalige des Instituts und befreundete Gruppen für die "Bespaßung" nach Dienstschluss.

... Herrn Friedhelm Sowa für den letzten \LaTeX -Schliff dieser Arbeit.

... an das Labor von Prof. Dr. Jens W. Fischer für die Möglichkeit dort Proliferationsassays durchzuführen.

... das Labor von Prof. Dr. Michael Weller für die zahlreichen Zellkulturprotokolle und den Erfahrungsaustausch.

... die DFG, die mich über das Neuro-Graduiertenkolleg 320 finanziert hat.

Ein ganz herzlicher Dank geht an ...

... meine Freundin Frau Melanie Sussmann, die so manches Mal meine Frustlaunen ertragen musste und mir immer zur Seite gestanden hat.

... meine Eltern, die mir die Voraussetzungen für das Studium mit auf den Weg gegeben haben.

Ein Schlusswort an alle die es angeht: "Auch wenn Ihr nicht versteht wat ich sach, so wisst Ihr doch hoffentlich wat ich mein!"

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

van den Boom J, Wolter M, Kuick R, Misek DE, Youkilis AS, Wechsler DS, Sommer C, Reifenberger G, and Hanash SM (2003) Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 163: 1033-1043