

Molekulargenetische Charakterisierung pleomorpher Xanthoastrozytome

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kerstin Kaulich

aus Koblenz

Mai 2008

Aus dem Institut für Neuropathologie
der medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Guido Reifenberger

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2008

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Weber RG, Hoischen A, Ehrler M, Zipper P, Kaulich K, Blaschke B, Becker AJ, Weber-Mangal S, Jauch A, Radlwimmer B, Schramm J, Wiestler OD, Lichter P, Reifenberger G. Frequent loss of chromosome 9, homozygous CDKN2A/p14(ARF)/CDKN2B deletion and low TSC1 mRNA expression in pleomorphic xanthoastrocytomas. *Oncogene* 2007;26:1088-97.

Reifenberger G, Kaulich K, Wiestler OD, Blümcke I. Expression of the CD34 antigen in pleomorphic xanthoastrocytomas. *Acta Neuropathol* 2003;105:358-64.

Kaulich K, Blaschke B, Nümann A, von Deimling A, Wiestler OD, Weber RG, Reifenberger G. Genetic alterations commonly found in diffusely infiltrating cerebral gliomas are rare or absent in pleomorphic xanthoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:1092-9.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Pleomorphe Xanthoastrozytome	2
1.1.1	Klinik und Histopathologie der pleomorphen Xanthoastrozytome	2
1.1.2	Zytogenetische und molekulargenetische Charakterisierung pleomorpher Xanthoastrozytome	4
1.2	Molekularbiologische Grundlagen der Tumorentstehung	5
1.2.1	Tumorsuppressorgene	5
1.2.2	Zelluläre Onkogene	10
2	ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN	13
3	MATERIAL UND METHODEN	14
3.1	Material	14
3.1.1	Untersuchungskollektiv	14
3.1.2	Geräte	16
3.1.3	Enzyme	16
3.1.4	Antikörper	17
3.1.5	Chemikalien	17
3.1.6	Molekularbiologische Kits und sonstige Materialien	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Isolierung von DNA und RNA	18
3.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	20
3.2.3	Mikrosatelliten-Untersuchung zum Nachweis von Allelverlusten	22
3.2.4	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	25
3.2.5	Mutationsanalyse mit Hilfe der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP-Analyse)	26
3.2.6	Ausschneiden von DNA-Banden aus Polyacrylamidgelen	28
3.2.7	Aufreinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung	29
3.2.8	Sequenzierung	29
3.2.9	Untersuchung des Methylierungsstatus der DNA	30
3.2.10	Untersuchung zur Amplifikation und homozygoten Deletion von Genen	33
3.2.11	Expressionsanalyse	35
3.2.12	Erstellung von Expressionsprofilen	41
3.2.13	Clustering der Expressionsdaten nach differentieller PCR	45
3.2.14	Immunhistochemische Untersuchungen	45
4	ERGEBNISSE	48
4.1	Molekulargenetische Analyse von Gliom-assoziierten Kandidatengen und -regionen	48
4.1.1	Mutationsanalyse des TP53-Tumorsuppressorgens	48
4.1.2	Analyse der Tumorsuppressorgene CDKN2A, p14ARF und CDKN2B	50
4.1.3	Amplifikationsanalyse der Proto-Onkogene CDK4, MDM2 und EGFR	55
4.1.4	LOH-Analyse von Gliom-assoziierten Kandidatenregionen	55

4.2	Identifizierung neuer PXA-assoziiierter Kandidatengene	57
4.2.1	Erstellung von Expressionsprofilen mittels cDNA-Arrays.....	58
4.2.2	Überprüfung der cDNA-Array-Daten mittels Duplex RT-PCR	60
4.2.3	Erstellung von Expressionsprofilen mit Hilfe der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH)	64
4.2.4	Überprüfung der Expression ausgewählter Kandidatengene mittels Real-Time RT-PCR ..	65
4.2.5	Untersuchung der Gene CDKN1B, AKT1, AKT2, TGFB1 und TIAM1	70
4.2.6	Cluster-Analyse der ermittelten mRNA-Expressionsdaten	72
4.3	Untersuchung und Expressionsanalyse von CD34.....	74
4.3.1	Immunhistochemische Untersuchung von CD34	74
4.3.2	Expressionsanalyse von CD34-Transkripten	76
5	DISKUSSION	78
5.1	Genetische und chromosomale Veränderungen in pleomorphen Xanthoastrozytomen	78
5.2	Transkriptionelle Veränderungen in pleomorphen Xanthoastrozytomen	82
5.2.1	Gene, die in PXA im Vergleich zu diffusen Astrozytomen stärker exprimiert wurden	84
5.2.2	Gene, die in diffusen Astrozytomen im Vergleich zu PXA stärker exprimiert wurden	91
5.2.3	Gene, die in PXA und AII im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe verstärkt bzw. vermindert exprimiert wurden.....	92
5.3	Expression von CD34 in pleomorphen Xanthoastrozytomen	95
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	ABSTRACT.....	100
8	LITERATUR	102
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	125
10	DANKSAGUNG.....	127
11	ANHANG	128

1 Einleitung

Krebserkrankungen sind nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Dabei bezeichnet der Begriff „Krebs“ keine einzelne Krankheit, sondern ist ein Oberbegriff für weit mehr als hundert verschiedener Formen maligner Entartungen, die nahezu jedes Gewebe unseres Körpers betreffen können. Mit einem Anteil von 2 % treten Gehirntumoren gemessen an anderen Krebserkrankungen eher selten auf (Lantos *et al.*, 1996). Bislang sind weder Umwelteinflüsse noch bestimmte Lebensgewohnheiten bekannt, die die Entstehung von Gehirntumoren bewirken. Entsprechend der Vielfalt der Zellen des zentralen Nervensystems gibt es eine Anzahl verschiedener Gehirntumoren, die sich in ihren morphologischen Eigenschaften erheblich voneinander unterscheiden. Die Klassifizierung der Gehirntumoren erfolgt aufgrund morphologischer Merkmale der Tumorzellen anhand der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) herausgegebenen Klassifikation der Tumoren des Nervensystems (Louis *et al.*, 2007). Von den glialen Stützzellen des zentralen Nervensystems leiten sich die Gliome ab, die mit einem Anteil von 40 % die am häufigsten auftretenden Gehirntumoren sind. Gliome werden abhängig von ihrer Morphologie und ihrer wahrscheinlichen Entstehungszelle in Astrozytome (aus Astrozyten), Oligodendrogliome (aus Oligodendrozyten) und Oligoastrozytome (Mischgliome mit astrozytärem und oligodendroglialem Anteil) unterteilt. Zusätzlich zur Artdiagnose wird die Dignität der Gliome anhand einer vierstufigen Gradeinteilung (WHO-Grad I-IV) eingestuft, wobei mit zunehmendem WHO-Grad die Malignität des Tumors zunimmt. Die astrozytären Tumoren können grob in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen in die häufigere Gruppe der diffus infiltrierend wachsenden Tumoren, bestehend aus dem diffusen Astrozytom (WHO-Grad II), dem anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) und dem Glioblastom (WHO-Grad IV). Zum anderen in die weniger häufige Gruppe mit gegenüber dem Gehirngewebe besser abgegrenzt wachsenden Tumoren, darunter das pilozytische Astrozytom (WHO-Grad I), das pleomorphe Xanthoastrozytom (WHO-Grad II) und das subependymale Riesenzellastrozytom (WHO-Grad I).

1.1 **Pleomorphe Xanthoastrozytome**

1.1.1 Klinik und Histopathologie der pleomorphen Xanthoastrozytome

Pleomorphe Xanthoastrozytome (PXA) gehören zu den selten auftretenden Tumoren des zentralen Nervensystems (ca. 1 % der Astrozytome). Sie kommen hauptsächlich in Kindern und jungen Erwachsenen vor und wachsen vornehmlich im Bereich der Großhirnrinde und infiltrieren in die weichen Hirnhäute. Aufgrund ihres gut begrenzten Wachstums weisen diese Tumoren eine relativ günstige Prognose auf. Die dem WHO-Grad II entsprechenden pleomorphen Xanthoastrozytome sind meist operativ gut entfernbar, in seltenen Fällen kann es aber zu einer Rezidivbildung und zu einer Progression in ein höhergradiges Gliom (anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III oder Glioblastom WHO-Grad IV) kommen (Kepes *et al.*, 1989, Paulus *et al.*, 1996, Bayindir *et al.*, 1997, Prayson und Morris, 1998, Nakajima *et al.*, 2006, Marton *et al.*, 2007). Pleomorphe Xanthoastrozytome mit einer erhöhten mitotischen Aktivität (> 5 Mitosen pro 10 HPFs) und/oder Nekrosen, welches beides mit einer schlechteren Prognose korreliert (Giannini *et al.*, 1999, Macaulay *et al.*, 1993), werden als pleomorphe Xanthoastrozytome mit Anaplasiezeichen (abgekürzt PXA waf von *pleomorphic xanthoastrocytoma with anaplastic features*) bezeichnet (Giannini *et al.*, 1999). Lange Zeit wurden diese Tumoren dem WHO-Grad III zugeordnet. Da ihre Prognose aber deutlich besser ist als diejenige für anaplastische Astrozytome oder Glioblastome (Giannini *et al.*, 1999), werden sie nach der aktuellen WHO-Klassifikation nicht mehr in den WHO-Grad III, sondern in den WHO-Grad II eingestuft (Kepes *et al.*, 2000, Louis *et al.*, 2007). Eine möglichst vollständige operative Entfernung ist die Behandlung der ersten Wahl für alle PXA. Bei nicht vollständiger operativer Entfernung besteht ein erhöhtes Risiko des Wiederauftretens des Tumors. Eine Strahlentherapie und/oder Chemotherapie wird meist erst bei nachgewiesener Tumorprogression oder Inoperabilität eingesetzt.

Nach einer erfolgreichen, d.h. einer möglichst vollständigen operativen Entfernung des Tumors ist die Prognose für die Patienten meist günstig. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 81 % und die 10-Jahresüberlebensrate bei 70 % (Giannini *et al.*, 1999).

Histopathologisch betrachtet handelt es sich bei pleomorphen Xanthoastrozytomen häufig um zystische Tumoren, charakterisiert durch das Vorkommen von pleomorphen multinukleären Riesenzellen mit auffälliger zytoplasmatischer Verfettung. Ebenso typisch ist die Ausbildung eines dichten Retikulinfasernetzwerks insbesondere in den oberflächlichen Tumorarealen und das verstärkte Auftreten von reaktiven lymphozytären Infiltraten (Abb. 1). Für den histogenetischen Ursprung der PXA gibt es mehrere Hypothesen: einerseits wird ihr Ursprung in subpialen Astrozyten vermutet (Kepes *et al.*, 1979), andererseits besteht die Möglichkeit der Abstammung von multipotentiellen, neuroektodermalen Vorläuferzellen bzw. von prä-existierenden hamartomatösen Läsionen (Ishii *et al.*, 2005, Lach *et al.*, 1996).

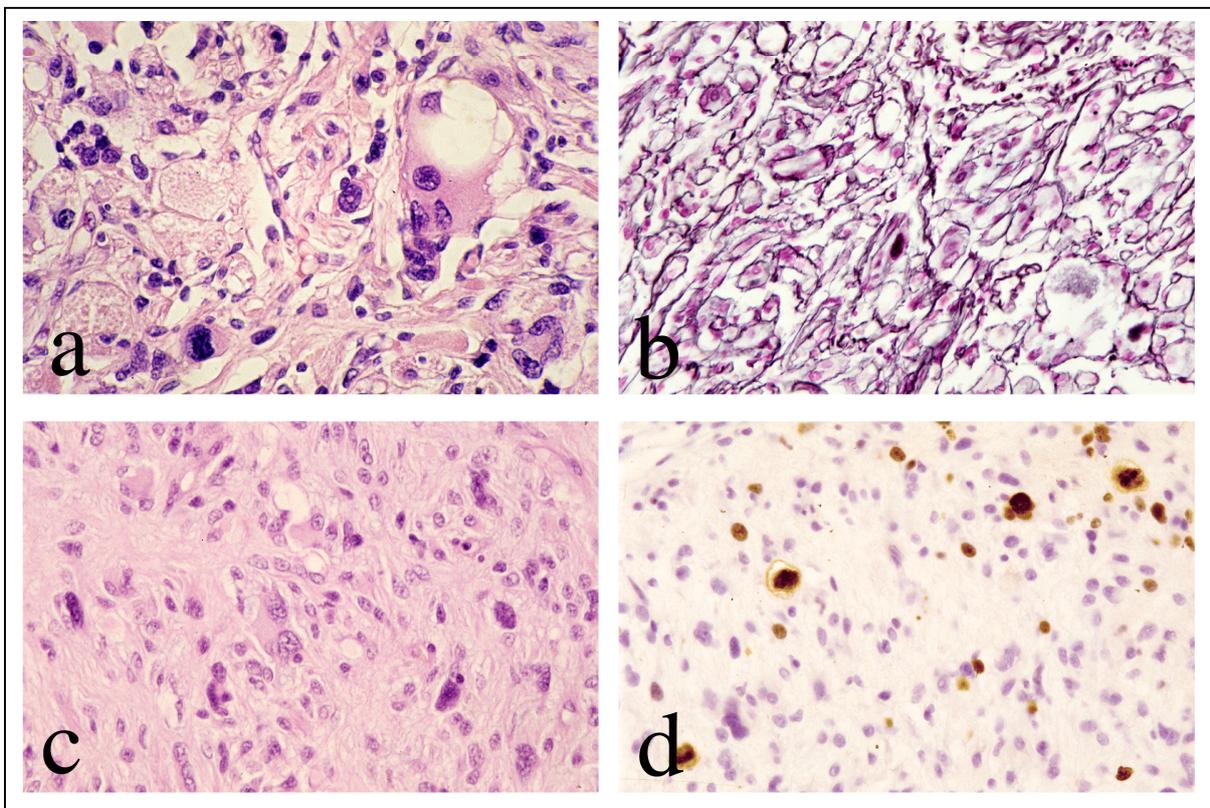


Abbildung 1 Histologische und immunhistochemische Charakteristika ausgewählter PXA. **a-b**, ein PXA (WHO-Grad II) aus dem temporo-basalen Cortex einer 19-jährigen Patienten (PXA 58). Die Hematotoxylin-Eosin (H&E)-Färbung zeigt pleomorphe und vakuolisierte (lipidisierte) astrozytäre Tumorzellen (a). In der Versilberung ist ein dichtes Retikulinfasernetzwerk zu erkennen (b). **c-d**, Beispiel eines PXA mit Anaplasiezeichen einer 23-jährigen Patientin (PXA 34). Neben den typischen Merkmalen eines PXA (c) zeigte dieser Tumor histologische Anzeichen der Anaplasie, inklusive Nekrosen und mitotischer Aktivität (nicht abgebildet). Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki67 (MIB1) zeigen Areale mit verstärkter proliferativer Aktivität (d).

1.1.2 Zytogenetische und molekulargenetische Charakterisierung pleomorpher Xanthoastrozytome

Seit der Erstbeschreibung des pleomorphen Xanthoastrozytoms durch Kepes *et al.* (1979) sind zahlreiche Fallstudien publiziert worden (Giannini *et al.*, 1999, Louis *et al.*, 2007). Zytogenetische Untersuchungen beschränkten sich allerdings bislang auf wenige Einzelfallanalysen. Es wird von Translokationen des langen Arms von Chromosom 1 (Li *et al.*, 1995), chromosomalen Zugewinnen auf den Chromosomen 3, 5, 7, 9q, 20 und X und von Verlusten auf den Chromosomen 8, 17, 20 und 22 (Sawyer *et al.*, 1991, Yin *et al.*, 2002, Weber *et al.*, 2007), sowie von der Ausbildung von Ringchromosomen (Sawyer *et al.*, 1992) berichtet. Einzelne Amplifikationen wurden in den Bereichen 2p23-25, 4p15, 12q13, 12q21, 21q21 und 21q22 beobachtet (Weber *et al.*, 2007).

Molekulargenetische Untersuchungen an pleomorphen Xanthoastrozytomen sind ebenfalls nur wenige durchgeführt worden. Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* konnten in fünf von insgesamt 62 untersuchten pleomorphen Xanthoastrozytomen (3 PXA II, 2 PXA waf) nachgewiesen werden (Paulus *et al.*, 1996, Munoz *et al.*, 1996, Giannini *et al.*, 2001, Nasuha *et al.*, 2003). In einer kleineren Serie von 5 PXA zeigte keiner der untersuchten Tumoren Allelverluste auf den Chromosomen 10 bzw. 19 (Paulus *et al.*, 1996).

Diese sehr begrenzten Befunde weisen darauf hin, dass es auf genetischer Ebene Unterschiede zu den ebenfalls dem WHO-Grad II zugeordneten diffusen Astrozytomen (AII) gibt. Diese Tumoren wachsen im Gegensatz zu PXA diffus infiltrierend im Hirngewebe. Sie treten bevorzugt bei Patienten zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr auf (Reifenberger *et al.*, 1999a). AII neigen aufgrund ihres diffus infiltrierenden Wachstums, welches die vollständige Resektion erschwert, zur Rezidivbildung und zu einer spontanen malignen Progression. Die Prognose ist dementsprechend mit einer mittleren Überlebenszeit von nur 6-8 Jahren (McCormack *et al.*, 1992) deutlich ungünstiger als für PXA. Bekannte molekulargenetische Veränderungen in diffusen Astrozytomen sind Mutationen im *TP53*-Gen (30-40 %) und im Zusammenhang damit Verluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 17, eine Überexpression des Plättchenwachstumsfaktor-Rezeptors α (*PDGFRA*) in etwa 50 % der AII und ein Verlust der chromosomalen Region 22q13.3 (30 %). Seltener treten Deletionen auf 13q und dem X-Chromosom auf (Louis *et al.*, 2007).

1.2 Molekularbiologische Grundlagen der Tumorentstehung

Molekulargenetische Untersuchungen der letzten Jahre weisen darauf hin, dass ein maligner Tumor durch mehrstufige genetische Veränderungen entsteht. Genetische Veränderungen in einer einzigen Zelle können zu einem selektiven Wachstumsvorteil und dadurch zu einer klonalen Vermehrung dieser Zelle führen (Nowell, 1976, 1986). Tochterzellen dieses Klons können weitere genetische Veränderungen erwerben, welche ein schnelleres Wachstum dieser Subklone ermöglichen und somit zu einer malignen Progression führen. Dementsprechend führt häufig nicht eine einzelne Mutation zu malignem Wachstum, sondern vielmehr die Anhäufung mehrerer unabhängiger genetischer Defekte. Die Tumorentstehung basiert auf zwei wesentlichen Aberrationen: Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von zellulären Onkogenen (Hunter *et al.*, 1991).

1.2.1 Tumorsuppressorgene

Ergebnisse aus Zellfusionsexperimenten zeigten, dass normale Zellen in der Lage sind, durch Fusion mit Tumorzellen deren malignen Phänotyp zu unterdrücken (Sager *et al.*, 1985, Harris, 1988). Daraus schloss man, dass bestimmte Gene, sogenannte Tumorsuppressorgene, in den Tumorzellen inaktiviert bzw. verloren gegangen sind. Diese Tumorsuppressorgene verhalten sich rezessiv, d.h. beide Allele müssen durch unabhängige Ereignisse geschädigt werden, um zu einem veränderten Phänotyp führen zu können. Diese Annahme, die sogenannte „two-hit“-Hypothese, stellte Knudson 1971 anhand seiner Untersuchungen an Retinoblastomen auf. Bei der erblichen Form des Retinoblastoms tritt bereits in der Keimzelle eine Mutation in einem Allel des Retinoblastom-Gens auf. Das andere Allel wird durch einen sogenannten „second hit“ in der somatischen Zelle inaktiviert. Bei sporadischen Tumoren, bei denen keine Keimbahnmutation vorliegt, müssen beide Allele durch somatische Mutationen inaktiviert werden. Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kann durch Punktmutation, Deletion, chromosomale Translokation, Insertion oder durch Hypermethylierung regulatorischer Sequenzen des jeweiligen Gens erfolgen. Häufig erfolgt die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens durch Verlust eines Allels und Mutation des anderen Allels oder durch den Verlust beider Allele. Der häufige Nachweis von Allelverlusten mittels Mikrosatellitenanalyse (LOH-Analyse, *loss of heterozygosity*) in einer bestimmten chromosomalen Region legt nahe, dass sich in dieser Region ein Tumorsuppressorgen

befindet (Lasko *et al.*, 1991, Weinberg, 1991) und ist somit eine Möglichkeit, Tumorsuppressorgene zu lokalisieren und zu identifizieren. Mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse konnten Allelverluste auf den chromosomalen Armen von 1p, 9p, 10p+q, 17p, 19q und 22q in diffus infiltrierenden astrozytären und/oder oligodendroglialen Gliomen nachgewiesen werden (Maher *et al.*, 2001, Cavenee *et al.*, 2000, Reifenberger *et al.*, 2000, Alaminos *et al.*, 2005, Bagchi *et al.*, 2007, Tews *et al.*, 2007). In Tabelle 1 sind, soweit bekannt, mögliche Tumorsuppressorgene in diesen chromosomalen Regionen aufgeführt. Im folgenden Abschnitt werden einige dieser Tumorsuppressorgene, denen eine Bedeutung in der Gliomentstehung zukommt, kurz vorgestellt.

Tabelle 1 Häufig in Gliomen deletierte chromosomale Regionen. In der Tabelle sind die bislang in diesen Regionen bekannten Tumorsuppressorgene sowie die Gliome aufgelistet, in denen die jeweiligen Gene bzw. chromosomalen Abschnitte häufig deletiert sind.

Lokalisation	Tumorsuppressorgen	Tumoren
1p34-p35	<i>CDKN2C</i> <i>CITED4</i>	Oligodendrogliom, anaplastisches Oligodendrogliom Oligodendrogliom
1p36.3	<i>CHD5</i>	Oligodendrogliom, anaplastisches Oligodendrogliom, Glioblastom
9p21	<i>CDKN2A</i> , <i>p14^{ARF}</i> , <i>CDKN2B</i>	anaplastisches Astrozytom, Glioblastom
10p15	unbekannt	Glioblastom
10q	<i>PTEN</i> (10q23) <i>MXI1</i> (10q25)	Glioblastom Glioblastom
13q14	<i>RBI</i>	anaplastisches Astrozytom, Glioblastom
17p13	<i>TP53</i>	Astrozytom, anaplastisches Astrozytom, Glioblastom
19q13	<i>EMP3</i>	Oligodendrogliom, anaplastisches Oligodendrogliom, anaplastisches Astrozytom, sekundäres Glioblastom
22q	unbekannt	Astrozytom, anaplastisches Astrozytom, Glioblastom

Tumorsuppressorgen *TP53*

Das *TP53*-Gen (17p13.1) kodiert ein nukleäres Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 53 kD, welches u.a. eine wichtige Rolle bei der Sicherung der Integrität der zu replizierenden DNA vor der Zellteilung spielt. Durch einen mittels p53 induzierten Arrest in der G1-Phase kann die Zelle DNA-Schäden mit Hilfe von Reparaturenzymen beseitigen. Kann der Schaden nicht behoben werden, besteht die Möglichkeit, einen kontrollierten Zelltod (Apoptose) auszulösen (Lowe *et al.*, 1993). Neben der Regulation des Übergangs von der G1- in die S-Phase des Zellzyklusses ist p53 auch an dem Übergang von der G2- in die M-Phase beteiligt (Levine, 1997). p53 fungiert als Transkriptionsfaktor für eine Reihe von Genen (u.a. *CDKN1A*, *14-3-3 σ* , *GADD45*, *BAX*), über deren transkriptionelle Regulation p53 sowohl zu einem Zellzyklusstillstand, einer DNA-Reparatur als auch zur Apoptose führen kann (Abb. 2). Der Verlust von p53, z.B. durch Mutation oder homozygote Deletion, kann zu unkontrolliertem Zellwachstum und Tumorentstehung führen. Eine Mutation in einem Allel kann ausreichen, um eine neoplastische Entartung zu induzieren. Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass das mutierte p53-Protein eine Wechselwirkung mit dem Wildtyp-p53-Protein eingeht und dadurch dessen suppressive Eigenschaften aufhebt. Man spricht hierbei von einem dominant-negativen Effekt, den das mutierte p53-Protein auf das Wildtyp-Protein ausübt (Milner und Medcalf, 1991). Neben dem Verlust der Wildtyp-Funktion können Mutationen des p53-Proteins auch zu einem sogenannten „*gain of function*“-Effekt führen. Dies bedeutet, dass das mutierte Protein aufgrund seiner Veränderung in der Aminosäuresequenz eine neue Funktion erlangt. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Transfektion einer Sarkomzelllinie ohne endogenes p53 mit mutiertem p53 zu einer deutlichen Verstärkung des neoplastischen Wachstumsverhaltens führte (Chen *et al.*, 1990b). In über 50 % aller menschlichen Tumoren wurden Alterationen im *TP53*-Gen nachgewiesen (Louis, 1994, Soussi *et al.*, 2005, Olivier *et al.*, 2002, Petitjean *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich vor allem um Punktmutationen in bestimmten konservierten Genregionen, um sogenannte „*hot spots*“ (Hollstein *et al.*, 1991). Verlust oder Mutation des *TP53*-Gens tritt in etwa der Hälfte aller diffusen Astrozytome auf, was zu der Schlussfolgerung führt, dass die Inaktivierung von *TP53* bereits in der Frühphase der Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielt (Peraud *et al.*, 2002). Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass Patienten mit einer *TP53*-Keimbahnmutation (sog. Li-Fraumeni-Syndrom) neben Sarkomen und Karzinomen gehäuft astrozytäre Gliome entwickeln (Kleihues *et al.*, 2000).

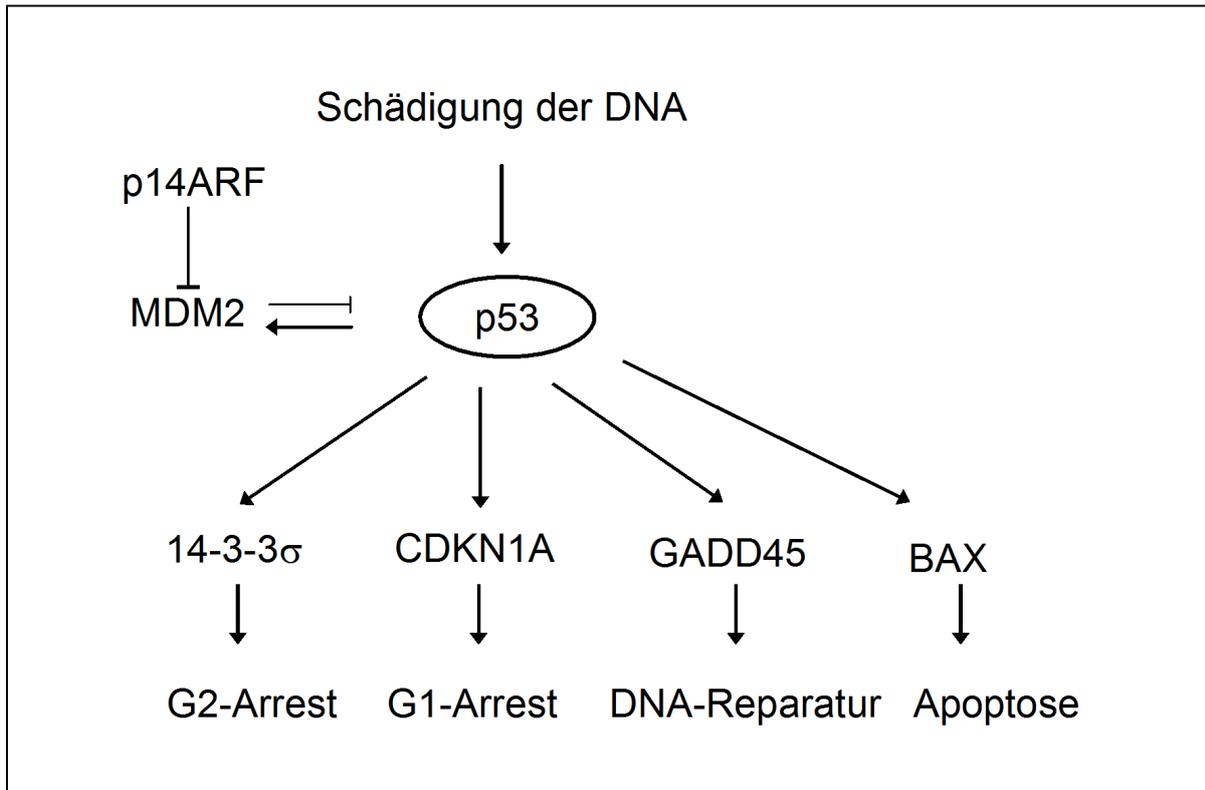


Abbildung 2 Vereinfachte Übersicht der p53-Signalwege. Durch DNA-Schädigung kommt es zur verstärkten Transkription von *TP53*. Aktives p53 fungiert u.a. als Transkriptionsfaktor für die Gene *14-3-3σ*, *CDKN1A* (p21), *GADD45* und *BAX*, wodurch p53 in die Regulation von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose eingreift. Die Regulation von p53 erfolgt über Mdm2, welches p53 bindet und seine proteasomale Degradierung veranlasst. p53 wiederum reguliert über transkriptionelle Aktivierung Mdm2, welches seinerseits durch p14^{ARF} gehemmt wird.

Die Gene *CDKN2B*, *p14^{ARF}* und *CDKN2A*

Die Gene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* liegen in unmittelbarer Nachbarschaft auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p21) und kodieren für die Proteine p16^{INK4a}, p14^{ARF} und p15^{INK4b}. Das p16^{INK4a}-Protein kann an Komplexe aus Cdk4/Cdk6 mit D-Typ-Cyclinen binden und dadurch die Phosphorylierung des Retinoblastomgenprodukts (pRB1) verhindern, was zu einem Arrest in der G1-Phase führt (Abb. 3; Sherr, 1994, Pei und Xiong, 2005). p16^{INK4a} fungiert somit als negativer Regulator der Zellzyklusprogression. Eine p16^{INK4a}-Inaktivierung kann zu einem Verlust der Zellzykluskontrolle und somit zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Das p14^{ARF}-Protein bindet an Mdm2 (Abb. 2), verhindert dadurch den Mdm2-vermittelten Abbau von p53 und reguliert somit die Aktivität von p53 (Sherr und Weber, 2000, Harris und Levine, 2005). Das *CDKN2B*-Genprodukt (p15^{INK4b}) fungiert wie

p16^{INK4a} als spezifischer Inhibitor von Cdk4 und Cdk6. Seine Expression wird durch TGF β reguliert (Roussel, 1999, Pei und Xiong, 2005). Die Inaktivierung dieser drei Tumorsuppressorgene kann über homozygote Deletionen, Mutationen sowie durch Hypermethylierung der CpG-Inseln der jeweiligen Promotorregionen erfolgen. Eine Inaktivierung eines oder mehrerer dieser drei Tumorsuppressorgene wurde in vielen verschiedenen Tumoren beobachtet, darunter auch in astrozytären und oligodendroglialen Tumoren (Nakamura *et al.*, 2001a, Ruas und Peters, 1998, Herman *et al.*, 1996, Wolter *et al.*, 2001, Watanabe *et al.*, 2003).

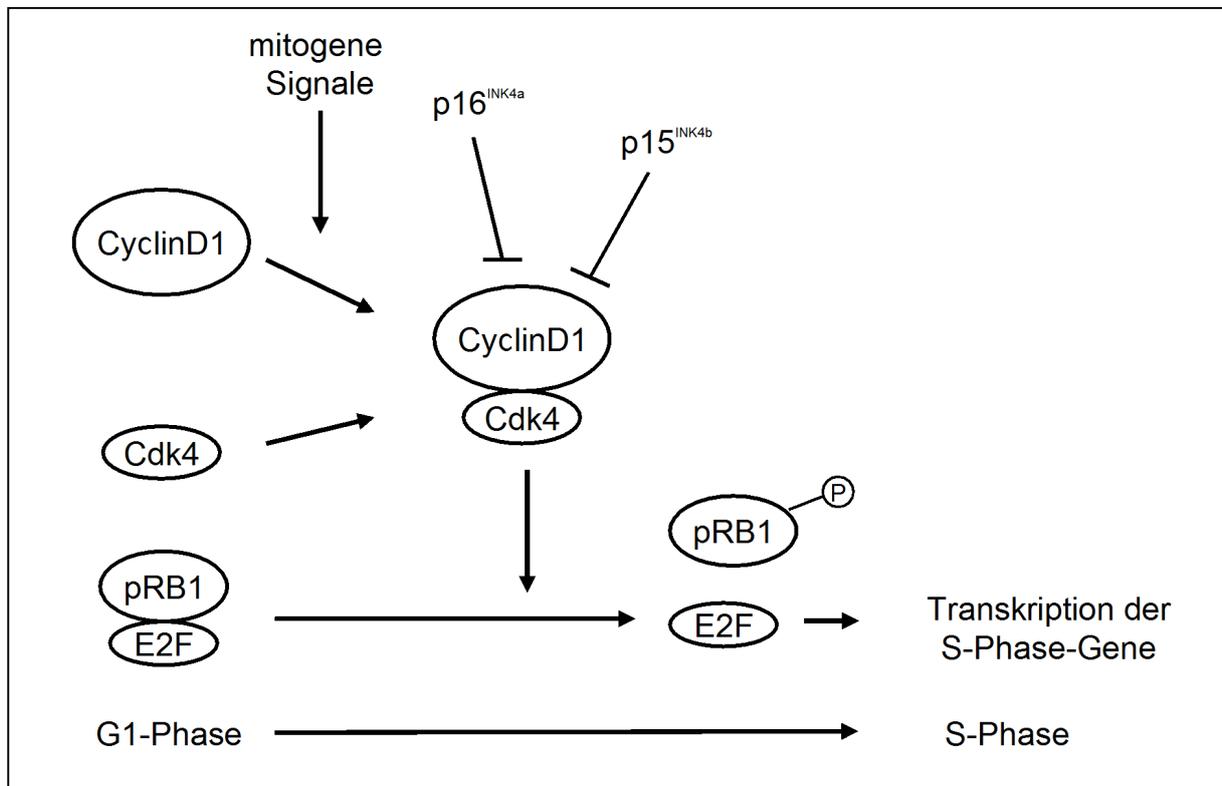


Abbildung 3 Stark vereinfachte Darstellung der Zellzyklusprogression von der G1- in die S-Phase. Beteiligt ist neben Cyclin D1, Cdk4 und den Cdk-Inhibitoren p15^{INK4b} und p16^{INK4a} das Retinoblastomgenprodukt pRB1. Durch Anlagerung von Cyclin D1 kommt es zur Aktivierung von Cdk4 und somit zur Phosphorylierung von pRB1. Dies hat zur Folge, dass durch pRB1 gebundene Transkriptionsfaktoren aus der E2F-Familie freigesetzt werden, welche dann die Transkription von S-Phase-Genen induzieren und dadurch den Übergang von der G1- in die S-Phase einleiten. Die Cdk-Inhibitoren p15^{INK4b} und p16^{INK4a} können den Cyclin D1-Cdk4-Komplex hemmen und somit die Zellzyklusprogression unterbinden.

1.2.2 Zelluläre Onkogene

Die zellulären Onkogene (Proto-Onkogene) stellen eine Gruppe von Genen dar, deren Hauptaufgabe die Regulation des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Genexpression ist (Bishop, 1991). Zu Onkogenen werden diese Gene erst dadurch, dass sie durch Punktmutationen, chromosomale Translokationen oder durch Vervielfachung der Genkopienzahl (Amplifikation) aktiviert werden, was zu einer unkontrollierten Überexpression des Gens bzw. zu durch Mutationen veränderten, onkogen wirksamen Genprodukten führt. Die veränderten oder überexprimierten Genprodukte der zellulären Onkogene verschaffen der jeweiligen Zelle einen Proliferationsvorteil, aus welchem letztendlich ein unkontrolliertes Zellwachstum und somit ein Tumor entstehen kann.

Proto-Onkogene kodieren für Proteine, die in verschiedene Hauptgruppen eingeteilt werden können: (1) Wachstumsfaktoren (z.B. *EGF*, *epidermal growth factor*; *PDGF- α* , *platelet derived growth factor α* ; *TGF- α* , *transforming growth factor α*); (2) Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (z.B. *EGFR*, *epidermal growth factor receptor*; *PDGFRA*, *platelet derived growth factor receptor α* ; *PDGFRB*, *platelet derived growth factor receptor β*); (3) Komponenten der intrazellulären Signaltransduktion (*RAS*-Familie; Bishop, 1991, Batra *et al.*, 1994); (4) nukleäre Proteine und Transkriptionsfaktoren (z.B. *MDM2*, *murine double minute 2*; *MYC*); (5) Zellzyklus-regulierende Gene (*CDKs*, *cyclin-dependent kinases*; Cycline).

In Gliomen kommt dem Mechanismus der Aktivierung von Proto-Onkogenen durch Genamplifikation die größte Bedeutung zu (Collins, 1995). Genamplifikationen finden sich am häufigsten in Glioblastomen, d.h. sie stellen eine Veränderung dar, die für die maligne Progression von Gliomen wichtig ist. Die am stärksten betroffenen Gene sind *EGFR*, *CDK4* und *MDM2* (Reifenberger *et al.*, 1999a, Ruano *et al.*, 2006, Ohgaki und Kleihues, 2007).

Das *EGFR* - Gen

Das *EGFR*-Gen ist auf Chromosom 7p12 lokalisiert und wurde ursprünglich aus einer Plattenepithelkarzinom-Zelllinie isoliert (Ullrich *et al.*, 1984, Wu *et al.*, 1989). Die Bindung der Liganden (EGF, TGF- α) an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptormoleküls und somit zur Aktivierung der Tyrosinkinase, welche an zytoplasmatische Zielproteine Phosphatgruppen anlagern kann (Ullrich und

Schlessinger, 1990). Wird der EGFR-Rezeptor unkontrolliert überexprimiert, z.B. als Folge einer Genamplifikation, wird bei gleichzeitiger Expression der zugehörigen Liganden das Zellwachstum so stark stimuliert, dass es zu einer neoplastischen Transformation kommt. Der häufigste Aktivierungsmechanismus von *EGFR* ist die Genamplifikation und konsekutive Überexpression, wobei *EGFR* das am häufigsten amplifizierte und überexprimierte Onkogen in Gliomen ist (Collins, 2002). In etwa der Hälfte der Glioblastome mit *EGFR*-Amplifikation finden sich zusätzlich genetische Rearrangements, die zu konstitutionell aktivierten Rezeptormolekülen führen (Collins, 2002).

Das *CDK4* - Gen

Die Cyclin-abhängigen Kinasen stellen eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen dar, welche in die Zellzyklus-Kontrolle eingebunden sind (Sherr, 1993, Pei und Xiong, 2005). Jede dieser Kinasen besitzt eine katalytische Untereinheit, die durch Komplexbildung mit einem Cyclin (im Fall von Cdk4 das D-Typ-Cyclin) aktiviert werden kann. Diese aktivierten Cyclin-Cdk-Komplexe können verschiedene andere Proteine, z.B. das Retinoblastomgenprodukt (pRB1) phosphorylieren (Matsushime *et al.*, 1994, Xiong *et al.*, 1992). Das Cdk4-Protein übt seine regulierende Funktion beim Übergang der G1-Phase in die S-Phase aus (Abb. 3). Veränderungen der Cdk4-Enzymaktivität spielen daher bei der Kontrolle der Zellzyklusprogression von der G1-Phase in die S-Phase eine wichtige Rolle. p16^{INK4a} und p15^{INK4b} fungieren als spezifische Inhibitoren von Cdk4. Sowohl die Überexpression von *CDK4* als auch eine Mutation bzw. Deletion von *CDKN2A* (p16^{INK4a}) und *CDKN2B* (p15^{INK4b}) kann zu neoplastischem Wachstum führen. Eine *CDK4*-Amplifikation findet sich in etwa 15 % der Glioblastome und anaplastischen Astrozytome (Reifenberger *et al.*, 1994a).

Das *MDM2* - Gen

Das *MDM2*-Gen wurde als amplifiziertes Gen auf sogenannten „double minute“-Chromosomen einer Mauszelllinie entdeckt (Fakharzadeh *et al.*, 1991). Das humane *MDM2*-Gen liegt auf Chromosom 12 in der Region 12q14.3-q15 und kodiert für ein 90 kD Phosphoprotein mit transformierenden Eigenschaften (Oliner *et al.*, 1992, Mitchell *et al.*, 1995). Das Genprodukt kann Komplexe mit Wildtyp- und mutiertem p53-Protein bilden und wirkt somit als zellulärer Regulator (Inhibitor) der p53-Aktivität (Momand *et al.*, 1992, Abb. 2). MDM2 ist am Export von p53 vom Kern ins Zytoplasma sowie an dem verstärkten Abbau

von p53 beteiligt (Alarcon-Vargas und Ronai, 2002). Das p53-Protein seinerseits kann durch Bindung an den Promotor des *MDM2*-Gens die *MDM2*-Transkription steigern, so dass sowohl die Aktivität des p53-Proteins als auch die Expression des *MDM2*-Genprodukts beeinflusst wird (Wu *et al.*, 1993, Oren *et al.*, 2002). In etwa 8-10 % der malignen Gliome konnte eine Genamplifikation und eine mRNA-Überexpression nachgewiesen werden (Reifenberger *et al.*, 1993).

2 Zielsetzung und Fragestellungen

Aufgrund des seltenen Auftretens pleomorpher Xanthoastrozytome sind die chromosomalen und genetischen Veränderungen in diesen Tumoren noch weitgehend unbekannt. Für die hier vorliegende Arbeit stand ein Kollektiv von 62 pleomorphen Xanthoastrozytomen (PXA), darunter 16 pleomorphe Xanthoastrozytome mit Anaplasiezeichen (PXA waf) zur Verfügung. Das wesentliche Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war es, einen Überblick über tumorassoziierte Alterationen in PXA auf chromosomaler, genetischer und transkriptioneller Ebene zu erhalten und damit zu der Aufklärung der molekularen Pathogenese der pleomorphen Xanthoastrozytome beizutragen. Desweiteren sollten erstmalig Erkenntnisse über die molekularbiologischen Unterschiede zwischen PXA und diffusen Astrozytomen erarbeitet werden. Folgende Fragestellungen sollten im Einzelnen angegangen werden:

1. Treten die bei den häufigen diffusen astrozytären und oligodendroglialen Gliomen bekannten chromosomalen und genetischen Veränderungen auch in pleomorphen Xanthoastrozytomen auf?
2. Welche Unterschiede bestehen auf genomischer Ebene zwischen pleomorphen Xanthoastrozytomen und diffusen Astrozytomen? Können die genetischen und transkriptionellen Unterschiede für das weniger infiltrierende Wachstum und somit für eine bessere Prognose der pleomorphen Xanthoastrozytome im Vergleich zu diffusen Astrozytomen verantwortlich sein?
3. Gibt es auf chromosomaler, genetischer und/oder transkriptioneller Ebene Unterschiede zwischen klassischen pleomorphen Xanthoastrozytomen (WHO-Grad II) und pleomorphen Xanthoastrozytomen mit Anaplasiezeichen?
4. Lassen sich mittels cDNA-Array-Technik differentielle Expressionsprofile zwischen pleomorphen Xanthoastrozytomen und diffusen Astrozytomen identifizieren? Finden sich mit diesem Ansatz neue Kandidatengene, die an der Pathogenese der pleomorphen Xanthoastrozytome beteiligt sind?

3 Material und Methoden

3.1 *Material*

3.1.1 Untersuchungskollektiv

Für die molekulargenetischen Analysen standen pleomorphe Xanthoastrozytome von 62 Patienten (31 Frauen, 31 Männer; Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation: 20,6 Jahre, Spannweite: 3 bis 49 Jahre) zur Verfügung. In Tabelle 2 sind die zugehörigen Patientendaten der in den molekulargenetischen Analysen verwendeten Tumoren aufgelistet. Alle Tumoren wurden am Hirntumorreferenzzentrum der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie am Institut für Neuropathologie der Universitätsklinik Bonn gemäß der WHO Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems (Kepes *et al.*, 2000) histopathologisch klassifiziert. Die Serie bestand aus 46 PXA (WHO-Grad II, PXA II) und 16 PXA mit Anaplasiezeichen (*with anaplastic features*, PXA waf). Von 15 Patienten wurden Teile des Tumors direkt nach der Operation schockgefroren und bei -80°C gelagert. Von 9 dieser Proben konnte ausreichend RNA isoliert werden, so dass Tumor-RNA von 7 PXA II und von 2 PXA waf zur Verfügung stand. Von 14 Patienten waren Blutproben zur Isolierung von Leukozyten-DNA vorhanden. Zusätzlich wurden Tumorproben von 8 Patienten mit einem diffusen Astrozytom WHO-Grad II (5 Männer, 3 Frauen; Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation: 43,3 Jahre, Spannweite: 32 bis 58 Jahre) aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ausgewählt. Es wurden nur Tumorproben mit einem histologisch bestimmten Tumorzellgehalt von 80 % oder mehr für die molekulargenetischen Untersuchungen verwendet. Als Referenzgewebe diente nicht-neoplastisches Hirngewebe (Cortex und weiße Substanz) aus dem Temporallappen von Patienten, bei denen aufgrund einer Therapie-resistenten chronischen Epilepsie ein Epilepsie-chirurgischer Eingriff vorgenommen worden war.

Tabelle 2 Ausgewählte klinische Daten und verfügbares Untersuchungsmaterial der in dieser Arbeit untersuchten pleomorphen Xanthoastrozytome und diffusen Astrozytome.

Fall-Nr.	Diagnose	Lokalisation	Alter (Jahre)	m/w	P/K	Blut	PT/RT	Fall-Nr.	Diagnose	Lokalisation	Alter (Jahre)	m/w	P/K	Blut	PT/RT
1	PXAwaf	nb	14	w	P	-	PT	49	PXAII	temp	42	w	K	+	PT
5	PXAII	nb	10	m	P	-	PT	50	PXAII	temp-occ	15	m	P	+	PT
7	PXAII	temp	13	w	P	-	PT	51	PXAII	temp	41	w	K	+	PT
8	PXAII	temp	16	m	P	-	PT	52	PXA waf	temp	7	m	K	-	PT
9	PXAII	front	18	m	P	-	PT	53	PXAII	temp	35	m	K	-	PT
10	PXAII	par	6	m	P	-	PT	54	PXAII	temp	16	m	P	+	PT
11	PXA waf	temp	3	m	P	-	PT	55	PXAII	temp	39	m	P	-	PT
12	PXA waf	temp	5	w	P	-	PT	57	PXAII	temp	19	m	P	-	PT
13	PXA waf	temp	25	w	P	-	PT	58	PXAII	temp	19	w	P	-	PT
15	PXAII	temp	26	m	P	-	PT	60	PXAII	occ	28	w	P	-	PT
16	PXAII	cer	13	m	P	-	PT	61	PXAII	front	19	w	P	-	PT
18	PXAII	temp	13	m	P	-	PT	62	PXA waf	nb	21	m	P	-	RT
19	PXAII	temp	19	w	P	-	PT	63	PXAII	temp	35	m	P	-	PT
20	PXA waf	temp	6	w	P	-	PT	64	PXAII	temp	49	w	P	-	PT
21	PXA waf	temp	15	m	P	-	PT	65	PXA waf	nb	39	m	K	+	PT
24	PXAII	temp	8	w	P	-	PT	66	PXAII	nb	37	m	K	+	RT
28	PXAII	temp	14	w	P	-	PT	67	PXAII	nb	18	w	K	+	PT
29	PXA waf	nb	14	m	P	-	RT	69	PXAII	nb	18	w	K	+	PT
30	PXAII	temp	8	w	P	-	PT	70	PXA waf	temp	48	w	P	-	PT
31	PXAII	front	10	w	P	-	PT	71	PXAII	temp	22	w	K	-	PT
32	PXAII	occ	31	m	P	-	PT	72	PXAII	temp-par	19	w	P	-	PT
33	PXA waf	nb	13	w	P	-	PT	73	PXAII	par	27	w	P	-	PT
34	PXA waf	cer	23	w	P	-	PT	74	PXA waf	temp	36	w	P	-	PT
35	PXAII	temp-par	15	m	P	-	PT	75	PXAII	par-occ	15	m	P	-	PT
37	PXAII	par	24	m	P	-	PT	76	PXAII	temp-occ	25	w	P	-	PT
38	PXAII	cer	11	m	P	-	PT	77	PXAII	front	9	m	P	-	PT
40	PXA waf	cer	10	m	P	-	PT	78	PXAII	cer	26	w	P	-	PT
42	PXAII	par-occ	14	m	P	-	PT	79	PXAII	nb	22	w	P	-	RT
43	PXA waf	temp	9	m	P	-	PT	81	PXAII	nb	10	m	K	+	PT
46	PXAII	temp	17	w	K	+	RT	84	<i>PXA waf</i>	<i>temp</i>	<i>10</i>	<i>m</i>	<i>K</i>	<i>+</i>	<i>RT v. 43</i>
47	PXAII	temp	35	w	K	+	PT	85	PXAII	temp	28	m	K	+	PT
48	PXAII	sp	34	w	K	+	PT								
A1	AII	cer	39	m	K	-	RT	A5	AII	temp	50	w	K	-	RT
A2	AII	nb	40	m	K	-	PT	A6	AII	temp	54	m	K	+	RT
A3	AII	temp	58	m	K	-	PT	A7	AII	cer	35	w	K	+	PT
A4	AII	front	38	w	K	-	PT	A8	AII	nb	32	m	K	+	PT

benutzte Abkürzungen: m = männlich; w = weiblich; P = formalinfixiertes, paraffin-eingebettetes Tumormaterial; K = Kryostatmaterial; PT = Primärtumor; RT = Rezidivtumor; nb = nicht bekannt; temp = temporal; front = frontal; par = parietal; cer = cerebral; sp = spinal; occ = occipital

3.1.2 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Automatischer Sequenzierer	377	Applied Biosystems
Deionisierungsanlage	Milli Q UF Plus	Millipore
Geldokumentationssystem	GelDoc 1000 system	BioRad
Gelkammer (Agarosegele)	Sub-Cell	BioRad
Gelkammer (Polyacrylamidgele)	P10DS	PeqLab
Geltrockner	583	BioRad
Hybridisierungssofen	APT Line	Biometra
Netzgerät	Power PAC 3000	BioRad
Online PCR-Thermocycler	TaqMan Abi Prism 5700	Applied Biosystems
PCR Thermocycler	Trio-Thermoblock	Biometra
Photometer	DU 640	Beckmann
Ultrazentrifuge	L8-M	Beckmann
Vakuumpumpe	Labport	KMF
Zentrifuge (Kühlzentrifuge)	EBA 12R	Hettich
Zentrifuge (Tischzentrifuge)	Centrifuge 5417	Eppendorf

3.1.3 Enzyme

Taq Polymerase (5 U/μl)	Sigma
HotStar Taq Polymerase (5 U/μl)	Qiagen, Eurogentec
DNase I (RNase frei; 10 U/μl)	Roche
Proteinase K	Sigma
Reverse Transkriptase (SuperscriptII; 200 U/μl)	Gibco/BRL
Restriktionsenzym: <i>Sma</i> I	Roche
RNase H ⁻ MMLV Reverse Transkriptase	Clontech

3.1.4 Antikörper

CD34-Antikörper (*mouse anti human*, 1µg/ml) Serotec

3.1.5 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham, BioRad, Fluka, GibcoBRL/Life Technologies, Hartmann Analytic, Merck, PeqLab, Qiagen, Riedel de Haen, Roche, Promega, Roth, Serva und Sigma bezogen.

3.1.6 Molekularbiologische Kits und sonstige Materialien

100bp-DNA-Leiter/ 1kb-DNA-Leiter	PeqLab
Atlas SMART TM Probe Amplification Kit	Clontech
Atlas TM cDNA 1.2 Array 7851-1	Clontech
BigDye Sequencing Kit	Applied Biosystems
EZ-RT-PCR Core Kit	Applied Biosystems
JetQuick Gel Extraction Kit	Genomed
PCR Product Purification Kit	Roche
PCR-Select TM cDNA Subtraction Kit	Clontech
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SMART TM PCR cDNA Synthesis Kit	Clontech
Sybr Green Core Kit	Eurogentec
Wizard DNA Clean-up System	Promega
Röntgenfilme (Biomax MR)	Kodak
RZPD Library Human Unigene Filter-Set No 950	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin)

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung von DNA und RNA

3.2.1.1 DNA- und RNA-Extraktion aus tiefgefrorenen Tumorproben

Lösungen:

4 M Guanidiniumisothiocyanat (GITC)-Lösung:

500 g	GITC
26,5 ml	Natriumcitrat pH 7,0
8,5 ml	β -Mercaptoethanol
ad 1058 ml	Aqua dest.
pH 7,0	

Cäsiumchlorid:

478,85 g	CsCl
4,15 ml	3 M Natriumacetat
ad 500 ml	Aqua dest.

1x Proteinase-K-Puffer:

10 ml	1 M Tris/HCl pH 7,8
10 ml	0,5 M EDTA
5 ml	10 % SDS

RNasin-Mix:

90 μ l	RNasin (40 U/ μ l)
6,916 ml	DEPC-Wasser
193,5 μ l	0,1 M DTT

Proteinase-K-Stammlösung:

20 mg/ml

Nach Homogenisierung des tiefgefrorenen Tumorgewebes in 4 M Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung erfolgte die Auftrennung der DNA und RNA durch Ultrazentrifugation (32.000 rpm, 15°C für 16 h) über einen Cäsiumchloridgradienten. Die DNA wurde danach gemäß Standardprotokollen durch Präzipitation, Proteinase-K-Verdau und Phenolextraktion weiter aufgearbeitet (vergl. Ichimura *et al.*, 1996). Die RNA wurde mit RNase freier DNaseI behandelt, um DNA-Kontaminationen zu beseitigen und nach Vorschrift des RNeasy Mini Kits (Qiagen) weiter aufgereinigt. Die Quantifizierung der DNA bzw. der RNA-Konzentration erfolgte durch photometrische Messung bei 260 nm (OD1 = 50 µg/ml bzw. OD1 = 44 µg/ml). Die aufgereinigte DNA bzw. RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.1.2 DNA-Extraktion aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Tumormaterial

DNA aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Tumorgewebe wurde nach der Methode von Reifenberger *et al.* (1996) isoliert. Nach Entparaffinieren in Xylol, Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe und nachfolgendem Proteinase-K-Verdau (mit 20 µl Proteinase-K (20 µg/ml) in 500µl 1x Proteinase-K-Puffer über Nacht bei 50°C) erfolgte eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion mit anschließender DNA-Fällung (Fällung in einem 2,5-fachem Volumen 3M Natriumacetat für 30 min bei -70°C; anschließender Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 13000 rpm; Waschen des Pellets in 500 µl eiskaltem 70% Ethanol; Lösen des Pellets in 1x TE-Puffer). Die DNA-Konzentration wurde durch Auftragen von DNA neben einem Größenstandard auf ein 0,8 %iges Agarose-Gel ermittelt.

3.2.1.3 DNA-Extraktion aus Blutleukozyten

Die Extraktion von hochmolekularer DNA aus peripheren Blutleukozyten wurde nach dem Protokoll in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Lösungen:**Puffer A:**

109,5 g	Saccharose
10 ml	1 M Tris/HCl pH 7,5
10 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
50 ml	Triton X-100
ad 1000 ml	Aqua dest.

Puffer B:

109,5 g	Saccharose
10 ml	1 M Tris/HCl pH 7,5
10 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1000 ml	Aqua dest.

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,4
1 mM EDTA pH 8,0

Durchführung:

20 ml Blut wurden mit 30 ml kaltem Puffer A (Lysepuffer) versetzt und 1 min sanft geschüttelt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 2500 rpm und 4°C. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte in 20 ml kaltem Puffer B. Nach erneutem Zentrifugieren für 20 min bei 2500 rpm und 4°C wurde das Pellet über Nacht bei 50°C mit 60 µl Proteinase-K (100 µg/ml) inkubiert. Nach der anschließenden Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion wurde die DNA gefällt und in TE-Puffer gelöst und anschließend spektrophotometrisch wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben quantifiziert und bei -20°C gelagert.

3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1986) lassen sich kurze DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigen. Dazu werden einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die komplementär zu den Endbereichen der zu amplifizierenden Sequenz

sind. In zyklisch wiederkehrenden Schritten wird nun die DNA denaturiert, die Primer an diese einzelsträngige DNA angelagert (*Annealing*) und anschließend durch Nukleotideinbau verlängert (*Extension*). Katalysiert wird diese zyklische Reaktion durch die sog. *Taq*-Polymerase, eine aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammende DNA-Polymerase, die sich durch eine besondere Hitzestabilität auszeichnet.

Das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, synthetisiert DNA (cDNA), indem sie RNA als Matrize verwendet. Die reverse Transkription und die nachfolgende PCR-Reaktion werden auch als „RT-PCR“ bezeichnet.

Lösungen:

dNTP-Mix:

2 mM dATP
2 mM dGTP
2 mM dCTP
2 mM dTTP

10x PCR-Puffer:

100 mM Tris-HCl, pH 8,5
500 mM KCl
15 mM MgCl₂
0,01 % Gelatine

Durchführung:

Die PCR-Reaktionen wurden in Volumina von 20-50 µl durchgeführt. In den Reaktionsansätzen waren jeweils 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,001 % Gelatine, 1,5 mM MgCl₂, jeweils 0,2 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, jeweils 0,5-2,0 µM Forward- und Reverse-Primer sowie 1 U *Taq*-Polymerase und ca. 10-50 ng DNA bzw. cDNA enthalten. Bei einigen PCR-Reaktionen wurde zusätzlich 0-5 % DMSO, 0-20 % Betain oder 0-5 % Formamid dem Reaktionsansatz zugegeben.

Die verwendeten Primer und genauen PCR-Bedingungen sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben. Die initiale Denaturierung für 5 min, bzw. 15 min bei Verwendung der HotStar *Taq*-Polymerase, bei 95°C und die abschließende Extension für 5 min bei 72°C ist bei jeder PCR unverändert und wird im Folgenden nicht gesondert angegeben. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mittels Elektrophorese über 0,8-4 %ige Agarosegele, die Ethidiumbromid (0,03 µg/ml Gellösung) enthielten. Dazu wurden je 10 µl PCR-Ansatz mit 4 µl Ladepuffer versetzt. Zur Abschätzung der Größen der PCR-Produkte wurden 5 µl eines entsprechenden DNA-Größenstandards aufgetragen.

Lösungen:

Ladepuffer:

40 %	Glycerol
60 %	Aqua dest.
0,025 %	Bromphenolblau/Xylencyanol

10x TAE pH 8,5

242 g	Tris
57,7 ml	Essigsäure
100 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1000 ml	Aqua dest.

Ethidiumbromidstammlösung

1 mg/ml

Agarosegel-Laufpuffer:

0,5 x TAE

Größenstandard:

100 bp- bzw. 1kb-Leiter

3.2.3 Mikrosatelliten-Untersuchung zum Nachweis von Allelverlusten

Mikrosatellitenmarker sind kurze, sich wiederholende DNA-Sequenzen, die in regelmäßigen Abständen (statistisch ca. 30 kb) über das menschliche Genom verteilt sind. Zur Identifizierung von Allelverlusten in Verbindung mit der PCR-Technik werden bevorzugt Di-, Tri-, und Tetranukleotidwiederholungen (*simple sequence repeats*, SSR) verwendet. Als besonders geeignet für die Analyse sind die Mikrosatellitenmarker einzustufen, deren Anzahl an Wiederholungseinheiten in der Population stark variiert, d.h. eine hohe Heterozygotenfrequenz aufweisen (Hamada *et al.*, 1982, 1984; Weber *et al.*, 1990).

Ist die Anzahl der Wiederholungseinheiten der Mikrosatellitenmarker des mütterlichen und väterlichen Allels unterschiedlich, entspricht dies einer heterozygoten Allelverteilung. In einem solchen Fall können nach Amplifikation und Analyse der PCR-Produkte in denaturierenden Polyacrylamidgelen im Regelfall 4 Banden (jeweils + und - Strang des väterlichen und mütterlichen Allels) nachgewiesen werden. Als nicht informativ wird der

Allelstatus bezeichnet, bei dem die Anzahl der Wiederholungseinheiten vom mütterlichen und väterlichen Allel identisch ist. Im denaturierenden Polyacrylamidgel zeigen sich in einem solchen Falle lediglich zwei Banden.

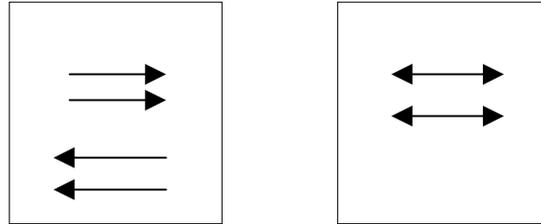


Abbildung 4 Darstellung eines LOH-Polyacrylamid-Gels. Die Banden des mütterlichen Allels sind als nach rechts zeigender Pfeil, die Banden des väterlichen Allels sind als nach links zeigender Pfeil dargestellt. Überlagerung des mütterlichen und väterlichen Allels ist als ein in beide Richtungen zeigender Pfeil dargestellt. Linke Abbildung: Beispiel eines heterozygoten (informativen) Allelstatus; rechte Abbildung: Beispiel eines homozygoten (nicht informativen) Allelstatus.

Das Fehlen eines Allels durch Deletion des entsprechenden Chromosomenabschnittes im Tumorgewebe wird als Allelverlust oder Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) bezeichnet. Der Vergleich zwischen konstitutioneller DNA aus Blutleukozyten- und Tumor-DNA eines Patienten ermöglicht somit eine Identifizierung von Allelverlusten im Tumor.

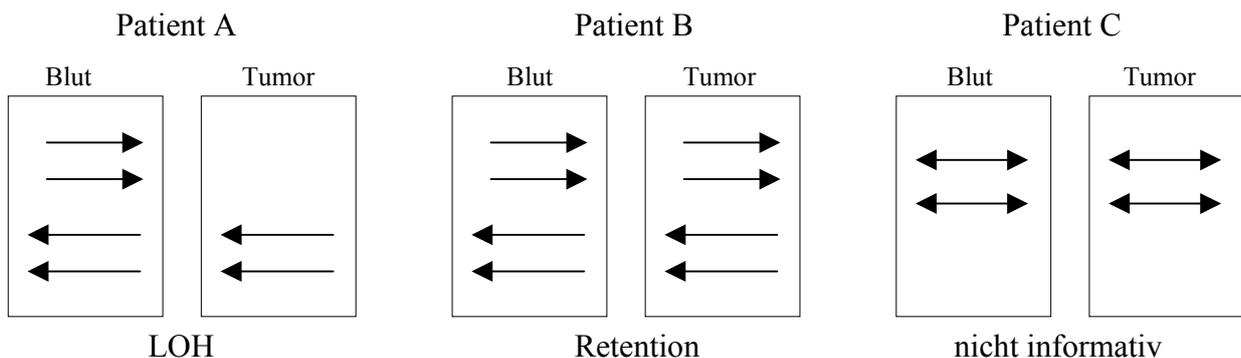


Abbildung 5 Beispiele von LOH-Polyacrylamid-Gelen. Bei Patient A ist ein Verlust der Heterozygotie durch Fehlen der beiden oberen Banden zu beobachten. Bei Patient B sind sowohl im Blut als auch im Tumor 4 gleiche Banden zu erkennen, was einer Retention der Heterozygotie, also dem Vorhandensein beider Stränge des väterlichen und des mütterlichen Allels entspricht. Bei Patient C kann weder ein Verlust noch eine Retention der Heterozygotie festgestellt werden, da nur 2 Banden auf dem nicht informativen LOH-Polyacrylamid-Gel zu erkennen sind.

Die Tabelle 3 zeigt die verschiedenen Mikrosatellitenmarker, die für die eigenen Untersuchungen zum Nachweis von Allelverlusten eingesetzt wurden. Die Primersequenzen bzw. die chromosomale Lokalisation der Marker wurden der Datenbank des Genethon (http://www.genlink.wustl.edu/genethon_frame/), der Genome Data Base (GDB, <http://www.gdb.org/gdb-bin/regionsearch.html>), dem UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/>) oder dem National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/>) entnommen.

Lösungen:

10 % Acrylamid/Bisacrylamid (Vernetzung 29:1)

1 x TBE

8 M Harnstoff

0,1 % APS

0,7 µl TEMED/µl Lösung

12 % Acrylamid/Bisacrylamid (Vernetzung 19:1)

1 x TBE

8 M Harnstoff

0,1 % APS

0,7 µl TEMED/µl Lösung

LOH-Ladepuffer:

98 %	Formamid
1 mM	EDTA
0,025 %	Bromphenolblau
0,025 %	Xylencyanol

Laufpuffer:

1 x TBE

Durchführung:

Die PCR-Reaktionen wurden unter den in Tabelle 3 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit 5 µl Ladepuffer versetzt, 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und auf 10 %ige oder 12 %ige denaturierende Polyacrylamidgele mit unterschiedlichen Vernetzungsgraden geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 45 W für 1 bis 6 Stunden. Die Produkte wurden anschließend durch Silberfärbung sichtbar gemacht (siehe 3.2.4).

Tabelle 3 Verwendete Mikrosatellitenmarker.

Mikrosatelliten- marker	chromosomale Lokalisation	PCR-Bedingungen (Annealingtemp.; Zyklenzahl; Zusätze)	Polyacrylamidgel-Bedingungen (Acryamid-Konz./Vernetzungsgrad)
D1S468	1p36	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D1S253	1p36	52°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D1S496	1p33	54°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D1S515	1p32	56°C; 30 Zyklen	10%, 29:1
D1S235	1q43	58°C; 30 Zyklen; 5% DMSO	10%, 29:1
D9S178	9p24	55°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D9S168	9p22	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D9S1748	9p21	55°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D9S157	9p21	59°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D9S162	9p21	55°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D9S171	9p13	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D10S249	10p15	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D10S215	10q23	55°C; 30 Zyklen	10%, 29:1
D10S541	10q24	58°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D10S209	10q26	58°C; 30 Zyklen	10%, 29:1
D10S587	10q26	55°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D10S212	10q26	60°C; 30 Zyklen	10%, 29:1
D17S796	17p13	55°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D17S938	17p13	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D17S786	17p13	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D17S936	17p11	55°C; 32 Zyklen	12%, 19:1
D17S947	17p11	55°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D17S953	17p11	58°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D19S217	19q13.2	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D19S219	19q13.3	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D19S572	19q13.3	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D19S210	19q13.4	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D22S264	22q11.2	60°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D22S533	22q11.2	53°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D22S689	22q11.2	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D22S929	22q12.2	58°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D22S430	22q12.2	56°C; 30 Zyklen; 5% DMSO	12%, 19:1
D22S304	22q12.3	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D22S683	22q12.3	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D22S530	22q13.1	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D22S417	22q13.2	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1
D22S532	22q13.3	56°C; 30 Zyklen	12%, 19:1

3.2.4 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Mittels Silberfärbung können DNA-Fragmente in Polyacrylamidgelen mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden (Budowle *et al.*, 1991).

Lösungen:

10 % Ethanol	Natriumcarbonatlösung:
1 % Salpetersäure	150 g Na_2CO_3
0,2 % Silbernitrat	2,5 ml 37 % Formaldehyd
10 % Essigsäure	ad 5 l Aqua dest.

Durchführung:

Die Glasplatten wurden zunächst vorsichtig voneinander getrennt und das Gel von der Platte abgezogen und in Färbeschalen gelegt. Die Gele wurden daraufhin 5 min in 10 %igem Ethanol geschwenkt und anschließend für 1-3 min in 1 %iger Salpetersäure inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Aqua dest. folgte eine 20-minütige Inkubation mit 0,2 %iger Silbernitratlösung. Anschließend wurden nicht komplexierte Silberionen durch mehrmaliges Waschen mit Aqua dest. entfernt. Mit der Zugabe von Natriumcarbonatlösung erfolgte eine pH-Änderung, deren Folge eine Reduktion der komplexierten Silberionen zu elementarem Silber ist. DNA wurde so als deutliche, braun gefärbte Bande auf dem Gel sichtbar. Durch erneute pH-Wert-Umkehr mit Hilfe 10 %iger Essigsäure wurde die Reaktion gestoppt, das Gel auf ein Filterpapier aufgezogen und bei 80°C für 1 Stunde auf einem Vakuumtrockner getrocknet.

3.2.5 Mutationsanalyse mit Hilfe der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP-Analyse)

Die SSCP-Methode (*single-strand conformation polymorphism*) erlaubt es, kurze DNA-Fragmente nach PCR-Amplifikation auf Mutationen hin zu untersuchen (Orita *et al.*, 1989, Hayashi, 1992a und 1992b). Hierbei nimmt einzelsträngige DNA, die eine Mutation trägt, in nativen, nicht denaturierenden Gelen häufig eine andere Konformation als Wildtyp-DNA ein und zeigt daher in der Gelelektrophorese ein verändertes Laufverhalten. Die elektrophoretische Mobilität hängt somit sowohl von der Länge als auch von der Konformation des DNA-Fragmentes ab. Diese ist ihrerseits durch die Sequenz bedingt. Bereits eine einzelne Basensubstitution kann eine Konformationsänderung bedingen und bei optimalen Bedingungen mittels SSCP-Analyse detektiert werden. Eine Reihe von Parametern, wie die Temperatur des Gels, der Vernetzungsgrad der Polymere, der Zusatz von Glycerol

oder die Ionenstärke von Gel- und Laufpuffer beeinflussen die Konformation des Einzelstranges und somit das Wanderungsverhalten. Die SSCP-Methode eignet sich besonders gut für Mutationsanalysen mit großem Probenumfang. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass in PCR-Produkten, die länger als 300 bp sind, nur noch weniger als 80 % der Mutationen detektiert werden können (Hayashi, 1993). Aus diesem Grund wurden alle PCR-Produkte über 300 bp Länge mittels Restriktionsenzymverdau in kleinere Fragmente geschnitten.

Allein durch das veränderte Laufverhalten von PCR-Produkten können keine Rückschlüsse auf die Art oder Position der Mutation in einem DNA-Strang gezogen werden. Daher schließt sich eine Sequenzierung dieser Proben an.

In den folgenden Tabellen sind die in den eigenen SSCP-Analysen verwendeten Primer, Amplifikations- und SSCP-Gelbedingungen aufgelistet:

Tabelle 4 Primersequenzen, PCR- und SSCP-Bedingungen für die Mutationsanalyse des *TP53*-Gens.

Primerpaar	Sequenz	Fragmentgröße (bp)	PCR-Bedingungen (Annealingtemp., Zyklenzahl, Zusätze)	SSCP-Gelbedingungen (Gelkonz.; Vernetzungsgrad; Zusätze, Temp.)
p53 Ex4.1-F p53 Ex 4.1R	5'-acttctgaaaacaacgttct-3' 5'-gtgaaccattgttcaatatcg-3'	183	58°C, 35 Zyklen	10%, 29:1, 2M Harnstoff, 4°C 8%, 29:1, 2M Harnstoff, RT
p53 Ex4.2-F p53 Ex4.2R	5'-gccgtccaagcaatggatg-3' 5'-agacggaaaccgtagctgc-3'	228	58°C, 35 Zyklen	10%, 29:1, 2M Harnstoff, 4°C 10%, 29:1, 5% Glycerol, RT
p53 Ex4.3-F p53 Ex4.3-R	5'-tcccttcccagaaaaccctac-3' 5'-gaatcccaaagttccaaaaca-3'	174	56°C, 35 Zyklen	10%, 29:1, 2M Harnstoff, 4°C 10%, 49:1, 4°C
p53 Ex5.1-F p53 Ex5.1-R	5'-tcaactgtctccttctc-3' 5'-ctgtgactgctttagatgg-3'	228	58°C, 35 Zyklen	10%, 29:1, 2M Harnstoff, RT 10%, 29:1, 2M Harnstoff, 4°C
p53 Ex5.2-F p53 Ex5.2-R	5'-gcagctgtgggtgattccac-3' 5'-gaatcagaggcctggggac-3'	198	58°C, 35 Zyklen	10%, 29:1, 2M Harnstoff, RT 10%, 29:1, 2M Harnstoff, 4°C
p53 Ex6-F p53 Ex6-R	5'-gtccccaggcctctgattc-3' 5'-cagtgcaaacaccagacctcag-3'	166	60°C, 35 Zyklen	10%, 29:1, 2M Harnstoff, RT 10%, 29:1, 2M Harnstoff, 4°C
p53 Ex7-F p53 Ex7-R	5'-ctcatcttggcctgtgtatc-3' 5'-gcacagcaggccagtg-3'	179	60°C, 35 Zyklen	10%, 29:1, 2M Harnstoff, RT 10%, 49:1, 5% Glycerol, RT
p53 Ex8-F p53 Ex8-R	5'-gagtagtgtaactactgggac-3' 5'-ctccaccgtcttcttctc-3'	172	60°C, 35 Zyklen, 5% DMSO	10%, 29:1, 2M Harnstoff, 4°C 10%, 29:1, 2M Harnstoff, RT

p53 Ex9-F	5'-gcagttatgcctcagattca-3'	186	55°C, 35 Zyklen, 20% Betain	14%, 99:1, RT
p53 Ex9-R	5'-cggcattttgagtgttagact-3'			
p53 Ex10-F	5'-ggtagctgtatatacttac-3'	228	52°C, 35 Zyklen	10%, 99:1, 5% Glycerol
p53 Ex10-R	5'-atgagaatggaatcctatgg-3'			

Tabelle 5 Primersequenzen, PCR- und SSCP-Bedingungen für die Mutationsanalyse der Gene *CDKN2A*, *p14^{ARF}*, *CDKN2B* und *TIAM1*.

Primerpaar	Sequenz	Fragmentgröße (bp)	PCR-Bedingungen (Annealingtemp.; Zyklenzahl; Zusätze)	SSCP-Gelbedingungen (Gelkonz.; Vernetzungsgrad; Zusätze, Temp.)
CDKN2A-Ex1/F CDKN2A-Ex1/R	5'-gaagaagaggaggggctg-3' 5'-gcgctacctgattccaattc-3'	340 (167,173)	58°C, 35 Zyklen, 20% Betain; Verdau mit <i>SmaI</i>	14%, 99:1, RT 10%, 29:1, 4°C
CDKN2A-Ex2/F CDKN2A-Ex2/R	5'-gaaaattgaaactggaagc-3' 5'-tctgagcttggagctct-3'	508 (260, 249)	58°C, 35 Zyklen, 5% Formamid; Verdau mit <i>SmaI</i>	10%, 79:1, RT 10%, 99:1, RT
CDKN2A-Ex3/F CDKN2A-Ex3/R	5'-ccgtagggagcggcaagaga-3' 5'-ctgtaggacctcggtgactg-3'	169	60°C, 35 Zyklen, 20% Betain	14%, 99:1, 4°C 10%, 29:1, 4°C
p14ARF-Ex1b/F1 p14ARF-Ex1b/R1	5'-gtcccatctgcagttaagg-3' 5'-tgagccgaggatgtgaac-3'	192	58°C, 35 Zyklen, 20% Betain	8%, 29:1, 4°C 14%, 99:1, 4°C
p14ARF-Ex1b/F2 p14ARF-Ex1b/R2	5'-ccgagtgagggttttcg-3' 5'-cctagaatgggctagagacg-3'	233	58°C, 35 Zyklen, 20% Betain	10%, 79:1, RT 8%, 29:1, 4°C
CDKN2B-Ex1/F CDKN2B-Ex1/R	5'-aagagtgcgtaagtttacg-3' 5'-acatcggcgatctaggtcca-3'	315	56°C, 30 Zyklen, 20% Betain	10%, 29:1, 4°C 14%, 99:1, RT
CDKN2B-Ex2/F CDKN2B-Ex2/R	5'-tgagtataacctgaaggtgg-3' 5'-gggtgggaaattggtaag-3'	512 (314,212)	58°C, 35 Zyklen, 20% Betain; Verdau mit <i>SmaI</i>	10%, 79:1, RT 10%, 99:1, RT
TIAM1-F TIMA1-R	5'-ctcgtcaggggtgtacgag-3' 5'-accggtgcatttggcacatagccg-3'	318	59°C, 30 Zyklen	

Für die *TIAM1*-Mutationsanalyse folgte eine direkte Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte.

3.2.6 Ausschneiden von DNA-Banden aus Polyacrylamidgelen

Die nach der Silberfärbung der SSCP-Gele detektierten aberranten Banden wurden mit einem Skalpell aus dem feuchten Gel ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden in

Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 50 µl Aqua dest. versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei 50°C auf einem Schüttler inkubiert und die DNA-haltige, wässrige Phase danach in ein frisches Gefäß überführt.

1-5 µl dieser Lösung wurde in eine Reamplifizierungs-PCR eingesetzt, bei der alle PCR-Bedingungen der primären PCR übernommen wurden.

3.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung

Um nicht eingebaute Primer, *Taq*-Polymerase und Salze zu entfernen, wurden die PCR-Produkte über Affinitätssäulen der Firma Roche (PCR Product Purification Kit) aufgereinigt. Dabei werden Nukleinsäuren spezifisch an eine Glasmembran gebunden und können nach einem einfachen Waschvorgang durch Elution in Wasser (pH > 7,5) oder in einem Niedrigsalzpuffer gelöst werden. Die Durchführung erfolgte wie im Hersteller-Protokoll angegeben. Die PCR-Produkte wurden in 30-60 µl 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) von der Säule eluiert und konnten direkt in eine Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden.

3.2.8 Sequenzierung

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) mit einem automatischen DNA-Sequenzierer der Firma Applied Biosystems (ABI 377) sequenziert. Für die Sequenzierungsreaktion wurde der PRISM™ Ready Reaction Big DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems eingesetzt. Dieses Verfahren der DNA-Sequenzierung beruht auf der enzymatisch katalysierten Synthese einer Population von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten, die nach ihrer Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. In der Reaktion werden verschiedenfarbig markierte Didesoxynukleotide verwendet. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden während der Elektrophorese mit einem Laser angeregt und können detektiert werden.

Material und Lösungen:

PRISM™ Ready Reaction Big DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

Sequenziergel:	Ladepuffer (Formamid/EDTA 4:1):
6 % Acrylamidstammlösung (29:1)	98 % deionisiertes Formamid
1x TBE	50 mM EDTA, pH 8,0
8 M Harnstoff	
0,1 % APS	
0,7 µl TEMED/µl Lösung	

Die Sequenzierreaktion setzt sich wie folgt zusammen: Programm:

2 µl	BigDye Terminator Premix	96°C 2 min initiale Denaturierung
1,6 pmol	Primer	96°C 10 sec Denaturierung
25 ng	Template (Matrizen-DNA)	55°C 10 sec Primeranlagerung
ad 10 µl	Aqua bidest.	60°C 3 min Extension

Durchführung:

Die Reaktion wurde mit 25 Zyklen in einem Trio-Thermoblock der Firma Biometra durchgeführt. Die Sequenzierprodukte wurden anschließend durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,4) und 2,5 Vol. 95 %igem Ethanol bei Raumtemperatur gefällt. Das Pellet wurde mit 200 µl 75 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 4 µl Ladepuffer resuspendiert. Die Auftrennung erfolgte auf Polyacrylamidgelen in einem automatischen DNA-Sequenzierer bei 2500 V, 40 mA und 30 W für 3-4 Stunden.

3.2.9 Untersuchung des Methylierungsstatus der DNA

Durch die Behandlung von genomischer DNA mit Natriumbisulfit und anschließender methylierungsspezifischer PCR (*methylation specific PCR*, MSP) können gezielt aberrante Methylierungen im Promotorbereich von Kandidatengenen analysiert werden (Herman *et al.*, 1996). Die Methylierung der DNA ist eine Enzym-vermittelte chemische Modifikation, bei der eine Methyl-Gruppe an das C₅ eines Cytosins gebunden wird, welches vor einem Guanosin steht (CpG). Dieser Mechanismus ist eine natürlich vorkommende Modifikation im Genom von Wirbeltieren. Findet eine Methylierung im Promotorbereich eines Gens statt, so kann hierdurch die Transkription dieses Gens unterdrückt werden. In neoplastischen Zellen kann eine aberrante CpG-Methylierung vorliegen, die zur Folge hat, dass z. B.

Tumorsuppressorgene, die in einer nicht-neoplastischen Zelle transkribiert werden, in den Tumorzellen aufgrund der Methylierung nicht mehr transkribiert und exprimiert werden.

Durch Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit werden unmethylierte Cytosine zu Uracil umgewandelt, methylierte Cytosine nicht. Die Natriumbisulfit-behandelte DNA dient als Template für zwei parallel laufende PCR-Reaktionen. Eine PCR-Reaktion wird mit Primern durchgeführt, die nur an die CpG-haltige Promotorregion des zu untersuchenden Gens binden, wenn eine Methylierung in dieser Region vorliegt und die andere PCR-Reaktion mit Primern, die nur an die CpG-haltige Promotorregion des zu untersuchenden Gens binden, wenn keine Methylierung in dieser Region vorliegt. Je nach Methylierungsstatus des zu untersuchenden Gens wird ein PCR-Produkt mit den Primern für methylierte DNA oder mit den Primern für nicht-methylierte DNA erzielt (Herman *et al.*, 1996).

Material und Lösungen:

Lösungen müssen frisch angesetzt werden !

10 N NaOH

3 M Natriumbisulfit pH 5,0:

6,24 g	Natriumbisulfit
ad 20 ml	Aqua dest

10 mM Hydrochinon:

0,11 g	Hydrochinon
ad 100 ml	Aqua dest.

Wizard DNA Clean-Up System (Promega)

Durchführung:

Zur Denaturierung der DNA-Proben wurde 1 µg DNA mit 1,5 µl 10 N NaOH und 18,5 µl Aqua dest. versetzt, gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl 10 mM Hydrochinon und 520 µl 3 M Natriumbisulfit inkubierten die Proben für 16 Stunden bei 55°C. Die Aufreinigung der Natriumbisulfit-behandelten DNA erfolgte nach Anleitung des Wizard DNA-Clean-Up Systems der Firma Promega. Die aufgereinigte, in Aqua dest. eluierte DNA wurde mit 1,5 µl 10 N NaOH für 15 min bei 37°C denaturiert. Nach Salzfällung der DNA mit 3 M Natriumacetat pH 5,2 erfolgte nach einem Waschschrift die Elution der DNA mit 15 µl Aqua dest.. Die in die folgenden PCR-Reaktionen eingesetzten Primer für die methylierte bzw. nicht-methylierte DNA liegen innerhalb der Promotorregionen der Gene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* (Herman *et al.*, 1996, Esteller *et al.*, 2001). Die Amplifikation der DNA

wurde unter den in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen mit 1 µl der Natriumbisulfit-modifizierten DNA, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 0,5 µM Vorwärts bzw. Rückwärts-Primer und einer Reaktionseinheit HotStar *Taq*-Polymerase (Qiagen) in einem Gesamtvolumen von 30 µl durchgeführt. 15 µl des PCR-Produkts wurden auf 2,5 %ige Ethidiumbromid-haltige Agarosegele aufgetragen und die PCR-Produkte der methylierungsspezifischen PCR wurden mit denen der nicht-methylierungsspezifischen PCR verglichen. Lag eine Methylierung in der untersuchten Region einer DNA vor, konnte ein PCR-Produkt nach der PCR mit methylierungsspezifischen Primern, nicht aber nach der PCR mit Primern für nicht methylierte DNA beobachtet werden.

Die Methylierungsuntersuchungen wurden an 10 PXA (8 PXA II, 2 PXA waf) durchgeführt. Als Positivkontrolle für nicht methylierte DNA diente nicht-neoplastisches humanes Gehirngewebe und als Positivkontrolle für methylierte DNA diente ein anaplastisches Oligodendrogliom (AO2), das in den Genen *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* methyliert ist (Wolter *et al.*, 2001).

Tabelle 6 Primersequenzen und PCR-Bedingungen für die methylierungsspezifische PCR.

Primerpaar	Primersequenz	PCR-Bedingungen (Annealingtemp., Zyklenzahl)
p14M-F p14M-R	5'-gtgtaaaggcgtagc-3' 5'-aaaaccctcactcgcgacga-3'	60°C, 35 Zyklen
p14U-F p14U-R	5'-ttttggtgtaaagggtgtagt-3' 5'-cacaaaacctcactcacacaa-3'	60°C, 35 Zyklen
p15M-F p15M-R	5'-gcgttcgtatttgcggtt-3' 5'-cgtacaataaccgaacgaccga-3'	60°C, 37 Zyklen
p15U-F p15U-R	5'-tgtgatgtttgtatttgggtt-3' 5'-ccatacaataaccaaacacaa-3'	60°C, 40 Zyklen
p16M-2R p16M-F	5'-ccacctaaatcgacctccgaccg-3' 5'-ttattagagggtggggcgatcgc-3'	68°C, 35 Zyklen
p16U-F p16U-R	5'-ttattagagggtgggtgattgt-3' 5'-caacccaaccacaaccataa-3'	60°C, 40 Zyklen

3.2.10 Untersuchung zur Amplifikation und homozygoten Deletion von Genen

Die Untersuchung der Proto-Onkogene *EGFR*, *CDK4* und *MDM2*, der Kandidatengene *MGP*, *TIMP1* und *DCN*, sowie der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* auf Amplifikation bzw. Deletion erfolgte mit Hilfe von Duplex-PCR-Analysen. Hierzu wurde jeweils ein Fragment des zu untersuchenden Gens zusammen mit einem Fragment eines Referenzgens in derselben PCR-Reaktion amplifiziert. Die Signalintensität für das zu untersuchende Gen wird dann densitometrisch mit der Signalintensität für das Referenzgen in Bezug gesetzt und gegen konstitutionelle DNA aus normalem Hirngewebe oder Leukozyten abgeglichen. Unterschiede in der Ausgangskopienzahl lassen sich bei dieser Analyse nur feststellen, wenn sich die PCR-Reaktion in ihrer exponentiellen Phase befindet, da sich die DNA-Mengen im Plateaubereich einem Sättigungswert annähern. Vor Beginn der eigentlichen Untersuchung wurde deshalb eine Zyklen-Kinetik durchgeführt. Dazu wurde nach jedem Zyklus, der dem 20. Zyklus der PCR-Reaktion folgte, ein Reaktionsgefäß aus dem Thermocycler entfernt und alle Produkte später parallel auf einem Agarosegel aufgetragen. Blieben die PCR-Produkt-Mengen konstant, war die Plateauphase erreicht. Für die eigentlichen Analysen wurde dann eine Zykluszahl ausgewählt, die vor der Zykluszahl der Plateauphase, d.h. in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion lag.

Für die Duplex-PCR-Reaktionen wurden ca. 20 ng Matrizen-DNA eingesetzt und die PCR nach den in Tabelle 7 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Als konstitutionelle Referenz wurde DNA aus nicht-neoplastischem Gehirngewebe eingesetzt. Nach Abschluss der PCR-Reaktionen wurden die Proben auf ein 3- oder 4 %iges Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Messung und densitometrische Analyse der Signalintensitäten erfolgte mit dem Gel-Doc 1000 System und dem Programm Molecular AnalystTM von BioRad. Eine Zunahme im Zielgen/Referenzgen-Verhältnis von mehr als 3-fach relativ zu konstitutioneller DNA wurde als Amplifikation und eine Abnahme im Zielgen/Referenzgen-Verhältnis in einen Bereich kleiner als 0,3 relativ zu konstitutioneller DNA als homozygote Deletion gewertet.

Tabelle 7 Primersequenzen und PCR-Bedingungen für die Duplex-PCR-Analysen.

Zielgen-Primer (Fragmentgröße)	Referenzgen-Primer (Fragmentgröße)	PCR-Bedingungen (Annealingtemp., Zyklenzahl, Zusätze)	Positivkontrolle
p16-F (115 bp) 5'-agcagcatggagccttcggc-3'	GAPDH-F (175 bp) 5'-ctaggcagcagcaagcattc-3'	58°C, 28 Zyklen, 5% Formamid	U118MG (homozygote <i>CDKN2A</i> - Deletion)
p16-R 5'-cgtaactatcgggtgcgttg-3'	GAPDH-R 5'-gcttaaggcatggctcaac-3'		
p14ARF-F (192 bp) 5'-gtcccatctgcagtaagg-3'	IFNG-F1 (85 bp) 5'-agtgatgctgactggc-3'	56°C, 33 Zyklen, 20% Betain	U118MG (homozygote <i>p14^{ARF}</i> - Deletion)
p14ARF-R 5'-tgagccgaggatggaac-3'	IFNG-R1 5'-ctgggatgctcttcca-3'		
CDKN2B-F (315 bp) 5'-aagagtgtcgttaagtttacg-3'	IFNG-F1 (85 bp) 5'-agtgatgctgactggc-3'	56°C, 30 Zyklen, 20% Betain	U118MG (homozygote <i>CDKN2B</i> - Deletion)
CDKN2B-R 5'-acatcggcgatctaggtcca-3'	IFNG-R1 5'-ctgggatgctcttcca-3'		
CDK4-F (205 bp) 5'-catgtagaccaggacctaagg-3'	IFNG-F2 (93 bp) 5'-gcagagccaaattgtctcc-3'	56°C, 30 Zyklen	TP365M (<i>CDK4</i> -Amplifikation)
CDK4-R 5'-aactggcgcatcatcctag-3'	IFNG-R2 5'-gtcttcttgatggtctcc-3'		
MDM2-F (107 bp) 5'-gtgaatgattcccagagagtc-3'	IFNG-F1 (85 bp) 5'-agtgatgctgactggc-3'	56°C, 30 Zyklen	TP365MG (<i>MDM2</i> -Amplifikation)
MDM2-R 5'-gctactagaagttgatggc-3'	IFNG-R1 5'-ctgggatgctcttcca-3'		
EGFR-F (110 bp) 5'-agccatgcccgattagctc-3'	APRT-F (134 bp) 5'-caggaacacattccttgc-3'	56°C, 30 Zyklen	S28970-91 (<i>EGFR</i> -Amplifikation)
EGFR-R 5'-aaaggaatgcaactcccaa-3'	APRT-R 5'-tgggaaagctgttactgcg-3'		
TIMP1-F (206bp) 5'-agcaggaggtttctcattgc-3'	IFNG-F (93 bp) 5'-gcagagccaaattgtctcc-3'	59°C, 30 Zyklen	-
TIMP1-R 5'-acagcagcattgtgattggc-3'	IFNG-R 5'-gtcttcttgatggtctcc-3'		
DCN-F (180 bp) 5'-tctaggttccctggttg-3'	IFNG-F (93 bp) 5'-gcagagccaaattgtctcc-3'	59°C, 30 Zyklen	-
DCN-R 5'-ctcgaagtcggtcatcag-3'	IFNG-R 5'-gtcttcttgatggtctcc-3'		
MGP-F (103 bp) 5'-ggatccgagaacgctctaag-3'	APRT-F (208 bp) 5'-caacatctccagctgatcc-3'	59°C, 29 Zyklen	-
MGP-R 5'-ggcagcatttatcctaaacc-3'	APRT-R 5'-tgggaaagctgttactgcg-3'		

3.2.11 Expressionsanalyse

3.2.11.1 cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese wurde nach dem Protokoll des SuperScript™ Preamplification System für Erststrang-Synthese der Firma Gibco/BRL durchgeführt. Unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase wurde dabei ein zu der eingesetzten RNA komplementärer DNA-Strang (cDNA) synthetisiert. Als Primer wurden Random-Hexamer-Primer verwendet, die eine Erststrang-cDNA-Synthese beginnend in beliebigen Bereichen der Transkripte ermöglichen. Es wurden 3 µg Gesamt-RNA mit 50 pg Random-Hexamer-Primer versetzt, 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend sofort eisgekühlt. Ein Mix aus 10x Puffer, dNTPs (10 mM), DTT (0,1 M) und Reverse Transkriptase (100 U) wurde zugegeben und die Umschreibung erfolgte bei 42°C für 50 min. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 70°C für 15 min beendet und die cDNA bei -20°C gelagert. In anschließend durchgeführte PCR-Reaktionen wurde die cDNA 1:5 verdünnt eingesetzt.

3.2.11.2 Überprüfen der RNA/cDNA auf genomische DNA-Kontamination

Der Ausschluss einer genomischen DNA-Kontamination in der extrahierten und DNase-behandelten RNA erfolgte durch eine PCR-Reaktion. Hierzu wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben und dann eine PCR-Reaktion (58°C, 40 Zyklen) mit intronisch liegenden Primern des *BUB1*-Gens (BUB1-11: TGAAAGCTCTTTTGCAACCTG; BUB1-12: GTGATAACCACCTATAATGC) durchgeführt. Als Positivkontrolle diente genomische DNA. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Nicht kontaminierte cDNAs durften auch nach 40 Zyklen kein Produkt zeigen. Wenn ein Produkt zu sehen war, wurde die RNA nochmals mit DNaseI behandelt und erneut kontrolliert.

3.2.11.3 Expressionsanalysen mittels Duplex-RT-PCR bzw. Triplex-RT-PCR

Zur semiquantitativen Bestimmung der mRNA-Expression von Kandidatengenen wurden Duplex-RT-PCR-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde ein Fragment des zu untersuchenden Gens gemeinsam mit einem Fragment eines Haushaltsgens (*housekeeping gene*) in der gleichen PCR-Reaktion amplifiziert. Das mRNA-Expressionslevel des jeweiligen

Kandidatengens wurde dann densitometrisch in Relation zum mRNA-Expressionslevel des Haushaltsgens bestimmt und mit dem Kandidatengen/Haushaltsgen-mRNA-Quotienten in normalem Hirngewebe verglichen.

Zum Nachweis verschiedener Spleißvarianten des *CD34*-Gens wurde eine Triplex-RT-PCR, bei der zwei unterschiedlich große Fragmente der beiden CD34-Spleißvarianten und ein Fragment von gamma-Actin gemeinsam amplifiziert wurden, durchgeführt.

Durchführung und Auswertung erfolgten wie in Kapitel 3.2.10 bereits beschrieben.

Für die PCR wurde 1 µl einer 1:5-Verdünnung der cDNA eingesetzt. Als Referenzgewebe wurde nicht-neoplastisches humanes Gehirngewebe (graue und weiße Substanz) herangezogen.

Tabelle 8 Primersequenzen und Bedingungen für die Duplex-RT-PCR-Analysen.

Zielgen-Primersequenz (Fragmentgröße)	Referenzgen-Primersequenz (Fragmentgröße)	PCR-Bedingungen (Annealingtemp., Zyklenzahl, Zusätze)
A2M-RT-F (218 bp) 5'-atagtacgctccgactgc-3' A2M-RT-R 5'-tgtgattcactggctgcc-3'	ARF1-RT-F (109 bp) 5'-gaccacgatcctctacaagc-3' ARF1-RT-R 5'-tcccacacagtgaagctgatg-3'	58°C, 28 Zyklen
CD74-RT-F (188 bp) 5'-ggctttgagagctggatgc-3' CD74-RT-R 5'-atgtgaagaccgctctgc-3'	ACTG-RT-F (114 bp) 5'-gacaccagggcgtcatggtg-3' ACTG-RT-R 5'-gtgacgatgccatgctcaatgg-3'	60°C, 28 Zyklen, 5% Formamid
CDKN1A-RT-F (171 bp) 5'-agcagaggaagaccatgtgg-3' CDKN1A-RT-R 5'-ctctggagaagatcagccg-3'	ARF1-RT-F (109 bp) 5'-gaccacgatcctctacaagc-3' ARF1-RT-R 5'-tcccacacagtgaagctgatg-3'	58°C, 27 Zyklen
DCN-RT-F (193 bp) 5'-cacaactctgtagacctgc-3' DCN-RT-R 5'-ttctggcaattcctcagctg-3'	β2MG-RT-F (114 bp) 5'-acccccactgaaaagatga-3' β2MG-RT-R 5'-atcttcaaacctccatgatg-3'	59°C, 28 Zyklen
ITGB8-RT-F (203 bp) 5'-tgctgaaagttcatcctctg-3' ITGB8-RT-R 5'-gtggatgactaatgtatggtg-3'	ARF1-RT-F (109 bp) 5'-gaccacgatcctctacaagc-3' ARF1-RT-R 5'-tcccacacagtgaagctgatg-3'	58°C, 28 Zyklen
NTRK2-RT-F (186 bp) 5'-ctggataaggtggcatggac-3' NTRK2-RT-R 5'-ggatctacactgttaggctc-3'	ACTG-RT-F (114 bp) 5'-gacaccagggcgtcatggtg-3' ACTG-RT-R 5'-gtgacgatgccatgctcaatgg-3'	58°C, 28 Zyklen, 5% Formamid

PDGFRA-RT-F (205 bp) 5'-ctaactctctgccagcttc-3' PDGFRA-RT-R 5'-tcactccaagaccgtcac-3'	ARF1-RT-F (109 bp) 5'-gaccacgatcctctacaagc-3' ARF1-RT-R 5'-tcccacacagtgaagctgatg-3'	58°C, 28 Zyklen
PTN-RT-F (228 bp) 5'-gcagtgaggagtgtgtgtgc-3' PTN-RT-R 5'-agggtcgccttcagactcc-3'	ACTG-RT-F (114 bp) 5'-gaccacaggcgctcatggtg-3' ACTG-RT-R 5'-gtgacgatgccatgctcaatgg-3'	60°C, 28 Zyklen; 5% Formamid
TIMP1-RT-F (199 bp) 5'-agcagaggtttctcattgc-3' TIMP1-RT-R 5'-agcaatgagtgccactctgc-3'	β2MG-RT-F (114 bp) 5'-acccccactgaaaagatga-3' β2MG-RT-R5'- atcttcaaacctccatgatg-3'	58°C, 27 Zyklen
ADD3-RT-F (213 bp) 5'-aacaggctatgcttacaggc-3' ADD3-RT-R 5'-gactcctcaggcacattcac-3'	ARF1-RT-F (109 bp) 5'-gaccacgatcctctacaagc-3' ARF1-RT-R 5'-tcccacacagtgaagctgatg-3'	58°C, 28 Zyklen
IFITM-RT-F (200 bp) 5'-cttgaactggctgtctg-3' IFITM-RT-R 5'-ggtagactgttacagagccg-3'	ARF1-RT-F (109 bp) 5'-gaccacgatcctctacaagc-3' ARF1-RT-R 5'-tcccacacagtgaagctgatg-3'	58°C, 27 Zyklen
MMP11-RT-F (160 bp) 5'-tgagattgcaccgctggcgc-3' MMP11-RT-R 5'-agaggccaatgctggtagc-3'	ARF1-RT-F (109 bp) 5'-gaccacgatcctctacaagc-3' ARF1-RT-R 5'-tcccacacagtgaagctgatg-3'	59°C, 27 Zyklen, 5% Formamid
NOTCH1-RT-F (182 bp) 5'-agatcgacgtcaacgagtg-3' NOTCH1-RT-R 5'-attgatctgtccaggcagc-3'	ACTG-RT-F (114 bp) 5'-gaccacaggcgctcatggtg-3' ACTG-RT-R 5'-gtgacgatgccatgctcaatgg-3'	58°C, 27 Zyklen
JNK2-RT-F (355 bp) 5'-aagtcactcgggtatgggc-3' JNK2-RT-R 5'-tctacagatccgctgtgc-3'	ARF1-RT-F (204 bp) 5'-gaccacgatcctctacaagc-3' ARF1-RT-R2 5'-tctctgctattgctccacc-3'	59°C, 27 Zyklen
TDGF1-RT-F (411 bp) 5'-tccagaactaccaccgtctg-3' TDGF1-RT-R 5'-aaccaagatcgctcattgc-3'	ARF1-RT-F (204 bp) 5'-gaccacgatcctctacaagc-3' ARF1-RT-R2 5'-tctctgctattgctccacc-3'	58°C, 30 Zyklen
AKT1-RT-F (186 bp) 5'-aggacttctacagctatg-3' AKT1-RT-R 5'-tggccagcaccatagtag-3'	β2MG-RT-F (114 bp) 5'-acccccactgaaaagatga-3' β2MG RT-R 5'-atcttcaaacctccatgatg-3'	56°C, 30 Zyklen, 5% DMSO
AKT2-RT-F (157 bp) 5'-ccgaggtcgacacaaggtac-3' AKT2-RT-R 5'-actgctcactcgggatgct-3'	ARF1-RT-F (204 bp) 5'-gaccacgatcctctacaagc-3' ARF1-RT-R2 5'-tctctgctattgctccacc-3'	56°C, 28 Zyklen, 5% DMSO
CD34-RT-F1 (101 bp) 5'-gaaaggctggcggaagacc-3' CD34-RT-F3 (147 bp) 5'-ccagtgctctcacagccctgc-3' CD34-RT-R1 5'-acactggccttccctgagc-3'	ACTG-RT-F (246 bp) 5'-gaccacaggcgctcatggtg-3' ACTG-RT-R2 5'-gagtcattctctctgttggc-3'	62°C, 29 Zyklen, 20% Betain

3.2.11.4 Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR-Technologie

Im Gegensatz zu PCR-Endproduktbestimmungen können bei der Real-Time PCR-Technologie PCR-Produktmengen im Verlauf einer PCR-Reaktion gemessen werden. Dabei erfolgen die Amplifikation und der Nachweis eines PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß. Der Farbstoff SYBR-Green interkaliert am Ende jedes Zyklusses in den entstehenden DNA-Doppelstrang und wird zur Fluoreszenz angeregt. Diese Fluoreszenz, die direkt proportional zur entstehenden PCR-Produkt-Menge ist, wird nach jedem Zyklus gemessen. Um sicher zu gehen, dass nur das gewünschte PCR-Produkt amplifiziert und detektiert wurde, wird nach der PCR-Reaktion eine Dissoziationskurve des PCR-Produktes erstellt. Wurde in der vorangegangenen PCR nur ein Produkt amplifiziert, so ist nur bei einer bestimmten Schmelztemperatur ein Signal zu sehen. Wurden mehrere (unspezifische) Produkte amplifiziert, sind mehrere Signale zu sehen. Die relative Quantifizierung erfolgt auch hier durch Verwendung eines Haushaltsgens, auf das die Expression des zu untersuchenden Gens bezogen wird. Im Unterschied zu der Expressionsanalyse mittels Duplex-RT-PCR findet die PCR-Reaktion für das Ziel- bzw. Referenzgen in zwei unterschiedlichen Reaktionsgefäßen statt (*double tube reaction*).

Material und Lösungen:

optical 96-well reaction plate (Eurogentec)

TaqMan™ RT-PCR Core Kit

adhesive covers (Applied Biosystems)

(Applied Biosystems)

Sybr Green core kit (Eurogentec)

Durchführung:

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. In die PCR-Reaktion wurden 2 µl einer 1:10 Verdünnung der cDNA, 1x SYBR-Puffer, 3 mM MgCl₂, 200 µM dATP, dCTP, dGTP und 400 µM dUTP, 50-900 nM Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 0,01 Unit AmpErase (NG) und 0,025 Unit AmpliTaq Gold eingesetzt. Nach der Aktivierung der Uracyl-N-Glykosylase (NG, Beseitigung eventuell vorhandener Verunreinigungen durch PCR-Produkte) für 2 min bei 50°C und einer initialen Denaturierung für 10 min bei 95°C folgten 40 Zyklen mit 15 sec bei 95°C und 1 min bei 60°C. Anschließend wurde eine Dissoziationskurve beginnend bei 60°C erstellt.

Zunächst wurde für jedes Zielgen die optimale Primer-Konzentration ermittelt (Primermatrix). Dabei wurde das Verhältnis von Vorwärts- und Rückwärts-Primer bei gleich bleibender cDNA-Konzentration variiert (50 nM, 300 nM, 900 nM). Als optimale Primer-Konzentration wurde die Primer-Konzentrations-Kombination ausgewählt, bei der die exponentielle Phase der PCR-Reaktion in einem möglichst frühen PCR-Zyklus erreicht wurde. In Tabelle 9 sind die Sequenzen und die optimalen Primerkombinationen aufgelistet. Bei allen Expressionsuntersuchungen wurden drei Wiederholungen pro Reaktion in einem PCR-Lauf durchgeführt. Die RT-PCR wurde in einem ABI PRISM 5700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der PCR-Zyklenzahl, bei der ein bestimmter Schwellenwert (C_t -Wert) erreicht wurde. Dieser Schwellenwert muss im exponentiellen Bereich aller PCR-Reaktionen liegen und wurde vorher festgelegt. Je kleiner dieser C_t -Wert ist, umso höher ist die Kopienzahl eines Gens in der Ausgangs-cDNA. Die Zyklenzahl am Schwellenwert wird sowohl für das Referenzgen als auch für das Zielgen bestimmt. Die Quantifizierung wurde gemäß der komparativen C_t -Methode (beschrieben im User Bulletin #2, Applied Biosystems) durchgeführt. Für die relative Quantifizierung wurde das Haushaltsgen *ARF1* (ADP-Ribosylation-Factor-1) als Referenzgen herangezogen. Als Referenzgewebe wurde nicht-neoplastisches Hirngewebe (graue und weiße Substanz) eingesetzt. Alle ermittelten Zyklenzahlen (C_t -Werte) des Zielgens werden auf die ermittelten Zyklenzahlen des Referenzgens (*ARF1*) normalisiert. Dies erfolgt, indem man die für die *ARF1*-PCR-Reaktion ermittelte Zyklenzahl von der Zyklenzahl der PCR-Reaktion des Zielgens der gleichen Probe subtrahiert. Man erhält den sogenannten ΔC_t -Wert einer Probe bzw. des nicht-neoplastischen Gewebes. Von dem ΔC_t -Wert einer Probe subtrahiert man den ΔC_t -Wert des nicht-neoplastischen Gewebes und erhält den $\Delta\Delta C_t$ -Wert. Dieser $\Delta\Delta C_t$ -Wert wird dann invers potenziert. Die ermittelten Werte geben nun die Expression eines Gens in einer Probe in Relation zu nicht-neoplastischem Gewebe an, wobei die Expression des nicht-neoplastischen Gewebes gleich 1 gesetzt wird. Eine Zunahme im Zielgen/Referenzgen-Verhältnis in der Probe von mehr als 3-fach relativ zu nicht-neoplastischem Gewebe wurde als verstärkte Expression und eine Abnahme im Zielgen/Referenzgen-Verhältnis in der Probe in einen Bereich kleiner/gleich 0,5 relativ zu nicht-neoplastischem Gewebe als erniedrigte Expression gewertet.

Formeln:

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

$$\Delta Ct(\text{Tumor}) - \Delta Ct(\text{nicht-neoplastisches Gewebe}) = \Delta\Delta Ct$$

Expression des Zielgens im Tumor in Relation zur Expression im
nicht-neoplastischen Gewebe = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Tabelle 9 Primersequenzen der TaqMan-Reaktionen sowie optimale Primer-Konzentrationen.

Primerpaare	Primersequenzen	Primer-Konz. (nM)	Primerpaare	Primersequenzen	Primer-Konz. (nM)
MGP-TaqF	5'-ggatccgagaacgctctaag-3'	50	CDKN2A-TaqF	5'-cagaggcagtaacctgcc-3'	600
MGP-TaqR	5'-ggcagcattgtatccataaac-3'	300	CDKN2A-TaqR	5'-gatg tctgaggaccttccgc-3'	600
SYK-TaqF	5'-aatatgtgaagcagacatggaacctg-3'	900	CDKN2B-TaqF	5'-atccaacggagcaaccg-3'	600
SYK-TaqR	5'-gctgtgtagcagatcagcttctc-3'	300	CDKN2B-TaqR	5'-ctgccatcatcatgacctg-3'	600
TP11-TaqF	5'-cccggcagaagctagatc-3'	300	p14 ^{ARF} -TaqF	5'-tcgtgctgatgactgagg-3'	600
TP11-TaqR	5'-gtccgcagctttgatcatg-3'	900	p14 ^{ARF} -TaqR	5'-tcatgacctggtcttagg-3'	600
TIAM1-TaqF	5'-agcaagcgaagagcaggtt-3'	300	NCOA4-TaqF	5'-accctgtcaagactgactcctgta-3'	300
TIAM1-TaqR	5'-cctctccaacacctgattg-3'	900	NCOA4-TaqR	5'-ggctcattcaggcactcagattg-3'	300
TGFB1-TaqF	5'-caagtcaagcagagtacacaca-3'	900	HXB-Taq2F	5'-ggagagcttccgattacc-3'	300
TGFB1-TaqR	5'-ctccacgtgctgctccactt-3'	300	HXB-Taq2R	5'-cgccaggatgagttcacc-3'	300
SOX4-TaqF	5'-cttcatggtgtgctcgagat-3'	300	EPHA1-Taq3F	5'-tgagtggctcagtcacac-3'	300
SOX4-TaqR	5'-tgagcagctccagcctttg-3'	900	EPHA1-Taq3R	5'-tcagctccagcacacactc-3'	50
SerpinE1-Taq2F	5'-gtcaagcaagtggactttcag-3'	300	ENO1-TaqF	5'-gcttctctccttaggcgac-3'	300
SerpinE1-Taq2R	5'-ccttccaagcaagttgctg-3'	300	ENO1-TaqR	5'-cccgagagtgcaagatctc-3'	300
SGPL1-TaqF	5'-ggcagaaatcgtgaggatagc-3'	300	CTGF-TaqF	5'-gctttctgctgcaccagcat-3'	300
SGPL1-TaqR	5'-ctttcaggccatcagtatgc-3'	300	CTGF-TaqR	5'-agcatcgccgctggtacat-3'	300
RB1-TaqF	5'-cctctccagaataatcacactgc-3'	50	ATP1B2-TaqF	5'-gagaacctgatgtcattgtcaatg-3'	50
RB1-TaqR	5'-gttgctgtgtctctgctttgc-3'	50	ATP1B2-TaqR	5'-gtcgtgtaaggctccaagaac-3'	50
IFITM-TaqF	5'-cctcttctgaaactggtgctgc-3'	300	ARF1-TaqF	5'-gaccacgatcctctacaagc-3'	600
IFITM-TaqR	5'-acttgccggtgaggcata-3'	300	ARF1-TaqR	5'-tcccacacagtgaagctgatg-3'	600
CDKN1B-TaqF	5'-ccggctaactctgaggacac-3'	900			
CDKN1B-TaqR	5'-agaagaatcgtcgttgagc-3'	900			

3.2.12 Erstellung von Expressionsprofilen

3.2.12.1 Erstellung von Expressionsprofilen mittels cDNA-Expression Arrays

Die Methode der cDNA-Array-Technik ermöglicht es, Unterschiede im Transkriptexpressionsmuster zahlreicher Gene zwischen verschiedenen Zellen, Geweben oder Tumoren festzustellen. Diese Screening-Methode wurde in den letzten Jahren u.a. auch erfolgreich zur Erstellung von Expressionsprofilen in Gliomen und Gliomzelllinien eingesetzt (Sallinen *et al.*, 2000, Huang *et al.*, 2000). Der AtlasTM Human Cancer 1.2 Array (Clontech) repräsentiert 1176 Krebs-relevante Gene und bietet somit die Möglichkeit, Expressionsprofile dieser Gene in unterschiedlichen Tumoren zu erstellen und miteinander oder in Relation zu Normalgewebe zu vergleichen. Die Amplifikation der RNA erfolgt mit Hilfe der SMARTTM cDNA Synthese Technologie (Clontech). Ausgehend von 50 ng bis 1 µg total-RNA wird die Erststrang-cDNA-Synthese mittels modifizierter Oligo(dT)-Primer, einem spezifischen cDNA-Synthese (CDS)-Primer-Mix durchgeführt, der gewährleistet, dass nur die cDNAs synthetisiert werden, die auf dem entsprechenden Atlas Array zu finden sind. Wenn die Reverse Transkriptase das 5'-Ende der mRNA erreicht, werden aufgrund der Transferase-Aktivität des Enzyms einige zusätzliche Nukleotide, vor allem Desoxyctidine, am 3'-Ende der cDNA angehängt. Die SMART-Oligonukleotide, die an ihrem 3'-Ende eine Oligo(dG)-Sequenz besitzen, paaren sich mit dem Desoxycytidin-Schwanz und präsentieren so ein neues Template. Die Reverse Transkriptase wechselt daraufhin das Template und repliziert bis ans 5'-Ende der SMART-Oligonukleotide (Chenchik *et al.*, 1998). Die daraus resultierende einzelsträngige cDNA enthält Sequenzen, die komplementär zu den SMART-Oligonukleotiden sind. Die SMART-Sequenz und die Poly-A-Sequenz werden dann als universelle Primer-Bindungsstellen für die End-zu-End cDNA-Amplifikation genutzt. Um sicher zu stellen, dass die amplifizierten cDNAs sich im exponentiellen Bereich der Amplifikation befinden, wird eine unterschiedliche Anzahl an PCR-Zyklen (15, 18, 21, 24 Zyklen) durchgeführt und die optimale Zyklenzahl bestimmt. Nach sich anschließender radioaktiver Markierung der cDNA folgt die Hybridisierung der markierten Proben auf die Membranen. Anschließend erfolgt die Exposition der hybridisierten cDNA-Arrays auf Röntgenfilme. Durch Vergleich der Intensität der Signale auf den Röntgenfilmen der verschiedenen Tumoren kann ein unterschiedliches Expressionsmuster festgestellt werden. Durch Bestimmung der Lokalisation der Signale auf der Membran kann jedes Signal einem bestimmten Gen zugeordnet werden.

 Material und Lösungen:

ATLAS™ Human Cancer 1.2 Array Kit	RNase H ⁻ MMLV Reverse Transkriptase
ATLAS SMART™ Probe Amplification Kit	$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	Röntgenfilme (Kodak Biomax MR)

Waschlösung 1:

2x SSC
1 % SDS

Waschlösung 2:

0,1x SSC
0,5 % SDS

Durchführung:

Die cDNAs wurden gemäß dem Protokoll des Atlas SMART™ Probe Amplification Kits (Clontech) synthetisiert. Die Erststrang-Synthese, in die 300-400 ng total-RNA, 1 μl CDS-Primer (10 μM), 1 μl SMART™ Oligonucleotide (10 μM), 2 μl 5x Erststrangpuffer, 1 μl DTT (20 mM), 1 μl dNTP-Mix (10 mM) und 0,5 μl RNase H⁻ MMLV Reverse Transkriptase eingesetzt wurden, wurde für 1 Stunde bei 42°C durchgeführt. Zu 5 μl der Erststrang-Synthese wurden 5 μl 10x Advantage-PCR-Puffer, 1 μl dNTP-Mix (10 mM), 1 μl PCR Primer (10 μM), 1 μl 50x Advantage Polymerase Mix und deionisiertes Wasser zu einem Endvolumen von 50 μl zugegeben. Die PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen nach Festlegung der optimalen Zyklenzahl im Trio-Thermoblock (Biometra) durchgeführt: 95°C für 1 min, 17-19 Zyklen mit jeweils 15 sec bei 95°, 30 sec bei 65°C und 3 min bei 68°C. 33 μl der aufgereinigten cDNA wurden zur Markierung der Proben mit 1 μl CDS-Primer, 5 μl 10x Markierungs-Puffer, 5 μl 10x dNTP-Mix (ohne dATP), 5 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) und 1 μl Klenow-Enzym versetzt. Die Proben wurden für 30 min bei 50°C inkubiert. Die Membranen wurden mit einem Gemisch aus ExpressHyb und SMART Blocking-Lösung für 30 min bei 68°C unter gleichmäßigem Schütteln in Hybridisierungstüten prähybridisiert. Die anschließende Hybridisierung erfolgte durch Zugabe der markierten Proben unter gleichmäßigem Schütteln bei 68°C über Nacht. Nach dem Waschen wurden die noch feuchten Membranen in Plastikfolie eingepackt und auf einem Röntgenfilm bei -80°C für 2-6 Tage inkubiert. Die Auswertung der Arrays wurde durch visuelle Bewertung und Einteilung der Intensität der Signale auf den Röntgenfilmen in 4 Kategorien, 0 (keine Expression), 1 (schwache Expression), 2 (mäßige Expression) und 3 (sehr starke Expression) vorgenommen. Bei einer homogenen Verteilung der Expressionswerte innerhalb der PXA bzw. der AII wurde der Mittelwert von den 9 bzw. 8 Werten errechnet. Bei einer stark gestreuten Verteilung (z.B.

3 x der Wert 0, 1 x der Wert 1 und 5 x der Wert 3) wurde jener Wert als Endwert angenommen, der in mindestens 50 % der Fälle (also der Wert 3 = sehr starke Expression) vorlag. Die durchschnittlichen Werte der Intensität für jedes Gen der 9 hybridisierten PXA bzw. der 8 AII wurden miteinander verglichen. Ebenso wurden die Werte der Hybridisierung des nicht-neoplastischen Hirngewebes mit denen der Tumoren verglichen. Die Gene, die als stark differentiell exprimiert herausgefunden worden sind, wurden zur Überprüfung mittels RT-PCR, wie in Kapitel 3.2.11.3 beschrieben untersucht.

3.2.12.2 Erstellung von Expressionsprofilen mittels suppressiver Subtraktionshybridisierung (SSH)

Die subtraktive Suppressionshybridisierung dient dazu, zwei unterschiedliche mRNA-Populationen miteinander zu vergleichen und Sequenzen anzureichern, die in der einen Population exprimiert werden (*Tester*), nicht aber in der anderen (*Driver*). Dazu werden zuerst beide mRNA-Populationen in cDNA umgeschrieben und anschließend mit *RsaI* verdaut, wobei *blunt-end*-Fragmente entstehen. Die verdauten Tester cDNA wird dann halbiert und jede Hälfte wird an einen anderen Adaptor ligiert. Beide Adaptoren haben Sequenzbereiche, die komplementär zu den Sequenzen der später verwendeten PCR-Primer sind. Bei der darauf folgenden ersten Hybridisierung wird ein Überschuss an Driver zu jedem Tester dazugegeben. Nach der Hitzedenaturierung der Proben hybridisieren komplementäre cDNA-Fragmente miteinander (*Tester* und *Driver* hybridisieren mit sich selbst und untereinander) und bilden doppelsträngige Moleküle. cDNA-Fragmente, die nur im *Tester* bzw. nur im *Driver* vorhanden sind, liegen neben den doppelsträngigen Molekülen (durch Hybridisierung mit einem Komplementärstrang aus der gleichen Population) auch als einzelsträngige Moleküle vor. Bei der zweiten Hybridisierung werden beide Proben ohne Denaturierungsschritt zusammen gegeben. Hierbei entstehen aus den einzelsträngigen Tester-cDNA-Fragmenten neue doppelsträngige Tester-Moleküle mit unterschiedlichen Enden aufgrund der unterschiedlichen Adaptor-Moleküle. Nach dem Auffüllen der Enden mittels DNA-Polymerase entstehen differentiell exprimierte Tester-cDNA-Sequenzen, die an ihren 3'- und 5'-Enden unterschiedliche Primer-Bindungsstellen für die später folgende PCR mit *nested*-Primern besitzen. Bei der folgenden PCR mit Primern, die an die Adaptoren binden, werden nur die differentiell exprimierten cDNA-Fragmente exponentiell angereichert. Die anderen Fragmente können aufgrund des Fehlens der Adaptoren bzw. aufgrund des Vorhandenseins nur eines Adaptors gar nicht oder nur linear amplifiziert werden. Eine zweite

PCR mit *nested*-Primern dient der Anreicherung der differentiell exprimierten cDNA-Fragmente sowie der Reduzierung des Hintergrunds. Die PCR-Produkte wurden anschließend als Sonden zur Hybridisierung von cDNA-Bibliotheken, wie z.B. den RZPD-Unigene-Filtern, verwendet, um die Identität der differentiell exprimierten Gene zu ermitteln.

Lösungen:

PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech)	RZPD-Unigene-Expressions-Filter
SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech)	Röntgenfilme (Kodak BiomaxMR)
Hybridisierungs-Kit (Amersham Pharmacia)	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)

Church-Medium:

7 % SDS
0,5 M Natriumphosphat pH 7,2
1 mM EDTA
denaturierte humane DNA

Waschlösung:

40 mM Natriumphosphat pH 7,2
0,1 % SDS

Durchführung:

Gemäß den Herstellerangaben des SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit wurden 400 ng RNA in cDNA transkribiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angaben des PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual, Abschnitt E.

Die PCR-Produkte wurden als cDNA-Sonden für die Hybridisierung auf RZPD-Unigene-Filter eingesetzt. Dazu wurden 6 μl der Sonde mit 2,5 μl Primer-Mix und 7,5 μl Aqua dest. gemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach anschließender Zugabe von 5 μl Puffer, 3 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP und 1 μl Klenow-Enzym wurden die Proben für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden 285 μl TE-Puffer, 6 μl Spermin (0,1M) und 6 μl Heringssperma-DNA (100g/ml) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis wurden die Proben zentrifugiert und das Pellet in 120 μl Denaturierungspuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei 37°C. Nach Zugabe von 44 μl 1 M Tris/HCl zu den Proben wurden diese mit 10 ml Church-Medium gemischt und dieses Gemisch zu den Membranen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte in Hybridisierungstüten bei 65°C über Nacht. Nach dem Waschen mit Waschlösung wurden die Membranen in Plastikbeutel verpackt und auf einen Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) für 1-6 Tage bei -80°C exponiert. Die Auswertung erfolgte

visuell. Dazu wurden die Signale mit einer Schablone der jeweiligen Lokalisation zugeordnet, anhand derer die entsprechenden Gene identifiziert werden konnten.

3.2.13 Clustering der Expressionsdaten nach differentieller PCR

Das menschliche Gehirn hat Schwierigkeiten, Zahlenkolonnen zu beurteilen. Dagegen werden farbige Grafiken bzw. Muster viel schneller interpretiert. Die Programme „Cluster“ und „TreeView“ (Eisen M., Stanford University, siehe auch Eisen *et al.*, 1998) bieten die Möglichkeit, Datensätze von DNA/cDNA-Array-Experimenten zu analysieren. Mit dem Programm „Cluster“ können z.B. Tumoren oder Gewebe unter Verwendung von statistischen Standard-Algorithmen hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit in der Genexpression verglichen und in Subgruppen zusammengefasst werden. Das Programm „Tree View“ stellt diese Ähnlichkeiten und Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den experimentellen Daten in farbigen Dendrogrammen dar.

Die eigenen mittels Duplex-RT-PCR und Real-Time RT-PCR erzielten Expressionsdaten wurden mit den Programmen „Cluster“ und „TreeView“ analysiert.

3.2.14 Immunhistochemische Untersuchungen

Mit Hilfe der Immunhistochemie können spezifische Antigene in Gewebeschnitten sichtbar gemacht und zellulär zugeordnet werden. Ebenso kann die Expression der Antigene semiquantitativ bestimmt werden.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte unter Verwendung der Avidin-Biotin-Peroxidase (ABC)-Methode. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, 4 Moleküle des Vitamins Biotin zu binden. Zunächst wird ein unmarkierter, gegen das interessierende Antigen gerichteter primärer Antikörper eingesetzt. Darauf folgt die Verwendung eines zweiten, sogenannten sekundären Antikörpers, der mit Biotin konjugiert ist. Dieser Sekundärantikörper kann an den ersten Antikörper binden. In einem weiteren Schritt wird nun ein Avidin-Biotin-Komplex mit freien Biotin-Bindungsstellen eingesetzt, der mit einer Peroxidase konjugiert ist. Dabei binden die freien Stellen des Avidinmoleküls des Komplexes an das Biotin des sekundären Antikörpers. Die Peroxidase kann nun einen

Farbumschlag eines Chromogens (DAB = 3'3'-Diaminobenzidine) katalysieren, mit der sich der gebundene primäre Antikörper sichtbar machen lässt.

Lösungen:

PBS-Puffer (pH 7,6):

7013 g	NaCl
1,38 g	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
5,44 g	K ₂ HPO
0,0198 g	Thimerosal (Sigma)
ad 1000 ml	Aqua dest.

PBSA-Puffer:

5 % Rinderserumalbumin (Sigma)
in PBS

CD34-Antikörper (*mouse anti human*, 1 µg/ml) Serotec

Durchführung:

Das formalinfixierte und paraffineingebettete Tumorgewebe wurde in 5 µm dicken Schnitten auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und mit 100 %igem Ethanol abgespült. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Objektträger in einer 1 %igen H₂O₂-Methanol-Lösung für 30 min inkubiert. Danach folgte nach einer Entwässerung über eine absteigende Alkoholreihe (96 %, 70 %, Aqua dest.) die Überführung in PBS-Puffer.

Bei Anwendung der ABC-Methode wurden die vorbehandelten Objektträger mit Ziegen-Normalserum (1:50 verdünnt in 5 %iger PBSA-Lösung) prä-inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper verdünnt in 5 % PBSA aufgetragen. Danach wurde 2 x 5 min mit PBS-Puffer gespült. Der biotinylierte Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin (Vector, Burlingame, USA) wurde in einer 1: 100 Verdünnung in 5 %iger PBSA-Lösung für 30 min aufgetragen. Nach zweimaligem Spülen für 5 min mit PBS-Puffer erfolgte die Beschichtung mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex in 5 %iger PBSA-Lösung für 30 min. Danach wurde 2 x 5 min mit PBS-Puffer gespült und anschließend in frisch hergestellter Substratlösung (0,5 mg/ml 3'3'-Diaminobenzidin (Sigma) in PBS mit 0,01 % H₂O₂) 10-15 min bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser folgte das Gegenfärben mit

Hämatoxylin, die Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol und das Eindeckeln mit DePex-Eindeckmedium.

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch begutachtet und die Anzahl der ein Antigen exprimierenden Tumorzellen semiquantitativ gemäß der folgenden Skala eingestuft:

0 = keine positiven Tumorzellen

1 = einzelne positive Tumorzellen (< 10 %)

2 = mäßig viele positive Tumorzellen (10 - 50 %)

3 = sehr viele positive Tumorzellen (> 50 %)

4 Ergebnisse

Im Rahmen eines Kandidatengenansatzes wurden mehrere Tumorsuppressorgene und Proto-Onkogene, die in diffusen astrozytären Gliomen bekanntermaßen verändert sind, auf genetische Alterationen in pleomorphen Xanthoastrozytomen hin untersucht. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Identifizierung neuer Gene, die in pleomorphen Xanthoastrozytomen im Vergleich zu diffusen Astrozytomen bzw. nicht-neoplastischem Hirngewebe differentiell exprimiert werden und somit für das unterschiedliche Wachstumsverhalten beider Astrozytom-Entitäten mitverantwortlich sein können.

4.1 Molekulargenetische Analyse von Gliom-assoziierten Kandidatengen und -regionen

4.1.1 Mutationsanalyse des *TP53*-Tumorsuppressorgens

Insgesamt 62 PXA (46 PXA II, 16 PXA waf) und 8 AII wurden mit Hilfe der SSCP/Heteroduplexanalyse auf Mutationen des *TP53*-Tumorsuppressorgens hin untersucht. Alle PCR-Produkte mit aberrantem Laufverhalten wurden sequenziert. Tabelle 10 fasst die erzielten Ergebnisse zusammen. Abbildung 6 zeigt beispielhaft das Ergebnis der *TP53*-Mutationsanalyse in einem PXA.

Die in Tabelle 10 aufgeführten Veränderungen wurden mit den bereits beschriebenen Mutationen und Polymorphismen der *TP53*-Datenbanken (<http://p53.iarc.fr>; <http://p53.free.fr>, siehe auch Olivier *et al.*, 2002, Petitjean *et al.*, 2007) verglichen.

Neben vier bereits bekannten Polymorphismen (IVS3+40-41insACCTGGAGGCTGGGG, IVS3-1G>A, c.639A>G, IVS10+30T>A) fanden sich in Intron 3 drei verschiedene neue Polymorphismen (IVS3+40G>A, IVS3+42G>A, IVS3+65C>A), die sich außerhalb der für das Spleißen wichtigen Regionen (Splice-Site, Branch-Site) befinden. Desweiteren wurden Mutationen in 3 PXA (PXA 34, 57 und 64) ermittelt. Die in PXA 64 detektierte Basensubstitution liegt in der konservierten Splice-Site des Intron 3/Exon 4-Bereichs (IVS3-1G>A). Diese Mutation wurde von anderen Autoren in einem Glioblastom bereits beschrieben (Ichimura *et al.*, 2000). Die in PXA 57 nachgewiesene Punktmutation

(c.827C>T, Abb. 6) ist eine in astrozytären Tumoren bislang noch nicht beschriebene Veränderung, die allerdings in anderen Tumoren schon detektiert wurde (z.B. in Blasenkrebs und Brustkrebs). Die Insertionsmutation in PXA 34 (c.984-985ins14bp) wurde bislang noch nicht in anderen Tumoren beschrieben. Durch die Insertion von 14 bp kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zu einem vorzeitigen Stopp in Codon 344. In AII konnten 5 weitere *TP53*-Mutationen detektiert werden. Dabei handelt es sich um vier bereits in Astrozytomen bekannte Punktmutationen (c.413C>T, c.451C>T, c.584T>C, c.817C>T), sowie um eine bisher noch nicht beschriebene Deletionsmutation (c.829delT), die ebenfalls zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zu einem vorzeitigen Stopp in Codon 344 führt.

Tabelle 10 Resultate der Mutationsanalyse des *TP53*-Gens in PXA und diffusen Astrozytomen (AII).

Betroffener Genbereich	Sequenzveränderung	PXA (Tumor-Nr.)	diffuse Astrozytome (Tumor-Nr.)
Intron 3	IVS3+40-41 insACCTGGAGGCTGGGG	7, 8, 13, 17, 21, 42, 46, 47, 49, 53, 61	A3, A7
Intron 3	IVS3+40G>A	60, 64	-
Intron 3	IVS3+42G>A	24	-
Intron 3	IVS3+65C>A	40, 55, 60, 64, 75	-
Intron 3	IVS3-1G>A	64	-
Exon 4	c.215G>C R72P	1, 8, 12, 13, 24, 40, 42, 46, 47, 49, 51, 53, 54, 55, 61, 64, 65, 66, 75, 81	A3, A7, A8
Exon 5	c.413C>T A138V	-	A4
Exon 5	c.451C>T P151S	-	A7
Exon 6	c.639A>G R213R	1, 54, 67	A2
Exon 6	c.584T>C I195T	-	A1
Exon 8	c.817C>T R273C	-	A1, A3, A8
Exon 8	c.827C>T A276V	57	-
Exon 8	c.829delT	-	A5
Exon 9	c.984-985 insCTGGAGAATATTC	34	-
Intron 10	IVS10+30T>A	7	-

IVS = Intron (*intervining-site*); c. = kodierende DNA-Sequenz; ins = Insertion; del = Deletion

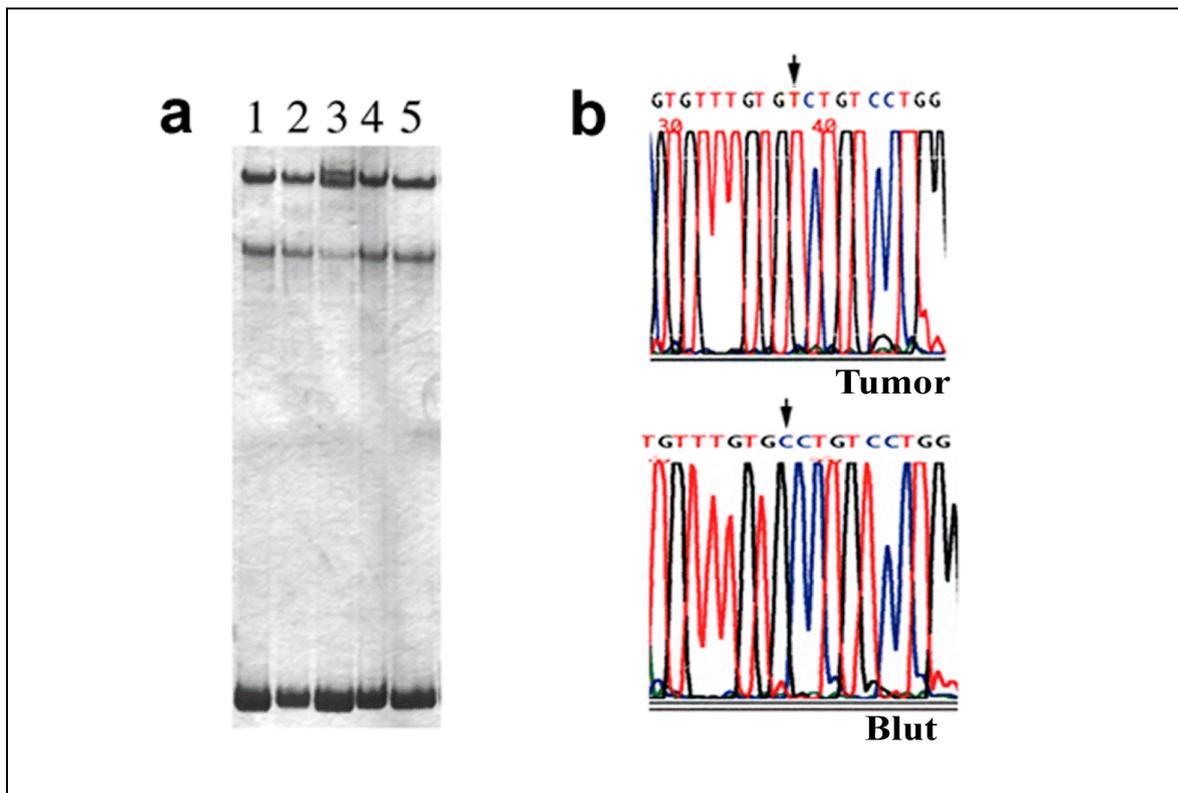


Abbildung 6 Beispiel einer *TP53*-Mutationsanalyse mittels SSCP/Heteroduplex-Methode (a) und DNA-Sequenzierung (b). (a) Abgebildet ist das silbergefärbte SSCP/Heteroduplex-Gel mit den PCR-Produkten für das Exon 8. Aufgetragen sind die PCR-Produkte des PXA 57 (Spur 3), von Blut-DNA (Spur 1, 2 und 4) und von PXA 54 (Spur 5). Das PXA 57 weist im Vergleich zum Wildtyp-Muster (Blut-DNA) ein aberrantes Bandenmuster auf. (b) Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzierung der PCR-Produkte der Tumor-DNA und des Blutes. Die Pfeile markieren den Basenaustausch von C→T an Position 827 im Tumor im Vergleich zum Blut. Dies führt zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin in Codon 276 (c.827C>T: A276V).

4.1.2 Analyse der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B*

Die Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p21). Das *CDKN2A*-Gen besteht aus 3 Exons (Exon 1 α , Exon 2 und Exon 3). Das *p14^{ARF}*-Gen setzt sich aus der Kombination von Exon 1 β sowie Exon 2 und 3 des *CDKN2A*-Gens zusammen. Es besitzt einen eigenen Promotor und verfügt über einen anderen Leserahmen als das *CDKN2A*-Gen. Das *CDKN2B*-Gen liegt proximal von *CDKN2A* und *p14^{ARF}* und besteht aus 2 Exons. Homozygote Deletionen, Mutationen sowie eine Hypermethylierung der CpG-Inseln im Promotorbereich der jeweiligen Gene sind bekannte Mechanismen ihrer Inaktivierung in Tumoren.

4.1.2.1 Deletionsanalyse

Mittels Duplex-PCR wurden 62 PXA (46 PXA II, 16 PXA waf) auf homozygote Deletion des *CDKN2A*-Gens hin analysiert. Zusätzlich wurden 14 PXA (11 PXA II, 3 PXA waf) auf homozygote Deletion in den Genen *CDKN2B* und *p14^{ARF}* hin untersucht. Die Primer und PCR-Bedingungen sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Ergebnisse der jeweiligen Duplex-PCR-Analyse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

In keinem der Tumoren konnte in den drei untersuchten Genen eine homozygote Deletion (Zielgen-Referenzgen-Verhältnis $\leq 0,3$) nachgewiesen werden. In 3 PXA (PXA 51, 53 und 85) sowie in einem PXA waf (PXA 52) wurde ein Zielgen-Referenzgen-Verhältnis von $0,5 \pm 0,1$ für *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* ermittelt (Abb. 7). Die PXA 47, 48 und 81 wiesen einen Wert von $0,5 \pm 0,1$ für *CDKN2A* auf. Für das PXA 65, ein PXA waf, wurde ein Wert von $0,5 \pm 0,1$ für *CDKN2B* und *p14^{ARF}* ermittelt.

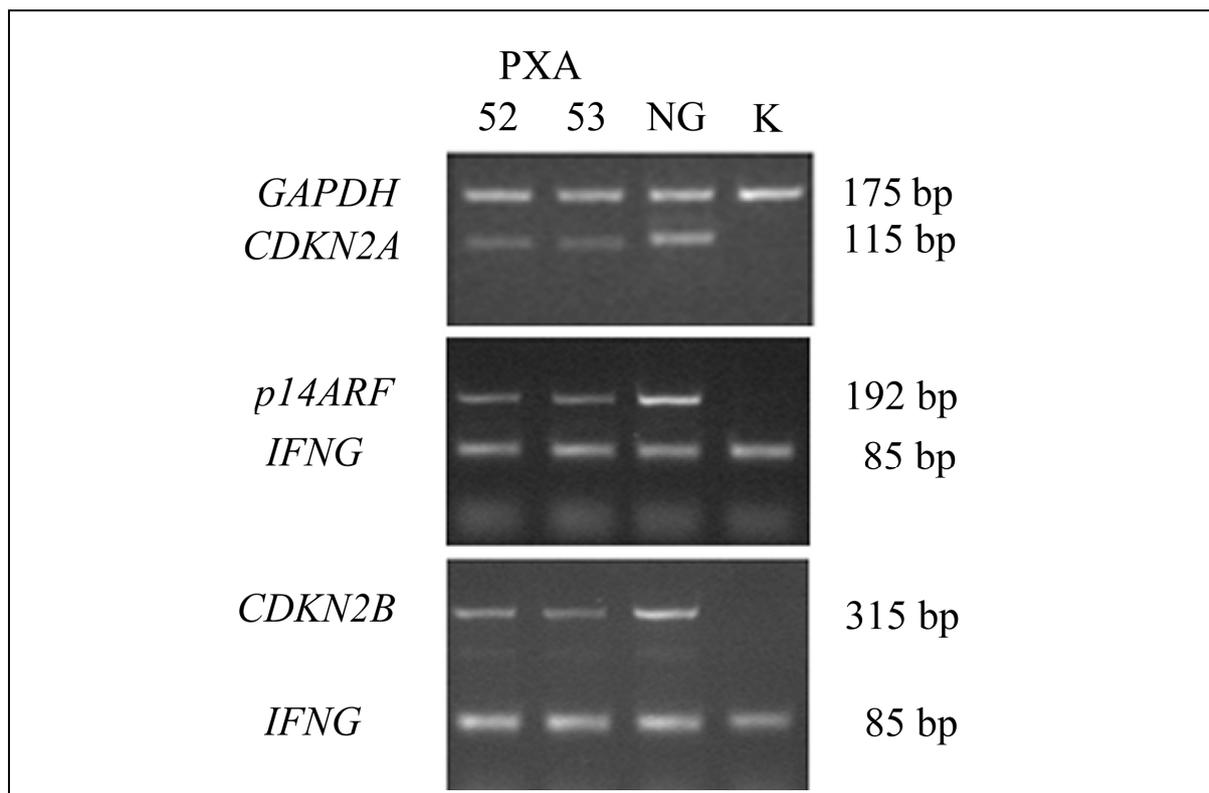


Abbildung 7 Beispielhafte Ergebnisse der mittels Duplex-PCR durchgeführten Deletionsanalysen von *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* in den Tumoren PXA 52 und 53. Abgebildet sind Ausschnitte aus den mit dem Gel-Doc 1000 System (BioRad) dokumentierten Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen. Für das *CDKN2A*-Gen diente *GAPDH* als Referenzgen. Fragmente der Gene *CDKN2B* und *p14^{ARF}* wurden zusammen mit einem Fragment des Gens *IFNG* als Referenz amplifiziert. Für alle drei Gene ergab die

densitometrische Auswertung eine auf $0,5 \pm 0,1$ reduzierte Signalintensität relativ zum Normalgewebe (NG), entsprechend dem Verlust jeweils eines Allels. NG = nicht-neoplastisches Gehirngewebe; K = Positivkontrolle mit homozygoter Deletion aller drei Gene (Glioblastom-Zelllinie U118MG).

4.1.2.2 Methylierungsanalysen

Mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) wurde der Methylierungsstatus der Promotorregion der Gene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* in 10 PXA (8 PXA II, 2 PXA waf) analysiert. Als Positivkontrolle diente ein Tumor (AO2), für den bereits gezeigt werden konnte, dass dieser in den Promotorregionen der drei untersuchten Gene hypermethyliert ist (Wolter *et al.*, 2001). In keinem der 10 analysierten PXA konnte eine Promotor-Hypermethylierung der drei untersuchten Gene nachgewiesen werden.

4.1.2.3 Mutationsanalyse

Insgesamt 14 PXA (11 PXA II, 3 PXA waf) wurden mittels SSCP-Analyse auf Mutationen in den Genen *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* hin untersucht. Das gesamte *CDKN2A*-Gen wurde in 3 Fragmenten amplifiziert, wovon das erste dem Exon 1 α entsprach, welches spezifisch für das *CDKN2A*-Gen ist. Das Exon 1 β des *p14^{ARF}*-Gens wurde in 2 überlappende Amplikons aufgeteilt. Die übrige kodierende Region des *p14^{ARF}*-Gens umfasste die mit *CDKN2A* gemeinsamen Exons 2 und 3, welche in zwei Fragmenten amplifiziert wurden. Das Gen *CDKN2B* wurde ebenfalls in 2 Amplikons unterteilt, die den gesamten kodierenden Bereich abdecken. Die jeweiligen Primersequenzen, PCR- und SSCP-Bedingungen sind in Tabelle 5 angegeben.

In keinem der untersuchten Gene konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Zwei zusammen auftretende Polymorphismen, die ebenfalls in der zugehörigen Blut-DNA vorhanden waren, wurden im Intron 1 des *CDKN2B*-Gens (IVS1-27C>A; IVS1-102G>A; GenBank Accession Nr. AC000049) in 2 PXA-Patienten (PXA 65 und 71) detektiert. Ein weiterer Polymorphismus war in 3 PXA-Patienten (PXA 47, 65 und 71) im Exon 3 des *CDKN2A*-Gens nachweisbar (3UTR+29G>C, GenBank Accession Nr. U12820).

4.1.2.4 Expressionsanalyse

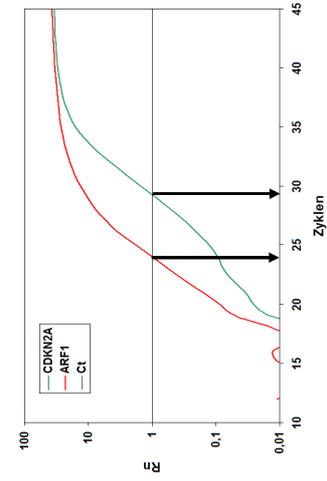
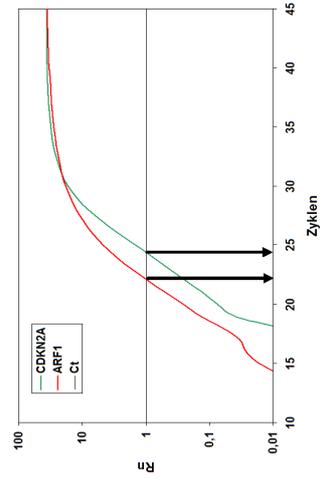
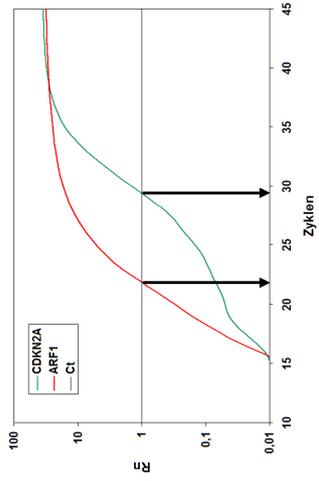
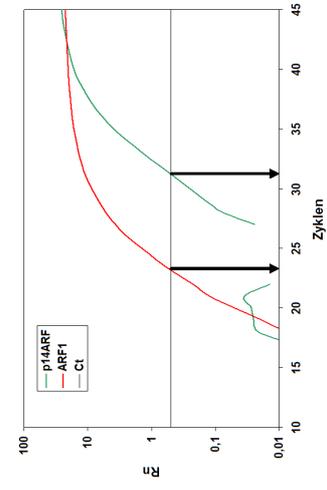
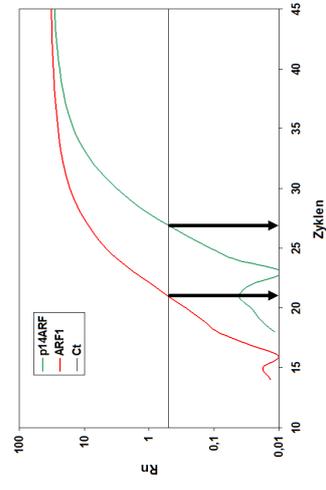
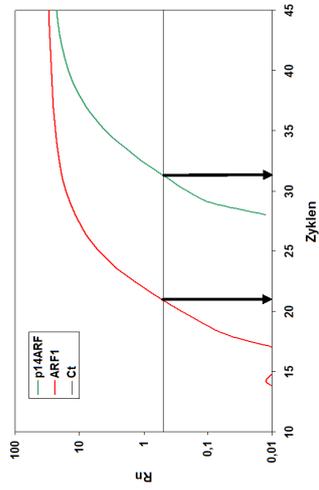
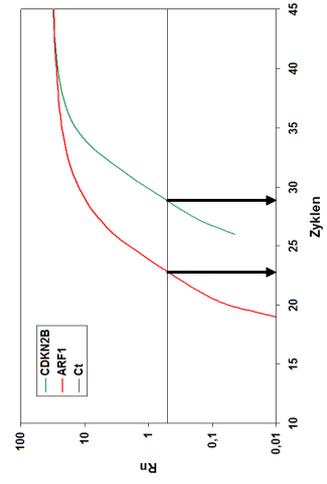
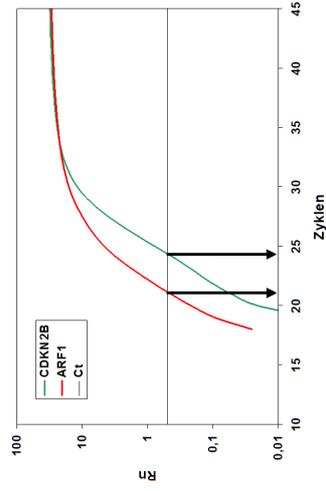
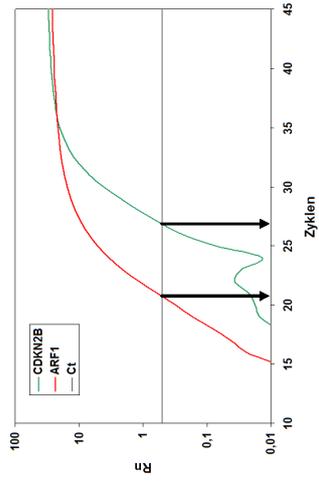
Mittels Real-Time PCR-Technologie wurde die Expression von *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* in 9 PXA (7 PXA II, 2 PXA waf) bestimmt. Die Analyse erfolgte mit der ABI PRISM 5700 Sequence Detection Software. Abbildung 8 zeigt ein typisches Auswertungsdiagramm.

Die Expressionswerte der 9 untersuchten PXA für die Gene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* sind in der Tabelle 11 zusammengefasst. Eine erniedrigte mRNA-Expression der Gene *CDKN2A* und *p14^{ARF}* konnte im PXA 84 festgestellt werden. Eine leicht verminderte Expression (0,6 - 0,75) aller drei Gene wurde in den Tumoren PXA 51 und PXA 53 detektiert. PXA 46 wies leicht reduzierte Expressionslevel für *p14^{ARF}* und PXA 48 für *CDKN2B* auf. Der Tumor PXA 71 zeigte eine deutlich verstärkte Expression der Transkripte aller drei Gene (Abb. 8, Tab. 11).

Tabelle 11 Resultate der molekulargenetischen Analyse der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* in PXA. Aufgeführt sind die Ergebnisse der Duplex-PCR-Analyse zur Bestimmung der Gendosis (1 = normal), der Mutations- und Methylierungsanalysen, sowie die mittels Real-Time RT-PCR ermittelten Expressionswerte.

PXA-Nr.	Diagnose	<i>CDKN2A</i>				<i>p14^{ARF}</i>				<i>CDKN2B</i>			
		Gen-dosis	Mut./PM	Methyl.	Expr.	Gen-dosis	Mut./PM	Methyl.	Expr.	Gen-dosis	Mut./PM	Methyl.	Expr.
46	PXAII	0,8	-	-	1,12	0,8	-	-	0,61	1,3	-	-	1,28
47	PXAII	0,6	PM	-	2,37	0,7	-	-	1,24	1,1	-	-	1,33
48	PXAII	0,6	-	-	1,73	1,0	-	-	1,15	0,9	-	-	0,58
49	PXAII	1,0	-	-	2,62	1,0	-	-	1,86	1,8	-	-	1,58
51	PXAII	0,6	-	-	0,61	0,5	-	-	0,59	0,5	-	-	0,63
52	PXAwaf	0,4	-	-	2,76	0,5	-	-	1,61	0,6	-	-	1,72
53	PXAII	0,4	-	-	0,75	0,4	-	-	0,54	0,6	-	-	0,69
65	PXAwaf	0,8	PM	n.a.	n.a.	0,5	-	n.a.	n.a.	0,5	PM	n.a.	n.a.
66	PXAII	1,0	-	n.a.	n.a.	0,9	-	n.a.	n.a.	1,0	-	n.a.	n.a.
67	PXAII	0,7	-	n.a.	n.a.	0,8	-	n.a.	n.a.	1,3	-	n.a.	n.a.
71	PXAII	0,8	PM	-	10,71	1,0	-	-	6,96	1,5	PM	-	8,75
81	PXAII	0,6	-	n.a.	n.a.	1,0	-	n.a.	n.a.	0,7	-	n.a.	n.a.
84	PXAwaf	0,7	-	-	0,25	0,9	-	-	0,32	0,8	-	-	1,14
85	PXAII	0,5	-	-	n.a.	0,6	-	-	n.a.	0,6	-	-	n.a.

Mut. = Mutation; PM = Polymorphismus; n.a. = nicht analysiert, da nicht ausreichend DNA/cDNA vorhanden war



PXA84

PXA71

NG

Abbildung 8 Expressionsanalyse der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* mittels Real-Time RT-PCR. Man sieht die Verlaufskurven der PCR-Reaktionen für die Gene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* (grüne Kurven) und das Referenzgen *ARF1* (rote Kurven) für PXA 84, PXA 71 und nicht-neoplastisches humanes Hirngewebe (NG). Die Auswertung erfolgt durch die Bestimmung der Zyklenzahl (senkrechter Pfeil) am Schwellenwert (Ct), der durch die waagerechte Linie markiert ist. Der Schwellenwert muss bei allen Reaktionen im exponentiellen Bereich liegen. Zur Absicherung der ermittelten Werte wurde jede Reaktion 3x in einem PCR-Lauf wiederholt. Je größer die Differenz zwischen dem Ct-Wert für das Zielgen und dem Ct-Wert für das Referenzgen ist, desto geringer ist die Expression des Zielgens, vorausgesetzt, dass die Expression des Referenzgens im Tumor- und Normalgewebe gleich ist. Die Verschiebung des Ct-Wertes für *CDKN2A* und *p14^{ARF}* nach rechts im Vergleich zu nicht-neoplastischem Gewebe ergibt für PXA 84 eine verminderte Expression dieser Gene. In PXA 71 entspricht die Verschiebung des Ct-Wertes für *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* nach links im Vergleich zu nicht-neoplastischem Gewebe einer erhöhten Expression dieser Gene.

4.1.3 Amplifikationsanalyse der Proto-Onkogene *CDK4*, *MDM2* und *EGFR*

62 PXA (46 PXA II und 16 PXA waf) wurden mittels Duplex-PCR-Analysen auf Amplifikationen der Proto-Onkogene *CDK4*, *MDM2* und *EGFR* hin untersucht. In keinem der untersuchten Tumoren konnte eine Amplifikation eines der drei Proto-Onkogene festgestellt werden.

4.1.4 LOH-Analyse von Gliom-assoziierten Kandidatenregionen

Insgesamt 14 PXA, von denen sowohl Tumorproben als auch Blutproben zur Verfügung standen, wurden auf Allelverluste im Bereich der chromosomalen Arme 1p, 9p, 10p, 10q, 17p, 19q und 22q mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse untersucht. Alle untersuchten Marker lagen dabei in solchen Regionen, die bekanntermaßen häufig Allelverluste in diffusen astrozytären und/oder oligodendroglialen Tumoren aufweisen (Maher *et al.*, 2001, Reifenberger *et al.*, 2000). Zwei der 14 untersuchten Tumoren (PXA 51 und 81, Abbildungen 9 und 10) zeigten Allelverluste an allen informativen Markern auf 9p, nicht aber in den anderen untersuchten Regionen. In PXA 54 konnte ein Verlust der Heterozygotie zwischen den Mikrosatellitenmarkern D22S533 und D22S417, entsprechend der chromosomalen Region 22q11.23 bis 22q13.31, detektiert werden. In keinem der anderen 11 PXA war ein Verlust der Heterozygotie in den untersuchten Regionen festzustellen.

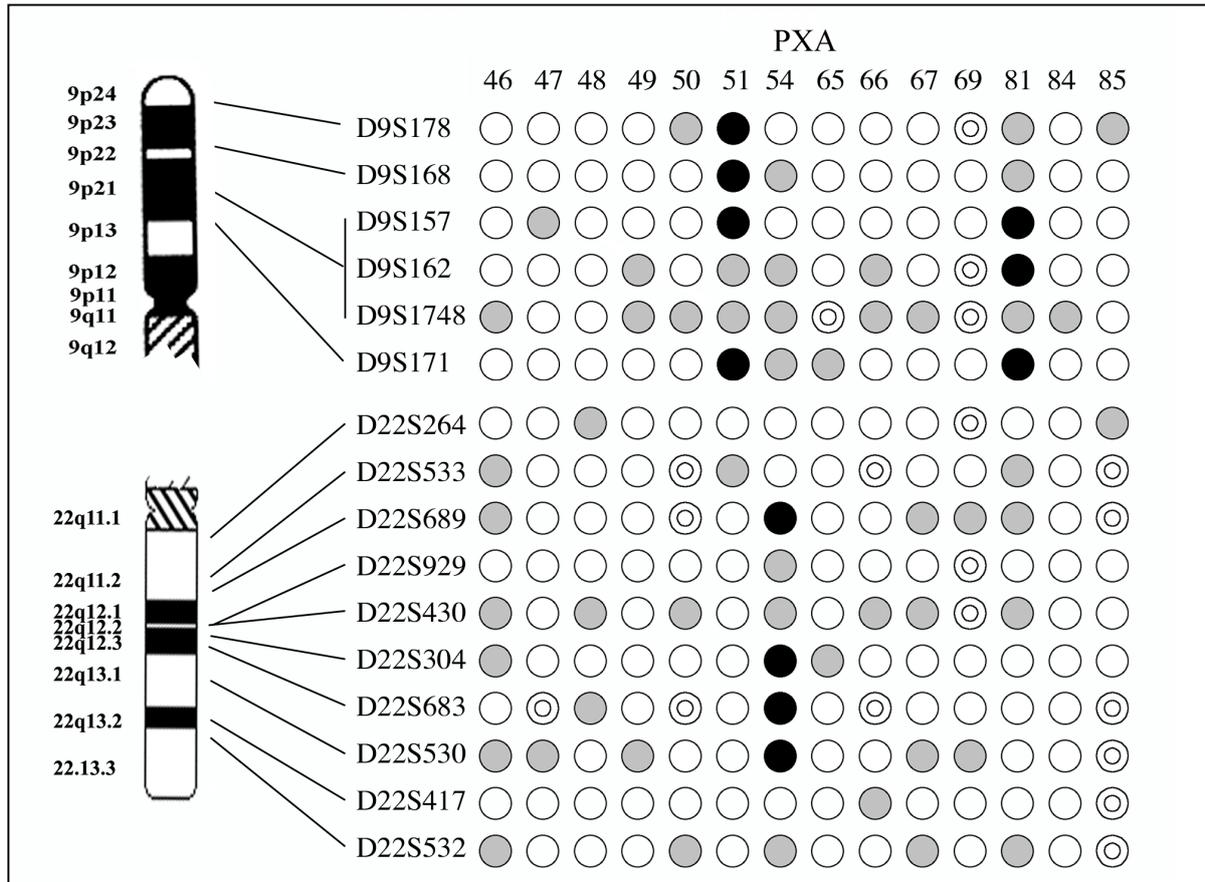


Abbildung 9 Schematische Darstellung der LOH-Muster auf 9p und 22q in den 14 untersuchten PXA. Links sind Ideogramme der beiden Chromosomenarme mit der ungefähren Lokalisation der untersuchten Mikrosatellitenmarker skizziert. Oben sind die Fallnummern der untersuchten PXA angegeben. Der Allelstatus an jedem Locus wurde folgendermaßen symbolisiert: schwarzer Kreis: Verlust eines Allels (LOH); weißer Kreis: Retention beider Allele; grauer Kreis: nicht informativer Locus; Doppelkreis: nicht analysiert. Zwei Tumoren, PXA 51 und PXA 81, zeigten Allelverluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 und PXA 54 wies einen Verlust der Heterozygotie auf 22q zwischen den Mikrosatellitenmarkern D22S533 und D22S417 auf. In allen anderen Tumoren ließen sich keine Allelverluste auf 9p oder 22q nachweisen. Keines der 14 untersuchten PXA zeigte Verluste der Heterozygotie auf 1p, 10, 17p und 19q (nicht abgebildet).

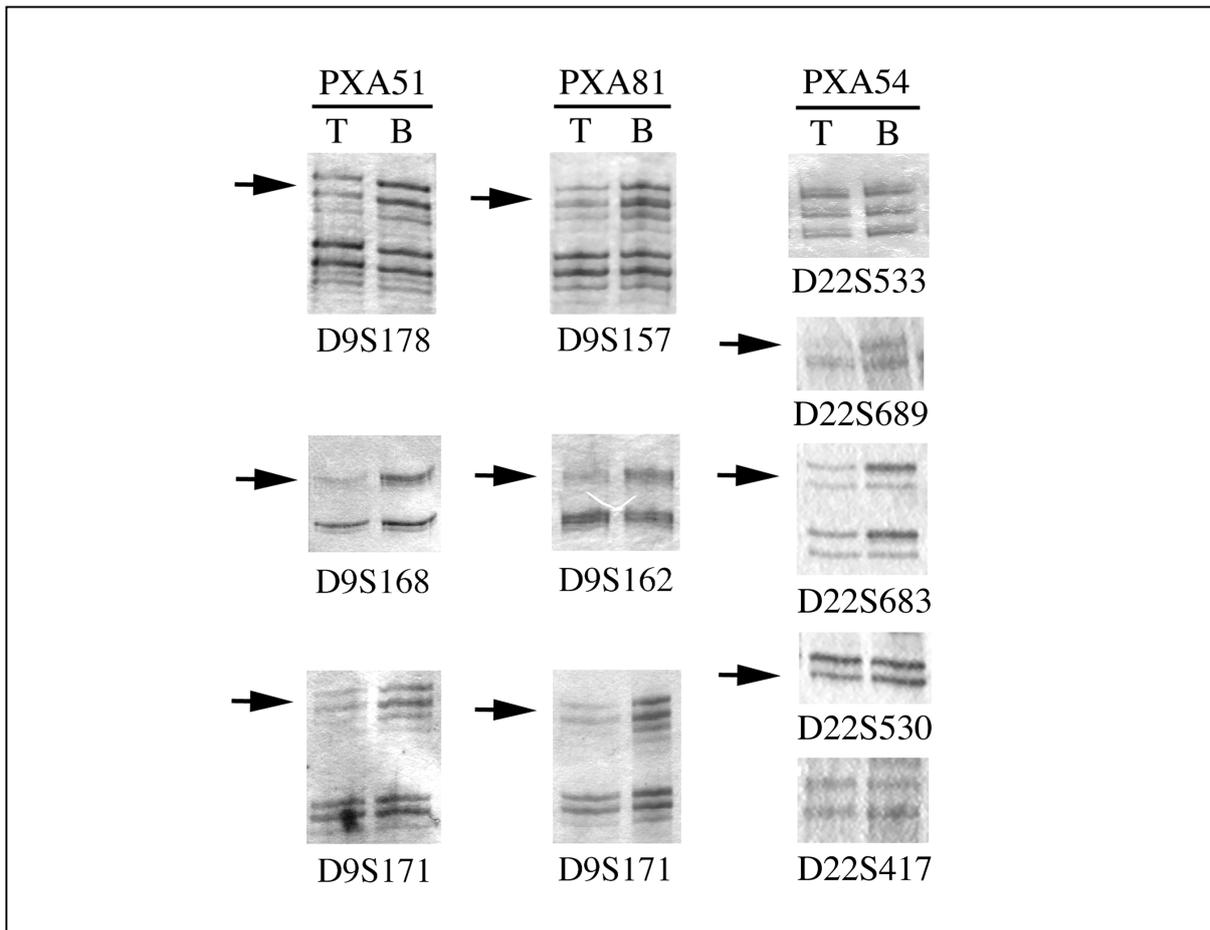


Abbildung 10 Ergebnisse der LOH-Untersuchungen von zwei PXA mit Verlust der Heterozygotie auf 9p (PXA 51 und PXA 81) und einem PXA mit interstitiellem Allelverlust auf 22q (PXA 54). Abgebildet sind Ausschnitte von PAA-Gelen mit silbergefärbten PCR-Produkten der amplifizierten Mikrosatelliten. Die Pfeile markieren jeweils die Allelverluste in der Tumor-DNA (T) im Vergleich zur Blut-DNA (B) der Patienten.

4.2 Identifizierung neuer PXA-assoziiertes Kandidatengene

Um neue Kandidatengene zu identifizieren, die in pleomorphen Xanthoastrozytomen im Vergleich zu diffusen Astrozytomen oder normalem Hirngewebe verstärkt oder vermindert exprimiert werden, wurden zwei Methoden angewandt. Zum einen wurden cDNA-Arrays mit 1176 krebs-relevanten Kandidatengenen direkt mit radioaktiv markierter cDNA aus Tumoren (PXA und AII) und normalem Hirngewebe hybridisiert und so differentiell exprimierte Gene identifiziert. Zum anderen wurden zunächst Gene, die differentiell zwischen PXA und AII exprimiert wurden, mittels Suppressiver Subtraktions-Hybridisierung (SSH) angereichert und dann die subtrahierten cDNA-Bibliotheken auf High-density-Filter hybridisiert. Die mit diesen beiden Ansätzen identifizierten Kandidatengene wurden anschließend mittels Duplex-

PCR oder Real-Time PCR zur Bestätigung ihrer differentiellen Expression in PXA und AII untersucht.

4.2.1 Erstellung von Expressionsprofilen mittels cDNA-Arrays

Zur Erstellung von Transkriptexpressionsprofilen wurden AtlasTM Human Cancer 1.2 cDNA Arrays (Clontech), welche 1776 krebsrelevante Gene repräsentieren, mit amplifizierter und radioaktiv-markierter cDNA von 9 PXA, 8 AII und einer nicht-neoplastischen Hirngewebsprobe hybridisiert. In Abbildung 11 sind hybridisierte cDNA-Arrays mit Expressionsmustern eines PXA (PXA 84), eines AII (A8) und nicht-neoplastischen Hirngewebes dargestellt.

Insgesamt wurden 173 Gene detektiert, die in PXA exprimiert wurden. Davon wurden 21 Gene sehr stark, 78 Gene stark und 74 Gene mäßig exprimiert. In AII konnte die Expression von insgesamt 181 Genen festgestellt werden, wovon sich 16 Gene als sehr stark, 62 als stark und 103 mäßig exprimiert zeigten. Insgesamt 164 exprimierte Gene wurden im nicht-neoplastischen Hirngewebe detektiert, wovon 14 Gene sich als sehr stark exprimiert, 80 als stark exprimiert und 70 als mäßig exprimiert erwiesen.

Durch den Vergleich der durchschnittlichen Expression der einzelnen Gene zwischen PXA, AII und nicht-neoplastischen Hirngewebe wurden 45 Gene identifiziert, deren Expression in PXA stärker ist im Vergleich zu AII. 46 Gene konnten detektiert werden, die stärker in AII als in PXA exprimiert werden. In 28 bzw. in 19 Genen wurde eine schwächere bzw. eine stärkere Expression im nicht-neoplastischen Hirngewebe als in PXA und AII festgestellt (siehe Anhang).

Der Vergleich der Expressionswerte der PXA II mit denen der PXA waf zeigte keine signifikanten Unterschiede im Expressionsverhalten.

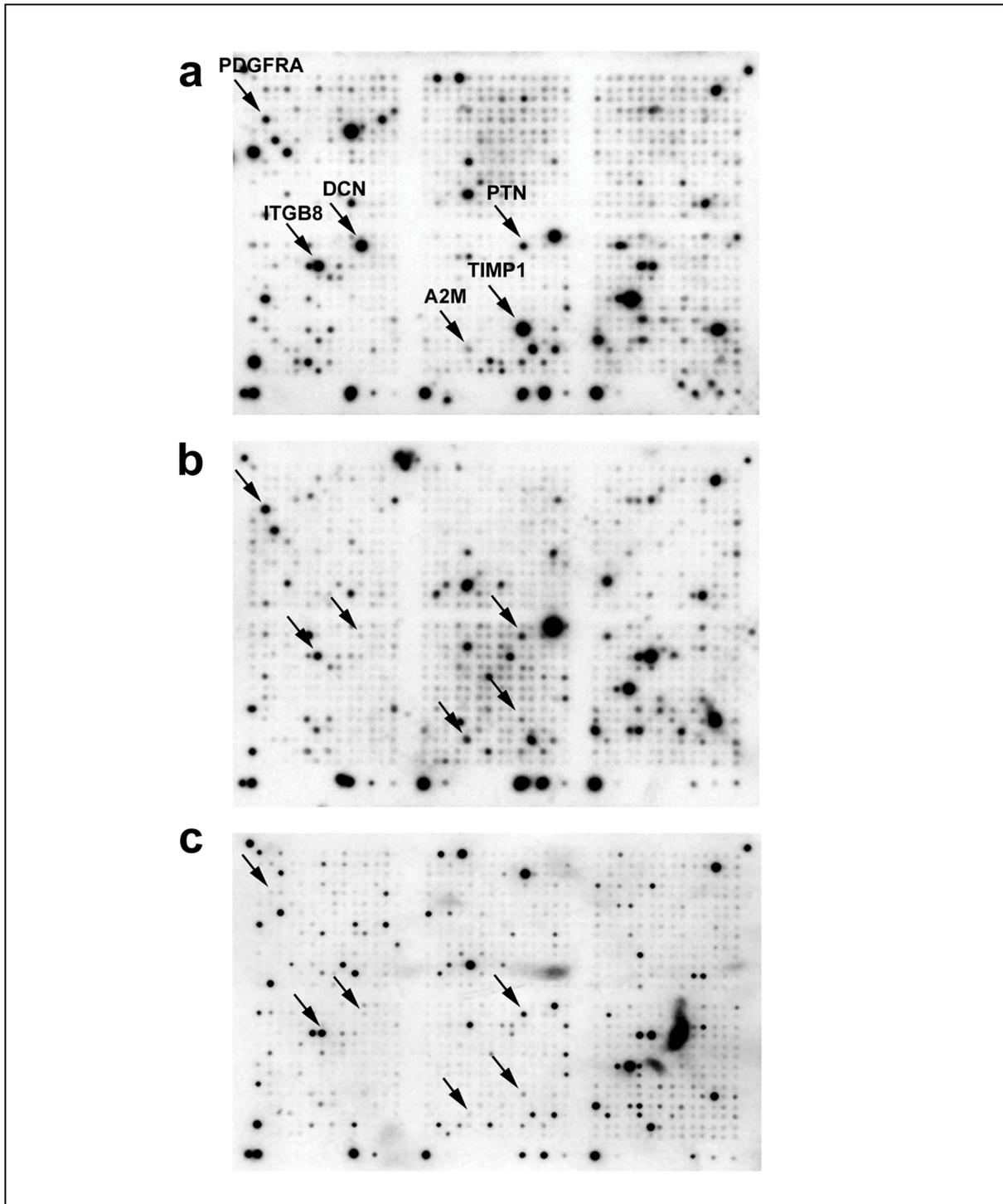


Abbildung 11 Beispiele von hybridisierten cDNA-Filter-Arrays (ATLAS™ Human Cancer 1.2 cDNA Arrays (Clontech)). Dargestellt sind die Ergebnisse von Hybridisierungen mit $\alpha^{32}\text{P}$ -markierter cDNA des Tumors PXA 84 (a), des Tumors A8 (b) und von nicht-neoplastischem Hirngewebe (c). Die Pfeile zeigen auf einige differentiell exprimierte Gene.

4.2.2 Überprüfung der cDNA-Array-Daten mittels Duplex RT-PCR

Aus dem Kandidatengenpool der differentiell exprimierten Genen wurden 15 Gene ausgewählt, die entweder aufgrund der Funktion ihres Genproduktes besonders interessant erschienen und/oder aufgrund ihres besonders stark unterschiedlichen Expressionsverhaltens auffällig waren (Tabelle 12). Unter den ausgewählten Genen waren 7 Gene, die in PXA, nicht aber in AII stark exprimiert wurden. Drei Gene wurden aus der Gruppe der stärker in AII als in PXA exprimierten Gene ausgewählt. Ebenso wurden 4 Gene, die schwächer bzw. 1 Gen, das stärker im nicht-neoplastischen Hirngewebe als in PXA und AII exprimiert wurden, untersucht. Die Expression dieser 15 Gene wurde mittels Duplex-RT-PCR analysiert. Entsprechende PCR-Primer und -Bedingungen sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 12 Wichtige Charakteristika der 15 für die bestätigenden Duplex-RT-PCR-Analysen ausgewählten Gene.

Genname	Lokalisation	Koordinate *	Funktionen des Genproduktes
Gene, die laut cDNA-Array-Analysen in PXA stärker exprimiert werden als in diffusen Astrozytomen			
<i>JNK2</i>	5q35	B10c	c-jun-terminale-Kinase; Serin-Threonin-Kinase, Signaltransduktion von der Zellmembran zum Zellkern
<i>PTN</i>	7q33	E10b	Pleiotrophin; entwicklungsreguliertes, Heparin-bindendes Protein; involviert in Neurogenese und Zellmigration
<i>NOTCH1</i>	9q34	A04h	Transmembranprotein, welches für das Zell-Schicksal entscheidende Signale während der Entwicklung (Hämatogenese, Neurogenese) weiterleitet
<i>IFITM</i>	11	A01h	Interferon-induziertes Transmembranprotein; spielt eine wichtige Rolle in der B-Zell-Entwicklung/Aktivierung; bildet mit <i>CD19</i> und <i>CD81</i> einen antiproliferativen Komplex
<i>DCN</i>	12q23	D11b	Decorin; Kollagen-bindendes Proteoglycan der extrazellulären Matrix; moduliert Wachstumsaktivität und Matrixzusammensetzung; de novo-Expression von <i>DCN</i> unterdrückt den malignen Phänotyp in Krebszellen (Santra <i>et al.</i> , 1995, 1997)
<i>MMP11</i>	22q11	A10f	Matrix-Metalloproteinase: Protease, die am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt ist; wird von Fibroblasten exprimiert; findet sich v.a. im an Tumorzellen angrenzenden Stroma
<i>TIMP1</i>	Xq11	E10j	Gewebe-Inhibitor der Matrixproteinase; hemmt einerseits Matrix-Metalloproteinasen, andererseits stimuliert es in bestimmten Konzentrationen das Wachstum von normalen und malignen Zellen

Genname	Lokali- sation	Koor- dinate *	Funktionen des Genproduktes
Gene, die laut cDNA-Array-Analysen in diffusenAstrozytomen stärker exprimiert werden als in PXA			
<i>TDGF1</i>	3p23	E05c	Teratokarzinom-Wachstumsfaktor; autokriner Wachstumsfaktor; aktiviert intrazelluläre Komponenten im <i>Ras/RAF/MEK/MAPK</i> -Signalweg
<i>PDGFRA</i>	4q12	A02e	Plättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptor; Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die durch Ligandenbindung aktiviert wird; beteiligt an Zellwachstum, Aktinreorganisation, Migration und Differenzierung
<i>NTRK2</i>	9q22	D01i	Neutrophinrezeptor (auch TRKB), Tyrosin-Kinase-Rezeptor, wichtig für Regulation und Entwicklung des zentralen und peripheren NS
Gene, die laut cDNA-Array-Analysen im nicht-neoplastischen Hirngewebe schwächer exprimiert werden als in PXA und diffusen Astrozytomen			
<i>CD74</i>	5q32	E07m	Antigen mit bisher unbekannter Funktion; in B-Zellen und Makrophagen exprimiert
<i>CDKN1A</i>	6p21	A09l	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor (p21); interagiert u.a. mit <i>CDK2/4</i> und <i>CDC2</i> und induziert den G1/S- und G2/M-Arrest
<i>ITGB8</i>	7p15	D07d	Integrin; heterodimäres Zelladhäsionsprotein, das die extrazelluläre Matrix an das Cytoskelett bindet; involviert in Wachstum, Differenzierung, Migration und Zelltod
<i>A2M</i>	12p13	E05l	α 2-Makroglobulin; unspezifischer Matrix-Proteinase-Inhibitor
Gene, die laut cDNA-Array-Analysen im nicht-neoplastischen Hirngewebe stärker exprimiert werden als in PXA und diffusen Astrozytomen			
<i>ADD3</i>	10q24	F14l	Adducin gamma; heterodimäres Membranskelettprotein; bindet an Calmodulin; spielt eine Rolle beim Zell-Zell-Kontakt

* = Lokalisation des Gens auf dem AtlasTM Human Cancer 1.2 cDNA Array (Clontech)

Die Expressionsanalyse der in Tabelle 12 aufgeführten Gene wurde mittels Duplex-RT-PCR-Analyse für jene 9 PXA und 8 AII durchgeführt, für die ein Expressionsprofil mittels cDNA-Array-Hybridisierung erstellt worden war. Als Referenzgewebe diente nicht-neoplastisches Gehirngewebe.

Für jedes der 15 Gene wurde der Mittelwert der mRNA-Expressionswerte für die Gruppe der PXA bzw. der AII bestimmt. Zur Feststellung, ob es signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression der einzelnen Gene zwischen PXA und AII gibt, wurde die Standardabweichung

ermittelt und der Mann-Whitney-Test angewendet. In Tabelle 13 sind jeweils die Duplex RT-PCR-Werte, die berechneten Mittelwerte, die Standardabweichung und der Signifikanz-Wert für die 15 untersuchten Gene aufgeführt. Ist der Signifikanz-Wert $\leq 0,05$, so liegt eine signifikant differentielle Expression zwischen PXA und AII vor.

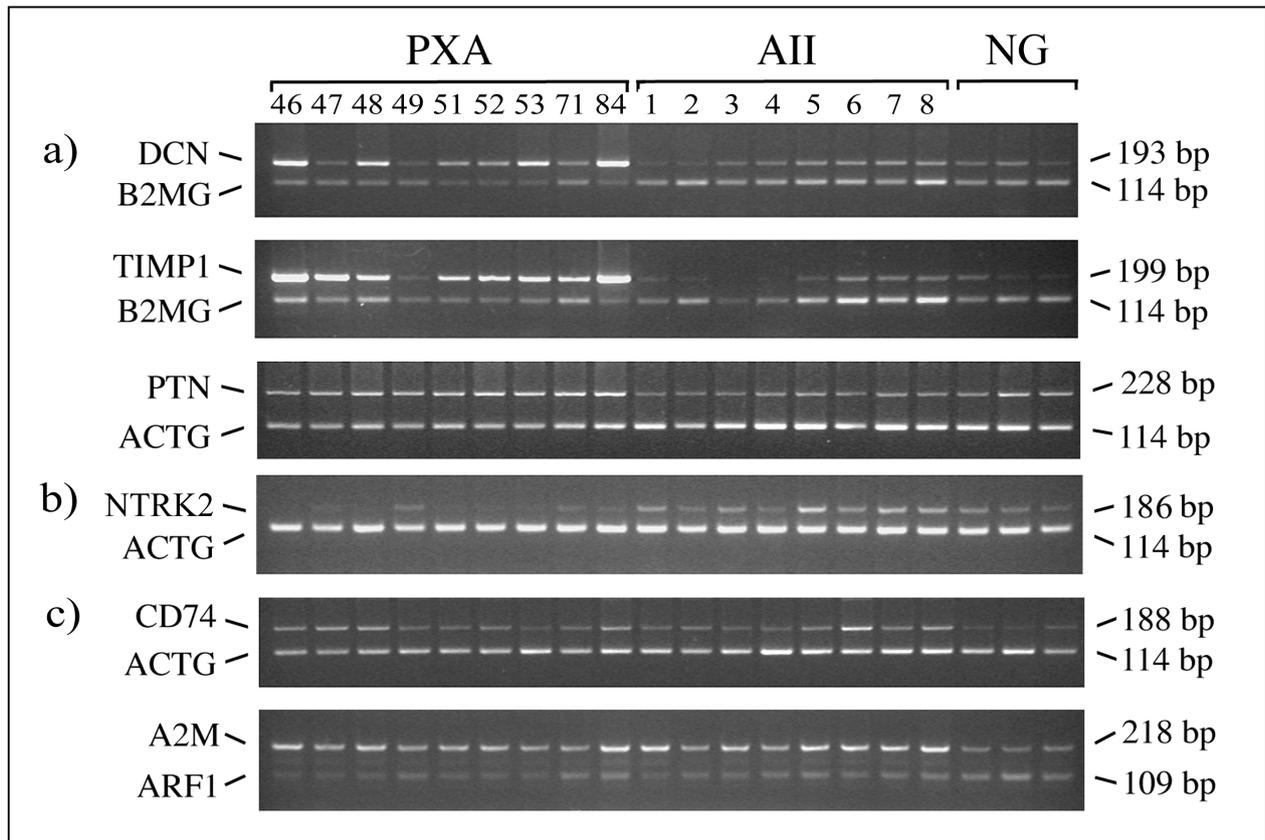


Abbildung 12 Duplex-RT-PCR Analyse von ausgewählten Genen, die laut der cDNA-Array-Hybridisierung differentiell exprimiert werden. In (a) wurden 3 Gene (*DCN*, *TIMP1*, *PTN*) untersucht, die in PXA stärker exprimiert werden als in AII und nicht-neoplastischem Hirngewebe (NG), in (b) ein Gen (*NTRK2*), welches in AII stärker exprimiert wird als in PXA und in (c) 2 Gene (*CD74*, *A2M*), die in PXA und AII stärker exprimiert werden als in nicht-neoplastischem Hirngewebe.

Tabelle 13 Ergebnisse der mittels Duplex-RT-PCR erstellten Expressionsanalyse von 15 ausgewählten Genen.

Tumor-Nr.	JNK2	PTN	NOTCH1	IFITM	DCN	MMP11	TIMP1	TDGF1	PDGFRA	NTRK2	CD74	CDKN1A	ITGB8	A2M	ADD3
PXA 46	0,44	1,94	1,95	3,51	9,53	3,38	16,83	0,21	1,05	0,24	4,79	3,78	1,67	17,69	0,73
PXA 47	0,80	2,43	0,76	0,58	1,67	0,00	23,35	0,60	0,68	1,07	4,94	2,95	3,30	14,22	0,47
PXA 48	0,79	2,14	1,75	3,02	9,27	0,00	9,10	2,76	0,58	0,17	4,70	7,13	0,88	16,59	1,31
PXA 49	1,35	2,03	1,04	0,49	1,22	0,00	4,31	5,33	2,75	1,40	1,89	1,20	1,84	5,62	1,03
PXA 51	0,93	1,91	3,25	0,54	8,34	0,00	12,74	3,47	1,29	0,48	1,82	5,33	1,41	9,09	1,38
PXA 52	0,80	2,68	12,49	0,14	7,89	0,00	21,84	0,61	1,20	0,76	2,89	7,39	2,39	16,40	0,57
PXA 53	0,63	2,17	1,22	0,24	46,64	0,00	18,92	2,19	1,08	0,36	0,91	2,95	3,64	10,63	0,43
PXA 71	1,58	2,09	1,51	0,52	2,50	0,00	8,29	0,50	0,62	0,61	1,74	7,60	3,78	3,95	0,59
PXA 84	0,94	2,23	1,02	3,83	47,41	3,02	93,58	0,17	1,70	0,68	3,77	3,84	2,26	7,66	0,86
MW	0,92	2,18	2,78	1,43	14,94	0,71	23,20	1,76	1,22	0,64	3,05	4,69	2,35	11,50	0,71
ST	0,35	0,24	3,72	1,54	18,48	1,41	27,16	1,80	0,68	0,40	1,54	2,29	1,02	5,10	0,34
A1	0,84	0,47	6,61	4,97	0,34	0,00	0,76	3,45	1,25	1,35	2,73	0,63	3,13	25,48	1,45
A2	1,08	0,61	3,49	2,24	0,18	0,00	0,52	1,21	5,29	0,83	3,51	0,59	1,66	5,57	0,51
A3	1,12	0,52	1,92	0,76	0,99	0,00	0,01	1,38	5,38	1,26	1,90	1,88	8,52	10,35	2,12
A4	0,90	0,86	1,73	0,92	1,21	0,00	0,97	1,54	5,36	0,90	1,03	0,04	1,76	5,29	0,92
A5	1,13	0,64	2,01	1,65	1,34	0,00	1,47	0,26	2,56	3,25	2,99	4,06	2,33	7,64	0,68
A6	1,29	0,54	2,25	2,36	1,51	0,00	1,75	0,03	2,30	1,40	6,75	17,15	0,32	9,48	1,19
A7	1,15	0,61	1,94	1,45	2,10	0,00	1,90	0,20	1,79	2,10	2,30	3,73	1,50	8,70	0,85
A8	1,07	0,49	2,51	2,89	1,09	0,00	1,30	0,42	4,49	1,77	2,94	7,69	1,29	8,64	0,70
MW	1,07	0,59	2,81	2,16	1,10	0,00	1,08	1,06	3,55	1,61	3,02	4,47	2,56	10,10	1,05
ST	0,14	0,12	1,63	1,35	0,62	0,00	0,65	1,13	1,75	0,79	1,69	5,71	2,54	6,47	0,53
P	0,124	0,001	0,083	0,149	0,002	0,441	0,001	0,386	0,004	0,005	0,923	0,386	0,441	0,386	0,34

Legende zu Tabelle 13 Die Tabelle listet die Duplex-RT-Werte im Verhältnis zu nicht-neoplastischem Hirngewebe (= 1), die berechneten Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (ST) und die anhand des Mann-Whitney-Tests ermittelten Signifikanz-Werte (p) für die differentielle Expression zwischen PXA und AII auf.

Ein statistisch signifikanter Expressionsunterschied zwischen PXA und AII wurde für 5 Gene detektiert (Tabelle 13), wobei die Gene *DCN*, *TIMP1* und *PTN* stärker in PXA und die Gene *PDGFRA* und *NTRK2* stärker in AII exprimiert wurden. Für 3 Gene (*CD74*, *CDKN1A* und *A2M*) konnte eine erhöhte Expression in PXA und AII im Vergleich zu nicht-neoplastischen Hirngewebe bestätigt werden. Die Duplex-RT-PCR-Analysen ergaben keine auffälligen Expressionsunterschiede zwischen PXA, AII und nicht-neoplastischen Hirngewebe für die Gene *JNK2*, *NOTCH1*, *IFITM*, *TDGF1*, *ITGB8* und *ADD3*. Eine Expression von *MMP11* konnte lediglich in 2 von 9 PXA, aber weder in AII noch im nicht-neoplastischen Gehirngewebe detektiert werden.

Wegen der stark erhöhten Expression von *DCN* und *TIMP1* in PXA wurde die Gendosis dieser beiden Gene in den 9 PXA zusätzlich mittels genomischer Duplex-PCR bestimmt, um festzustellen, ob Gewinne oder Amplifikationen auf DNA-Ebene vorliegen. Es konnte jedoch in keinem der Fälle eine erhöhte *DCN*- oder *TIMP1*-Gendosis festgestellt werden.

4.2.3 Erstellung von Expressionsprofilen mit Hilfe der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH)

Um neue Gene zu identifizieren, die ausschließlich oder zumindest stärker in PXA bzw. AII exprimiert werden, wurde eine SSH-Analyse durchgeführt, wobei einerseits gepoolte RNA aus 3 PXA (PXA 48, 53 und 71) und andererseits gepoolte RNA aus 3 AII (A2, A3 und A4) eingesetzt wurde. Die zwischen PXA und AII differentiell exprimierten cDNA-Populationen wurden als Sonde zur Hybridisierung von High-Density-Filtern (Unigene RZPD-Filter, Berlin), welche ca. 36.000 Gene und exprimierte Sequenzen (ESTs = *expressed sequence tags*) der Unigene-Datenbank (aufgeteilt auf 2 Filter) repräsentieren, eingesetzt.

Insgesamt konnten 233 positive Klone auf den High-Density-Filtern der Vorwärts-Subtraktion (d.h. eine Anreicherung der in PXA stärker exprimierten Gene) detektiert und identifiziert werden. Auf den High-Density-Filtern der Rückwärts-Subtraktion (d.h. eine Anreicherung der in AII stärker exprimierten Gene) konnten 168 Signale detektiert und identifiziert werden.

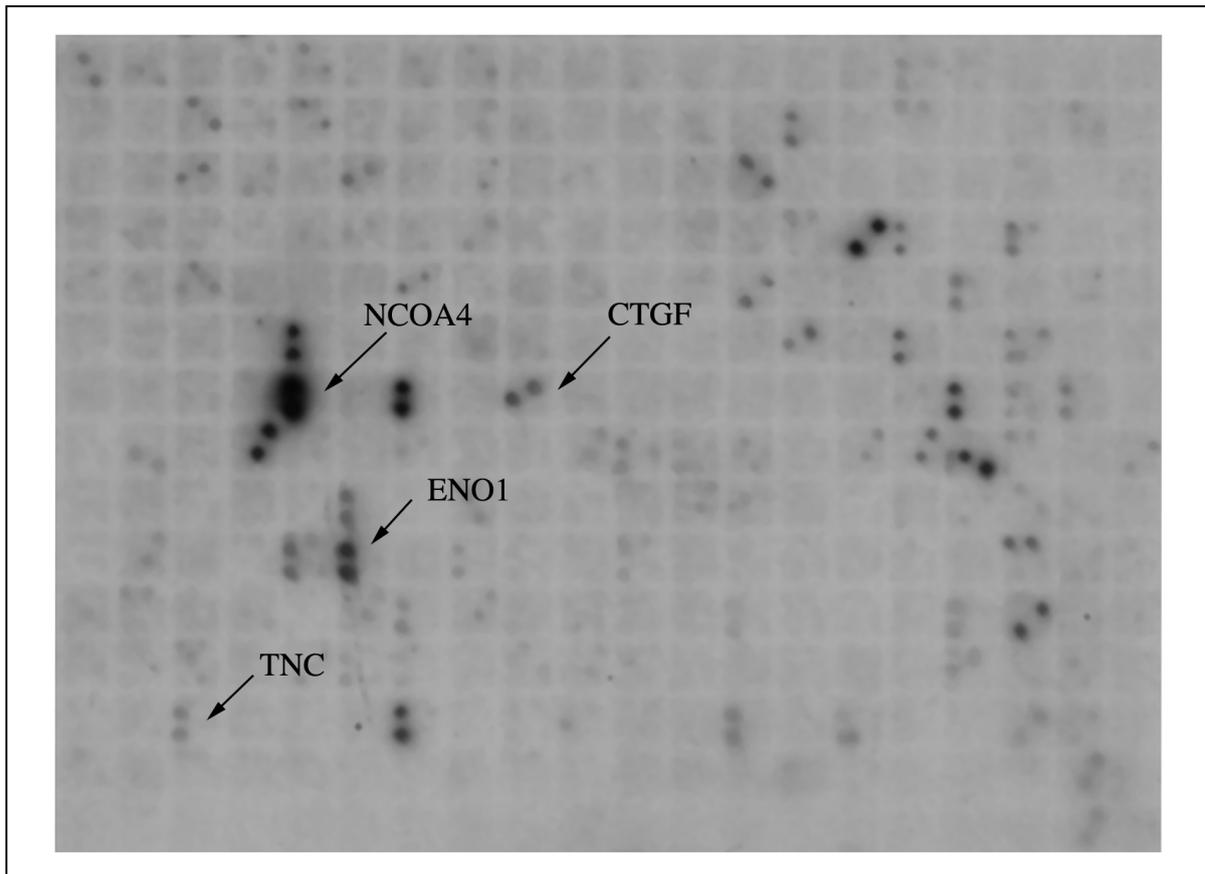


Abbildung 13 Expressionsanalyse mittels Hybridisierung von SSH-Produkten auf Unigene RZPD-Filter. Dargestellt ist das Ergebnis der Hybridisierung mit dem SSH-Produkt nach der Vorwärts-Subtraktion (PXA minus AII). Aufgrund ihrer Position auf dem Unigene-Filter können die deutlich sichtbaren Hybridisierungssignale einem bestimmten Gen bzw. EST zugeordnet werden. Die Pfeile deuten auf ausgewählte radioaktive Spots, welche die bezeichneten Gene repräsentieren.

4.2.4 Überprüfung der Expression ausgewählter Kandidatengene mittels Real-Time RT-PCR

Aus dem Kandidatengenpool von insgesamt 401 Genen und ESTs, die sich nach der Hybridisierung der Vorwärts- bzw. Rückwärtssubtraktion auf RZPD-Unigene Filter ergaben, wurden 7 Gene, die sich in PXA als stärker exprimiert und 6 Gene, die sich in AII als stärker exprimiert dargestellt hatten, ausgewählt (Tabelle 14). Die Überprüfung der differentiellen Expression dieser insgesamt 13 Gene erfolgte mittels Real-Time RT-PCR. Die entsprechenden PCR-Primer und -Bedingungen sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 14 Wichtige Charakteristika der 13 für die Real-Time RT-PCR-Analyse ausgewählten Gene.

Genname	Lokalisation	Funktion des Genprodukts
differenziell exprimierte Gene nach der Vorwärts-Subtraktion (PXA minus AII)		
<i>ENO1</i>	1p36	Enolase 1, Enzym der Glykolyse
<i>CTGF</i>	6q23	<i>Connective tissue growth factor</i> ; Wachstumsfaktor-bindendes Protein; cysteinreiches Peptid, das in der Angiogenese eine Rolle spielt
<i>SYK</i>	9q22	<i>Spleen tyrosine kinase</i> ; vermittelt zwischen aktivierten Immunorezeptoren und nachfolgenden Signalwegen, die u.a. an der Proliferation und Differenzierung beteiligt sind
<i>TNC</i>	9q33	Tenascin; im ZNS v.a. von Astrozyten exprimiertes extrazelluläres Matrixprotein
<i>NCOA4</i>	10q11	<i>Nuclear receptor coactivator 4</i> ; Koaktivator des Androgen-Rezeptors; ein <i>NCOA4</i> -Expressionsverlust wurde in Mammakarzinomen beobachtet (Kollara <i>et al.</i> , 2001)
<i>TPI</i>	12p13	Triosephosphat-Isomerase 1; Enzym der Glykolyse
<i>MGP</i>	12p13	Matrix Gla Protein; Vitamin-K-abhängiges Protein der extrazellulären Matrix; übt inhibitorische Effekte auf Gewebs-Calzifizierung aus
differenziell exprimierte Gene nach der Rückwärts-Subtraktion (AII minus PXA)		
<i>SOX4</i>	6p22	<i>SRY-Box 4</i> ; Transkriptionsfaktor; verstärkt exprimiert während der Embryogenese
<i>SerpinE1</i>	7q21	Plasminogen-Aktivator (<i>PAI 1</i>); spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Fibrinolyse und Thrombolyse; eine erhöhte Expression wurde in höhergradigen Astrozytomen beschrieben (Bu <i>et al.</i> , 1998)
<i>EPHA1</i>	7q32	Ephrin-Rezeptor 1; Rezeptor-Tyrosin-Kinase; wichtig insbesondere bei der Entwicklung des Nervensystems
<i>SGPL1</i>	10q21	Sphingosin-1-Phosphat-Lyase; katalysiert den Abbau von SPP (Sphingosine-1-Phosphatase), eine in den Proliferations-Signal-Transduktionsweg involvierte Phosphatase
<i>RBI</i>	13q14	Retinoblastomgen; an der Zellzyklus-Regulation und der Kontrolle der Zelldifferenzierung beteiligt
<i>ATP1B2</i>	17p	β -Untereinheit der Na/K-ATPase; membranintegrales Glykoprotein, das v.a. in Gliazellen exprimiert wird

Neun PXA und 8 AII wurden mittels Real-Time RT-PCR auf die mRNA-Expression der ausgewählten Gene hin untersucht. Als Referenzgewebe diente nicht-neoplastisches Hirngewebe. Die Auswertung der Real-Time RT-PCR-Daten (Tabelle 15) sowie die Ermittlung der Expressionswerte in Relation zu nicht-neoplastischem Hirngewebe erfolgte wie in den Kapiteln 3.2.11.4 und 4.1.2.4 beschrieben.

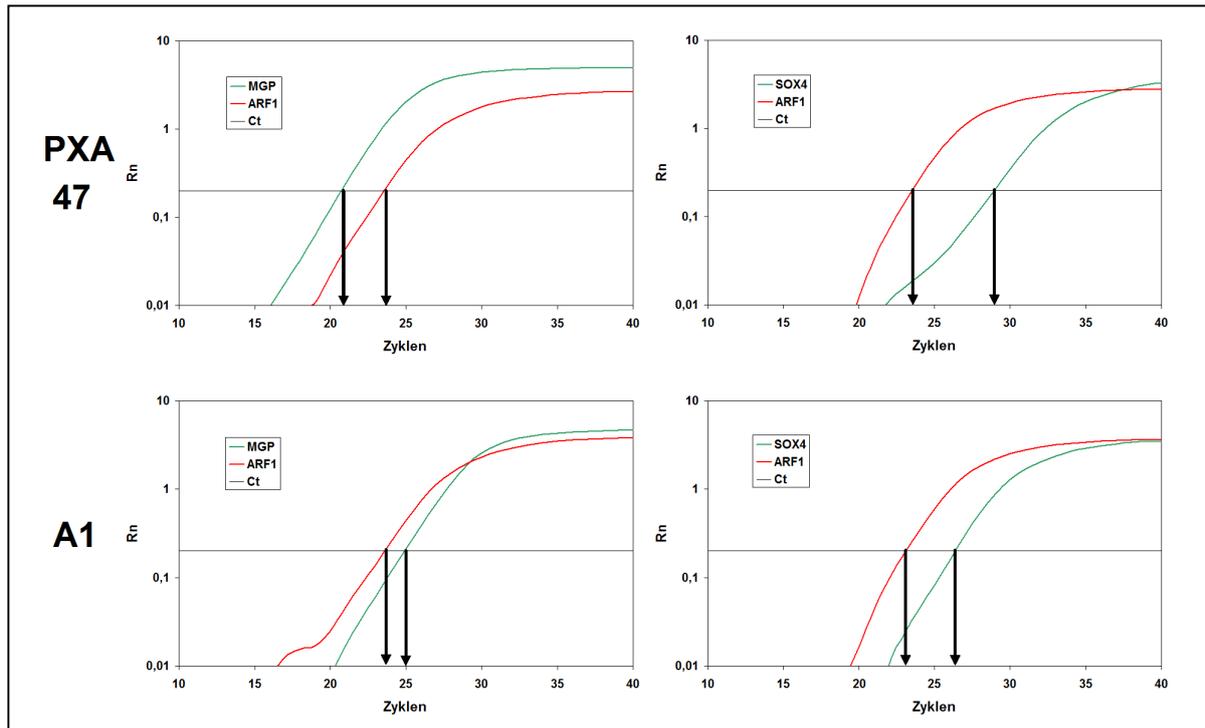


Abbildung 14 Darstellung der PCR-Produktentwicklung für die Gene *MGP* und *SOX4* im Verhältnis zum Referenzgen *ARF1* in den Tumoren PXA 47 und A1. Der Ct-Wert für *MGP* in Relation zu *ARF1* ist in dem PXA um etwa 4 Zyklen im Vergleich zu dem AII nach links verschoben. Das entspricht einer 16-fach (2^4) höheren Expression von *MGP* in PXA 47 im Vergleich zu A1. Der Ct-Wert für *SOX4* in Relation zu *ARF1* ist in A1 um 2,5 Zyklen im Vergleich zu PXA 47 nach links verschoben, was einer 5,7-fachen erhöhten Expression von *SOX4* in A1 im Vergleich zu PXA 47 entspricht.

Tabelle 15 Ergebnisse der Expressionsanalyse nach der Real-Time RT-PCR.

Tumor-Nr.	ENO1	CTGF	SYK	TNC	NCOA4	TPH1	MGP	SOX4	Serpine1	EPHA1	SGPL1	RB1	ATP1B2
PXA 46	1,21	28,57	1,86	6,32	1,76	0,56	725,75	2,20	120,67	11,56	1,86	3,96	2,08
PXA 47	1,50	5,07	2,68	2,39	1,72	0,34	79,34	2,35	21,70	3,64	1,57	4,17	11,19
PXA 48	1,07	15,20	4,39	1,41	2,15	0,26	367,09	1,86	70,60	24,90	1,37	2,87	1,73
PXA 49	1,04	0,75	1,39	0,42	1,52	0,11	34,77	1,95	2,29	1,46	0,93	3,96	6,78
PXA 51	0,75	2,63	2,13	2,56	1,04	0,25	103,72	4,16	29,71	15,90	0,68	7,26	11,88
PXA 52	1,83	0,96	4,08	2,12	1,12	0,38	97,45	7,14	13,25	9,42	0,37	8,00	6,33
PXA 53	1,05	0,62	1,57	3,48	1,06	0,10	8,51	1,65	61,25	13,50	1,28	5,11	16,99
PXA 71	2,07	20,29	0,86	4,16	1,42	0,10	16,91	0,55	39,62	3,08	0,72	5,66	13,13
PXA 84	0,77	22,26	1,36	2,22	0,90	0,68	607,46	2,70	145,84	9,18	1,95	2,65	2,63
MW	1,25	10,70	2,25	2,79	1,41	0,30	226,80	2,72	56,10	10,29	1,19	4,84	8,08
ST	0,46	10,94	1,24	1,70	0,42	0,21	272,88	1,91	49,17	7,36	0,55	1,85	5,47
A1	1,86	6,21	2,92	4,14	3,64	0,82	3,92	10,97	4,74	6,79	3,42	7,07	11,79
A2	1,56	0,66	1,70	2,24	1,70	0,53	1,43	6,74	3,21	4,55	1,98	4,99	2,71
A3	1,35	12,24	2,39	2,67	2,01	0,58	6,14	3,99	13,64	4,26	2,14	5,33	4,17
A4	1,27	3,32	1,35	1,64	1,84	0,73	1,69	18,80	4,15	5,40	1,58	3,91	2,96
A5	1,19	2,02	1,42	2,89	1,47	0,31	0,37	21,85	3,03	6,93	2,67	3,34	3,04
A6	1,37	0,18	4,78	3,94	1,80	0,31	27,12	23,80	4,52	4,84	1,41	8,88	1,34
A7	1,45	5,63	1,80	3,14	1,93	0,20	4,48	8,14	30,41	4,04	2,11	6,33	0,67
A8	1,59	2,01	2,07	1,89	2,05	0,56	2,28	21,50	2,59	7,05	0,95	4,93	1,97
MW	1,45	4,03	2,30	2,82	2,05	0,50	5,92	14,47	8,28	5,48	2,03	5,59	3,58
ST	0,21	3,96	1,13	0,90	0,67	0,22	8,76	7,86	9,62	1,26	0,77	1,79	3,49
p	0,149	0,336	0,772	0,700	0,021	0,092	0,001	0,001	0,021	0,248	0,012	0,501	0,102

Legende zu Tabelle 15 Der Wert des nicht-neoplastischen Referenzgewebes wurde = 1 gesetzt. Angegeben ist neben den Expressionswerten der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (ST) sowie der anhand des Mann-Whitney-Tests ermittelte Signifikanzwert (p). Grau unterlegt sind die 3 PXA und 3 AII, die für die SSH-Analyse verwendet wurden.

Die Real-Time RT-PCR-Ergebnisse bestätigen eine signifikant erhöhte Expression ($p < 0,05$) des *MGP*-Gens in PXA im Vergleich zu AII. Für *CTGF* fand sich in 45 % der PXA, für *EPHA1* und *ATP1B2* in 67 % der PXA eine stärkere Expression als in AII, wobei aufgrund der SSH-Ergebnisse eine erhöhte Expression der Gene *EPHA1* und *ATP1B2* in AII erwartet wurde. Insgesamt war der Unterschied in der Expression dieser 3 Gene in den beiden Tumorgruppen aber nicht signifikant (Tab. 15). Für die Gene *ENO1*, *SYK* und *TNC* ließ sich eine verstärkte Expression in PXA nicht verifizieren. Für das Gen *TPII* wurde ebenfalls keine differentielle Expression zwischen PXA und diffusen Astrozytomen festgestellt, aber eine Herunterregulation in beiden Tumorgruppen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe beobachtet. Im Falle von *NCOA4* ergaben die Real-Time PCR-Untersuchungen wider Erwarten eine signifikant höhere, aber nur mäßige Expression (MW= 2,05) in AII. Die in diffusen Astrozytomen im Vergleich zu PXA erhöhte Expression von *SOX4* und *SGPL1* bestätigte sich in den Zusatzuntersuchungen, wobei das Gen *SGPL1* ebenfalls nur mäßig stark exprimiert wurde (MW= 2,03). Eine sogar signifikant erhöhte Expression in PXA wurde für das Gen *SerpinE1* ermittelt. Dagegen ließ sich für *RBI* kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tumorgruppen, wohl aber eine erhöhte Expression in beiden Tumorgruppen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Gewebe feststellen. Zusammenfassend fand sich somit für *MGP* und *SerpinE1* eine signifikant erhöhte Expression und für *CTGF*, *Epha1* und *ATP1B2* in 45 % bzw. 67 % der Fälle eine erhöhte Expression in PXA im Vergleich zu diffusen Astrozytomen und nicht-neoplastischen Gewebe. Die Gene *SOX4*, *NCOA4* und *SGPL1* wurden signifikant stärker in diffusen Astrozytomen im Vergleich zu PXA exprimiert, wobei nur mäßig starke Expressionswerte für die Gene *NCOA4* und *SGPL1* in diffusen Astrozytomen beobachtet werden konnten.

Zur Überprüfung der Möglichkeit, dass die stark erhöhte Expression von *MGP*-mRNA in PXA auf einer Genamplifikation beruht, wurde zusätzlich eine Duplex-PCR-Analyse durchgeführt. Es konnte jedoch keine Amplifikation des *MGP*-Gens in den 9 untersuchten Tumoren festgestellt werden.

4.2.5 Untersuchung der Gene *CDKN1B*, *AKT1*, *AKT2*, *TGFB1* und *TIAM1*

Eine erhöhte Expression von Decorin wurde zum einen mit einer Hochregulation der Gene *CDKN1A* (p21^{WAF1/CIP1}), *CDKN1B* (p27^{KIP1}, beides Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren) und *AKT* (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*) in Endothelzellen (Schönherr *et al.*, 2001, de Luca *et al.*, 1996) und zum anderen mit einer Herunterregulation der *TGFB1*-Synthese (*transforming growth factor 1*) in Gliomzellen (Ständer *et al.*, 1998) in Zusammenhang gebracht. Eine transkriptionelle Hochregulation von *TIMP1* induziert durch eine von *TIAM1* (*T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*)-vermittelte Aktivierung von *RAC1* (*Rho-like GTPase*) wurde von Engers *et al.* (2001) beschrieben. Desweiteren ist eine dominant aktivierende Mutation in *TIAM1* (A441G) bekannt, die verstärkt in Nierenzell-Karzinomen auftritt (Engers *et al.*, 2000).

In den untersuchten PXA konnte eine deutlich erhöhte Expression von *DCN* und *TIMP1* nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.2). Aufgrund der oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen einer erhöhten Expression von Decorin und einer Erhöhung der Expression der Gene *CDKN1B*, *AKT1*, *AKT2* und *TGFB1* sowie zwischen einer erhöhten Expression von *TIAM1* und *TIMP1* wurde im Folgenden der Expressionsstatus dieser Gene in 9 PXA und 8 AII mittels Duplex-RT-PCR bzw. Real-Time-RT-PCR untersucht. (Die Expression von *CDKN1A* wurde wie bereits in Kapitel 4.2.2 beschrieben untersucht). Als Referenzgewebe diente nicht-neoplastisches Hirngewebe. Die Durchführung und Auswertung der RT-PCRs erfolgte wie bereits beschrieben (Kapitel 3.2.11.3 bzw. 4.1.2.4 und 4.2.2). Ferner wurde die sogenannte HotSpot-Region des *TIAM1*-Gens, in welcher das Codon 441 liegt, mit Hilfe direkter Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte in 9 PXA sowie in 8 AII auf Mutationen hin untersucht. Die entsprechenden PCR-Primer und -Bedingungen sind in Tabelle 5 zu finden.

Die Expression von *CDKN1B* in PXA (Streuung von 0,6 - 2,4) bewegte sich auf dem Expressionsniveau von nicht-neoplastischem Hirngewebe (Tabelle 16). Es lag somit keine erhöhte Expression von *CDKN1B* in PXA vor. In AII ist der Grad der Expression von *CDKN1B* etwas erhöht (MW = 2,9), wobei sich die mäßig verstärkte Expression (≥ 3) auf 4 der 8 AII (50 %) beschränkte. Eine leicht erhöhte Expression von *TGFB1* war in 2 PXA und 3 AII zu beobachten. Die durchschnittlichen Expressionswerte für beide Tumorentitäten (2,2 bzw. 2,7) wiesen jedoch einen dem nicht-neoplastischen Hirngewebe ähnlichen Wert auf. Die

Expression von *AKT1* war innerhalb der PXA bzw. der AII sehr heterogen. Vier der PXA bzw. 3 der AII wiesen eine erniedrigte Expression auf. Die beiden PXA, bei denen eine sehr starke *DCN*-Expression detektiert werden konnte (PXA 53 und PXA 84), wiesen dagegen eine verstärkte Expression von *AKT1* auf. Eine leicht erhöhte Expression von *AKT2* konnte in 4 PXA und in einem AII detektiert werden. Die Expression von *TIAMI* war in einem PXA und in 2 AII leicht erhöht.

Tabelle 16 mRNA-Expressionswerte der untersuchten Gene in PXA und AII relativ zu nicht-neoplastischem Hirngewebe. Zum direkten Vergleich sind neben den Expressionswerten von *CDKN1B*, *TGFBI*, *AKT1*, *AKT2* und *TIAMI* auch die Expressionswerte von *DCN*, *CDKN1A* und *TIMPI* (siehe Kapitel 4.2.2) dargestellt. Hellgrau unterlegt sind die Werte, die auf eine erhöhte Expression (≥ 3), dunkelgrau unterlegt sind die Werte, die auf eine erniedrigte Expression ($< 0,5$) hinweisen.

Tumor-Nr.	<i>DCN</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>AKT1</i>	<i>AKT2</i>	<i>TGFBI</i>	<i>TIMPI</i>	<i>TIAMI</i>
PXA 46	9,53	3,78	1,10	0,77	1,70	2,60	16,83	4,10
PXA 47	1,67	2,95	0,60	1,71	3,43	2,50	23,35	2,00
PXA 48	9,27	7,13	2,10	0,17	1,82	2,50	9,10	2,70
PXA 49	1,22	1,20	2,30	0,27	1,43	1,00	4,31	1,70
PXA 51	8,34	5,33	2,40	0,24	3,35	2,40	12,74	1,40
PXA 52	7,89	7,39	1,80	0,40	3,24	3,70	21,84	1,50
PXA 53	46,64	2,95	1,10	4,17	2,68	1,80	18,92	0,70
PXA 71	2,50	7,60	1,60	0,85	4,50	0,80	8,29	1,40
PXA 84	47,41	3,84	0,60	5,27	1,85	4,00	93,58	1,60
MW	14,94	4,69	1,50	1,54	2,67	2,20	23,20	1,90
A1	0,34	0,63	4,70	0,78	0,99	3,20	0,76	3,20
A2	0,18	0,59	2,40	0,84	1,23	2,60	0,52	1,20
A3	0,99	1,88	3,00	1,40	1,07	2,40	0,01	1,22
A4	1,21	0,04	3,30	2,65	1,61	1,70	0,97	1,60
A5	1,34	4,06	1,60	2,42	1,68	1,60	1,47	3,30
A6	1,51	17,15	1,50	0,34	3,98	4,60	1,75	2,30
A7	2,10	3,73	2,20	0,30	2,01	2,10	1,90	2,40
A8	1,09	7,69	4,20	0,09	0,75	3,90	1,30	1,90
MW	1,1	4,47	2,90	1,10	1,67	2,77	1,08	2,10

4.2.6 Cluster-Analyse der ermittelten mRNA-Expressionsdaten

Die Clusteranalyse mittels „*Cluster*“ und „*TreeView*“ (M. Eisen; Stanford University) bietet die Möglichkeit, eine Serie von Tumoren aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Expression verschiedener Gene zueinander zu sortieren. Sind sich zwei Tumoren aufgrund ihres Expressionsverhaltens der untersuchten Gene ähnlich, werden sie in der Baumschemadarstellung (*TreeView*) als direkte Nachbarn dargestellt. Je weniger sich Expressionsmuster zweier Tumoren ähneln, desto weiter voneinander entfernt werden sie in diesem Baumschema dargestellt.

Die für die untersuchten PXA und AII ermittelten Expressionsdaten (Kapiteln 4.2.2, 4.2.4 und 4.2.5) wurden mit Hilfe der „*Cluster*“- und „*TreeView*“-Software analysiert. Die Tumoren wurden durch die Software wie in Abbildung 15 dargestellt sortiert.

Insgesamt unterteilt die Cluster-Software die Messdaten der untersuchten Tumoren in zwei Subgruppen. In einer Subgruppe befinden sich die 9 pleomorphen Xanthoastrozytome sowie 4 AII, die andere Subgruppe setzt sich aus den 4 übrigen AII zusammen. Alle 9 PXA werden aufgrund ihres Expressionsprofils unmittelbar nebeneinander angeordnet. Die beiden PXA waf (PXA 52 und 84) bilden keine eigene Gruppierung. Sie scheinen sich im Expressionsverhalten der in dieser Arbeit untersuchten Gene nicht von den PXA II zu unterscheiden. Alle 8 diffusen Astrozytome werden getrennt von den PXA arrangiert, wobei 4 dieser AII im Expressionsverhalten den PXA ähnlicher sind als die übrigen AII.

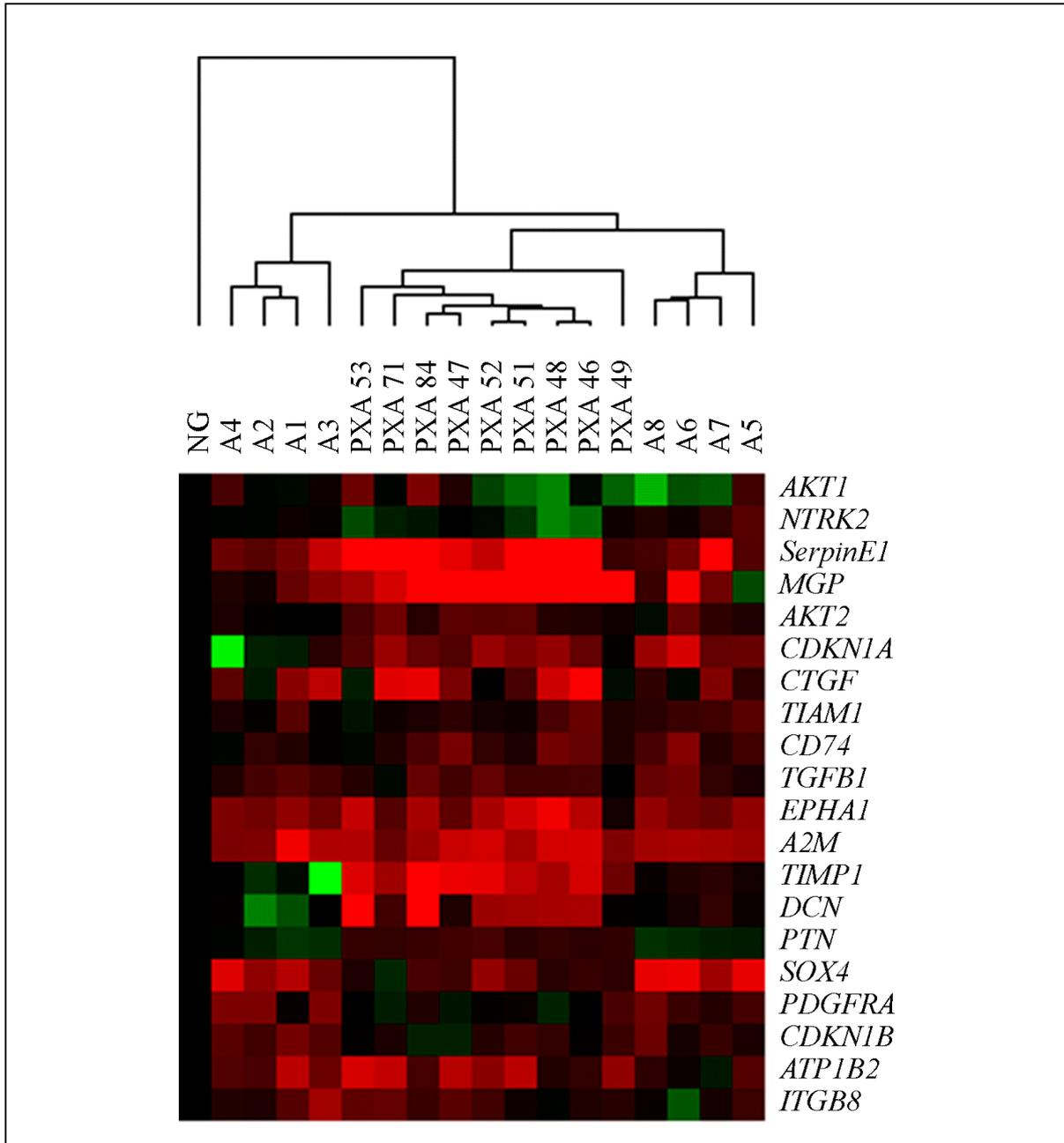


Abbildung 15 Darstellung der Clusteranalyse der RT-PCR-Daten aus den Kapiteln 4.2.2, 4.2.4 und 4.2.5. Alle Messwerte wurden mit der Basis 2 logarithmisch transformiert, um für Expressionsverhältnisse bei gleich starker Abweichung nach oben oder nach unten gleich große Zahlenwerte zu erhalten, welche je nach Abweichung positiv oder negativ sind. Die ermittelten Werte werden im Verhältnis zu nicht-neoplastischem Hirngewebe (Referenzfarbe schwarz) farbig dargestellt. Genüberexpressionen werden mit wachsender Größe in zunehmend rötlichen Farbtönen, Genunterexpressionen in zunehmend grünlichen Farbtönen dargestellt. Jede Zeile entspricht den Messwerten für ein Gen, jede Spalte entspricht einem Tumor.

4.3 Untersuchung und Expressionsanalyse von CD34

4.3.1 Immunhistochemische Untersuchung von CD34

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurden 56 PXA (42 PXA II, 14 PXA waf) auf eine Expression des CD34-Proteins hin untersucht. Insgesamt konnte in 43 der 56 untersuchten PXA (77 %) eine CD34-Immunreaktivität nachgewiesen werden. In allen Tumoren wurde eine CD34-Färbung in den vaskulären Endothelzellen beobachtet, was als interne Positivkontrolle diente. In 15 Tumoren (13 PXA II und 2 PXA waf) fand sich eine CD34-Expression in der Mehrheit der Tumorzellen. Zwischen 10 % und 50 % CD34-positive Tumorzellen ließen sich in 16 PXA II nachweisen, während einzelne CD34-positive Tumorzellen (< 10 %) in 6 PXA II und 6 PXA waf detektiert wurden. In 13 PXA, darunter 6 PXA waf, sowie im nicht-neoplastischen Hirngewebe wurden keine CD34-positiven Tumorzellen beobachtet. In 3 Fällen wurden CD34-positive nicht-neoplastische Zellen im Cortex angrenzend an ein PXA waf, in dem keine CD34-positiven Zellen zu finden waren, detektiert. Zusammenfassend ergaben die immunhistochemischen Analysen, dass eine Expression von CD34 sehr häufig in WHO-Grad II PXA (35 von 42 Tumoren, 83 %) und etwas seltener in PXA mit Anaplasiezeichen (8 von 14 Tumoren, 57 %) nachweisbar ist.

Innerhalb der CD34-positiven PXA wurde zumeist eine regionale Heterogenität der Immunreaktivität festgestellt (Abb. 16, 1b-c). Zusätzlich konnten verschiedene Muster der CD34-Färbung beobachtet werden, darunter eine CD34-Expression entlang der Zellmembran der Perikarya, eine zytoplasmatische Markierung sowie Immunreaktivität in einem perizellulären/perilobulären Muster parallel zu dem Retikulinfasernetzwerk der Tumoren (1b-f). In einigen Fällen konnte aufgrund einer CD34-Expression entlang der fibrovaskulären Septen ein lobuläres Erscheinungsbild des Tumors beobachtet werden (1g). Im an die Tumoren angrenzenden Cortex wurden oftmals stark CD34-positive, nicht-neoplastische, neuroepitheliale Zellen, die häufig Satelliten-ähnliche Herde ausbildeten, vorgefunden (1h-i).

Es fand sich kein Zusammenhang zwischen einer CD34-Immunreaktivität und der Tumorlokalisation. In 24 der 33 (73 %) PXA, die im Temporallappen lagen, fanden sich CD34-positive Tumorzellen. In 9 der 13 Tumoren (69 %), die nicht im Temporallappen lokalisiert waren, wurden ebenfalls CD34-positive Tumorzellen detektiert. Das cerebelläre PXA (PXA 15) und das spinale PXA (PXA 48) waren ebenfalls CD34-positiv.

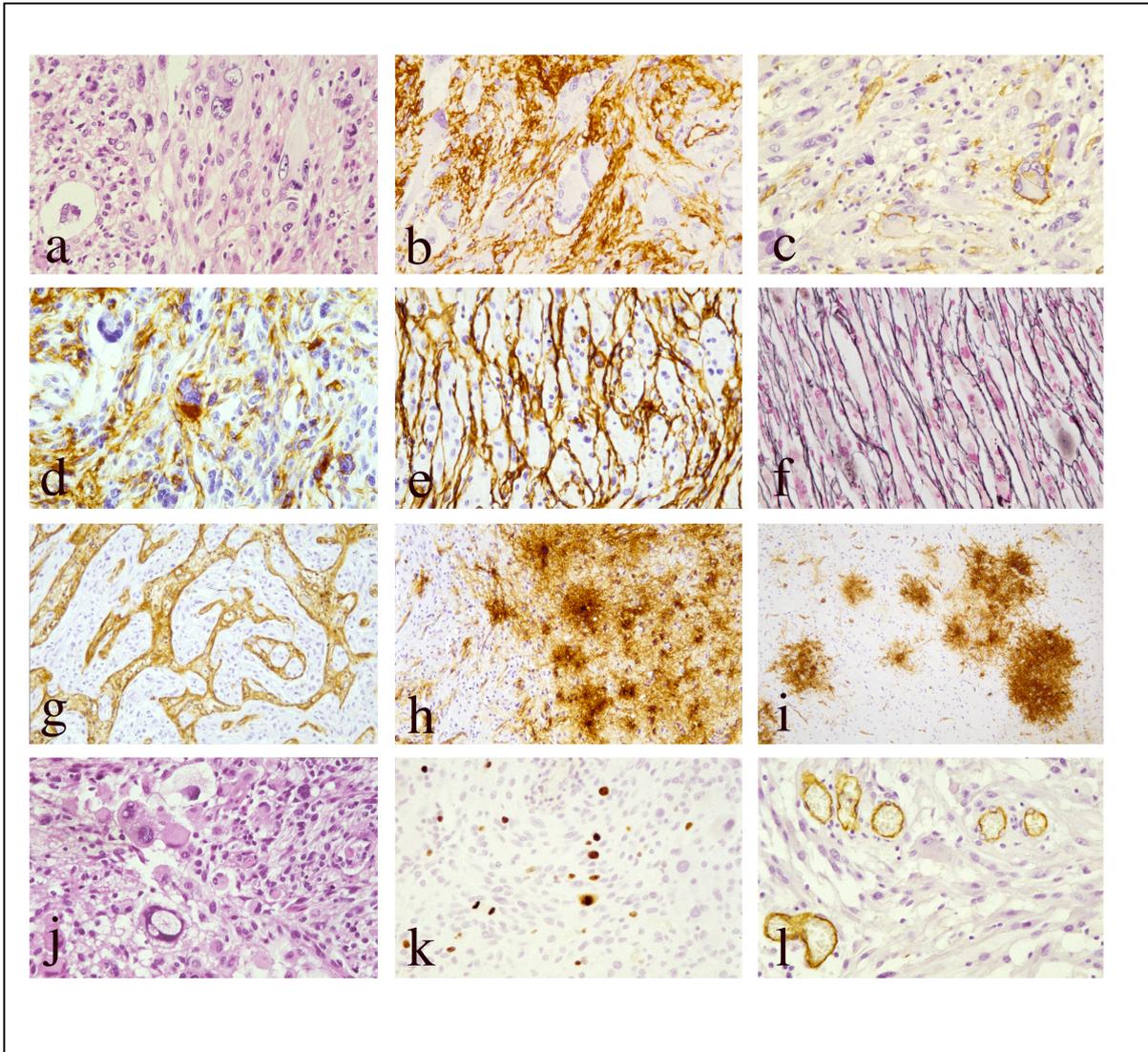


Abbildung 16 Histologische und immunhistochemische Befunde in ausgewählten PXA. (a) Typisches histologisches Erscheinungsbild eines in dem Occipitallappen einer 28-jährigen Patientin lokalisierten PXA WHO-Grad II (PXA 60). Die Tumorzellen sind auffällig pleomorph und zeigen eine zytoplasmatische Vakuolisierung (HE). (b) Die Immunhistochemie für CD34 zeigt Areale mit stark immunreaktiven Tumorzellen. Das Zytoplasma von einzelnen Riesenzellen ist CD34-negativ. (c) Anderes Areal des gleichen Tumors mit einzelnen Tumorzellen, die eine Zellmembran-assoziierte CD34-Expression zeigen. (d) Stark CD34-immunreaktive Tumorzellen in einem PXA vom WHO Grad II aus dem Temporallappen einer 19-jährigen Patienten (PXA 58). (e) CD34-Expression in einem läppchenförmigen Muster in einem PXA einer 14-jährigen Patientin (PXA 28). (f) Das Muster der Immunreaktivität in (e) erinnert an das durch eine Silberfärbung darstellbare Retikulinfasernetzwerk im gleichen Tumor (f). (g) Ein anderes PXA mit CD34-Immunreaktivität in einem perilobulären Muster, welches die fibrovaskulären Septen betont (PXA 47, ein temporaler Tumor einer 35-jährigen Patientin). (h) Starke CD34-Immunreaktivität im an das PXA58 angrenzenden Cortex. (i) Stärkere Vergrößerung der ungleichmäßigen CD34-Immunreaktivität in nicht-neoplastischen Zellen des an den Tumor angrenzenden Cortex. (j) - (l) Beispiel eines PXA waf (PXA 29). Die HE Färbung zeigt pleomorphe astrozytäre Glioma mit auffälliger zytoplasmatischer Vakuolisierung (j). In der Immunfärbung mit Ki-67 (MIB1) fand sich eine verstärkte proliferative Aktivität mit einem

MIB1-Index von 10 % (k). Immunreaktivität für CD34 fand sich in diesem Tumor nur in den vaskulären Endothelzellen, aber nicht in den Tumorzellen (l).

Tabelle 17 Ergebnisse der CD34-Expression auf Proteinebene.

Fall-Nr.	Diagnose	CD34 IMH	Fall-Nr.	Diagnose	CD34 IMH	Fall-Nr.	Diagnose	CD34 IMH
1	PXA waf	1	31	PXAII	1	55	PXAII	2
5	PXAII	3	32	PXAII	0	57	PXAII	2
7	PXAII	3	33	PXA waf	1	58	PXAII	3
8	PXAII	1	34	PXA waf	0	60	PXAII	2
9	PXAII	3	35	PXAII	0	61	PXAII	2
10	PXAII	2	37	PXAII	0	62	PXA waf	0
11	PXA waf	1	38	PXAII	2	63	PXAII	2
12	PXA waf	1	40	PXA waf	3	64	PXAII	3
13	PXA waf	0	42	PXAII	2	71	PXAII	3
15	PXAII	2	43	PXA waf	3	72	PXAII	2
16	PXAII	3	46	PXA II	2	73	PXAII	2
18	PXAII	0	47	PXAII	1	74	PXA waf	1
19	PXAII	0	48	PXAII	3	75	PXAII	0
20	PXA waf	0	49	PXAII	3	76	PXAII	3
21	PXA waf	0	50	PXAII	1	77	PXAII	0
24	PXAII	1	51	PXAII	2	78	PXAII	2
28	PXAII	3	52	PXA waf	1	79	PXAII	3
29	PXA waf	0	53	PXAII	2	85	PXAII	3
30	PXAII	1	54	PXAII	2			

IMH = Immunhistochemie; 0 = keine positiven Tumorzellen; 1 = einzelne positive Tumorzellen (< 10 %); 2 = mäßig viele positive Tumorzellen (10 - 50 %); 3 = viele positive Tumorzellen (> 50 %)

4.3.2 Expressionsanalyse von CD34-Transkripten

Zusätzlich zu den immunhistologischen Untersuchungen, die eine verstärkte Immunreaktivität von CD34 in PXA zeigten, wurde die Expression der beiden CD34-Transkripte *CD34_t* (*truncated*) sowie von *CD34_f* (*full length*) mittels einer Triplex-RT-PCR in 9 PXA (7 PXA II, 2 PXA waf) und 7 AII untersucht (Primer- und PCR-Bedingungen siehe Tabelle 8) und das Verhältnis der Signalintensitäten für *CD34_t* und *CD34_f* zum Referenzgen *APRT* bestimmt (Abbildung 17).

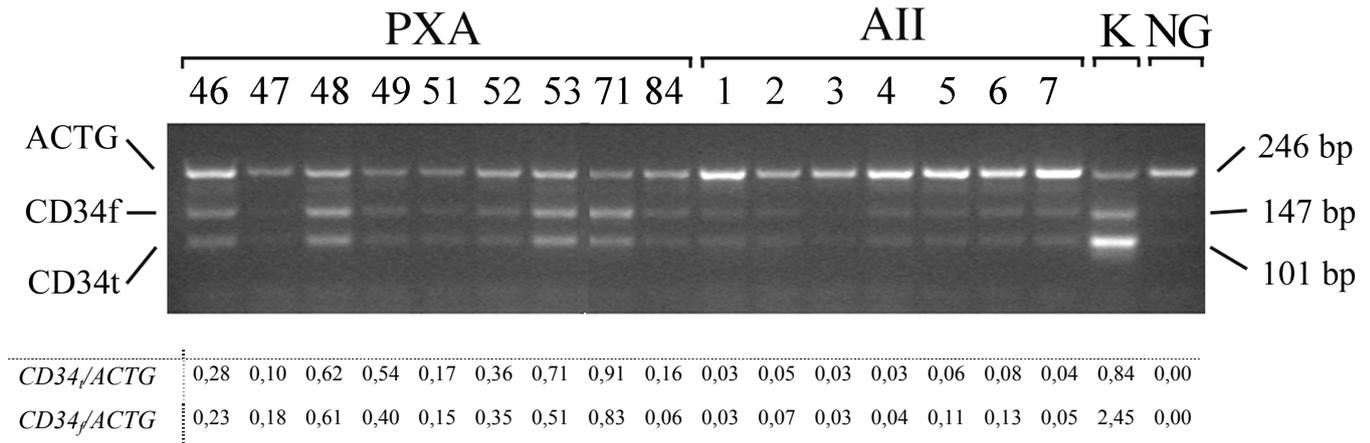


Abbildung 17 Expressionsuntersuchung von $CD34_t$ und $CD34_f$ -Transkripten mittels Triplex-RT-PCR. Neben 9 PXA und 7 AII ist eine Positivkontrolle (K; Leukämie-Zelllinie KG1) sowie nicht-neoplastisches Hirngewebe (NG) aufgetragen. Die beiden $CD34$ -Transkripte wurden in einer PCR zusammen mit einem $ACTG$ -Fragment amplifiziert. Unterhalb der einzelnen Spuren sind die densitometrisch ermittelten Signalintensitäten von $CD34_t$ bzw. $CD34_f$ relativ zu $ACTG$ aufgetragen. Beide $CD34$ -Transkripte wurden in den Tumoren etwa gleich stark exprimiert. Im Gegensatz dazu wird in der Leukämiezelllinie KG1 $CD34_f$ deutlich stärker als $CD34_t$ exprimiert. Die ermittelte durchschnittliche $CD34_t$ Expression ist 5-fach stärker bzw. die ermittelte durchschnittliche $CD34_f$ Expression ist 9-fach stärker in den 9 PXA im Vergleich zu den 7 AII. Im nicht-neoplastischen Hirngewebe ist die Expression von $CD34$ nur sehr gering und unter den hier angewendeten PCR-Bedingungen nicht detektierbar.

In 8 der 9 untersuchten PXA konnte eine 5- bis 9-fach erhöhte Expression beider $CD34$ -Transkripte im Vergleich zu AII detektiert werden. Im nicht-neoplastischen Hirngewebe konnte keine Expression von $CD34$ nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 **Genetische und chromosomale Veränderungen in pleomorphen Xanthoastrozytomen**

Über die mit Entstehung und Wachstum der pleomorphen Xanthoastrozytome assoziierten genetischen und chromosomalen Veränderungen ist bislang noch wenig bekannt. Mutationen im *TP53*-Gen, einem Gen, das in diffusen Astrozytomen häufig mutiert vorliegt (Rasheed *et al.*, 1999, Collins, 1999, Peraud *et al.*, 2002), wurden bislang nur in 5 von insgesamt 62 (8 %) pleomorphen Xanthoastrozytomen gefunden (Paulus *et al.*, 1996, Munoz *et al.*, 1996, Giannini *et al.*, 2001, Nasuha *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden 62 PXA, darunter 16 PXA mit Anaplasiezeichen (PXA waf), auf Mutationen im *TP53*-Gen hin untersucht. Drei (<5 %) der untersuchten Tumoren, darunter ein PXA waf, zeigten *TP53*-Mutationen. Dieses Ergebnis stimmt mit den oben genannten Studien anderer Arbeitsgruppen überein. Die im PXA 64 detektierte Punktmutation in der intronischen Spleißstelle der Intron3/ Exon4-Grenze, welche vermutlich zu einer aberrant gesplicißen mRNA führt, wurde bisher nur in einem Glioblastom gefunden (Ichimura *et al.*, 2000). Somit gehört diese Mutation nicht zu den häufig in Astrozytomen vorliegenden *TP53*-Mutationen (Olivier *et al.*, 2002, Petitjean *et al.*, 2007; siehe auch <http://p53.free.fr> und <http://p53.iarc.fr>). Die beiden anderen in der eigenen Arbeit detektierten Mutationen (PXA 57: c.827C>T:A276V und PXA 34: c.984-985insCTGGAGAATATTTTC) wurden bislang nicht in anderen Gliomen beschrieben (<http://p53.free.fr>). Die eigenen Ergebnisse bestätigen somit die Vermutung von Paulus *et al.* (1996), dass sich die *TP53*-Mutationen in PXA von den *TP53*-Mutationen in diffusen Astrozytomen unterscheiden. Die Seltenheit von *TP53*-Mutationen in PXA im Vergleich zu diffusen Astrozytomen, in denen in mehr als 50 % der Fälle *TP53*-Mutationen auftreten (Maher *et al.*, 2001, Cavenee *et al.*, 2000, Watanabe *et al.*, 2003), zeigt ebenfalls einen deutlichen Unterschied auf molekulargenetischer Ebene zwischen diesen beiden Tumorentitäten auf. Das legt die Vermutung nahe, dass in PXA andere genetische Ereignisse als in diffusen Astrozytomen von Bedeutung sind. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten genetischen Analysen der Proto-Onkogene *CDK4*, *MDM2* und *EGFR* gestützt. Für keines dieser drei häufig in malignen

Gliomen amplifizierten Gene (Reifenberger *et al.*, 1999a, Ruano *et al.*, 2006, Ohgaki und Kleihues, 2007) wurde in den 62 untersuchten PXA eine Amplifikation festgestellt.

Ausgehend von den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse, die Verluste eines Allels auf 9p in 2 von 14 untersuchten PXA (PXA 51 und 81) ergaben, wurden die drei Tumorsuppressorgene auf 9p21, *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B*, in 14 PXA näher untersucht. Auf genetischer Ebene konnten weder Mutationen noch homozygote Deletionen dieser drei Gene nachgewiesen werden. In 4 Fällen (PXA 51, 52, 53 und 85) weisen die ermittelten Daten der Duplex-PCR-Analyse allerdings auf eine hemizygoten Deletion aller drei Gene hin. Die Analyse der Expression von *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* ergab, dass in 2 der Tumoren mit hemizygoter Deletion eine verminderte Expression dieser drei Gene vorlag (PXA 51 und 53). In Tumor 84, der auf genetischer Ebene keine Veränderungen aufweist, konnte eine auf ca. 30 % erniedrigte Expression im Vergleich zu Normalgewebe der auf einem Genlocus liegenden Gene *p14^{ARF}* und *CDKN2A* festgestellt werden. Eine mögliche Ursache dieser Expressionsverringeringung kann eine Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich des jeweiligen Gens sein. Die Untersuchung der 10 PXA auf eine *CDKN2A*-, *p14^{ARF}*- oder *CDKN2B*-Promotor-Hypermethylierung verlief allerdings negativ. Die der 7- bis 10-fach erhöhten Expression dieser drei Tumorsuppressorgene in PXA 71 zugrunde liegenden Mechanismen und Auswirkungen sind bislang unklar.

In einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit unserer Arbeitsgruppe (Weber *et al.*, 2007) wurden 50 der 62 in der vorliegenden Arbeit untersuchten PXA II und PXA waf mittels chromosomaler und Array-basierender komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) und Interphase-Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) untersucht. In 25 der 50 untersuchten PXA wurden Verluste auf Chromosom 9 detektiert. In 5 (4 PXA II: PXA 47, 51, 53 und 85 und 1 PXA waf: PXA 52) von 10 Tumoren mit einem kompletten bzw. mit einem partiellen Verlust von Chromosom 9 konnte eine homozygote Deletion der Region 9p21.3 einschließlich der Gene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* festgestellt werden. In einem PXA II (PXA 48) und einem PXA waf (PXA 43) ohne Verlust von Chromosom 9 wurde ebenfalls eine Deletion von 9p21.3 beobachtet. Die Tumoren 65, 81 und 84 konnten von Weber *et al.* (2007) aufgrund von unzureichendem Tumormaterial nicht mittels CGH untersucht werden. In den 19 von Weber *et al.* (2007) untersuchten diffusen Astrozytomen konnte kein Verlust von Chromosom 9 festgestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf eine hemizygoten Deletion der 3 Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* in PXA 51, 52, 53 und 85 hin. Eine hemizygoten Deletion der Gene *p14^{ARF}* und *CDKN2B* wurde in PXA 65 beobachtet. In den

Tumoren 47, 48 und 81 konnte lediglich eine hemizygoter Deletion des *CDKN2A*-Gens, nicht aber der beiden anderen Gene festgestellt werden (Tabelle 11). PXA 43 wurde in dieser Arbeit nicht auf Veränderungen in den Genen *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* hin untersucht, da zu diesem Zeitpunkt nur Paraffinmaterial des Tumors zur Verfügung stand.

Eine mögliche Ursache für diese abweichenden Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Untersuchungsmethoden ist, dass homozygote Deletionen, die nur auf eine Subpopulation der Tumorzellen begrenzt sind, mittels Duplex-PCR nicht als homozygote Deletionen, sondern gar nicht oder allenfalls nur als hemizygoter Deletionen detektiert werden. Eine weitere mögliche Ursache sind Kontaminationen des Tumormaterials mit nicht-neoplastischen Zellen. In beiden Fällen ist die Array-CGH, wie von Weber *et al.* (2007) gezeigt, eindeutig sensitiver im Nachweis von homozygoten Deletionen.

Die Inaktivierung der p53- bzw. pRB-abhängigen Wachstumskontrolle (siehe Kapitel 1.2) durch homozygote Deletionen der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B*, wie sie in anaplastischen Gliomen und Glioblastomen zu finden sind (Reifenberger und Collins, 2004), scheint somit aufgrund der durch die CGH-Analyse erhobenen Daten (Weber *et al.*, 2007) eine signifikante Rolle in der Pathogenese der pleomorphen Xanthoastrozytome zu spielen.

Aufgrund des häufigen Verlusts von beiden Armen von Chromosom 9 bzw. des Verlusts von 9q in einem PXA steht zu vermuten, dass sich auf dem langen Arm von Chromosom 9 ein weiteres Tumorsuppressorgen befindet (Weber *et al.*, 2007). Aber weder im Tumorsuppressorgen *PTCH* (9q22.3) noch im Tumorsuppressorgen *TSC1* (9q34) konnten Mutationen festgestellt werden. Eine transkriptionelle Herunterregulation des *TSC1*-Gens, die aber nicht auf eine Promotor-Hypermethylierung zurückgeführt werden konnte, wurde in PXA beobachtet. Womöglich spielt eine *TSC1*-Haploinsuffizienz, wie sie im Blasenkrebs beobachtet wurde (Knowles *et al.*, 2003), bei der Pathogenese der PXA eine Rolle.

Der Verlust eines Allels auf 22q ist mit 20-40 % eine häufig auftretende Veränderung in diffusen Astrozytomen (Cavenee *et al.*, 2000, Nakamura *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verlust der Heterozygotie zwischen den Mikrosatellitenmarkern *D22S533* und *D22S417*, entsprechend der Region 22q11.2 und 22q13.3, in einem von 14 (7 %) analysierten Tumoren beobachtet. In dieser Region kartieren die beiden Tumorsuppressorgen-Kandidaten *NF2* und *TIMP3*. Dass das *NF2*-Gen (*neurofibromatosis type 2*, 22q12.2) das entscheidende Tumorsuppressorgen in dieser Region ist, erscheint wenig wahrscheinlich, da sich in Astrozytomen bislang keine *NF2*-Mutationen fanden und auch keine Assoziation zwischen dem Auftreten von PXA und einer Neurofibromatose Typ2 bekannt ist (Rubio *et*

al., 1994, Hoang-Xuan *et al.*, 1995, Watkins *et al.*, 1996, Oskam *et al.*, 2000). Eine Promotor-Hypermethylierung und einhergehend damit ein Expressionsverlust von *TIMP3* wurde von Nakamura *et al.* (2005) in diffusen Astrozytomen sowie in sekundären Glioblastomen beobachtet.

In diffusen Astrozytomen (WHO-Grad II) ist der Verlust der Heterozygotie auf 17p und 22q eine bekannte chromosomale Veränderung (Collins und James, 1993, James *et al.*, 1988). In anaplastischen Astrozytomen (WHO-Grad III) wurden zusätzlich auch gehäuft Allelverluste auf 9p und 19q beobachtet (James *et al.*, 1991, von Deimling *et al.*, 1994). Neben den in diffusen und anaplastischen Astrozytomen beschriebenen Verlusten der Heterozygotie finden sich in etwa 60–70 % der Glioblastome Allelverluste auf Chromosom 10 (Collins, 2002). In Oligodendrogliomen sind verstärkt Verluste in den chromosomalen Regionen 1p und 19q zu finden (Reifenberger *et al.*, 1994b, Bello *et al.*, 1995, Felsberg *et al.*, 2004, Tews *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden 14 PXA auf Verlust der Heterozygotie in diesen häufig in diffus infiltrierenden astrozytären und/oder oligodendroglialen Gliomen deletierten Regionen hin untersucht. Bis auf die oben beschriebenen Verluste auf 9p in 2 Fällen (14 %) und dem interstitiellen Verlust auf 22q in einem Fall (7 %) konnten keine weiteren Allelverluste nachgewiesen werden.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der genetischen Untersuchungen dieser Arbeit führt zu folgenden Schlussfolgerungen: Homozygote Deletionen der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* scheinen in PXA eine wichtige Rolle zu spielen. Die anderen häufig in diffusen Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen, Glioblastomen und/oder Oligodendrogliomen auftretenden Veränderungen auf genetischer und chromosomaler Ebene, wie Mutationen im *TP53*-Gen, Amplifikationen der Proto-Onkogene *CDK4*, *MDM2* und *EGFR* sowie Allelverluste in den chromosomalen Regionen 1p, 10 p, 10q, 17p, 19q und 22q treten in PXA gar nicht oder nur recht selten auf. Somit unterscheiden sich die pleomorphen Xanthoastrozytome auf genetischer Ebene eindeutig von den diffus infiltrierenden astrozytären und oligodendroglialen Tumoren.

Analog zu den eigenen Befunden der PXA-Untersuchungen unterscheiden sich die gutartigen pilozytischen Astrozytome (PA), die dem WHO-Grad I zugeordnet werden, ebenfalls bezüglich ihrer genetischen Veränderungen von diffusen astrozytären Tumoren. Auch in diesen Tumoren sind Mutationen im *TP53*-Gen sehr selten (James *et al.*, 1990, von Deimling *et al.*, 1993, Ohgaki *et al.*, 1993, Lang *et al.*, 1994, Ishii *et al.*, 1998, Cheng *et al.*, 2000). Veränderungen in den Genen *CDK4*, *MDM2*, *EGFR*, *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* sind in den pilozytischen Astrozytomen kaum zu finden. Ebenso treten selten Allelverluste in diesen

Tumoren auf (James *et al.*, 1990, Ransom *et al.*, 1992, Sanoudou *et al.*, 2000). Der Verlust der Heterozygotie auf dem langen Arm von Chromosom 17, einem Bereich, in dem u.a. auch das Gen für Neurofibromatose Typ 1 (*NF1*, 17q11.2) lokalisiert ist, wurde nur in pilozytischen Astrozytomen von Patienten mit Neurofibromatose Typ 1, nicht aber in Patienten mit einem sporadischen pilozytischen Astrozytom beobachtet (von Deimling *et al.*, 1993, Kluwe *et al.*, 2001). Auch im Hinblick auf die betroffene Altersgruppe und das Wachstumsverhalten gibt es Parallelen zwischen pleomorphen Xanthoastrozytomen und pilozytischen Astrozytomen. Beide Tumorentitäten treten vornehmlich bei Kindern und jungen Erwachsenen auf und sind mit einer günstigen Prognose assoziiert. Makroskopisch wachsen pilozytische Astrozytome meist gut abgegrenzt und neigen nicht zur malignen Progression. Im Unterschied zu pleomorphen Xanthoastrozytomen sind sie allerdings vor allem im Kleinhirn lokalisiert und histologisch durch das Vorkommen von länglichen, uni- oder bipolaren astrozytären Tumorzellen charakterisiert, die oft in parallelen oder miteinander verwobenen Bündeln wachsen. Diagnostisch wichtig sind charakteristische regressive Zellveränderungen in Form von sogenannten Rosenthal-Fasern und granulierten Körperchen (Reifenberger *et al.*, 1999a). Somit sind auf histologischer Ebene sowie im Hinblick auf die Vorzugslokalisationen Unterschiede zwischen pleomorphen Xanthoastrozytomen und pilozytischen Astrozytomen vorhanden. Der einzige bisher festgestellte Unterschied auf genetischer Ebene ist die homozygote Deletion der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B* in PXA.

Ein Grund für das im Vergleich zu diffusen Astrozytomen besser begrenzte Wachstum und die damit einhergehende günstige Prognose für Patienten mit einem pleomorphen Xanthoastrozytom bzw. mit einem pilozytischen Astrozytom scheint möglicherweise das Fehlen derjenigen chromosomalen und genetischen Veränderungen zu sein, die in diffus infiltrativ wachsenden Gliomen, wie oben bereits aufgeführt, gehäuft vorkommen.

5.2 Transkriptionelle Veränderungen in pleomorphen Xanthoastrozytomen

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Expressionsprofile mittels cDNA-Array-Technik (Human Cancer 1.2 Expression Array von Clontech) erstellt, um transkriptionelle Veränderungen, die an der Pathogenese der PXA beteiligt sind, zu detektieren. Diese Screening-Methode wurde in den letzten Jahren bereits erfolgreich zur Erstellung von Expressionsprofilen verschiedener Tumorentitäten, u.a. auch von Gliomen und Gliomzelllinien eingesetzt (Nutt *et al.*, 2003, van den Boom *et al.*, 2003, Sallinen *et al.*, 2000, Huang *et al.*, 2000). Durch den Vergleich der

Expressionsprofile von zwei unterschiedlichen Tumorarten, in diesem Fall von pleomorphen Xanthoastrozytomen und diffusen Astrozytomen, können Unterschiede im Transkript-expressionsmuster zwischen diesen beiden Tumorentitäten detektiert werden. Eine weitere Methode um Gene zu identifizieren, die in den beiden Tumorentitäten unterschiedlich stark exprimiert werden, ist die sogenannte suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH) mit anschließender Hybridisierung von High-Density-cDNA-Filtern (UniGene RZPD-Filter, van den Boom *et al.*, 2006). Ziel der SSH bzw. des Vergleichs der beiden Expressionsprofile war es, neue Kandidatengene zu identifizieren, die an der Pathogenese der pleomorphen Xanthoastrozytome beteiligt sind bzw. das unterschiedliche Wachstumsverhalten dieser Tumoren im Vergleich zu diffusen Astrozytomen zu erklären.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal systematische Expressionsuntersuchungen an pleomorphen Xanthoastrozytomen durchgeführt. Die Expressionsprofile von 9 pleomorphen Xanthoastrozytomen, darunter 2 PXA waf, wurden mit den Expressionsprofilen von 8 diffusen Astrozytomen verglichen. Die Expressionsprofile dieser beiden Tumorentitäten wurden zusätzlich mit dem Expressionsmuster von nicht-neoplastischem Hirngewebe verglichen. Für die SSH mit anschließender Hybridisierung wurde gepoolte RNA aus jeweils drei PXA bzw. 3 AII eingesetzt.

Durch den Vergleich der mittels cDNA-Array-Hybridisierung erzielten Expressionsprofile bzw. der Ergebnisse aus den der SSH nachfolgenden Hybridisierungen wurde eine Reihe differentiell exprimierter Gene identifiziert, von denen 28 aufgrund ihrer Funktion, chromosomalen Lokalisation oder starken differentiellen Expression interessant erscheinende Kandidatengene ausgewählt und mittels Duplex-RT-PCR bzw. Real-Time RT-PCR auf ihre differentielle Expression hin überprüft wurden.

Insgesamt konnten 8 Gene (*DCN*, *MGP*, *TIMP1*, *PTN*, *SerpinE1*, *CTGF*, *EPHA1* und *ATP1B2*), die stärker in PXA als in AII und/oder im nicht-neoplastischen Hirngewebe exprimiert wurden, 3 Gene (*PDGFRA*, *NTRK2* und *SOX4*), die in AII stärker exprimiert wurden als in PXA und/oder im nicht-neoplastischen Hirngewebe und 5 Gene, deren Expression in PXA und AII im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe hochreguliert (*CDKN1A*, *CD74*, *A2M* und *RBI*) bzw. herunterreguliert (*TPII*) war, identifiziert werden.

Eine signifikant erhöhte Expression der Gene *NCOA4* und *SGPL1* wurde in AII festgestellt, aber aufgrund der geringen durchschnittlichen Expression dieser beiden Gene sowohl in AII (Mittelwert von *NCOA4*: 2,05; von *SGPL1*: 2,03) als auch in PXA (Mittelwert von *NCOA4*: 1,41; von *SGPL1*: 1,19), liegt die Vermutung nahe, dass diese Gene in der Pathogenese beider Tumorentitäten keine Rolle spielen.

Für einige der in der cDNA-Array-Analyse oder mittels SSH gefundenen Kandidatengene konnte die erwartete differentielle Expression mittels RT-PCR nicht bestätigt werden (*JNK2*, *NOTCH1*, *IFITM*, *MMP11*, *TDGF1*, *ITGB8*, *ADD3*, *SYK*, *ENO1*, *TNC*). Im Fall von *SerpinE1*, *EPHA1* und *ATP1B* wurde sogar aufgrund der SSH-Ergebnisse ein umgekehrtes Expressionsverhalten erwartet, als mittels RT-PCR festgestellt wurde. Eine mögliche Fehlerquelle kann die subjektive visuelle Auswertung der hybridisierten Filter darstellen. Ein weiterer sicherlich wichtiger Punkt ist die falsche Annotation einiger Klone auf den in dieser Arbeit verwendeten Unigene-Filtern, von der bereits in der Literatur berichtet wurde (Knight, 2001, Halgren *et al.*, 2001). Außerdem beruhte die SSH-Analyse auf lediglich 3 ausgewählten und gepoolten Fällen von PXA und AII, so dass die fehlende Bestätigung der differentiellen Expression einiger Kandidatengene anhand der größeren Serie von 9 bzw. 8 Tumoren zum Teil auch ein Problem der Probenmenge bzw. -auswahl darstellen kann. Im Folgenden werden die oben genannten differentiell exprimierten Gene eingehend diskutiert.

5.2.1 Gene, die in PXA im Vergleich zu diffusen Astrozytomen stärker exprimiert wurden

5.2.1.1 *Decorin (DCN)*

Das der Familie der kleinen Leucin-reichen Proteoglykane (*SLRP*, *small leucin-rich proteoglycans*) angehörende Decorin spielt aufgrund seiner Fähigkeit, an Kollagen I, II und IV sowie an Fibronectin binden zu können und dadurch die Stabilität der extrazellulären Matrix zu stärken, eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Toole und Lowther, 1968, Ständer *et al.*, 1999, Dugan *et al.*, 2006). Desweiteren ist Decorin in die Zellzykluskontrolle involviert. Es induziert die Synthese der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21^{waf1/CIP1} (*CDKN1A*) und p27^{KIP1} (*CDKN1B*), was in einem Zellzyklus-Arrest resultiert (Moscatello *et al.*, 1998, Schönherr *et al.*, 2001, 2002, Xaus *et al.*, 2001). Decorin bindet und inhibiert somit den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*EGFR*, *epidermal growth factor receptor*, Csordas *et al.*, 2000, Zhu *et al.*, 2005). In Endothelzellen konnte sowohl eine verstärkte Phosphorylierung von AKT als auch eine erhöhte Transkriptionsrate von *AKT* durch Decorin nachgewiesen werden (Schönherr *et al.*, 2001). Weitere Funktionen von Decorin sind zum einen seine Bindung an den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β), wodurch die Bioaktivität von TGF- β gehemmt und dessen wachstumsfördernde Eigenschaften in Tumoren eingeschränkt werden

(Abdel-Wahab *et al.*, 2002, Shi *et al.*, 2006) und zum anderen die Inhibierung der TGF- β -Synthese (Ständer *et al.*, 1998).

Eine Verringerung bzw. der Verlust der Decorin-Expression wurde bereits in verschiedenen Tumorgeweben festgestellt (Iozzo, 1999, Troup *et al.*, 2003, Arnaldi *et al.*, 2005, Campo *et al.*, 2006, Matsumine *et al.*, 2007). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine transgene Expression von Decorin das Wachstum von neoplastischen Zellen, u.a. auch in C6-Rattengliomzellen hemmt (Ständer *et al.*, 1998, Santra *et al.*, 1997, Reed *et al.*, 2005, Seidler *et al.*, 2006). Bei Patientinnen mit Eierstockkrebs hingegen korreliert eine verstärkte *DCN*-Expression mit einer schlechten Prognose (Newton *et al.*, 2006).

Über die Regulation von Decorin ist bekannt, dass es eine bimodale Regulatorregion im Promotorbereich des *DCN*-Gens gibt, an die TNF- α inhibitorisch sowie IL-1 und auch IL-4 aktivatorisch binden können (Mauviel *et al.*, 1996, Wegrowski *et al.*, 1995). Eine verstärkte Infiltration von Lymphozyten, wie sie in PXA zu finden ist (Louis *et al.*, 2007), wurde von Ständer *et al.* (1999) in Decorin-exprimierenden Ratten-Gliomzelllinien beobachtet. Aufgrund der oben beschriebenen Befunde wurden in dieser Arbeit die im Durchschnitt stark *DCN*-exprimierenden PXA und im Vergleich dazu die schwach *DCN*-exprimierenden AII auf Expression der Gene *CDKN1A* (p21), *CDKN1B* (p27), *TGFBI*, *AKT1* und *AKT2* hin untersucht. Eine verstärkte *CDKN1A*-Expression konnte in 5 von 6 PXA, die eine starke *DCN*-Expression zeigten, nachgewiesen werden (Tabelle 15). In zwei der drei schwächer *DCN* exprimierenden PXA konnte keine erhöhte *CDKN1A*-Expression festgestellt werden. Das legt die Vermutung nahe, dass die verstärkte *DCN*-Transkription in PXA möglicherweise im Zusammenhang mit einer Hochregulation von *CDKN1A* (siehe Kap. 5.2.3.1) steht. Eine erhöhte Expression von *CDKN1B* in PXA konnte nicht beobachtet werden. Ein Zusammenhang zwischen der Hochregulierung von *CDKN1A* und einer erhöhten Expression von *AKT1* bzw. *AKT2*, wie sie von Schönherr *et al.* (2001) beschrieben wurde, konnte nicht festgestellt werden.

Die Beobachtung von Ständer *et al.* (1998), dass Decorin die Synthese von TGF- β inhibiert, wurde in dieser Arbeit auf transkriptioneller Ebene nicht bestätigt. Die stark erhöhte Expression von *DCN* in PXA trägt möglicherweise aufgrund seiner Funktion bei der Matrixregulation und -stabilisierung bzw. aufgrund seiner Fähigkeit, p21 zu induzieren und EGFR zu inhibieren, dazu bei, dass PXA ein deutlich begrenztes Wachstum zeigen, nur selten zur Progression neigen und somit eine gute Prognose haben.

5.2.1.2 *Matrix Gla Protein (MGP)*

Das zweite im Vergleich zu diffusen Astrozytomen deutlich stärker in PXA exprimierte Gen kodiert für das Matrix Gla Protein (*MGP*), ein Vitamin-K-abhängiges Protein. MGP dient als Substrat der γ -Carboxylase, die Glutaminsäure zu γ -Carboxy-Glutaminsäure (Gla) umwandelt (Kirfel *et al.*, 1997). Eine wichtige Rolle spielt der inhibitorische Effekt von MGP auf BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*, Zebbedouj *et al.*, 2002). Letztendlich fungiert MGP somit als Inhibitor von Gewebs- und Gefäß-Calzifizierung (Boström und Demer, 2000, Proudfoot und Shanahan, 2006). Die Expression von *MGP* wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone und Retinolsäure reguliert (Kirfel *et al.*, 1997). Keimbahn-Mutationen im *MGP*-Gen sind ursächlich für die Entstehung des sogenannten Keutel-Syndroms (OMIM 245150), welches durch abnormale Verknöcherung des Knorpelgewebes, Pulmonalarterienstenose und Gesichtsfehlbildungen charakterisiert ist (Munroe *et al.*, 1999).

Einerseits wurde eine verminderte *MGP*-Expression mit Tumorprogression und Metastasierung in Zusammenhang gebracht (Levedakou *et al.*, 1992, Fan *et al.*, 2001), andererseits wurde aber berichtet, dass die *MGP*-Expression in diffusen astrozytären Tumoren mit steigendem Malignitätsgrad zunimmt, d.h., dass anaplastische Astrozytome und Glioblastome deutlich höhere *MGP*-Transkriptlevel aufweisen als AII (van den Boom *et al.*, 2003). Auch von einer *MGP*-Überexpression in Brustkrebs und Ovarialtumoren wird berichtet (Chen *et al.*, 1990a, Hough *et al.*, 2001). Die in der eigenen Arbeit detektierte stark erhöhte Expression von *MGP* in PXA im Vergleich zu diffusen Astrozytomen würde zu der Beobachtung von Levedakou *et al.* (1992) und Fan *et al.* (2001) passen, dass in Tumoren, die zur Progression neigen, eine verminderte *MGP*-Expression festzustellen ist. Ob der Grund für eine niedrigere Progressionsrate in Tumoren mit hoher *MGP*-Expressionsrate der inhibitorische Effekt von MGP auf BMP-2 ist, ist ungeklärt. Insofern ist es momentan nicht klar, welche Rolle *MGP* in Gliomen genau spielt. Möglicherweise spiegelt das *MGP*-Expressionsniveau die verstärkte Bildung von extrazellulärer Matrix in PXA und anaplastischen Astrozytomen im Vergleich zu AII wider.

5.2.1.3 *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP1)*

Ein weiteres in PXA verstärkt exprimiertes Gen ist *TIMP1* (*tissue inhibitor of metalloproteinase 1*), welches für einen Inhibitor der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) kodiert, der diese durch Bindung irreversibel inaktiviert (Brew *et al.*, 2000). Metalloproteinasen sind u.a. verantwortlich für den Abbau der extrazellulären Matrix, welcher eine Voraussetzung für die Migration, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen

darstellt (Schultz *et al.*, 1988, Curran und Murray, 1999). TIMP1 hat auf die Tumorentwicklung zwei gegensätzliche Effekte: auf der einen Seite ist TIMP1 ein Antagonist der MMPs und hemmt damit die o.g. Prozesse der Tumorzellmigration und -invasion, auf der anderen Seite stimuliert TIMP1 in bestimmten Konzentrationen unabhängig von seiner hemmenden Funktion das Wachstum von normalen und malignen Zellen (Hayakawa *et al.*, 1992). In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass (I) die Induktion von *TIMP1* mit der Suppression des invasiven Phänotyps korreliert (Tanaka *et al.*, 1995, Rigg und Lemoine, 2001, Jee *et al.*, 2006), (II) eine *TIMP1*-Überexpression mit einer guten Prognose für Brustkrebspatienten im Zusammenhang steht (Nakopoulou *et al.*, 2003) und (III) eine fehlende bzw. erniedrigte Expression von *TIMP1* zu Matrixabbau und Tumordinvasion führt (Crawford *et al.*, 1995, Polette *et al.*, 1993). Dagegen wird von einer Korrelation zwischen einer erhöhten TIMP1-Konzentration und zunehmendem Tumorstadium in B-Zell-Lymphomen sowie bei Prostatakarzinompatienten (Lein *et al.*, 1998, Stetler-Stevenson *et al.*, 1997, Kossakowska *et al.*, 2000) und einer signifikant erniedrigten Überlebensrate für Bronchialkarzinom- und Nierenzellkarzinompatienten mit hoher *TIMP1*-Expression berichtet (Fong *et al.*, 1996, Kallakury *et al.*, 2001). Eine konstitutive Expression von *TIMP1* wurde in Hodgkin-Lymphomen beobachtet (Oelmann *et al.*, 2002). Inzwischen weiß man, dass das gestörte Gleichgewicht zwischen MMPs und ihren Inhibitoren (TIMPs) von entscheidender Bedeutung für die Migration und Invasion von Zellen ist (Hofmann *et al.*, 2000, Bode *et al.*, 1999). Da freies, aktives am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligtes MMP von TIMP gebunden und inhibiert werden kann, ist es denkbar, dass die hohe *TIMP1*-Expressionsrate in PXA mitverantwortlich für das im Vergleich zu AII wesentlich besser begrenzte Wachstum dieser Tumoren ist.

Eine aktivierende Mutation oder eine verstärkte Expression von *TIAMI*, welche über die Aktivierung von RAC1 zu einer verstärkten *TIMP1*-Transkription führen kann (Engers *et al.*, 2000, 2001), konnte als Ursache für die hohe *TIMP1*-Expressionsrate in PXA in dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

5.2.1.4 Pleiotrophin (*PTN*)

Pleiotrophin (*PTN*, auch HBGF8 und NEGF1), ebenfalls in PXA stark exprimiert, ist ein entwicklungsreguliertes Heparin-bindendes Protein, das verstärkt während der Embryogenese im Gehirn exprimiert wird (Bohlen und Kovesdi, 1991) und das Neuritenwachstum sowie die neuronale Differenzierung stimuliert (Rauvala, 1989). *PTN* ist in den Reparaturprozess nach Verletzungen involviert und wird von reaktiven Astrozyten produziert (Takeda *et al.*, 1995).

Die in differenzierten adulten Geweben herunter regulierte Expression von *PTN* ist in einer Vielzahl von Krebsarten aufgehoben, d.h. es findet sich eine erhöhte Expression dieses Gens in den Tumorzellen (Kurtz *et al.*, 1995, Aigner *et al.*, 2003, Wu *et al.*, 2005, Yeh *et al.*, 2006). Die Inaktivierung von *PTN* in Tumorzellen wiederum führt zu einer Verzögerung bzw. einer Hemmung des Tumorwachstums (Czubayko *et al.*, 1994, Zhang *et al.*, 1997, Satyammorthy *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2007a). Schließlich konnte gezeigt werden, dass eine Expression von *PTN* in gesunden Epithelzellen zu einem neoplastischen Phänotyp führt (Kurtz *et al.*, 1998). Eine Überexpression von *PTN* fand sich in Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen sowohl in Glioblastomen als auch in diffusen Astrozytomen (Schulte und Wellstein, 1997, Huang *et al.*, 2000). Peria *et al.* (2007) stellten eine Korrelation zwischen der *PTN*-Expression und dem histopathologischen Grad von Astrozytomen fest. Andererseits wird von einer reduzierten *PTN*-Expression in Kolorektaltumoren berichtet (Yamakawa *et al.*, 1999) und Nakagawara *et al.* (1995) stellten fest, dass eine erhöhte *PTN*-Expression in Neuroblastomen mit einer guten Prognose korreliert. Die in dieser Arbeit untersuchten diffusen Astrozytome zeigen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Huang *et al.* (2000) und Peria *et al.* (2007) eine leicht reduzierte *PTN*-Expression im Vergleich zum nicht-neoplastischen Gewebe. Ob die erhöhten Transkriptionslevel von *PTN* in PXA mitverantwortlich für die Entstehung dieser Tumoren sind oder ob sie möglicherweise im Zusammenhang mit der relativ guten Prognose dieser Tumoren stehen, ist derzeit noch unklar.

5.2.1.5 *SerpinE1*

SerpinE1, auch als PAI1 (*plasminogen activator inhibitor*) bezeichnet, ist ein Inhibitor von Serin-Proteasen (u.a. u-PA, *urokinase plasminogen activator*, t-PA, *tissue plasminogen activator*), die sowohl in der normalen Entwicklung als auch bei bestimmten neurologischen Krankheiten von Bedeutung sind. Der Verlust der Aktivität von Serpinen resultiert in einem Ungleichgewicht zwischen den Serin-Proteasen und deren Inhibitoren, was zu pathologischen Prozessen führen kann (Turgeon und Hounenou, 1997, Janciauskiene, 2001). Das sogenannte Plasmin-Aktivatorsystem, bestehend aus Serin-Proteasen und Serpinen, ist (womöglich aufgrund veränderter *SerpinE1*-Transkription) in den extrazellulären Matrix-Abbau in vielen malignen Tumoren involviert (Smit *et al.*, 1999).

PAI1 ist durch die Hemmung von u-PA und Interaktion mit Vitronektin an der Zellmigration und Tumorentwicklung beteiligt. Durch die Hemmung von t-PA spielt PAI1 eine wichtige Rolle in kardiovaskulären Krankheiten (Gils und Declerck *et al.*, 2004). Eine erhöhte Expression von *PAI1* in verschiedenen Krebsarten (u.a. Brustkrebs, Magenkrebs,

Speiseröhrenkrebs) wird mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht (Andreasen *et al.*, 2000, Leissner, *et al.* 2006, Sakakibara *et al.*, 2004, 2006, Offersen *et al.*, 2007).

PAI1 reguliert und induziert die VEGF (*vascular endothelial growth factor*)-Expression in Gliomen (Hjortland *et al.*, 2004). Muracciole *et al.* (2002) stellten eine positive Korrelation zwischen der *PAI1*-Expression, dem histologischen Grad der Gliome und dem Alter der Patienten fest. Eine Überexpression von *PAI1* in Gliomzellen kann deren Beweglichkeit und die Fähigkeit zur Invasion *in vitro* inhibieren; in einem Versuchsansatz, der das gesunde Gehirngewebe simuliert, ist das aber nicht der Fall (Hjortland *et al.*, 2003).

Eine verstärkte *PAI1*-Expression durch *PAI1*-Gen-Transfektion in Bauchspeicheldrüsenkrebs-Zelllinien verhindert die Bildung von Metastasen (Inoue *et al.*, 2005). Whitley *et al.* (2004) zeigten, dass Brustkrebs- und Eierstockkrebszelllinien einen weniger invasiven Phänotyp aufgrund einer Überexpression von *PAI1* aufweisen, was sie auf die Fähigkeit von *PAI1*, Plasminogen-Aktivierung zu hemmen, zurückführen.

Die erhöhte *Serpine1*-Expression in PXA wirkt möglicherweise durch Bindung an Serin-Proteasen dem zur Invasion von Tumoren nötigen Abbau der extrazellulären Matrix entgegen. Eine Korrelation zwischen der *PAI1*-Expression und dem Patientenalter konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

Die Expression der Gene *CTGF*, *EPHA1* und *ATP1B2* war in PXA im Vergleich zu AII nicht signifikant erhöht, aber in einem Großteil der untersuchten PXA (45-67 %) waren diese Gene stark exprimiert.

5.2.1.6 *Connective Tissue Growth Factor (CTGF)*

CTGF (connective tissue growth factor) ist ein Angiogenesefaktor, der u.a. von Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert wird (Kasragod *et al.*, 2001) und eine wichtige Rolle in der Tumorangiose, Fibroblastenproliferation, Migration, Adhäsion und dem Aufbau der extrazellulären Matrix spielt (Moussad und Brigstock, 2000, Shimo *et al.*, 2001a, b). Eine Überexpression von *CTGF* wurde in verschiedenen Krebsarten beobachtet, darunter in Pankreaskarzinomen, in akuter lymphatischer Leukämie (ALL), in Melanomen und in Glioblastomen (Aikawa *et al.*, 2006, Sala-Torra *et al.*, 2007, Kubo *et al.*, 1998, Pan *et al.*, 2002). Xie *et al.* (2004) berichten von einer Korrelation zwischen einer *CTGF*-Überexpression und dem Tumorgrad in Gliomen. Liu *et al.* (2007) beobachteten einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten *CTGF*-Expression und einer verstärkten

Metastasenbildung in den Lymphknoten sowie einer kürzeren Überlebenszeit bei Magenkrebspatienten. Auf der anderen Seite haben Shakunaga *et al.* (2000) festgestellt, dass in Chondrosarkomen mit zunehmendem Tumorgrad die *CTGF*-Expression abnimmt und Patienten mit hoher *CTGF*-Expression eine längere Überlebenszeit aufweisen. Von einer verminderten Expression von *CTGF* wird in Lungenkrebs berichtet (Chen *et al.*, 2007). Ein *CTGF*-Gentransfer verhindert die Metastasierung und Invasion in Lungen-Adenokarzinomen (Chang *et al.*, 2004). Aufgrund von reduzierten Expressionsleveln von *CTGF* in Brustkrebspatienten mit einer schlechten Prognose vermuten Jiang *et al.* (2004), dass *CTGF* als Tumorsuppressorgen agiert. Somit scheinen die Auswirkungen einer *CTGF*-Überexpression abhängig von der Art des Tumors zu sein.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der *CTGF*-Expression und einer verminderten Expression von p27, wie von Kothapalli und Grotendorst (2000) berichtet, kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Welche Rolle die *CTGF*-Überexpression in PXA spielt, bleibt zu klären.

5.2.1.7 *Ephrin Related Tyrosine Kinase Receptor 1 (EphA1)*

Die Kontrolle von Zellbewegungen ist wichtig, um die räumliche Organisation von Geweben und Zelltypen zu stabilisieren. Ephrin-Rezeptoren wie EphA1 (*Ephrin related tyrosin kinase receptor 1*), sowie deren Liganden, die Ephrine, üben aufgrund ihrer regulatorischen Fähigkeiten bei der Zelladhäsion/repulsion während des Aufbaus, dem Erhalt und der Umstrukturierung der Gewebsorganisation eine wichtige Funktion bei der Kontrolle von Zellbewegungen aus (Wilkinson, 2000, 2001, Mellitzer *et al.*, 2000). Ephrine und deren Rezeptoren sind in die Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems involviert (O'Leary und Wilkinson, 1999) und spielen eine kritische Rolle sowohl in der Gefäßentwicklung als auch in der Tumorangiogenese und dem Tumorwachstum (Cheng *et al.*, 2002). Eine Überexpression von *EphA1* ist ein bekanntes Phänomen bei Eierstockkrebs und in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (*Head and neck squamous cell carcinoma*, *HNSCC*, Herath *et al.*, 2006, Lin *et al.*, 2004). In Melanomen, Brustkrebs, Prostatakrebszellen und auch in Glioblastomen wird dagegen von einer Herunterregulation von *EphA1* berichtet (Hafner *et al.*, 2004, 2006, Fox und Kandpal, 2004, Fox *et al.*, 2006). Über eine veränderte Expression in anderen glialen Tumoren ist bislang nicht bekannt.

5.2.1.8 *ATPase, Na⁺/K⁺-Transporting, Beta-2 Polypeptide (ATP1B2)*

Die β 2-Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase, auch AMOG (*adhesion molecule on glia*) genannt, die vom *ATP1B2*-Gen codiert wird, ist ein membranintegrales Glykoprotein, welches Neuron-Astrozyten-Interaktionen *in vitro* vermittelt (Antonicek *et al.*, 1987). Möglicherweise interagiert AMOG mit einem noch unbekanntem neuronalen Rezeptor, was ein verstärktes Neuritenwachstum zur Folge hat (Muller-Husmann *et al.*, 1993). Senner *et al.* (2003) stellten fest, dass in neoplastischen Astrozyten die Expression von *AMOG* herunterreguliert ist und dass diese Herunterregulation mit dem Grad der Malignität invers korreliert. Eine verminderte Expression von *AMOG* in Glioblastomen wurde ebenfalls von van den Boom *et al.* (2006) beschrieben. Eine mögliche Ursache hierfür scheint eine Promotorhypermethylierung des *AMOG*-Gens zu sein. Eine verstärkte Adhäsion und eine verminderte Migration wurde in *AMOG*-positiven Gliomzellen gegenüber *AMOG*-negativen Gliomzellen festgestellt (Senner *et al.*, 2003). Die in dieser Arbeit nachgewiesene höhere Expression von *ATP1B2 (AMOG)* in PXA im Vergleich zu diffusen Astrozytomen ist möglicherweise mitverantwortlich für das begrenztere Wachstum der PXA.

5.2.2 Gene, die in diffusen Astrozytomen im Vergleich zu PXA stärker exprimiert wurden

Insgesamt konnten in dieser Arbeit drei Gene detektiert werden, die in AII im Vergleich zu PXA stärker exprimiert wurden: *PDGFRA*, *NTRK2* und *SOX4*.

5.2.2.1 *Platelet-Derived Growth Factor Receptor α , (PDGFRA)*

Der Plättchenwachstumsfaktor-Rezeptor α (*PDGFRA*, *platelet-derived growth factor receptor α*), ist ebenso wie *NTRK2* (s.u.) ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor, dessen Dimerisierung nach Ligandenbindung verschiedene Signalwege aktiviert, die zu Zellwachstum, Aktin-Reorganisation, Migration und Differenzierung führen (Heldin *et al.*, 1998, Claesson-Welsh, 1996). Eine bekannte Hochregulation von *PDGFRA*-mRNA in allen Tumorgraden der diffusen Astrozytome lässt vermuten, dass diese Überexpression bereits im frühen Stadium der Astrozytombildung eine Rolle spielt (Cavenee *et al.*, 2000). Hermanson *et al.* (1996) und Huang *et al.* (2000) konnten zeigen, dass eine verstärkte *PDGFRA*-mRNA-Expression in diffusen Astrozytomen ohne *PDGFRA*-Amplifikation mit einem Verlust auf 17p und einer Mutation des dort lokalisierten *TP53*-Gens korreliert. Da die zwei der 8 in dieser Arbeit

untersuchten AII, die keine *TP53*-Mutation aufweisen (A2, A6), in ihrer *PDGFRA*-Expression nicht von den AII mit *TP53*-Mutation abweichen, kann diese Korrelation nicht bestätigt werden, was allerdings auch an der relativ kleinen eigenen Tumorerie liegen kann. Die Expressionsstärke des *PDGFRA*-Gens in PXA entsprach derjenigen des nicht-neoplastischen Hirngewebes.

5.2.2.2 *Neutrophic Tyrosine Kinase Receptor (NTRK2)*

Der Neutrophinrezeptor NTRK2 (auch TRKB), ein Rezeptor für BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), Neutrophin-4 und -5, ist wichtig für in die Entwicklung und Erhaltung des zentralen Nervensystems (Lindsay, 1996). Eine Expression von *NTRK2* wurde nur in Astrozyten bzw. astrozytären Gliomen, nicht aber in Oligodendrozyten bzw. oligodendrozytären Gliomen detektiert. Dies führt zu dem Schluss, dass die *NTRK2*-Expression Gliotyp-spezifisch ist (Wang *et al.*, 1998). Von einer *TRKB*-Überexpression in aggressiven Neuroblastomen und in Pankreastumoren wird berichtet (Schramm *et al.*, 2005, Sclabas *et al.*, 2005). Wadhwa *et al.* (2003) beobachteten eine verstärkte Expression von *TRKB* in niedriggradigen Astrozytomen, nicht aber in höhergradigen, was sie zu der Vermutung führte, dass TRKB in den frühen Stadien der Tumorphogenese eine Rolle spielt. Bei der Tumorphogenese der PXA scheint TRKB keine Rolle zu spielen, da in der vorliegenden Arbeit keine erhöhte *TRKB*-Expression in PXA festgestellt wurde.

5.2.2.3 *Sry-Like HMG Box Protein 4 (SOX4)*

SOX4 (sry-like HMG box protein 4) ist ein Transkriptionsaktivator, der in sämtlichen Geweben exprimiert wird und in die Entwicklung von Herz, B-Zellen und des Reproduktionssystems involviert ist (Cheung *et al.*, 2000). Eine *SOX4*-Überexpression ist ein bekanntes Phänomen in verschiedenen Krebsarten, darunter Lungen-, Blasen- und Prostata-Krebs (Friedman *et al.*, 2004, Aaboe *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2006b). Über eine veränderte Expression von *SOX4* in Gliomen ist bislang nichts bekannt. Welche Rolle die beobachtete erhöhte *SOX4*-Expression in AII spielt, bleibt zu klären.

5.2.3 Gene, die in PXA und AII im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe verstärkt bzw. vermindert exprimiert wurden

Die Expression der 5 Gene *CDKN1A*, *CD74*, *A2M*, *RBI* und *TPII* unterschied sich nicht signifikant zwischen PXA und AII, sondern war in beiden Tumorentitäten im Vergleich zu

nicht-neoplastischem Gewebe erhöht (*CDKN1A*, *CD74*, *A2M*, *RBI*) bzw. erniedrigt (*TP11*). Im Folgenden soll nur kurz auf diese Gene eingegangen werden.

5.2.3.1 *Cyclin-dependent-Kinase-Inhibitor 1A (CDKN1A)*

p21^{WAF1/CIP1}, das Genprodukt von *CDKN1A*, spielt aufgrund seiner Fähigkeit, verschiedene Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks) und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*, Untereinheit der DNA-Polymerase δ) zu inhibieren, eine wichtige Rolle in der Zellzykluskontrolle. Eine Überexpression von p21 resultiert in einem G1-Arrest und unterdrückt das Tumorwachstum (Gartel *et al.*, 1996, siehe Kapitel 1.2.1). Die Induktion von p21 kann sowohl über einen p53-abhängigen und als auch über einen p53-unabhängigen Weg erfolgen. Es ist bereits bekannt, dass eine Überexpression von p21 sowohl abhängig als auch unabhängig vom p53-Signalweg in Gliomen zu beobachten ist (Jung *et al.*, 1995, Khalid *et al.*, 1998, Ono *et al.*, 1997). Eine verstärkte Expression von *CDKN1A* in PXA steht möglicherweise in Zusammenhang mit einer erhöhten Decorin-Expression (siehe Kap. 5.2.1.1). Da in 3 der 4 diffusen Astrozytome mit erhöhter *CDKN1A*-Expression eine *TP53*-Mutation detektiert wurde, in einem der beiden AII ohne *TP53*-Mutation keine erhöhte *CDKN1A*-Expression vorliegt und keine Hochregulation des *DCN*-Gens festgestellt werden konnte, scheint die *CDKN1A*-Expression in AII über einen p53- und *DCN*-unabhängigen Weg gesteuert zu werden.

5.2.3.2 *CD74*

CD74 ist ein von B-Zellen, Makrophagen und Reed-Sternberg-Zellen exprimiertes Antigen (Lazova *et al.*, 1997). Das vor allem im Cytoplasma lokalisierte *CD74* ist an der Beladung exogener Peptide in HLA (humane Leukozyten Antigene) Klasse II Heterodimere beteiligt (Rebmann *et al.*, 1997), spielt eine Rolle bei der B-Zell-Differenzierung (Starlets *et al.*, 2006) und bindet an das Zytogen MIF (*migration-inhibitory factor*), was unter anderem zur Zellproliferation führt (Leng *et al.*, 2003). Von einer Korrelation zwischen einer erhöhten *CD74*-Expression und reaktiver, lymphozytärer Infiltration des Tumors wird von Young *et al.* (2001) in Nierenzellkarzinomen berichtet. Andere Autoren kamen zu dem Schluss, dass eine verstärkte *CD74*-Expression ein Marker für Tumorprogression ist (Lazova *et al.*, 1997, Datta *et al.*, 2000). Ob dies auch in diffusen astrozytären Gliomen der Fall ist, müsste durch Untersuchungen von Tumoren unterschiedlicher WHO-Grade bestimmt werden.

5.2.3.3 *Alpha-2-Macroglobulin (A2M)*

Alpha-2-Makroglobulin (A2M) ist ebenfalls wie TIMP1 ein MMP-Inhibitor. Huang *et al.* (2005) berichten von einer verstärkten *A2M*-Expression in pilozytischen Astrozytomen im Vergleich zu diffusen Astrozytomen. Gemäß Kanoh *et al.* (2001) korreliert die *A2M*-Expression invers mit der Metastasierung von Prostatatumoren. Demgegenüber scheint A2M ein Wachstumsfaktor in hochmalignen Zellen zu sein (Asplin *et al.*, 2000). Vermutlich spielt auch hier das Gleichgewicht zwischen dem unspezifischen Inhibitor A2M und den MMPs eine wichtige Rolle in der Tumorprogression.

5.2.3.4 *Retinoblastoma 1 (RB1)*

Das Retinoblastom-Genprodukt (pRB1) ist ein nukleäres Protein, welches eine wichtige Funktion im Zellzyklus und in der Zelldifferenzierung ausübt (Weinberg, 1995; siehe auch Kapitel 1.2.1). Abhängig vom jeweiligen Phosphorylierungsgrad interagiert das Protein mit Transkriptionsfaktoren für solche Gene, deren Transkription zum Eintritt der Zelle in die S-Phase führt (Dowdy *et al.*, 1993, Kato *et al.*, 1993). Ein Verlust bzw. eine Verringerung der *RB1*-Expression ist in verschiedenen Tumoren, unter anderem in einem Teil der Glioblastome beschrieben worden (Volinia *et al.*, 2006, Nakamura *et al.*, 2001b). Andererseits wurde eine *RB1*-Überexpression in Verbindung mit einer schlechten Prognose in Blasenkrebs gebracht (Benedict *et al.*, 1999). Möglicherweise ist die erhöhte Expression von *RB1*-Transkripten in PXA und AII lediglich eine Folge der im Vergleich zum nicht neoplastischen Hirngewebe erhöhten Zellteilungsrate in Tumoren.

5.2.3.5 *Triosephosphat Isomerase 1 (TPII)*

Die Triosephosphatisomerase 1 (TPII) katalysiert die Isomerisierung von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat in der Glykolyse. Bei Patienten mit der autosomal rezessiven Stoffwechselkrankheit Triosephosphatisomerase-Defizienz liegen Mutationen im *TPII*-Gen vor (Watanabe *et al.*, 1996, Arya *et al.*, 1997). Turashvili *et al.* (2005) berichten von einer differentiellen *TPII*-Expression in duktalem und lobulärem Brustkarzinom, ansonsten ist über eine veränderte *TPII*-Expression in Tumoren bislang nichts bekannt. Ob der in PXA und AII erniedrigte *TPII*-mRNA-Level mit einer vermehrten glykolytischen Aktivität der Tumorzellen korreliert, ist eine interessante Hypothese, die einer weiteren Abklärung bedarf.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Cluster-Analyse mittels „Cluster“ und „TreeView“ verdeutlicht die Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen pleomorphen Xanthoastrozytomen und diffusen Astrozytomen. Ein Teil der untersuchten Astrozytome ist dabei den PXA auf Expressionsebene ähnlicher als der andere Teil. Es zeigt sich, dass es auf transkriptioneller Ebene keine signifikanten Unterschiede zwischen pleomorphen Xanthoastrozytomen mit (PXA waf) und ohne Anaplasiezeichen (PXA II) gibt.

5.3 Expression von CD34 in pleomorphen Xanthoastrozytomen

Mit Hilfe immunhistologischer Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit eine CD34-Immunreaktivität auf Tumorzellen in 83 % der PXA WHO-Grad II und in 57 % der PXA waf detektiert. Dieser Befund unterscheidet die PXA von den diffus astrozytären Gliomen, die keine CD34-positiven Tumorzellen enthalten. Die immunhistochemischen Befunde wurden auf mRNA-Ebene mittels Triplex-RT-PCR bestätigt.

CD34 (1q32) ist ein stark glykolisiertes Transmembranprotein, dessen genaue Funktion bislang nicht bekannt ist. Bisherige Untersuchungen lassen eine Funktion bei der Zell-Adhäsion und Signaltransduktion vermuten (Healy *et al.*, 1995, Lindboe *et al.*, 1992). CD34 wird vor allem an der Oberfläche von hämatopoetischen Vorläufer-Zellen und vaskulären Endothelzellen verschiedener Gewebe sowie in Fibrozyten und Fibroblasten-ähnlichen mesenchymalen Zellen exprimiert (Fina *et al.*, 1990, Greaves *et al.*, 1992, Simmons *et al.*, 1992, Satterthwaite *et al.*, 1992, Chaubal *et al.*, 1994). Zwei Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen, sind bekannt (Nakamura *et al.*, 1993): *CD34_f* (*full length*) besteht aus den Exons 1 bis 8. Bei der verkürzten Form von *CD34*, *CD34_t* (*truncated*), ist ein zusätzliches Exon (Exon X, 194 bp) zwischen Exon 7 und Exon 8 inseriert, was zu einer Verschiebung des Leserahmens, zu einem vorzeitigen Stopp und somit zu einem verkürzten Protein führt. Der *CD34_t*-Form fehlt ein großer Teil der intrazellulären Domäne.

Von einer Tumorzell-assoziierten CD34-Immunreaktivität wurde bislang in verschiedenen Tumortypen berichtet; darunter vaskuläre Tumoren, gastrointestinale stromale Tumoren (GIST), bestimmte Leukämien, Dermatofibrosarkome, Spindelzell-Lipome, epitheloide Sarkome und Myofibroblastome (Natkunam *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2006a).

CD34-positive Fibrozyten sind im normalen Brustgewebe sowie in benignen Mammatumoren zu finden, in invasiven Mammakarzinomen hingegen fanden sich keine CD34-positiven Fibroblasten im Stroma, weshalb der CD34-Nachweis als eine hilfreiche Zusatzuntersuchung

zur Unterscheidung von nicht invasiven und invasiven Brusttumoren propagiert wurde (Barth *et al.*, 2002, Cimpean *et al.*, 2005). Die in den eigenen Analysen beobachtete wesentlich seltenere und schwächere Expression von *CD34* in PXA waf im Vergleich zu PXA II lässt auf einen Verlust der *CD34*-Expression mit zunehmender Anaplasie schließen.

Unter den verschiedenen Tumoren des Nervensystems wurde eine *CD34*-Expression in einem Teil der fibroblastischen Meningiome, in solitären fibrösen Tumoren der Meningen (Perry *et al.*, 1997a), in Schwannzell-Tumoren (Weiss und Nickoloff, 1993), in neoplastischen und malformativen Läsionen bei fokaler Epilepsie (vor allem in Gangliogliomen, Blümcke und Wiestler, 2002, Deb *et al.*, 2006) und in den seltenen chordoiden Gliomen des dritten Ventrikels beschrieben (Reifenberger *et al.*, 1999b, Takei *et al.*, 2006). Diffus astrozytäre und oligodendrogliale Gliome sind gar nicht bzw. nur in seltenen Fällen *CD34*-positiv (Blümcke *et al.*, 1999a, 2004, Chaubal *et al.*, 1994, Sreenen und Prayson, 1997). Über eine Expression von *CD34* im gesunden Hirn ist bislang nichts bekannt (Blümcke *et al.*, 1999a).

Regulatoren der *CD34*-Expression sind *Ets-2*, *c-myb*, *Mzf-1* und Nukleolin (Melotti und Calabretta, 1994, Morris *et al.*, 1995, Grinstein *et al.*, 2007). Da, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, die *CD34*-Expression in PXA auf Transkriptionsebene hochreguliert wird, wären weiterführende Untersuchungen des Aktivitätszustandes dieser drei Gene der nächste Schritt.

Der Anteil *CD34*-positiver Tumoren unter den PXA ist ähnlich hoch wie er für Gangliogliome berichtet wurde (Blümcke *et al.*, 1999). Ähnlich den Ergebnissen an PXA ist der Anteil der *CD34*-positiven Tumoren in gutartigen Gangliogliomen wesentlich höher als in anaplastischen Gangliogliomen (Blümcke und Wiestler, 2002). Das Auftreten von *CD34*-Immunreaktivität in den dysplastischen Zellen des an den Tumor angrenzenden Cortex ist sowohl in PXA als auch in Gangliogliomen zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen auf eine phänotypische Verwandtschaft zwischen PXA und Gangliogliomen schließen, wie sie bereits in der Literatur anhand mehrerer Fallberichte vermutet wurde (Evans *et al.*, 2000, Kordek *et al.*, 1995, Lindboe *et al.*, 1992, Perry *et al.*, 1997b, Vajtai *et al.*, 1997). Diese Hypothese wird zusätzlich durch folgende klinische Merkmale, die in beiden Entitäten zu finden sind, verstärkt: Entwicklung dieser Tumoren hauptsächlich in Kindern und Jugendlichen, gute Prognose sowie Assoziation mit chronisch fokaler Epilepsie (Blümcke und Wiestler, 2002, Louis *et al.*, 2007). Welche Bedeutung die erhöhte *CD34*-Expression in PXA und Gangliogliomen zukommt, bleibt aufgrund der bislang nicht genau bekannten Funktion von *CD34* unklar. Möglicherweise ist die *CD34*-Expression aufgrund der Funktion von *CD34* in der Zelladhäsion (Healy *et al.*, 1995, Majdic *et al.*, 1994) an dem relativ gut begrenzten

Wachstum der PXA und Gangliogliomen beteiligt. Ebenso könnte man über eine gemeinsame CD34-positive Ursprungszelle spekulieren, deren Existenz allerdings bislang nicht bewiesen ist.

Untersuchungen der *CD34*-Expression stellen neben der klassischen Histologie und dem Nachweis etablierter immunhistochemischer Marker eine hilfreiche Methode in der Differentialdiagnostik dar, insbesondere um PXA von den häufiger auftretenden, höhergradigen astrozytären Tumoren wie dem anaplastischen Astrozytom (AAIII) und dem Glioblastom (GBM IV) zu unterscheiden. CD34-Negativität bedeutet allerdings nicht automatisch, dass die Diagnose „PXA“ ausgeschlossen werden kann, da ein Fünftel der PXA II bzw. etwa die Hälfte der PXA waf in dieser Arbeit keine CD34-Immunreaktion zeigen. Ebenso kann aufgrund einer positiven CD34-Immunreaktion nicht unbedingt auf ein PXA geschlossen werden, da in einigen anderen neuroepithelialen Tumoren und glioneuralen Hämatomen, die in Verbindung zu chronisch fokaler Epilepsie stehen, sowie auch in seltenen Fällen in diffusen Gliomen eine *CD34*-Expression zu finden ist (Blümcke *et al.*, 1999, Deb *et al.*, 2006). Die endgültige Diagnostik dieser Tumoren kann daher nur unter Berücksichtigung aller histologischen und immunhistochemischen Merkmale erfolgen.

6 Zusammenfassung

Das pleomorphe Xanthoastrozytom (PXA) ist ein relativ seltener astrozytärer Tumor des zentralen Nervensystems, der vornehmlich bei Kindern und jungen Erwachsenen auftritt, typischerweise oberflächlich in der Großhirnrinde lokalisiert ist und relativ gut begrenzt wächst. Trotz eines sehr pleomorphen histologischen Erscheinungsbildes ist das PXA im Regelfall mit einer günstigen Prognose assoziiert. Histologisch werden diese Tumoren dementsprechend gemäß der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) herausgegebenen Klassifikation in den WHO-Grad II eingestuft. Über die diesen Tumoren ursächlich zugrunde liegenden molekulargenetischen Veränderungen ist bislang erst sehr wenig bekannt. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine große Serie von PXA auf Veränderungen in solchen Genen hin untersucht, die in anderen, häufigeren glialen Tumoren, wie z.B. den diffusen Astrozytomen und Oligodendrogliomen, typischerweise Veränderungen zeigen. Hierzu gehörte die molekulare Analyse von PXA auf Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53*, Aberrationen in den Tumorsuppressorgen *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B*, Genamplifikationen der Proto-Onkogene *CDK4*, *MDM2* und *EGFR* und Allelverluste auf den chromosomalen Armen 1p, 9p, 10p, 10q, 17p, 19q und 22q. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Expressionsprofile von PXA und den ebenfalls dem WHO Grad II angehörenden diffusen Astrozytomen mittels Hybridisierung von cDNA-Arrays erstellt und miteinander verglichen, um Unterschiede zwischen diesen beiden Tumorentitäten festzustellen und neue Kandidatengene zu identifizieren, die an der Pathogenese der PXA beteiligt sind. Der dritte Teil der Arbeit fokussierte auf die Charakterisierung der Expression des CD34 Antigens als möglicher diagnostischer Marker für PXA.

Homozygote Deletionen der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *p14^{ARF}* und *CDKN2B*, die zu einer Inaktivierung der p53- bzw. pRB-abhängigen Wachstumskontrolle führen, wurden als häufige und wichtige genetische Veränderungen in PXA identifiziert. Andere genetische Alterationen, die typischerweise in diffusen Astrozytomen oder Oligodendrogliomen zu finden sind, wie z.B. Mutationen des *TP53*-Gens oder kombinierte Allelverluste auf den Chromosomenarmen 1p und 19q, sind dagegen in PXA selten oder gar nicht nachweisbar. Unterschiede zwischen PXA und diffusen Astrozytomen wurden nicht nur auf genomischer Ebene, sondern auch auf transkriptioneller Ebene beobachtet. Hierdurch wurde eine Reihe von Genen identifiziert, die in den beiden Tumorentitäten differentiell exprimiert werden. Die in PXA verstärkt exprimierten Gene kodieren für Genprodukte verschiedener Funktionalitäten, wobei insbesondere solche Gene gefunden wurden, deren Proteine in die

Matrixregulation und/oder in Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen involviert sind. Hierzu gehören u.a. die Gene für Decorin (*DCN*), Matrix-Gla-Protein (*MGP*), *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1* (*TIMP1*), *Connective Tissue Growth Factor* (*CTGF*), Ephrinrezeptor EphA1 (*EPHA1*) und Serpin 1/Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (*PAI1*). Die Hochregulation dieser Gene in Kombination mit einer im Vergleich zu diffusen Astrozytomen verminderten Expression der Gene für den Plättchenwachstumsfaktorrezeptor alpha (*PDGFRA*) und den neurotrophen Tyrosinkinase-Rezeptor (*NTRK2*) ist vermutlich mitverantwortlich für das vergleichsweise weniger infiltrative Wachstum der PXA. Diese Hypothese sowie die funktionelle Bedeutung der in dieser Arbeit ebenfalls als differentiell exprimiert gefundenen Gene für die Proteine Pleiotrophin (*PTN*), Adhäsionsmolekül auf Glia (*AMOG/ATP1B2*) und den Transkriptionsfaktor *SOX4* in PXA, bedarf der Abklärung in weitergehenden Analysen. Weder auf genetischer noch auf transkriptioneller Ebene wurden eindeutige Unterschiede zwischen klassischen PXA des WHO-Grades II und sogenannten PXA mit Anaplasiezeichen festgestellt. Schließlich fand sich in PXA im Vergleich zu anderen Gliomen eine immunhistochemisch deutlich häufiger nachweisbare Expression des CD34 Antigens, das bekanntermaßen in Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird. Die häufige CD34-Immunreaktivität in PXA kann somit als neuer diagnostischer Marker in der neuropathologischen Differentialdiagnose dieser Tumoren herangezogen werden.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit die sehr seltenen PXA erstmalig systematisch im Hinblick auf die assoziierten genetischen Veränderungen und Expressionsprofile hin analysiert. Die erzielten Ergebnisse sprechen dafür, dass sich PXA von den häufigeren, diffusen astrozytären und oligodendroglialen Gliomen sowohl auf genetischer als auch auf transkriptioneller Ebene eindeutig unterscheiden. Zusätzlich konnte eine Reihe neuer Kandidatengene identifiziert werden, deren verstärkte Expression wahrscheinlich zur Entstehung und zum Wachstumsverhalten der PXA beiträgt. Mit dem CD34-Antigen wurde zudem ein neuer in der neuropathologischen Routinediagnostik einsetzbarer diagnostischer Marker für diese Tumoren identifiziert.

7 Abstract

Pleomorphic xanthoastrocytoma (PXA) is a rare astrocytic neoplasm of the central nervous system that predominantly develops in children and young adults, usually shows a well-demarcated growth pattern, and histologically corresponds to low-grade glioma of World Health Organization (WHO) grade II. Despite a rather pleomorphic histology, PXA is usually associated with a favorable prognosis. Knowledge about the molecular aberrations that are associated with the pathogenesis of these tumors is still very limited. In the first part of the thesis, a large series of PXA tumors were screened for alterations of genes known to be frequently aberrant in other, more common types of gliomas, such as diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. These studies comprised molecular analyses for mutations in the *TP53* tumor suppressor gene, aberrations in the *CDKN2A*, *p14^{ARF}* and *CDKN2B* tumor suppressor genes, amplification of the proto-oncogenes *CDK4*, *MDM2* and *EGFR*, as well as loss of heterozygosity on the chromosomal arms 1p, 9p, 10p, 10q, 17p, 19q and 22q. In the second part of the thesis, cDNA-array hybridization was used to compare the mRNA expression profiles of PXA with those of diffuse astrocytomas WHO grade II in order to identify differentially expressed genes that might be specifically involved in the pathogenesis of PXA. The third part of the thesis focussed on the characterization of CD34 expression in PXA.

Homozygous deletion of the tumor suppressor genes *CDKN2A*, *p14^{ARF}* and *CDKN2B*, leading to inactivation of the p53- and pRB-dependent growth control, was identified as an important molecular alteration in PXA. In contrast, other genetic alterations typically found in diffuse astrocytomas or oligodendrogliomas, such as *TP53* mutation or deletion of chromosomal arms 1p and 19q, were rare or absent in PXA. Differences between PXA and diffuse astrocytoma were also found at the transcriptional level. A number of different genes, whose gene products exhibit diverse functionality, most notably involvement in matrix regulation and/or cell-cell- or cell-matrix-interaction, were found to be expressed at higher levels in PXA as compared to diffuse astrocytomas and non-neoplastic brain tissue. These included the genes for decorin (*DCN*), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (*TIMP1*), connective tissue growth factor (*CTGF*), ephrin receptor EphA1 (*EPHA1*), matrix-Gla protein (*MGP*) and serpine 1, also known as plasminogen activator inhibitor 1 (*PAI1*). The increased expression of these genes together with decreased expression of the genes encoding platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*) and neurotrophic tyrosine kinase receptor 2 (*NTRK2*) likely contribute to the less infiltrative growth behaviour of PXA as compared to diffuse astrocytoma. Further functional analysis should uncover the precise roles of the

differential expression of these and certain other differentially expressed genes, such as the genes encoding pleiotrophin (*PTN*), adhesion molecule on glia (*AMOG/ATP1B2*) and SRY-box 4 (*SOX4*), in PXA development. Significant differences between classic PXA of WHO grade II and so-called PXA with anaplastic features were neither detected at the genetic nor at the transcriptional level. Finally, PXA were found to frequently express the endothelial and hematopoietic stem cell-associated antigen CD34, which thus may serve as a novel marker in the differential diagnosis towards other types of gliomas that are usually CD34-negative.

In summary, the thesis reports for the first time on a systematic molecular analysis of the genetic alterations and expression profiles associated with PXA. The results indicate that the genetic and transcriptional alterations in PXA are clearly distinct from those in the more common diffuse astrocytic and oligodendroglial gliomas, which may explain the different growth behavior and more favorable prognosis of PXA. Furthermore, several interesting new candidate genes were found that show up-regulated expression in PXA and thus likely contribute to PXA development. In addition, CD34 was identified as a novel diagnostic immunohistochemical marker for PXA.

8 Literatur

Aaboe M, Birkenkamp-Demtroder K, Wiuf C, Sørensen FB, Thykjaer T, Sauter G, Jensen KM, Dyrskjød L, Ørntoft T. SOX4 expression in bladder carcinoma: clinical aspects and in vitro functional characterization. *Cancer Res* 2006;66:3434-42.

Abdel-Wahab N, Wicks SJ, Mason RM, Chantry A. Decorin suppresses transforming growth factor-induced expression of plasminogen activator inhibitor1 in human mesangial cells through a mechanism that involves Ca²-dependent phosphorylation of Smad2 at serine-240. *Biochem. J* 2002;362:643–649.

Aigner A, Brachmann P, Beyer J, Jäger R, Raulais D, Vigny M, Neubauer A, Heidenreich A, Weinknecht S, Czubayko F, Zugmaier G. Marked increase of the growth factors pleiotrophin and fibroblast growth factor-2 in serum of testicular cancer patients. *Ann Oncol* 2003;14:1525-9.

Aikawa T, Gunn J, Spong SM, Klaus SJ, Korc M. Connective tissue growth factor-specific antibody attenuates tumor growth, metastasis, and angiogenesis in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1108-16.

Alaminos M, Dávalos V, Ropero S, Setién F, Paz MF, Herranz M, Fraga MF, Mora J, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Res.* 2005;65:2565-71.

Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis* 2002; 4:541-7.

Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:25–40.

Antonicek H, Persohn E, Schachner M. Biochemical and functional characterization of a novel neuron-glia adhesion molecule that is involved in neuronal migration. *J Cell Biol* 1987; 104:1587-95.

Arnaldi LA, Borra RC, Maciel RM, Cerutti JM. Gene expression profiles reveal that DCN, DIO1, and DIO2 are underexpressed in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 2005;15:210-21.

Arya R, Lalloz MR, Bellingham AJ, Layton DM. Evidence for founder effect of the Glu104Asp substitution and identification of new mutations in triosephosphate isomerase deficiency. *Hum Mutat* 1997;10:290-4.

Asplin IR, Misra UK, Gawdi G, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Selective upregulated expression of the alpha2-macroglobulin signaling receptor in highly metastatic 1-LN prostate carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys* 2000; 383:135-41.

Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, Bredel M, Vogel H, Mills AA. CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell*. 2007;128:459-75.

Barth PJ, Ebrahimsade S, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and benign breast lesions. *Virchows Arch* 2002;440:298-303.

Batra SK, Rasheed BK, Bigner SH, Bigner DD. Oncogenes and anti-oncogenes in human central nervous system tumors. *Lab Invest* 1994;71:621-37.

Bayindir C, Balak N, Karasu A, Kasaroglu D. Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma. *Childs Nerv Syst* 1997;13:50-6.

Bello MJ, Leone PE, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA. Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 1995;64:207-10.

Benedict WF, Lerner SP, Zhou J, Shen X, Tokunaga H, Czerniak B. Level of retinoblastoma protein expression correlates with p16 (MTS-1/INK4A/CDKN2) status in bladder cancer. *Oncogene* 1999;18:1197-203.

Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64:235-48.

Blümcke I, Giencke K, Wardelmann E, Beyenburg S, Kral T, Sarioglu N, Pietsch T, Wolf HK, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD. The CD34 epitope is expressed in neoplastic and malformative lesions associated with chronic, focal epilepsies. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999a;97:481-90.

Blümcke I, Lobach M, Wolf HK, Wiestler OD. Evidence for developmental precursor lesions in epilepsy-associated glioneuronal tumors. *Microsc Res Tech* 1999b;46:53-8.

Blümcke I, Wiestler OD. Gangliogliomas: an intriguing tumor entity associated with focal epilepsies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:575-84.

Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Ruth FX, Nagase H, Tschesche H, Maskos K. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:73-91.

Bohlen P, Kovesdi I. HBNF and MK, members of a novel gene family of heparin-binding proteins with potential roles in embryogenesis and brain function. *Prog Growth Factor Res* 1991;3:143-57.

Boström K, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000;10:151-8.

Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267-83.

Bu X, Zhang X, Cao W. The expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene in human astrocytomas. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 1998;27:433-5.

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991;48:137-44.

Campo S, Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Musolino C, Calabrò L, Bellomo G, Quartarone E, Calatroni A. Lymphocytes from patients with early stage of B-cell chronic lymphocytic leukaemia and long survival synthesize decorin. *Biochimie* 2006;88:1933-9.

Cavenee WK, Furnari FB, Nagane M, *et al.* Diffusely infiltrating astrocytomas. In: Kleihues P, Cavenee WK, eds. *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. World Health Organization classification of tumours. Lyon, IARC Press, 2000: 10-21.

Chang CC, Shih JY, Jeng YM, Su JL, Lin BZ, Chen ST, Chau YP, Yang PC, Kuo ML. Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:364-75.

Chaubal A, Paetau A, Zoltick P, Miettinen M. CD34 immunoreactivity in nervous system tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994;88:454-8.

Chen H, Gordon MS, Campbell RA, Li M, Wang CS, Lee HJ, Sanchez E, Manyak SJ, Gui D, Shalitin D, Said J, Chang Y, Deuel TF, Baritaki S, Bonavida B, Berenson JR. Pleiotrophin is highly expressed by myeloma cells and promotes myeloma tumor growth. *Blood* 2007a;110:287-95.

Chen L, O'Bryan JP, Smith HS, Liu E. Overexpression of matrix Gla protein mRNA in malignant human breast cells: isolation by differential cDNA hybridization. *Oncogene* 1990a;5:1391-5.

Chen PL, Chen YM, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990b;250:1576-80.

Chen PP, Li WJ, Wang Y, Zhao S, Li DY, Feng LY, Shi XL, Koeffler HP, Tong XJ, Xie D. Expression of Cyr61, CTGF, and WISP-1 correlates with clinical features of lung cancer. *PLoS ONE* 2007b;2:534.

Chenchik A, Chen S, Makhanov M, Siebert P. Profiling of gene expression in a human glioblastoma cell line using the Atlas Human cDNA Expression Array I. *Clontechniques XIII* 1998;1: 16-7.

Cheng N, Brantley DM, Chen J. The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:75-85.

Cheng Y, Pang JC, Ng HK, Ding M, Zhang SF, Zheng J, Liu DG, Poon WS. Pilocytic astrocytomas do not show most of the genetic changes commonly seen in diffuse astrocytomas. *Histopathology* 2000;37:437-44.

Cheung M, Abu-Elmagd M, Clevers H, Scotting PJ. Roles of Sox4 in central nervous system development. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;79:180-91.

Cîmpean AM, Raica M, Narița D. Diagnostic significance of the immunoexpression of CD34 and smooth muscle cell actin in benign and malignant tumors of the breast. *Rom J Morphol Embryol* 2005;46:123-9.

Claesson-Welsh L. Mechanism of action of platelet-derived growth factor. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:373-85.

Collins VP, James CD. Gene and chromosomal alterations associated with the development of human gliomas. *FASEB J* 1993; 10:926-30.

Collins VP. Cellular mechanisms targeted during astrocytoma progression. *Cancer Lett* 2002; 188: 1-7.

Collins VP. Gene amplification in human gliomas. *Glia* 1995;15:289-96.

Collins VP. Progression as exemplified by human astrocytic tumors. *Semin Cancer Biol* 1999; 9:267-76.

Crawford HC, Matrisian LM. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis* 1995;14: 234-45.

Csordas G, Santra M, Reed CC, Eichstetter I, McQuillan DJ, Gross D, Nugent MA, Hajnoczky G, and Iozzo RV. Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth in vivo. *J. Biol. Chem* 2000;275:32879–32887.

Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999;189:300-8.

Czubayko F, Riegel AT, Wellstein A. Ribozyme-targeting elucidates a direct role of pleiotrophin in tumor growth. *J Biol Chem* 1994;269:21358-63.

Datta MW, Shahsafaie A, Nadler LM, Freeman GJ, Dorfman DM. Expression of MHC class II-associated invariant chain (Ii;CD74) in thymic epithelial neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000;8:210-5.

De Luca A, Santra M, Baldi A, Giordano A, Iozzo RV. Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 1996;271:18961-5.

Deb P, Sharma MC, Tripathi M, Sarat Chandra P, Gupta A, Sarkar C. Expression of CD34 as a novel marker for glioneuronal lesions associated with chronic intractable epilepsy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006;32:461-8.

Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 1993;73:499-511.

Dugan TA, Yang VW, McQuillan DJ, Höök M. Decorin modulates fibrin assembly and structure. *J Biol Chem* 2006;281:38208-16.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14863-8.

Engers R, Springer E, Michiels F, Collard JG, Gabbert HE. Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J Biol Chem* 2001;276:41889-97.

Engers R, Zwaka TP, Gohr L, Weber A, Gerharz CD, Gabbert HE. Tiam1 mutations in human renal-cell carcinomas. *Int J Cancer* 2000;88:369-76.

Esteller M, Cordon-Cardo C, Corn PG, Meltzer SJ, Pohar KS, Watkins DN, Capella G, Peinado MA, Matias-Guiu X, Prat J, Baylin SB, Herman JG: p14^{ARF} silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2. *Cancer Res* 2001;61:2816-21.

Evans AJ, Fayaz I, Cusimano MD, Laperriere N, Bilbao JM. Combined pleomorphic xanthoastrocytoma-ganglioglioma of the cerebellum. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1707-9.

Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* 1991;10:1565-9.

Fan C, Sheu D, Fan H, Hsu K, Allen Chang C, Chan E. Down-regulation of matrix Gla protein messenger RNA in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Lett* 2001;165:63-9.

Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC, Kirsch L, Fimmers R, Blaschke B, Schlegel U, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G. Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol* 2004;14:121-30.

Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75:2417-26.

Fong KM, Kida Y, Zimmerman PV, Smith PJ. TIMP1 and adverse prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1369-72.

Fox BP, Kandpal RP. Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:882-92.

Fox BP, Tabone CJ, Kandpal RP. Potential clinical relevance of Eph receptors and ephrin ligands expressed in prostate carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:1263-72.

Friedman R, Bangur C, Zasloff E, *et al.* Molecular and immunological evaluation of the transcription factor SOX-4 as a lung tumor vaccine antigen. *J Immunol* 2004;172:3319-27.

Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;213:138-49.

Giannini C, Hebrink D, Scheithauer BW, Dei Tos AP, James CD. Analysis of p53 mutation and expression in pleomorphic xanthoastrocytoma. *Neurogenetics* 2001;3:159-62.

Giannini C, Scheithauer BW, Burger PC, Brat DJ, Wollan PC, Lach B, O'Neill BP. Pleomorphic xanthoastrocytoma: what do we really know about it? *Cancer* 1999;85:2033-45.

Gils A, Declerck PJ. The structural basis for the pathophysiological relevance of PAI-I in cardiovascular diseases and the development of potential PAI-I inhibitors. *Thromb Haemost* 2004;91:425-37.

Greaves MF, Brown J, Molgaard HV, Spurr NK, Robertson D, Delia D, Sutherland DR. Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia* 1992;6 Suppl 1:31-6.

Grinstein E, Du Y, Santourlidis S, Christ J, Uhrberg M, Wernet P. Nucleolin regulates gene expression in CD34-positive hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2007;282:12439-49.

Hafner C, Becker B, Landthaler M, Vogt T. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in human skin and downregulation of EphA1 in nonmelanoma skin cancer. *Mod Pathol* 2006;19:1369-77.

Hafner C, Schmitz G, Meyer S, Bataille F, Hau P, Langmann T, Dietmaier W, Landthaler M, Vogt T. Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem* 2004;50:490-9.

Hamada H, Kakunaga T. Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* 1982;298:396-8.

Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T, Seidman M, Stollar BD. Characterization of genomic poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequences: structure, organization, and conformation. *Mol Cell Biol* 1984;4:2610-21.

Harris H. The analysis of malignancy by cell fusion: the position in 1988. *Cancer Res* 1988;48:3302-6.

Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005;24:2899-908.

Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992;298:29-32.

Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 1993;2:338-46.

Hayashi K. PCR-SSCP- rapid and easy detection of DNA-sequence changes. *Hum Cell* 1992a ;5:180-4.

Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl* 1992b;9:73-9.

-
- Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:12240-4.
- Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1998;1378:F79-113.
- Herath NI, Spanevello MD, Sabesan S, Newton T, Cummings M, Duffy S, Lincoln D, Boyle G, Parsons PG, Boyd AW. Over-expression of Eph and ephrin genes in advanced ovarian cancer: ephrin gene expression correlates with shortened survival. *BMC Cancer* 2006;6:144.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci US* 1996,93:9821-6.
- Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermark B, Heldin CH, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A, Nistér M. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res* 1996;56:164-71.
- Hjortland GO, Bjørnland K, Pettersen S, Garman-Vik SS, Emilsen E, Nesland JM, Fodstad O, Engebraaten O. Modulation of glioma cell invasion and motility by adenoviral gene transfer of PAI-1. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:301-9.
- Hjortland GO, Lillehammer T, Somme S, Wang J, Halvorsen T, Juell S, Hirschberg H, Fodstad Ø, Engebraaten O Plasminogen activator inhibitor-1 increases the expression of VEGF in human glioma cells. *Exp Cell Res* 2004;294:130-9.
- Hoang-Xuan K, Merel P, Verga F, Hugot JP, Cornu P, Delattre JY, Poisson M, Thomas G, Delattre O. Analysis of the NF2 tumor-suppressor gene and of chromosome 22 deletions in gliomas. *Int J Cancer* 1995,60:478-81.
- Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2000;115:337-44.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994;22:3551-5.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
- Hough CD, Cho KR, Zonderman AB, Schwartz DR, Morin PJ. Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. *Cancer Res* 2001;61:3869-76.
- Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res* 2000;60:6868-74.
- Huang H, Hara A, Homma T, Yonekawa Y, Ohgaki H. Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:891-901.

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. *Cell* 1991;66:1071-4.

Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP. Deregulation of the p14^{ARF}/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res* 2000;60: 417-24.

Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16^{INK4a}, MTS1) and CDK4 gene have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 1996, 13: 1065-72.

Inoue M, Sawada T, Uchima Y, Kimura K, Nishihara T, Tanaka H, Yashiro M, Yamada N, Ohira M, Hirakawa K. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene transfection inhibits the liver metastasis of pancreatic cancer by preventing angiogenesis. *Oncol Rep* 2005;14:1445-51.

Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 1999;274:18843-6.

Ishii E, Ohga S, Imashuku S, Kimura N, Ueda I, Morimoto A, Yamamoto K, Yasukawa M. Review of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in children with focus on Japanese experiences. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;53:209-23.

Ishii N, Sawamura Y, Tada M, Daub DM, Janzer RC, Meagher-Villemure M, de Tribolet N, Van Meir EG. Absence of p53 gene mutations in a tumor panel representative of pilocytic astrocytoma diversity using a p53 functional assay. *Int J Cancer* 1998;76:797-800.

James CD, Carlbom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK. Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 1988;48:5546-51.

James CD, He J, Carlbom E, Mikkelsen T, Ridderheim PA, Cavenee WK, Collins VP. Loss of genetic information in central nervous system tumors common to children and young adults. *Genes Chromosomes Cancer* 1990;2:94-102.

James CD, He J, Carlbom E, Nordenskjold M, Cavenee WK, Collins VP. Chromosome 9 deletion mapping reveals interferon alpha and interferon beta-1 gene deletions in human glial tumors. *Cancer Res* 1991;51:1684-8.

Janciauskiene S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochim Biophys Acta* 2001;1535:221-35.

Jee BK, Park KM, Surendran S, Lee WK, Han CW, Kim YS, Lim Y. KAI1/CD82 suppresses tumor invasion by MMP9 inactivation via TIMP1 up-regulation in the H1299 human lung carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:655-61.

Jiang WG, Watkins G, Fodstad O, Douglas-Jones A, Mokbel K, Mansel RE. Differential expression of the CCN family members Cyr61, CTGF and Nov in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:781-91.

Jung JM, Bruner JM, Ruan S, Langford LA, Kyritsis AP, Kobayashi T, Levin VA, Zhang W. Increased levels of p21^{WAF1/Cip1} in human brain tumors. *Oncogene* 1995;11:2021-8.

Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:3113-9.

Kanoh Y, Ohtani N, Mashiko T, Ohtani S, Nishikawa T, Egawa S, Baba S, Ohtani H. Levels of alpha 2 macroglobulin can predict bone metastases in prostate cancer. *Anticancer Res* 2001;21:551-6.

Kasaragod AB, Lucia MS, Cabirac G, Grotendorst GR, Stenmark KR. Connective tissue growth factor expression in pediatric myofibroblastic tumors. *Pediatr Dev Pathol* 2001;4:37-45.

Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 1993;7:331-42.

Kepes JJ, Louis DN, Giannini C, Paulus W. Pleomorphic xanthoastrocytoma. In: Kleihues P, Cavenee WK (eds). *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. International Agency for Research on Cancer Press, Lyon 2000:52-4.

Kepes JJ, Rubinstein LJ, Ansbacher L, Schreiber DJ. Histopathological features of recurrent pleomorphic xanthoastrocytomas: further corroboration of the glial nature of this neoplasm. A study of 3 cases. *Acta Neuropathol (Berl)* 1989;78:585-93.

Kepes JJ, Rubinstein LJ, Eng LF. Pleomorphic xanthoastrocytoma: a distinctive meningocerebral glioma of young subjects with relatively favourable prognosis. A study of 12 cases. *Cancer* 1979;44:1839-52.

Khalid MH, Yagi N, Hiura T, Shibata S. Immunohistochemical analysis of p53 and p21 in human primary glioblastomas in relation to proliferative potential and apoptosis. *Brain Tumor Pathol* 1998;15:89-94.

Kirfel J, Kelter M, Cancela LM, Price PA, Schule R. Identification of a novel negative retinoic acid responsive element in the promoter of the human matrix Gla protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2227-32.

Kleihues P, Davis RL, Ohgaki H, Burger PC, Westphal MM, Cavenee WK. Diffuse astrocytoma. In: Kleihues P, Cavenee WK (eds). *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. International Agency for Research on Cancer Press, Lyon 2000:22-6.

Kluwe L, Hagel C, Tatagiba M, Thomas S, Stavrou D, Ostertag H, von Deimling A, Mautner VF. Loss of NF1 alleles distinguish sporadic from NF1-associated pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:917-20.

Knight J. When the chips are down. *Nature* 2001;410:860-1.

Knowles MA, Habuchi T, Kennedy W, Cuthbert-Heavens D. Mutation spectrum of the 9q34 tuberous sclerosis gene TSC1 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 2003;63:7652-6.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;6:820-3.

Kollara A, Kahn HJ, Marks A, Brown TJ. Loss of androgen receptor associated protein 70 (ARA70) expression in a subset of HER2-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2001;67:245-53.

Kordek R, Biernat W, Sapieja W, Alwasiak J, Liberski PP. Pleomorphic xanthoastrocytoma with a gangliomatous component: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Acta Neuropathol (Berl)* 1995;89:194-7.

Kossakowska AE, Urbanski SJ, Janowska-Wieczorek A: Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors—expression, role and regulation in human malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2000;39:485–493.

Kothapalli D, Grotendorst GR. CTGF modulates cell cycle progression in cAMP-arrested NRK fibroblasts. *J Cell Physiol* 2000;182:119-26.

Kubo M, Kikuchi K, Nashiro K, *et al.* Expression of fibrogenic cytokines in desmoplastic malignant melanoma. *Br J Dermatol* 1998;139:192-7.

Kurtz A, Schulte AM, Wellstein A. Pleiotrophin and midkine in normal development and tumor biology. *Crit Rev Oncol* 1995;6:151-77.

Kurtz A, Spitzer E, Zschiesche W, Wellstein A, Grosse R. Local control of mammary gland differentiation: mammary-derived growth inhibitor and pleiotrophin. *Biochem Soc Symp* 1998;63:51-69.

Lach B, Duggal N, DaSilva VF, Benoit BG. Association of pleomorphic xanthoastrocytoma with cortical dysplasia and neuronal tumors. A report of three cases. *Cancer*. 1996;78:2551-63.

Lang FF, Miller DC, Pisharody S, Koslow M, Newcomb EW. High frequency of p53 protein accumulation without p53 gene mutation in human juvenile pilocytic, low grade and anaplastic astrocytomas. *Oncogene* 1994;9:949-54.

Lantos PL, Vamdenberg SR, Kleihues P. Tumours of the nervous systemn. In: Graham DI, Lantos PL (eds) *Greenfield's neuropathology* , 6th edn, vol 2. Arnold. London, 1996:583-875.

Lasko D, Cavenee W, Nordenskjold M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet* 1991;25:281-314.

Lazova R, Moynes R, May D, Scott G. LN-2 (CD74). A marker to distinguish atypical fibroxanthoma from malignant fibrous histiocytoma. *Cancer* 1997;79:2115-24.

Lein M, Nowak L, Jung K, Koenig F, Schnorr D, Loening SA. Metalloproteinsaen (MMP-1, MMP-3) and ihre Inhibitoren (TIMP) im Blutplasma bei Patienten mit Prostatakarzinom. *Der Urologe (A)* 1998;37:377-81.

Leissner P, Verjat T, Bachelot T, Paye M, Krause A, Puisieux A, Mouglin B. Prognostic significance of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in lymph node- and hormone receptor-positive breast cancer. *BMC Cancer* 2006;6:216.

Leng L, Metz CN, Fang Y, *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 2003;197:1467-1476.

Levedakou EN, Strohmeyer TG, Effert PJ, Liu ET. Expression of the matrix Gla protein in urogenital malignancies. *Int J Cancer* 1992;52:534-7.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.

Li YS, Ramsay DA, Fan YS, Armstrong RF, Del Maestro RF. Cytogenetic evidence that a tumor suppressor gene in the long arm of chromosome 1 contributes to glioma growth. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;84:46-50.

Lin HS, Berry GJ, Fee WE Jr, Terris DJ, Sun Z. Identification of tyrosine kinases overexpressed in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:311-6.

Lindboe CF, Cappelen J, Kepes JJ. Pleomorphic xanthoastrocytoma as a component of a cerebellar ganglioglioma: case report. *Neurosurgery* 1992;31:353-5.

Lindsay RM. Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996;351:365-73.

Liu FY, Qi JP, Xu FL, Wu AP. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of gastrointestinal stromal tumor. *World J Gastroenterol* 2006a;12:4161-5.

Liu L, Li Z, Feng G, You W, Li J. Expression of connective tissue growth factor is in agreement with the expression of VEGF, VEGF-C, -D and associated with shorter survival in gastric cancer. *Pathol Int* 2007;57:712-8.

Liu P, Ramachandran S, Ali Seyed M, Scharer CD, Laycock N, Dalton WB, Williams H, Karanam S, Datta MW, Jaye DL, Moreno CS. Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2006b;66:4011-9.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (eds). WHO classification of tumours of the central nervous system. International Agency for Research on Cancer Press, Lyon 2007.

Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:11-21.

Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993;362:847-9.

Macaulay RJ, Jay V, Hoffman HJ, Becker LE. Increased mitotic activity as a negative prognostic indicator in pleomorphic xanthoastrocytoma. Case report. *J Neurosurg* 1993;79:761-8.

-
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 2001;15:1311-33.
- Majdic O, Stockl J, Pickl WF, Bohuslav J, Strobl H, Scheinecker C, Stockinger H, Knapp W. Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34. *Blood* 1994;83:1226-34.
- Marton E, Feletti A, Orvieto E, Longatti P. Malignant progression in pleomorphic xanthoastrocytoma: personal experience and review of the literature. *J Neurol Sci* 2007;252:144-53.
- Matsumine A, Shintani K, Kusuzaki K, Matsubara T, Satonaka H, Wakabayashi T, Iino T, Uchida A. Expression of decorin, a small leucine-rich proteoglycan, as a prognostic factor in soft tissue tumors. *J Surg Oncol* 2007;96:411-8.
- Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994;14:2066-76.
- Mauviel A, Korang K, Santra M, Tewari D, Uitto J, Iozzo RV. Identification of a bimodal regulatory element encompassing a canonical AP-1 binding site in the proximal promoter region of the human decorin gene. *J Biol Chem* 1996;271:24824-9.
- McCormack BM, Miller DC, Budzilovich GN, Voorhees GJ, Ransohoff J. Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults--1977-1988. *Neurosurgery* 1992;31:636-42.
- Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG. Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:400-8.
- Melotti P, Calabretta B. Ets-2 and c-Myb act independently in regulating expression of the hematopoietic stem cell antigen CD34. *J Biol Chem* 1994;269:25303-9.
- Milner J, Medcalf EA. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991;65:765-74.
- Mitchell EL, White GR, Santibanez-Koref MF, Varley JM, Heighway J. Mapping of gene loci in the Q13-Q15 region of chromosome 12. *Chromosome Res* 1995;3:261-2.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992;69:1237-45.
- Morris JF, Rauscher FJ 3rd, Davis B, Klemsz M, Xu D, Tenen D, Hromas R. The myeloid zinc finger gene, MZF-1, regulates the CD34 promoter in vitro. *Blood* 1995;86:3640-7.
- Moscatello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 1998;101:406-12.
- Moussad EE, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 2000;71:276-92.

Muller-Husmann G, Gloor S, Schachner M. Functional characterization of beta isoforms of murine Na,K-ATPase. The adhesion molecule on glia (AMOG/beta 2), but not beta 1, promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem* 1993;268:26260-7.

Munoz EL, Eberhard DA, Lopes MBS, Schneider BF, Gonzalez-Fernandez F, VandenBerg SR. Proliferative activity and p53 mutation as prognostic indicators in pleomorphic xanthoastrocytoma. A clinicopathologic study of six cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:606.

Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP, Van Maldergem L, Zierysen F, Yuksel B, Gardiner RM, Chung E. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* 1999;21:142-4.

Muracciole X, Romain S, Dufour H, Palmari J, Chinot O, Ouafik L, Grisoli F, Branger DF, Martin PM. PAI-1 and EGFR expression in adult glioma tumors: toward a molecular prognostic classification. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:592-8.

Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T, Deuel TF, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 1995;55:1792-7.

Nakajima T, Kumabe T, Shamoto H, Watanabe M, Suzuki H, Tominaga T. Malignant transformation of pleomorphic xanthoastrocytoma. *Acta Neurochir Wien* 2006;148:67-71.

Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, Konishi N. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2005;85:165-75.

Nakamura M, Shimada K, Ishida E, Higuchi T, Nakase H, Sakaki T, Konishi N. Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors. *Neuro Oncol* 2007;9:113-23.

Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* 2001a;11:159-68.

Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest* 2001b;81:77-82.

Nakamura Y, Komano H, Nakauchi H. Two alternative forms of cDNA encoding CD34. *Exp Hematol* 1993;21:236-42.

Nakopoulou L, Giannopoulou I, Lazaris ACh, Alexandrou P, Tsirmpa I, Markaki S, Panayotopoulou E, Keramopoulos A. The favorable prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 protein overexpression in breast cancer cells. *APMIS* 2003;111:1027-36.

Nasuha NA, Daud AH, Ghazali MM, Yusoff AA, Zainuddin N, Abdullah JM, Mutum SS, Biswal BM, Ariff AR, Sulong S, Isa MN. Molecular genetic analysis of anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma. *Asian J Surg* 2003;26:120-5.

Natkunam Y, Rouse RV, Zhu S, Fisher C, van De Rijn M. Immunoblot analysis of CD34 expression in histologically diverse neoplasms. *Am J Pathol* 2000;156:21-7.

Newton TR, Parsons PG, Lincoln DJ, Cummings MC, Wyld DK, Webb PM, Green AC, Boyle GM. Expression profiling correlates with treatment response in women with advanced serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006;119:875-83.

Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 1986;46:2203-7.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-8.

Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, Hartmann C, McLaughlin ME, Batchelor TT, Black PM, von Deimling A, Pomeroy SL, Golub TR, Louis DN. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* 2003;63:1602-7.

Oelmann E, Herbst H, Zuhlsdorf M, Albrecht O, Nolte A, Schmitzmann C, Manzke O, Diehl V, Stein H, Berdel WE. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 is an autocrine and paracrine survival factor, with additional immune-regulatory functions, expressed by Hodgkin/ Reed-Sternberg cells. *Blood* 2002;99:258-267.

Offersen BV, Riisbro R, Knoop A, Brüner N, Overgaard J; Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG) Tumor Biology Committee. Lack of association between level of Plasminogen Activator Inhibitor-1 and estimates of tumor angiogenesis in early breast cancer. *Acta Oncol* 2007;46:782-91.

Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M, Reichel MB, Mariani L, Gehring M, Petersen I, Holl T, Wiestler OD, Kleihues P. Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinog* 1993;8:74-80.

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

O'Leary DD, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:65-73.

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992;358:80-3.

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002;19:607-14.

Ono Y, Tamiya T, Ichikawa T, Matsumoto K, Furuta T, Ohmoto T, Akiyama K, Seki S, Ueki K, Louis DN. Accumulation of wild-type p53 in astrocytomas is associated with increased p21 expression. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997;94:21-7.

Oren M, Damalas A, Gottlieb T, Michael D, Taplick J, Leal JF, Maya R, Moas M, Seger R, Taya Y, Ben-Ze'Ev A. Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973:374-83.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:2766-70.

Oskam NT, Bijleveld EH, Hulsebos TJ. A region of common deletion in 22q13.3 in human glioma associated with astrocytoma progression. *Int J Cancer* 2000;85:336-9.

Pan LH, Beppu T, Kurose A, *et al.* Neoplastic cells and proliferating endothelial cells express connective tissue growth factor (CTGF) in glioblastoma. *Neurol Res* 2002;24:677-883.

Paulus W, Lisle DK, Tonn JC, Wolf HK, Roggendorf W, Reeves SA, Lous DN. Molecular genetic alterations in pleomorphic xanthoastrocytoma. *Acta Neuropathol* 1996;91:293-7.

Pei XH, Xiong Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 2005;24:2787-95.

Peraud A, Kreth FW, Wiestler OD, Kleihues P, Reulen HJ Prognostic impact of TP53 mutations and P53 protein overexpression in supratentorial WHO grade II astrocytomas and oligoastrocytomas. *Clin Cancer Res* 2002;5:1117-24.

Peria FM, Neder L, Marie SK, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Colli BO, Gabbai AA, Malheiros SM, Zago MA, Panepucci RA, Moreira-Filho CA, Okamoto OK, Carlotti CG Jr. Pleiotrophin expression in astrocytic and oligodendroglial tumors and its correlation with histological diagnosis, microvascular density, cellular proliferation and overall survival. *J Neurooncol* 2007;84:255-61.

Perry A, Giannini C, Scheithauer BW, Rojiani AM, Yachnis AT, Seo IS, Johnson PC, Kho J, Shapiro S. Composite pleomorphic xanthoastrocytoma and ganglioglioma: report of four cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1997b;21:763-71.

Perry A, Scheithauer BW, Nascimento AG. The immunophenotypic spectrum of meningeal hemangiopericytoma: a comparison with fibrous meningioma and solitary fibrous tumor of meninges. *Am J Surg Pathol* 1997a;21:1354-60.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007;28:622-9.

Polette M, Clavel C, Cockett M, Girod de Bentzmann S, Murphy G, Birembaut P. Detection and localization of mRNAs encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. *Invasion Metastasis* 1993;13:31-7.

Prayson RA, Morris HH 3rd. Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:1082-6.

Proudfoot D, Shanahan CM. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology, Carlton*. 2006;11:455-61.

Ransom DT, Ritland SR, Kimmel DW, Moertel CA, Dahl RJ, Scheithauer BW, Kelly PJ, Jenkins RB. Cytogenetic and loss of heterozygosity studies in ependymomas, pilocytic astrocytomas, and oligodendrogliomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;5:348-56.

Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD. Molecular pathogenesis of human gliomas. *Curr Opin Oncol* 1999;11:162-7.

Rauvala H. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J* 1989;8:2933-41.

Rebmann V, Dornmair K, Grosse-Wilde H. Biochemical analysis of plasma-soluble invariant chains and their complex formation with soluble HLA-DR. *Tissue Antigens* 1997;49:438-42.

Reed CC, Waterhouse A, Kirby S, Kay P, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV. Decorin prevents metastatic spreading of breast cancer. *Oncogene* 2005;24:1104-10.

Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* 2004;82:656-70.

Reifenberger G, Kramm C, Bilzer T, Kiwit JC. Gliale Neoplasien. In: Ganten D, Ruckpaul K. *Handbuch der molekularen Medizin, Band 5: Erkrankungen des Zentralnervensystems.* (1999a) Berlin, Heidelberg, Springer Verlag.

Reifenberger G, Kros JM, Burger, PC, Louis DN, Collins VP. Oligodendroglial tumours and mixed gliomas. In: Kleihues P, Cavenee WK, eds. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. World Health Organization Classification of Tumours.* Lyon, IARC Press, 2000:55-70.

Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 1993;53:2736-9.

Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res* 1994a;54:4299-303.

Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletion on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994b;145:1175-90.

Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers JM, Oberstraß J, An HX, Niederacher D, Wechsler W, Reifenberger G. Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:824-33.

Reifenberger G, Weber T, Weber RG, Wolter M, Brandis A, Kuchelmeister K, Pilz P, Reusche E, Lichter P, Wiestler OD. Chordoid glioma of the third ventricle: Immunohistochemical and molecular genetic characterization of a novel tumor entity. *Brain Pathol*, 1999b;9:617-26.

Rigg AS, Lemoine NR. Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect in vivo. *Cancer Gene Ther* 2001;8:869-78.

Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 1999;18:5311-7.

Ruano Y, Mollejo M, Ribalta T, Fiaño C, Camacho FI, Gómez E, de Lope AR, Hernández-Moneo JL, Martínez P, Meléndez B. Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling. *Mol Cancer* 2006;5:39.

Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochem Biophys Acta* 1998;1378:F115-77.

Rubio MP, Correa KM, Ramesh V, MacCollin MM, Jacoby LB, von Deimling A, Gusella JF, Louis DN. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas. *Cancer Res* 1994;54:45-7.

Sager R. Genetic suppression of tumor formation. *Adv Cancer Res* 1985;44:43-68.

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986;324:163-6.

Sakakibara T, Hibi K, Kodera Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A. Plasminogen activator inhibitor-1 as a potential marker for the malignancy of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:1375-8.

Sakakibara T, Hibi K, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y, Ito K, Nakao A. Plasminogen activator inhibitor-1 as a potential marker for the malignancy of gastric cancer. *Cancer Sci* 2006;97:395-9.

Sala-Torra O, Gundacker HM, Stirewalt DL, Ladne PA, Pogossova-Agadjanyan EL, Slovak ML, Willman CL, Heimfeld S, Boldt DH, Radich JP. Connective tissue growth factor (CTGF) expression and outcome in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007;109:3080-3.

Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, Helin HJ, Schraml P, Kallioniemi OP, Kononen J. Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res* 2000;60:6617-22.

Sambrook, J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:9.17-9.19.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1977;24:104-8.

Sanoudou D, Tingby O, Ferguson-Smith MA, Collins VP, Coleman N. Analysis of pilocytic astrocytoma by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 2000;82:1218-22.

Santra M, Mann DM, Mercer EW, Skorski T, Calabretta B, Iozzo RV. Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Clin Invest* 1997;100:149-57.

Santra M, Skorski T, Calabretta B, Lattime EC, Iozzo RV. De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7016-20.

Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG. Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics* 1992;12:788-94.

Satyamoorthy K, Oka M, Herlyn M. An antisense strategy for inhibition of human melanoma growth targets the growth factor pleiotrophin. *Pigment Cell Res* 2000;13:87-93.

Sawyer JR, Roloson GJ, Chadduck WM, Boop FA. Cytogenetic findings in a pleomorphic xanthoastrocytoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;55:225-30.

Sawyer JR, Thomas EL, Roloson GJ, Chadduck WM, Boop FA. Telomeric associations evolving to ring chromosomes in a recurrent pleomorphic xanthoastrocytoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;60:152-7.

Schönherr E, Levkau B, Schaefer L, Kresse H, Walsh K. Decorin affects endothelial cells by Akt-dependent and -independent pathways. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:149-52.

Schönherr E, Levkau B, Schaefer L, Kresse H, Walsh K. Decorin-mediated signal transduction in endothelial cells. Involvement of Akt/protein kinase B in up-regulation of p21(WAF1/CIP1) but not p27(KIP1). *J Biol Chem* 2001;276:40687-92.

Schramm A, Schulte JH, Astrahantseff K, Apostolov O, Limpt V, Sieverts H, Kuhfittig-Kulle S, Pfeiffer P, Versteeg R, Eggert A. Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2005;228:143-53.

Schulte A, Wellstein A. Pleiotrophin and related molecules. In: Bicknell R, Lewis CM, Ferrara N (eds). *Tumor angiogenesis*. New York, Oxford, University Press, 1997:273-89.

Schultz RM, Silberman S, Persky B, Bajkowski AS, Carmichael DF. Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res* 1988;48:5539-45.

Scwab GM, Fujioka S, Schmidt C, Li Z, Frederick WA, Yang W, Yokoi K, Evans DB, Abbruzzese JL, Hess KR, Zhang W, Fidler IJ, Chiao PJ. Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:440-9.

Seidler DG, Goldoni S, Agnew C, Cardi C, Thakur ML, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV. Decorin protein core inhibits in vivo cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2006;281:26408-18.

Senner V, Schmidpeter S, Braune S, Puttmann S, Thanos S, Bartsch U, Schachner M, Paulus W. AMOG/beta2 and glioma invasion: does loss of AMOG make tumour cells run amok? *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003;29(4):370-7.

Shakunaga T, Ozaki T, Ohara N, Asaumi K, Doi T, Nishida K, Kawai A, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H. Expression of connective tissue growth factor in cartilaginous tumors. *Cancer* 2000;89(7):1466-73.

Shakunaga T, Ozaki T, Ohara N, Asaumi K, Doi T, Nishida K, Kawai A, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H. Expression of connective tissue growth factor in cartilaginous tumors. *Cancer* 2000;89:1466-73.

Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:94-9.

Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-5.

Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993;73:1059-65.

Shi YF, Zhang Q, Cheung PY, Shi L, Fong CC, Zhang Y, Tzang CH, Chan BP, Fong WF, Chun J, Kung HF, Yang M. Effects of rhDecorin on TGF-beta1 induced human hepatic stellate cells LX-2 activation. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:1587-95.

Shimo T, Kubota S, Kondo S, Nakanishi T, Sasaki A, Mese H, Matsumura T, Takigawa M. Connective tissue growth factor as a major angiogenic agent that is induced by hypoxia in a human breast cancer cell line. *Cancer Lett* 2001a;174:57-64.

Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, Asano M, Sasaki A, Kanyama M, Kuboki T, Matsumura T, Takigawa M. Involvement of CTGF, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, in tumor angiogenesis. *Oncology* 2001b;61:315-22.

Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol* 1992;148:267-71.

Smit JW, van der Pluijm G, Romijn HA, Lowik CW, Morreau H, Goslings BM. Degradation of extracellular matrix by metastatic follicular thyroid carcinoma cell lines: role of the plasmin activation system. *Thyroid* 1999;9:913-9.

Soussi T, Kato S, Levy PP and Ishioka C. Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum. Mutat* 2005;25:6-17.

Sreenan JJ, Prayson RA. Gliosarcoma. A study of 13 tumors, including p53 and CD34 immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:129-33.

Ständer M, Naumann U, Dumitrescu L, Heneka M, Loschmann P, Gulbins E, Dichgans J, Weller M. Decorin gene transfer-mediated suppression of TGF-beta synthesis abrogates experimental malignant glioma growth in vivo. *Gene Ther* 1998;5:1187-94.

Ständer M, Naumann U, Wick W, Weller M. Transforming growth factor-beta and p-21: multiple molecular targets of decorin-mediated suppression of neoplastic growth. *Cell Tissue Res* 1999;296:221-7.

Starlets D, Gore Y, Binsky I, Haran M, Harpaz N, Shvidel L, Becker-Herman S, Berrebi A, Shachar I. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* 2006;107:4807-16.

Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, Fukushima P, Kehrl J, Marti G, Ptaszynski K, Wang J, Stetler-Stevenson WG: Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood* 1997, 89:1708–1715.

Takeda A, Onodera H, Sugimoto A, Itoyama Y, Kogure K, Rauvala H, Shibahara S. Induction of heparin-binding growth-associated molecule expression in reactive astrocytes following hippocampal neuronal injury. *Neuroscience* 1995;68:57-64.

Takei H, Bhattacharjee MB, Adesina AM. Chordoid glioma of the third ventricle: Report of a case with cytologic features and utility during intraoperative consultation. *Acta Cytol* 2006;50:691-6.

Tanaka K, Iwamoto Y, Ito Y, Ishibashi T, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Sugioka Y. Cyclic AMP-regulated synthesis of the tissue inhibitors of metalloproteinases suppresses the invasive potential of the human fibrosarcoma cell line HT1080. *Cancer Res* 1995;55:2927-35.

Tews B, Felsberg J, Hartmann C, Kunitz A, Hahn M, Toedt G, Neben K, Hummerich L, von Deimling A, Reifenberger G, Lichter P. Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int J Cancer* 2006;119:792-800.

Tews B, Roerig P, Hartmann C, Hahn M, Felsberg J, Blaschke B, Sabel M, Kunitz A, Toedt G, Neben K, Benner A, Deimling A, Reifenberger G, Lichter P. Hypermethylation and transcriptional downregulation of the CITED4 gene at 1p34.2 in oligodendroglial tumours with allelic losses on 1p and 19q. *Oncogene*. 2007;26:5010-6.

Toole BP, Lowther DA. The effect of chondroitin sulphate-protein on the formation of collagen fibrils in vitro. *Biochem J* 1968;109:857-66.

Troup S, Njue C, Kliever EV, Parisien M, Roskelley C, Chakravarti S, Roughley PJ, Murphy LC, Watson PH. Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:207-14.

Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, Kolár Z. Differentiation of tumours of ductal and lobular origin: II. Genomics of invasive ductal and lobular breast carcinomas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005;149:63-8.

Turgeon VL, Houenou LJ. The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 1997;25:85-95.

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, *et al.* Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984;309:418-25.

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-12.

Vajtai I, Varga Z, Aguzzi A. Pleomorphic xanthoastrocytoma with gangliogliomatous component. *Pathol Res Pract* 1997;193:617-21.

van den Boom J, Wolter M, Blaschke B, Knobbe CB, Reifenberger G. Identification of novel genes associated with astrocytoma progression using suppression subtractive hybridization and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Int J Cancer*. 2006;119:2330-8.

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

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2257-61.

von Deimling A, Bender B, Jahnke R, Waha A, Kraus J, Albrecht S, Wellenreuther R, Fassbender F, Nagel J, Menon AG, *et al.* Loci associated with malignant progression in astrocytomas: a candidate on chromosome 19q. *Cancer Res* 1994;54:1397-401.

von Deimling A, Louis DN, Menon AG, von Ammon K, Petersen I, Ellison D, Wiestler OD, Seizinger BR. Deletions on the long arm of chromosome 17 in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol (Berl)* 1993;86:81-5.

Wadhwa S, Nag TC, Jindal A, Kushwaha R, Mahapatra AK, Sarkar C. Expression of the neurotrophin receptors Trk A and Trk B in adult human astrocytoma and glioblastoma. *J Biosci* 2003;28:181-8.

Wang Y, Hagel C, Hamel W, Muller S, Kluwe L, Westphal M. Trk A, B, and C are commonly expressed in human astrocytes and astrocytic gliomas but not by human oligodendrocytes and oligodendroglioma. *Acta Neuropathol (Berl)* 1998;96:357-64.

Watanabe M, Zingg BC, Mohrenweiser HW. Molecular analysis of a series of alleles in humans with reduced activity at the triosephosphate isomerase locus. *Am J Hum Genet* 1996;58:308-16.

Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Komine C, Yokoyama T. Deregulation of the TP53/p14ARF tumor suppressor pathway in low-grade diffuse astrocytomas and its influence on clinical course. *Clin Cancer Res* 2003;13:4884-90.

-
- Watanabe T, Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promotor hypermethylation and homozygous deletion of the p14^{ARF} and p16^{INK4a} genes in oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* 2001;101:185-9.
- Watkins D, Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Poisson M, Delattre JY, Rouleau GA. Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human gliomas does not inactivate the neurofibromatosis type 2 gene. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;92:73-8.
- Weber JL. Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Curr Opin Biotechnol* 1990;1:166-71.
- Weber RG, Hoischen A, Ehrler M, Zipper P, Kaulich K, Blaschke B, Becker AJ, Weber-Mangal S, Jauch A, Radlwimmer B, Schramm J, Wiestler OD, Lichter P, Reifenberger G. Frequent loss of chromosome 9, homozygous CDKN2A/p14(ARF)/CDKN2B deletion and low TSC1 mRNA expression in pleomorphic xanthoastrocytomas. *Oncogene* 2007;26:1088-97.
- Wegrowski Y, Paltot V, Gillery P, Kalis B, Randoux A, Maquart FX. Stimulation of sulphated glycosaminoglycan and decorin production in adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin-4. *Biochem J* 1995;307:673-8.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81:323-30.
- Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991;254:1138-46.
- Weiss SW, Nickoloff BJ. CD-34 is expressed by a distinctive cell population in peripheral nerve, nerve sheath tumors, and related lesions. *Am J Surg Pathol* 1993;17:1039-45.
- Whitley BR, Palmieri D, Twerdi CD, Church FC. Expression of active plasminogen activator inhibitor-1 reduces cell migration and invasion in breast and gynecological cancer cells. *Exp Cell Res* 2004;296:151-62.
- Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly. *Int Rev Cytol* 2000;196:177-244.
- Wilkinson DG. Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:155-64.
- Wolter M, Reifenberger J, Blaschke B, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP, Reifenberger G. Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16INK4a), p14ARF, and CDKN2B (MTS2, p15INK4b) tumor suppressor genes. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:1170-80.
- Wu DG, Wang LH, Sato GH, West KA, Harris WR, Crabb JW, Sato JD. Human epidermal growth factor (EGF) receptor sequence recognized by EGF competitive monoclonal antibodies. Evidence for the localization of the EGF-binding site. *J Biol Chem* 1989;264:17469-75.

Wu H, Barusevicius A, Babb J, Klein-Szanto A, Godwin A, Elenitsas R, Gelfand JM, Lessin S, Seykora JT. Pleiotrophin expression correlates with melanocytic tumor progression and metastatic potential. *J Cutan Pathol* 2005;32:125-30.

Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993;7:1126-32.

Xaus J, Comalada M, Cardo M, Valledor AF, Celada A. Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27(Kip1) and p21(Waf1). *Blood* 2001;98:2124-33.

Xie D, Yin D, Wang HJ, *et al.* Levels of expression of CYR61 and CTGF are prognostic for tumor progression and survival of individuals with gliomas. *Clin Cancer Res* 2004;10:2072-81.

Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992;71:505-14.

Yamakawa T, Kurosawa N, Kadomatsu K, Matsui T, Itoh K, Maeda N, Noda M, Muramatsu T. Levels of expression of pleiotrophin and protein tyrosine phosphatase zeta are decreased in human colorectal cancers. *Cancer Lett* 1999;135:91-6.

Yeh HS, Chen H, Manyak SJ, Swift RA, Campbell RA, Wang C, Li M, Lee HJ, Waterman G, Gordon MS, Ma J, Bonavida B, Berenson JR. Serum pleiotrophin levels are elevated in multiple myeloma patients and correlate with disease status. *Br J Haematol* 2006;133:526-9.

Yin XL, Hui AB, Liong EC, Ding M, Chang AR, Ng HK. Genetic imbalances in pleomorphic xanthoastrocytoma detected by comparative genomic hybridization and literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;132:14-9.

Young AN, Amin MB, Moreno CS, Lim SD, Cohen C, Petros JA, Marshall FF, Neish AS. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am J Pathol* 2001;158:1639-51.

Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002;277:4388-94.

Zhang N, Zhong R, Wang ZY, Deuel TF. Human breast cancer growth inhibited in vivo by a dominant negative pleiotrophin mutant. *J Biol Chem* 1997;272:16733-6.

Zhu JX, Goldoni S, Bix G, Owens RT, McQuillan DJ, Reed CC, Iozzo RV. Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis. *J Biol Chem* 2005;280:32468-79.

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AII	diffuses Astrozytom
ACTG	γ Actin
AO	anaplastisches Oligodendrogliom
AOA	anaplastisches Oligoastrozytom
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bq)
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
GBM	Glioblastom
h	Stunden
HE	Hematotoxylin-Eosin
HPF	<i>high power field</i> (Objektiv 40x)
kD	Kilo-Dalton
Ki67 (MIB1)	Proliferationsmarker
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
M	Molar
m	milli
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
μ	mikro
n	nano
OA	Oligoastrozytom
OD	optische Dichte
p	pico
PA	pilozytisches Astrozytom
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PXA	pleomorphes Xanthoastrozytom

PXA waf	pleomorphes Xanthoastrozytom mit anaplastischen Merkmalen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
SSC	<i>Standard Sodium Citrate buffer</i>
SSCP	<i>single-strand-conformation-polymorphism</i>
SSH	suppressive subtraktive Hybridisierung
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N-N-N-N-Tetraethylmethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	<i>Unit</i> (Einheit des enzymatischen Umsatzes)
V	Volt
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	zentrales Nervensystem

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Labor von Prof. Dr. Guido Reifenberger am Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Guido Reifenberger für die interessante Fragestellung, die intensive Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken. Herrn Prof. Dr. Ulrich Rütger danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit durch die Übernahme des Korreferates.

Bei allen Einsendern von Tumorproben, ohne die diese Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre, möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeiten möchte ich im Besonderen der Deutschen Krebshilfe danken.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Neuropathologie für das gute Arbeitsklima und die stets freundliche Hilfsbereitschaft. Frau. B. Friedensdorf sowie Frau C. Mähler danke ich für die technische Unterstützung. Besonders danken möchte ich Herrn Dr. P. Roerig, Herrn Dr. J. van den Boom sowie Herrn Dr. R. Büschges und insbesondere Frau Dr. M. Wolter, die mir stets mit Rat und Tat und guter Laune zur Seite gestanden haben und für eine angenehme Atmosphäre innerhalb des Labors und des Büros gesorgt haben.

Meinen Eltern sowie meinen verwandten Nachbarn möchte ich für ihr Interesse an meiner Arbeit sowie für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Hans Peter, der mich ständig motiviert und unterstützt hat, der immer Verständnis für mich und meine Launen hat und der sich liebevoll um unsere Kinder kümmert. Unseren Kindern Leonie und Moritz danke ich dafür, dass sie DA sind!

11 Anhang

Gene, die laut Expression-Array stärker in PXA im Vergleich zu AII exprimiert wurden

Koor- dinate	Lokali- sation	Genname
A01h	11	INTERFERON-INDUCIBLE PROTEIN 9-27
A04h	9q34	neurogenic locus notch protein homolog 1 precursor; translocation-associated notch protein tan-1 IFITM
A05g	9q34	GAMMA-INTERFERON-INDUCIBLE PROTEIN (IP-30)
A09j	nb	extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3); MAP kinase isoform p97 (p97-MAPK)
A09l	6p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A); melanoma differentiation-associated protein 6 (MDA6); CDK-interacting protein 1 (CIP1); WAF1
A10b	17q21	nucleoside diphosphate kinase A (NDK A); NDP kinase A; tumor metastatic process-associated protein; metastasis inhibition factor NM23
A10f	22q11	MMP-11; stromelysin-3
A11g	nb	PIG7
A13a	5q21	colorectal mutant cancer protein (MCC)
A14a	16q22.1	cadherin1 (CDH1); epithelial cadherin precursor (E-cadherin; CDHE); uvomorulin (UVO); CAM 120/80
B01a	nb	High affinity glutamate transporter; EAAC1 EXCITATORY AMINO ACID TRANSPORTER 3
B08l	6p21.3	ALLOGRAFT INFLAMMATORY FACTOR-1 (AIF-1) (IONIZED CALCIUM BINDING ADAPTER MOLECULE 1).
B10c	5q35	c-jun N-terminal kinase 2; stress-activated protein kinase JNK2; JNK-55
C05k	5q31	purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha (PURA)
D01e	2q31	integrin alpha 4 subunit precursor (ITGA4); VLA4; CD49D antigen
D01m	Xq28	sex gene
D02g	nb	OSTEOBLAST SPECIFIC FACTOR 2 (OSF-2OS)
D05l	1q21	LEUKOCYTE IGG RECEPTOR (FC-GAMMA-R)
D05m	13q14	PURINERGIC RECEPTOR P2Y5
D06d	17p13	integrin alpha E subunit precursor (ITGAE); mucosal lymphocyte-1 antigen; hml-1 antigen; CD103 antigen
D08j	21q22	interferon-gamma (IFN-gamma) receptor beta subunit precursor; IFN-gamma accessory factor 1 (AF1); IFN-gamma transducer 1 (IFNGT1)
D08k	19q13	DNAX ACTIVATION PROTEIN 12
D08m	4q28-31	MICROSOMAL GLUTATHIONE S-TRANSFERASE II (EC 2.5.1.18) (MICROSOMAL GST-II).
D09d	5q31	alpha1 catenin (CTNNA1); cadherin-associated protein; alpha E-catenin
D11b	12q23	bone proteoglycan II precursor (PGS2); decorin (DCN)
E04c	6q23	connective tissue growth factor precursor (CTGF)
E05c	3p23-21	teratocarcinoma-derived growth factor 1 (TDGF1); teratocarcinoma-derived growth factor 3 (TDGF3)
E05l	12p13	alpha-2-macroglobulin precursor (alpha-2-M)
E05m	2p12	Ig rearranged gamma chain
E07m	5q32	HLA-DR ANTIGENS ASSOCIATED INVARIANT CHAIN (P33)
E08h	20p12	Jagged 1
E08m	nb	GLIOMA PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN (RTVP-1 PROTEIN)
E08n	2q31	procollagen 3 alpha 1 subunit precursor (COL3A1)
E09c	nb	acidic fibroblast growth factor (AFGF) + heparin-binding growth factor 1 precursor (HBGF-1) + beta-endothelial cell growth factor
E10b	7q33	pleiotrophin precursor (PTN) + osteoblast specific factor 1 (OSF-1) + heparin-binding neurite outgrowth promoting factor 1 (HBNF-1)
E10j	Xp11	metalloproteinase inhibitor 1 precursor (TIMP1); erythroid potentiating activity (EPA); fibroblast collagenase inhibitor
E10m	6p21	MHC CLASS II HLA-DR-BETA (DR2-DQW1/DR4 DQW3) PRECURSOR (DR2-DQW1/DR4 DQW3).
E12m	6p21	CLASS II HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, M ALPHA CHAIN PRECURSOR
E13j	2q33	glia-derived nexin precursor (GDN); protease nexin I (PN-1); protease inhibitor 7
E13l	6p21	HLA CLASS II HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, DR ALPHA CHAIN PRECURSOR
F03b	2q34	fibronectin precursor (FN)
F03g	12q13	type II cytoskeletal 8 keratin; cytokeratin 8 (K8; CK 8)
F04g	10p13	vimentin (VIM)
F05a	6q21	laminin alpha-4 subunit precursor (LAMA4)
F09g	6q24	GRAVIN

Gene, die laut Expression-Array stärker in AII im Vergleich zu PXA exprimiert wurden

A01a	5q21	APC
A02e	4q12	platelet-derived growth factor receptor alpha subunit (PDGFRA); CD140A antigen
A03c	8	c-myc oncogene
A08e	nb	proto-oncogene c-src1 tyrosine kinase domain
A09b	nb	c-myc purine-binding transcription factor puf; nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDK B) + nm23-H2S
A09e	18p11	c-yes-1 proto-oncogene
A09l	6p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A); melanoma differentiation-associated protein 6 (MDA6); CDK-interacting protein 1 (CIP1); WAF1
A10m	nb	CDC10 protein homolog
A12b	3p21	LUCA15 PUTATIVE TUMOR SUPPRESSOR
A12d	7p12	epidermal growth factor receptor (EGFR)
A12n	nb	G1 TO S PHASE TRANSITION PROTEIN 1 HOMOLOG (GTP-BINDING PROTEIN GST1-HS).
A13c	11q13	fos-related antigen (FRA1)
B03l	1p31	DPDE4; cAMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B (EC 3.1.4.17) (PDE32)
B04a	nb	ATP SYNTHASE COUPLING FACTOR 6, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 3.6.1.34) (F6).
B05l	14q24-31	Calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)
C02l	1p36	p73 (monoallelically expressed p53-related protein)
C05d	12q13	GADD153=growth arrest and DNA-damage-inducible
C05h	Xq24-25	ubiquitin-conjugating enzyme E2 17-kDa (UBE2A); ubiquitin-protein ligase; ubiquitin carrier protein; HR6A
C10g	2q31-33	DNA mismatch repair protein PMS1 (PMS1 protein homolog 1)
C10m	7	TAX1-BINDING PROTEIN TXBP151
C11b	1p36	caspase-9 precursor; ICE-like apoptotic protease 6 (ICE-LAP6); apoptotic protease MCH-6
C14e	17p13	replication protein A 70-kDa subunit (RPA70; REPA1; RF-A); single-stranded DNA-binding protein
D01b	nb	NUCLEAR DOMAIN 10 PROTEIN NDP52
D01i	9q22	brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/NT-3 growth factors receptor precursor; TRKB tyrosine kinase receptor; GP145-TRKB
D01k	19q13	urokinase-type plasminogen activator receptor; GPI-anchored form precursor (U-PAR); monocyte activation antigen MO3; CD87 antigen
D02b	nb	HISTONE DEACETYLASE 2 (HD2)
D02f	nb	laminin 3-kDa receptor
D02h	nb	DELTA-CATENIN
D06j	6q23	interferon-gamma receptor (IFNR-gamma; IFNGR1); CDW119 antigen
D06m	nb	PURINERGIC RECEPTOR P2Y5
D07k	nb	FC-EPSILON-RECEPTOR GAMMA-CHAIN
D10m	nb	BETAINE--HOMOCYSTEINE S-METHYLTRANSFERASE
E04j	nb	metalloprotease/disintegrin/cysteine-rich protein precursor (MDC9)
E05c	3p23	teratocarcinoma-derived growth factor 1 (TDGF1); epidermal growth factor-like CRIPTO protein CR1; CRIPTO-1 growth factor (CRGF) + teratocarcinoma-derived growth factor 3
E05l	12p13	alpha-2-macroglobulin precursor (alpha-2-M)
E07f	2q14	interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin
E07m	5q32	HLA-DR ANTIGENS ASSOCIATED INVARIANT CHAIN (P33); CD74
F04k	nb	60S RIBOSOMAL PROTEIN L5
F05h	21q22	INTERFERON-REGULATED RESISTANCE GTP-BINDING PROTEIN MXA (INTERFERON-INDUCED PROTEIN P78) (IFI-78K).
F06d	12p12	L-LACTATE DEHYDROGENASE H CHAIN (EC 1.1.1.27) (LDH-B)
F08d	nb	MULTIFUNCTIONAL PROTEIN ADE2 [INCLUDES: PHOSPHORIBOSYLAMINOIMIDAZOLE-SUCCINOCARBOXAMIDE SYNTHASE
F09k	1q25	ASPARTYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.12) (ASPARTATE--TRNA LIGASE) (ASPRS).
F10c	3p21	INOSINE-5'-MONOPHOSPHATE DEHYDROGENASE 2 (EC 1.1.1.205) (IMP DEHYDROGENASE 2) (IMPDH-II) (IMPD 2).
F10d	nb	THIOREDOXIN REDUCTASE
F11c	2p14	URIDINE DIPHOSPHOGLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE (EC 2.7.7.9) (UTP--GLUCOSE-1-PHOSPHATE URIDYLYLTRANSFERASE)).
F11h	2p16	CRM1 PROTEIN

Gene, die laut Expression-Array schwächer im nicht-neoplastischen Gewebe im Vergleich zu PXA und AII exprimiert wurden

A03a	18q21	tumor suppressor protein DCC precursor; colorectal cancer suppressor
A03c	8	c-myc oncogene
A06h	6p21	Notch4
B13d	3	RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE II ALPHA 1 (EC 2.7.1.-) (S6KII-ALPHA 1) (P90-RSK 1) (RIBOSOMAL S6 KINASE 1) (RSK1) (PP90RSK1)
C01d	17q21	serine/threonine protein kinase NIK; binds specifically to TRAF2
D01m	Xq28	sex gene
D04n	nb	CYTOCHROME B-245 HEAVY CHAIN (P22 PHAGOCYTE B-CYTOCHROME) (NEUTROPHIL CYTOCHROME B, 91 KD POLYPEPTIDE)
D05h	5q31-32	platelet-derived growth factor receptor beta subunit (PDGFRB); CD140B antigen
D05l	1q21-31	LEUKOCYTE IGG RECEPTOR (FC-GAMMA-R)
D05m	13q14	PURINERGIC RECEPTOR P2Y5
D07d	7pter-15	integrin beta 8 subunit precursor (ITGB8)
D07f	12q13	integrin beta 7 subunit precursor (ITGB7)
D07k	nb	FC-EPSILON-RECEPTOR GAMMA-CHAIN
D09a	5q31	HISTONE DEACETYLASE-3C
E02m	6p21	MHC class I antigen HLA-B
E03n	15q26	cartilage-specific proteoglycan core protein (CSPCP); aggrecan 1; chondroitin sulfate proteoglycan core protein 1
E04m	19q13	IGG RECEPTOR FCRN LARGE SUBUNIT P51 PRECURSOR (FCRN) (NEONATAL FC RECEPTOR)
E05c	3p23-21	teratocarcinoma-derived growth factor 1 (TDGF1); epidermal growth factor-like CRIPTO protein CR1; CRIPTO-1 growth factor (CRGF)
E10m	6p21	MHC CLASS II HLA-DR-BETA (DR2-DQW1/DR4 DQW3) PRECURSOR (DR2-DQW1/DR4 DQW3).
E12m	6p21	CLASS II HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, M ALPHA CHAIN PRECURSOR
E13a	19q13	transforming growth factor-beta (TGF-beta; TGFB)
E13l	6p21	HLA CLASS II HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, DR ALPHA CHAIN PRECURSOR
E14c	14q21-22	glia maturation factor beta (GMF-beta)
E14f	1q31-32	interleukin-10 precursor (IL-10); cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF)
E14h	10q24	WNT-8B
F02b	17q11	vitronectin precursor (VTN); serum spreading factor; S-protein
F02l	1p35	leukocyte interferon-inducible peptide
F06m	10q23	INTERFERON-INDUCED 56 KD PROTEIN (IFI-56K)

Gene, die laut Expression-Array stärker im nicht-neoplastischen Gewebe im Vergleich zu PXA und AII exprimiert wurden

B10d	1p36	cAMP-dependent protein kinase, beta-catalytic subunit (EC 2.7.1.37) (PKA C-beta).
B13j	nb	GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN G(I)/G(S)/G(O) GAMMA-10 SUBUNIT
B14c	3q13	GSK-3 beta; glycogen synthase kinase 3 beta; tau kinase subunit; factor A (EC 2.7.1.37)
C01m	10q11	ZINC FINGER PROTEIN 22 (ZINC FINGER PROTEIN KOX15)
C04j	11	BRCA1-ASSOCIATED RING DOMAIN PROTEIN.
C07h	8q24	KIAA0078 GENE
C09f	3p	DNA topoisomerase II beta (TOP2B)
C10b	nb	caspase-8 precursor (EC 3.4.22.-); ICE-like apoptotic protease 5; MORT1-associated CED-3 homolog (MACH)
C10g	nb	DNA mismatch repair protein PMS1 (PMS1 protein homolog 1)
C12h	17q	RAD51C TRUNCATED PROTEIN
C14i	nb	JUN ACTIVATION DOMAIN BINDING PROTEIN.
D09m	nb	glutathione-S-transferase (GST) homolog
F07k	nb	TRANSLATION INITIATION FACTOR EIF-2ALPHA
F08i	4q13	G-RICH SEQUENCE FACTOR-1 (GRSF-1)
F08j	nb	HSC70-interacting protein; progesterone receptor-associated P48 protein
F09h	nb	TRAM PROTEIN
F11j	4q21	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E (EIF-4E) (EIF4E) (MRNA CAP-BINDING PROTEIN) (EIF-4F 25 KD SUBUNIT)
F13k	7p15	GLYCYL TRNA SYNTHETASE
F14l	10q24	ADDUCIN GAMMA SUBUNIT

nb = nicht bestimmt