

Aus dem Institut für Neuropathologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Reifenberger
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Molekulargenetische Untersuchung und Identifizierung neuer
Tumorsuppressor-Kandidatengene auf dem langen Arm von Chromosom 10
in Glioblastomen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Rouwen Jan Riediger

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Jakob Steiger

Meiner Familie gewidmet

1	Einleitung	1
1.1	Tumoren des Nervensystems	1
1.2	Glioblastome.....	4
1.2.1	Neuropathologie	4
1.2.2	Klinik, Therapie und Prognose.....	5
1.2.3	Molekulare Veränderungen	7
1.3	Fragestellung und Zielsetzung der eigenen Arbeit	11
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Material.....	13
2.1.1	Tumorgewebe und Referenzgewebe.....	13
2.1.2	Oligonukleotide.....	14
2.1.3	Geräte.....	15
2.1.4	Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	16
2.1.5	Lösungen und Puffer	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	PCR.....	18
2.2.2	Mutationsanalyse mittels Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP)-Methode	19
2.2.3	Suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH)	22
2.2.4	<i>Real-Time</i> Reverse Transkription (RT)-PCR	28
2.2.5	Statistische Auswertung	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Ergebnisse der <i>BMPR1A</i> -Mutationsanalyse.....	32
3.2	Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels suppressiver Subtraktionshybridisierung (SSH).....	33
3.2.1	Ergebnisse der Vorwärtssubtraktion.....	33
3.2.2	Ergebnisse der Rückwärtssubtraktion	35
3.3	Validierung der Tumorsuppressor-Kandidatengene <i>BMS1L</i> und <i>DPYSL4</i> mittels <i>Real-Time</i> RT-PCR	37
3.3.1	Ergebnisse der <i>Real-Time</i> RT-PCR Expressionsanalyse des <i>BMS1L</i> -Gens.....	37
3.3.2	Ergebnisse der <i>Real-Time</i> RT-PCR Expressionsanalyse des <i>DPYSL4</i> -Gens.....	41
4	Diskussion	45
4.1	Mutationsanalyse des <i>BMPR1A</i> -Gens.....	45
4.2	Identifizierung von neuen Gliomprogressions-assoziierten Kandidatengenen mittels suppressiver Subtraktionshybridisierung.....	48
5	Literaturverzeichnis.....	53
6	Danksagung	62
7	Tabellarischer Lebenslauf	63
8	Zusammenfassung	65

1 Einleitung

1.1 Tumoren des Nervensystems

Die Diagnose „Gehirntumor“ stellt für den betroffenen Patienten eine extreme psychische Belastung und in vielen Fällen auch eine tödliche Erkrankung dar, in deren Verlauf es zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität bzw. des alltäglichen Lebens kommt. Insgesamt machen die Tumoren des Nervensystems etwa 2-3 % aller Neoplasien aus, die Inzidenz beträgt 10-12 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Im Kindesalter stellen sie mit einem Anteil von 20-25 % nach den akuten Leukämien die zweithäufigste Neoplasie dar. Tumoren des Nervensystems umfassen eine heterogene Gruppe unterschiedlicher Tumorentitäten, unter denen die aus neoplastisch transformierten Gliazellen hervorgehenden Gliome die größte Gruppe darstellen (Abb. 1). Im Kindesalter dominieren vor allem niedriggradige Gliome und embryonale Tumoren, bei den Erwachsenen stehen hochgradig maligne Gliome, Meningeome und Karzinometastasen im Vordergrund.

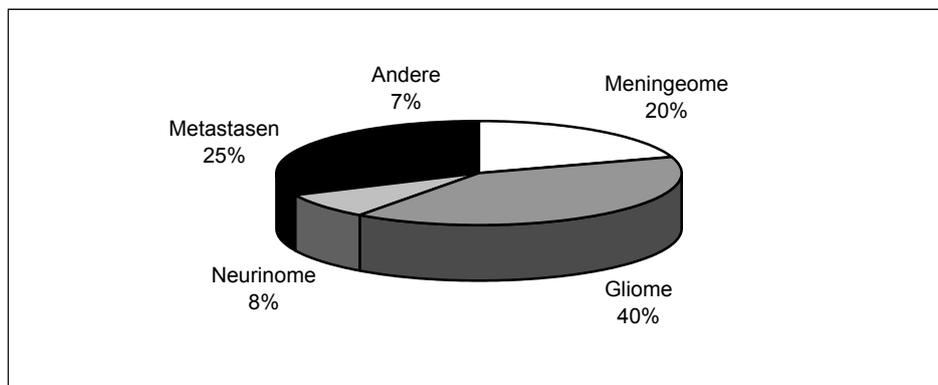


Abb. 1: Ungefähre Häufigkeit der wichtigsten Tumoren des Nervensystems.

Die Einteilung der Tumoren des Nervensystems erfolgt anhand der WHO (*World Health Organisation*)-Klassifikation durch eine histologische Typisierung und Gradierung von WHO-Grad I (benigne) bis WHO-Grad IV (maligne) [1]. Die histologische Gradierung (Tab. 1) ist entscheidend für die weitere postoperative Therapie und gibt Anhaltspunkte für die Prognose. Dabei werden zelluläre Kriterien wie Zell- und Kernatypien, mitotische Aktivität, Gefäßproliferation oder Nekrosen zugrunde gelegt.

Tab. 1: Vereinfachte Darstellung der histologischen Gradierung gemäß WHO-Klassifikation.

WHO-Grad I	benigne, langsam wachsend, Heilung durch Operation möglich
WHO-Grad II	langsam wachsend, Tendenz zu Rezidiv und maligner Progression
WHO-Grad III	bösartig, anaplastisch und schnell wachsend
WHO-Grad IV	extrem bösartig, hochgradig anaplastisch und sehr schnell wachsend

Bei der histologischen Typisierung der Tumoren des Nervensystems kann man zunächst primäre und sekundäre Tumore des Nervensystems unterscheiden. Bei den sekundären Tumoren handelt es sich überwiegend um Karzinometastasen oder um einen Mitbefall der Meningen im Sinne einer *Meningeosis leucaemica* im Rahmen von Leukämien (insbesondere bei akuter lymphatischer Leukämie im Kindesalter).

Nach ihrem histogenetischen Ursprung gliedern sich die primären ZNS Tumoren in neuroepitheliale Tumoren - hierzu zählen auch die Gliome - , Tumoren des peripheren Nervensystems, Tumoren der Meningen, primäre ZNS-Lymphome und Keimzelltumoren mit unterschiedlicher Dignität (siehe Tab. 2 und 3).

Entscheidend für Symptomatik, Therapie und Prognose eines Hirntumors ist nicht nur seine Histologie, sondern auch seine Lokalisation und sein Wachstumsverhalten. Somit sind die Malignitätskriterien der allgemeinen Tumorpathologie nur beschränkt anwendbar, weil einerseits hochmaligne Hirntumoren nur extrem selten hämatogen oder lymphogen metastasieren und andererseits auch histologisch gutartige Tumoren bei ungünstiger Lokalisation zum Tod führen können [1, 2].

Tab. 2: Einteilung der wichtigsten primären ZNS-Tumoren.

Tumorart	Hauptgruppe	Untergruppen
Neuroepitheliale Tumoren	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gliome 	<ul style="list-style-type: none"> - Astrozytäre Gliome - Oligodendrogliale Tumoren - Mischgliome - Ependymale Tumoren - Tumoren des Plexus choroideus
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Embryonale Tumoren ▪ Pinealistumoren ▪ Neuronale Tumoren 	
Tumoren der peripheren Nerven	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Neurinom ▪ Neurofibrom ▪ Maligner peripherer Nervenscheidentumor 	
Tumoren der Meningen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Meningeome 	<ul style="list-style-type: none"> - Meningeome WHO-Grad I - Meningeome WHO-Grad II (atypische Meningeome) - Meningeome WHO-Grad III (anaplastische Meningeome)
Primäre ZNS-Lymphome		
Keimzelltumoren		

Tab. 3: Einteilung der astrozytären Gliome.

Tumor	WHO Grad	Vorzugslokalisation	Altersgipfel*
Pilozytisches Astrozytom	I	Kleinhirn, N. opticus, Hirnstamm, Thalamus	Kinder/ Jugendliche
Diffuses Astrozytom	II	Großhirnhemisphären	30-40 LJ
Anaplastisches Astrozytom	III	Großhirnhemisphären	1. Kinder 2. 35-45 LJ
Glioblastom	IV	Großhirn, Hirnstamm	45-75 LJ

* LJ, Lebensjahr

1.2 Glioblastome

Das Glioblastom ist der häufigste und zugleich bösartigste Hirntumor (WHO-Grad IV). Es macht 12-15 % aller intrakraniellen Neoplasmen und mehr als 50 % aller astrozytären Tumoren aus. Seine Inzidenz beträgt 2-3 pro 100.000 Einwohner/Jahr. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr. Die Hauptlokalisation sind die Großhirnhemisphären, bei Kindern auch der Hirnstamm. Die meisten Glioblastome entstehen *de novo*, sie werden als „primäre“ Glioblastome bezeichnet. Glioblastome, die sich im Sinne einer malignen Progression aus einem vorbestehenden niedriggradigeren Astrozytom (WHO-Grad II oder III) entwickelt haben, werden als „sekundäre“ Glioblastome bezeichnet.

Die Ätiologie des Glioblastoms ist nach wie vor weitgehend unklar, eine kausale Bedeutung chemischer Kanzerogene oder viraler Infektionen ist beim Menschen nicht gesichert [2, 3]. Eine Ausnahme stellt die therapeutische Röntgenbestrahlung des Schädels, wie sie z.B. im Rahmen der Therapie von Kindern mit Akuter Lymphatischer Leukämie aber auch bei anderen Erkrankungen durchgeführt wird, dar. Hierbei zeigt sich für die Kinder nach kraniospinaler Bestrahlung ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Glioms als Zweitumor [4]. Ferner wurde auch von Patienten berichtet, die Jahre nach der therapeutischen Schädelbestrahlung an einem Gliom erkrankten [3].

1.2.1 Neuropathologie

Makroskopisch ergeben Glioblastome ein variables Bild. Charakteristisch ist eine bunte Schnittfläche, die aus gelblichen Nekrosearealen, Hämorrhagien unterschiedlichsten Alters und dem grau-glasig erscheinendem Tumorgewebe besteht. Meist zeigt sich ein ausgeprägtes perifokales Ödem. Gelegentlich finden sich zwei oder mehr räumlich getrennte Tumorherde, so daß man von einem multifokalen Glioblastom spricht.

Histologisch bietet das Glioblastom ein heterogenes Erscheinungsbild mit ausgeprägten Zell- und Kernatypien, hoher mitotischer Aktivität, starker Gefäßproliferation, zahlreichen Nekrosen und infiltrativem Wachstum, so daß es nach der WHO als Grad IV-Tumor klassifiziert wird.

Die folgenden histologischen Merkmale sind typisch für das Glioblastom:

- Pathologische glomerulumartige oder girlandenförmige Gefäßproliferate
- Großflächige und strichförmige Nekrosen
- Perinekrotische Pseudopalisaden

Das Gesamtbild wird durch eine zelluläre Pleomorphie geprägt. Dabei können je nach Tumor fibrilläre oder gemistozytäre astrozytäre Zellen, kleinzellige, spindelzellige oder riesenzellige Elemente dominieren [1, 2, 5].

1.2.2 Klinik, Therapie und Prognose

Auf Grund des aggressiven und schnellen Wachstums der Glioblastome ist die Anamnesedauer meist sehr kurz und beträgt weniger als 3-4 Monate. Die Diagnose wird häufig erst relativ spät gestellt, da die Patienten im Frühstadium der Erkrankung asymptomatisch sind und erst mit differentialdiagnostisch mehrdeutigen Symptomen auffällig werden. Charakteristische Frühsymptome sind Kopfschmerzen oder Zeichen einer intrakraniellen Drucksteigerung. Häufig kommt es wegen der großen Tumorausdehnung und des peritumorösen Ödems zu Lähmungen, insultartige Verschlechterungen werden nicht selten beobachtet (sog. apoplektisches Gliom). Weitere Symptome sind Wesensveränderungen bis hin zum hirnrorganischen Psychosyndrom und seltener epileptische Anfälle. Die klinischen Symptome können je nach Tumorgröße und Lokalisation sehr unterschiedlich sein und durch eine eingehende neurologische Untersuchung können Rückschlüsse auf den Sitz des Tumors gezogen werden. Da die neurologischen Symptome lokalisations- aber nicht tumorspezifisch sind, müssen als Differentialdiagnose degenerative, vaskuläre und entzündliche Erkrankungen in Betracht gezogen werden. Die Kombination aus Klinik, Laboruntersuchungen und bildgebenden Verfahren (CT, MRT, Angiographie) führt in mehr als 95 % der Fälle zur richtigen Verdachtsdiagnose eines Glioblastoms bzw. Gehirntumors. Die Diagnosesicherung und die genaue Artdiagnose kann jedoch nur histologisch erfolgen. Die wegweisende Diagnostik ist meist die Computertomographie (CT), in der sich nach intravenöser Kontrastmittelapplikation ringförmige Kontrastmittelanreicherungen in der Tumorrandszone sowie ein großes begleitendes Marklagerödem zeigen. In der Magnetresonanztomographie (MRT) zeigen sich stark kontrastmittelanreichernde solide Tumoranteile sowie ein ausgedehntes fingerförmiges Ödem im T2-Bild.

Durch die Angiographie lässt sich in 60-70 % der Fälle eine Kontrastmittelanreicherung mit pathologischen Gefäßen erkennen. Durch diese bildgebenden Verfahren kann jedoch nicht immer von entzündlichen Prozessen, insbesondere dem Hirnabszeß (mit guter Prognose und komplett anderer Therapiestrategie!) oder grossen nekrotischen Hirnmetastasen unterschieden werden. Daher muss zur Diagnosesicherung immer eine histologische Untersuchung erfolgen.

Die Standardtherapie der Glioblastome ist eine funktionserhaltende Neurochirurgie im Sinne einer zytoreduktiven Chirurgie, da eine Radikaloperation mit einer R0-Resektion nicht möglich ist, sowie eine postoperative Strahlentherapie mit konkomittanter und adjuvanter Chemotherapie [68]. Glioblastome besitzen allerdings oftmals eine primäre Resistenz gegenüber verschiedenen Zytostatika. Zur Prävention bzw. Therapie des Hirnödems kommen Glukokortikoide zum Einsatz. Als prognostische Faktoren für die betroffenen Patienten gelten Resektionsumfang, Lebensalter und Ausmaß der klinischen Beeinträchtigung zu Beginn der Therapie. Aufgrund des Fehlens kurativer Therapieansätze und des sehr aggressiven Wachstumsverhaltens des Tumors beträgt die mittlere postoperative Überlebenszeit in Abhängigkeit von den oben genannten prognostischen Faktoren ungefähr 12 Monate. Neuere Therapieansätze wie Immun- und Gentherapie sind zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung und befinden sich zum Teil schon in der klinischen Erprobung. Zur Weiterentwicklung dieser neuen Therapieansätze ist eine genaues Verständnis der molekularbiologischen Veränderungen in Glioblastomen außerordentlich hilfreich [2, 5, 6].

1.2.3 Molekulare Veränderungen

In zahlreichen molekulargenetischen Untersuchungen der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der genetischen und chromosomalen Veränderungen vom diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) über das anaplastische Astrozytom bis zum Glioblastom (WHO-Grad IV) signifikant zunimmt. Somit ist also die maligne Progression offensichtlich mit einer Akkumulation molekularer Aberrationen assoziiert. Diese Aberrationen führen funktionell meist zu abnormen Expressionen wichtiger Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene (Tab. 4).

Tab. 4: Tumorsuppressorgene und Protoonkogene, für die genetische Veränderungen in Glioblastomen beschrieben wurden.

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

Veränderungen auf Chromosom 10. Ein wesentliches genetisches Merkmal der Glioblastome sind Allelverluste auf dem Chromosom 10, welche man in bis zu 90 % der Fälle vorfindet, wohingegen diese bei niedriggradigeren Astrozytomen selten sind [7]. In der Mehrheit der Glioblastome liegt eine Monosomie 10 (60-70 %) vor, d.h. die Verluste der Heterozygotie auf Chromosom 10 betreffen alle informativen Loci. Dadurch war die Eingrenzung der genauen Lokalisation der auf diesem Chromosom vermuteten Tumorsuppressorgene erschwert. In Deletionskartierungen, in denen multiple Loci auf Chromosom 10 an grossen Tumorkollektiven untersucht wurden, konnte man jedoch Glioblastome identifizieren, die lediglich partielle Verluste aufwiesen [2]. Hierbei wurden unterschiedliche Kandidatengenregionen auf 10p, 10q23 und 10q24-qter identifiziert. Mit dem *PTEN (MMAC1)*-Gen konnte ein Tumorsuppressorgen nachgewiesen werden, welches in 30-40 % der primären Glioblastome mutiert oder homozygot deletiert ist [8, 9, 10, 11]. In sekundären Glioblastomen finden sich dagegen *PTEN*-Mutationen nur in ca. 5 % der Fälle, obwohl 10q-Deletionen auch hier in den meisten Fällen vorhanden sind [12, 13]. Insgesamt treten nur in weniger als 50 % aller Glioblastome mit Allelverlusten auf 10q-Mutationen des *PTEN*-Gens auf. Somit liegt die Vermutung nahe, dass in dieser Region noch weitere Tumorsuppressorgene lokalisiert sind. In mehreren Studien konnten Glioblastome mit 10q-Deletionen gefunden werden, welche auf Bereiche distal des *PTEN*-Locus beschränkt waren [13, 14, 15, 16]. In mehreren Arbeiten wurden Kandidatengene auf 10q24-qter vorgestellt, die in Glioblastomen eine Rolle spielen sollen. Zu diesen gehören *DMBT1*, *MXI1*, *NEURL*, *LG11* [17]. Für keines dieser Gene konnte aber bisher eine funktionelle Bedeutung in Glioblastomen nachgewiesen werden [16, 18, 19]. Daher ist davon auszugehen, dass in der Region 10q24-qter ein bisher noch nicht identifiziertes Tumorsuppressorgen liegt und dessen Inaktivierung von grosser Bedeutung in Glioblastomen ist. Auch das auf 10p vermutete Tumorsuppressorgen konnte bisher nicht gefunden werden.

p53 und pRb1-Signalweg. Bei nahezu allen Glioblastomen zeigen sich Veränderungen in Genen, deren Genprodukte Kontrollfunktionen im Rahmen der p53- und pRb-abhängigen Regulation von Zellzyklusprogression, DNA-Reparatur und Apoptose ausüben. Dies führt zu einem Kontrollverlust beim G1/S-Phase-Übergang. Die Zellen können nicht mehr in die G1-Arretierung übergehen, was zur unkontrollierten Proliferation führt und somit einen für das rasche Wachstum der Glioblastome wesentlichen Mechanismus darstellt [17, 20].

So finden sich Inaktivierungen des Tumorsuppressorgens *TP53* (17p13) durch Allelverluste auf 17p und Mutationen in 30 % der Glioblastome [21, 22], des *CDKN2A* Gens auf 9p21 durch homozygote Deletion in 40 % der Glioblastome [23, 24, 25], des *CDKN2B* Gens und *p14^{ARF}* (beide auf 9p21) [20] sowie des *RB1* Gens (13q14) durch Deletion oder Mutation in einem Drittel der Glioblastome [23, 24, 26]. Außerdem kommt es zur Aktivierung der Protoonkogene *CDK4* (12q13), *CCND1* (11q13), *CCND3* (6p21), *MDM2* (12q14) und *MDM4* (1q32) [20].

PTEN/Pi3k/Akt-Signalweg. Ein weiterer von Veränderungen betroffener Signalweg ist der PTEN/Pi3k/Akt Signalweg. So kommt es neben *PTEN*-Mutationen (s.o.) in 30-40 % der Glioblastome zu Amplifikation des *EGFR*-Gens (7p12) [27, 28] mit gleichzeitiger Überexpression von *TGF- α* und/oder *EGF* [28]. In 50 % der Tumoren mit *EGFR*-Amplifikation kommt es durch eine sog. Typ III Deletion des Gens zu einem konstitutiv aktivierten Rezeptormolekül [29, 30, 31].

Primäre und Sekundäre Glioblastome. Während es histologisch keine Unterscheidungsmerkmale gibt, weisen primäre und sekundäre Glioblastome eine unterschiedliche Häufigkeit der genetischen Veränderungen auf, deren funktionellen Konsequenzen jedoch dieselben Signalwege betreffen (Abb. 2). So weisen nur 25-30 % der primären Glioblastome Mutationen des *TP53*-Gens (70-80 % bei sekundären Glioblastomen) und wesentlich seltener Promotormethylierungen des *RB1*-Gens, Allelverluste auf 13q und 19q sowie Überexpression des *PDGFRA*-Gens als sekundäre Glioblastome auf [21, 22, 32, 33, 34, 35, 36] (Abb. 2).

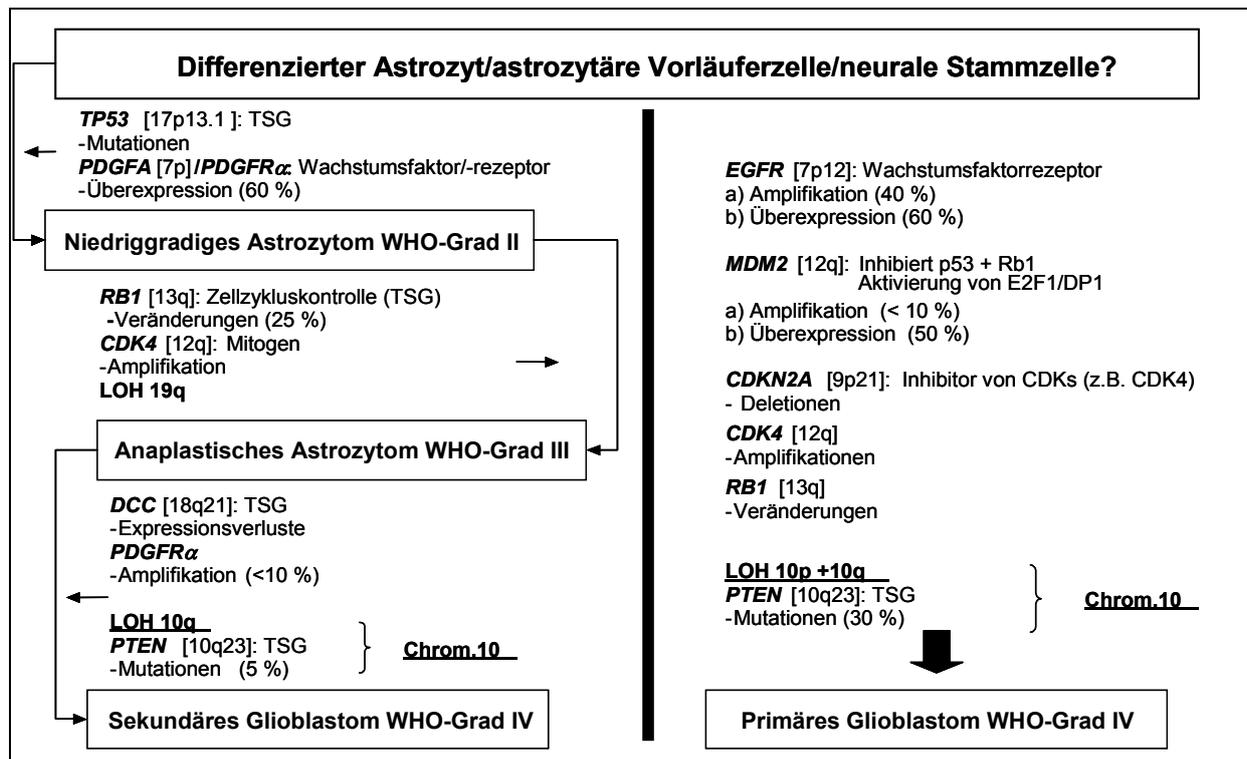


Abb. 2: Akkumulation der genetischen Aberrationen vom diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) bis hin zum Glioblastom (WHO-Grad IV). TSG, Tumorsuppressorgen

1.3 Fragestellung und Zielsetzung der eigenen Arbeit

Glioblastome sind die häufigsten Hirntumoren beim Erwachsenen und ihr infiltratives Wachstum macht eine vollständige Resektion in der Regel unmöglich, so dass die Prognose für die betroffenen Patienten äußerst schlecht ist. Die Standardtherapie war bislang der neurochirurgische Eingriff sowie die postoperative Bestrahlung. Durch einen neuartigen Therapieansatz mit einer zusätzlichen Chemotherapie mit Temozolomid (Temodal®, Essex) konnte die Zwei-Jahres-Überlebensrate von 10,4 % auf 26,5 % verbessert werden [37]. Insbesondere profitierten Patienten mit einer Promotorhypermethylierung des *MGMT*-Gens (O6-Methylguanidin-DNA-Methyltransferase), das für ein DNA-Reparaturenzym kodiert, von der Chemotherapie. Die Zwei-Jahres-Überlebensrate beträgt bei diesen Patienten 48 % [69]. Dieses Beispiel macht die Notwendigkeit für das Verständnis der molekularen Mechanismen der Glioblastomentstehung, die bisher nur unzureichend verstanden sind, deutlich.

Ein spezifisches genetisches Merkmal von Glioblastomen sind Allelverluste auf Chromosom 10. Bisher konnte mit dem *PTEN*-Gen ein Tumorsuppressorgen auf 10q23 identifiziert werden, welches jedoch nur in 30-40 % der primären Glioblastome und in 5 % der sekundären Glioblastome Mutationen aufweist (siehe Kapitel 1.2.3). Somit besteht ein Missverhältnis zwischen LOH auf Chromosom 10 und *PTEN* Mutationen, so dass die Wahrscheinlichkeit für ein weiteres Tumorsuppressorgen ausserhalb der Region 10q23 auf Chromosom 10 sehr gross ist.

Im ersten Ansatz dieser Arbeit wurde daher eine Mutationsanalyse des Tumorsuppressor-Kandidatengens *BMPR1A* (10q22) in Glioblastomen durchgeführt. Das *BMPR1A* Gen wurde in Arbeiten über das Juvenile Polyposis Syndrom (JPS) als mögliches Tumorsuppressorgen auf Chromosom 10 identifiziert. Hier konnten in einer signifikanten Untergruppe von JPS-Fällen Keimbahnmutationen mit gleichzeitigem LOH 10q nachgewiesen werden [38, 39]. Das *BMPR1A* Gen kodiert für den *Bone morphogenetic protein receptor* der zur *Transforming growth factor-β* (TGF-β) Superfamilie gehört und somit an der Kontrolle von Zelltod, Zelldifferenzierung und Zellproliferation beteiligt ist [40].

Durch seine Lokalisation auf 10q und die oben beschriebene Funktion als Mitglied der *TGF- β* Familie stellt *BMPR1A* ein interessantes Tumorsuppressor-Kandidatengen in Glioblastomen dar.

Das infiltrative Wachstum der Astrozytome macht eine vollständige Resektion meist unmöglich, so dass eine hohe Neigung zur Rezidivbildung besteht, die häufig mit einer malignen Progression einhergeht. In einem zweiten methodischen Ansatz wurde eine Subtraktionshybridisierung zwischen einem anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) und einem sekundären Glioblastom des selben Patienten durchgeführt, um differentiell exprimierte Transkripte auf dem langen Arm von Chromosom 10 anzureichern. Der Primärtumor zeigte eine Retention von genomischem Material in dieser Region, während der Rezidivtumor eine Allelverlust auf 10q26-qter aufwies. Zur Verifizierung der Ergebnisse der SSH-Expressionsanalyse wurde die Expression von zwei der differentiell exprimierten Glioblastom-assoziierten Tumorsuppressor-Kandidatengene auf Chromosom 10 mittels der *Real-Time* RT-PCR an einer Tumorserie aus primären und sekundären Glioblastomen sowie an Glioblastomzelllinien untersucht. Ziel dieser Untersuchung war letztendlich die Identifizierung neuer Gene, die für die maligne Progression von niedriggradigen Astrozytomen zum Glioblastom verantwortlich sind und somit neue Ansätze für eine spezifische molekulare Diagnostik und Therapie liefern können, mit einem besonderen Augenmerk auf ein potentiell Tumorsuppressorgen auf Chromosom 10.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tumorgewebe und Referenzgewebe

Operativ entfernte Tumorproben wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Es wurden nur solche Tumorproben verwendet, die histologisch mindestens 80 % Tumoranteil aufwiesen. Für die Mutationsanalyse von *BMPR1A* wurden 42 primäre Glioblastome und 16 sekundäre Glioblastome untersucht. Als Kontrolle wurde aus venösem Blut isolierte DNA (Leukozyten-DNA) von 6 Patienten verwendet. Bei der Subtraktiven Suppressionshybridisierung (SSH) wurde Tumormaterial eines anaplastischen Astrozytoms WHO Grad III (AAIII) als Primärtumor und eines sekundären Glioblastoms WHO Grad IV (sGBIV) als Rezidivtumor desselben Patienten verwendet. Für die *Real-Time* RT-PCR Analyse von *BMSL1* (bzw. *DPYSL4*) wurde RNA von 39 (33) primären, 5 (10) sekundären Glioblastomen, 5 (11) anaplastischen und 6 (11) niedriggradigen Astrozytomen sowie von folgenden 5 Glioblastomzelllinien verwendet: A172, T98G, CCF-STTG1, U138M und TP365MG. Die Zelllinie TP365MG wurde freundlicherweise von Prof. V. P. Collins, Pathologisches Institut der Universität Cambridge, zur Verfügung gestellt. Die restlichen Zelllinien stammen aus der *American Type Culture Collection* (ATCC). Von den Zelllinien stand zusätzlich RNA zur Verfügung, die aus 5-Aza-2'-Deoxycytidin- und Trichostatin A behandelten Zellen extrahiert worden war. Als Kontrolle diente RNA aus nicht-neoplastischem Hirngewebe von zwei Patienten.

2.1.1.1 Behandlung der Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A

Die Zelllinien wurden sowohl unter Standardbedingungen als auch unter zwei verschiedenen Behandlungsbedingungen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A kultiviert: (1) mit 500mM über 48 Stunden plus 1 μM Trichostatin A über 24 Stunden oder (2) mit 500mM über 72 Stunden plus 1 μM Trichostatin A über 24 Stunden [70].

2.1.2 Oligonukleotide

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Oligonukleotide als Primer für PCR-basierende Experimente verwendet. Die Oligonukleotide für die Mutationsanalyse von *BMPR1A* sind in Tab. 5, für die *Real-Time* RT-PCR in Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 5: Oligonukleotide für die SSCP/Heteroduplex-Mutationsanalyse von *BMPR1A/ALK3* (NCBI GenBank-Zugangsnr. AC0210365).

Amplikon	Primer	Sequenz	Amplikonlänge (bp)
ALK3	ALK3-F1	tccaaaattcagttgtattccttac	133
	ALK3-R2	gctgaggcattgttcaattg	
	ALK-3F2	ggtgacagtacacaggaaac	211
	ALK3-R	cacatacattactaaaatgaacactg	
ALK4	ALK4-F	gtcacgaaacaatgagcttt	157
	ALK4-R2	gtatcctctgggtgtaag	173
	ALK4-F2	cttcatggcactgggatg	
	ALK4-R1	ctctaagaagggtctgc	
ALK5	ALK5-F	cattcagactcaaatttcggt	205
	ALK5-R	tctcatgggtcccaaatta	
ALK6	ALK6-F	ccaaaccatttctaattttatca	164
	ALK6-R	catgctccgacttttctc	
ALK7	ALK7-F	ccaggctacctagaattgaa	236
	ALK7-R	aacagcgggtgacatctaata	
ALK8	ALK8-F	tcaacacaccattcatgtct	220
	ALK8-R2	catttttaatgtagattgtttctgc	
ALK9	ALK9-F	tcatcaagagctcaaacctt	152
	ALK9-R2	gaatactttcaccgccac	173
	ALK9-F2	gatgggcaaatggcgtg	
ALK10	ALK9-R	acctactagccttgtcaaa	210
	ALK10-F	ccctagcctatctctgatga	
	ALK10-R2	acagaccacaggcagctg	
	ALK10-F2	catcactggacaccagagc	
ALK11	ALK10-R1	aacagtggggcaagaaccac	222
	ALK11-F1	ctcaacttggaccttggc	
	ALK11-R2	gctgtagatgcagccatg	
	ALK11-F2	ctggacgaaagcctgaac	
ALK12	ALK11-R	tgatgagtaaatcaacataatcag	149
	ALK12-F	atthttgtgccatgtttt	
	ALK12-R	aatcacttctcaggggact	
ALK13	ALK13-F	actcagtcctcgaagaagt	233
	ALK13-R	catgagtttctcctccgatg	

Tab. 6: Oligonukleotide für die *Real-Time* RT-PCR-Analysen.

Amplikon	Oligonukleotide	Sequenz	Amplikonlänge (bp)	NCBI GenBank Zugangsnummer
BPMR1A/ALK3	ALK3-TaqF	cggaggagaaactctagactgcaag	120	AC0210365
	ALK3-TaqR	gcagcctgtgaacacgtagtg		
BMS1L	BMS1L-Taq-F	cacccttatatcctggcagac	183	NM 014753
	BMS1L-Taq-R	gaggaaactgatgtcactcacg		
DPYSL4	DPYSL4-Taq-F2	tgtaccgagctgtcaccatc	181	NM 006426
	DPYSL4-Taq-R2	gccagttctgtctcagta		
ARF1	ARF1-F	gaccacgatcctctacaagc	111	NM 0016583
	ARF1-R3	tcccacacagtgaagctgatg		

2.1.3 Geräte

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Geräte verwendet:

Tab. 7: Modelle und Hersteller der verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Real-Time PCR-Thermocycler	GeneAmp 5700 SDS	Applied Biosystems
Hybridisierungssofen	APT Line	Biometra
PCR Thermocycler	Trio-Thermoblock	Biometra
PCR Thermocycler	UNO-Thermoblock	Biometra
Tischzentrifuge	Rotofix 32	Hettich
Tischzentrifuge	5417	Eppendorf
Kühlzentrifuge	EBA 12R	Hettich
Geldokumentationssystem	GelDoc 1000 System	BioRad
Gelkammern für Agarosegele	Sub-Cell	BioRad
Gelkammern für Polyacrylamidgele	P10DS	PeqLab
Geltrockner	583	BioRad
Netzgerät	Power PAC 3000	BioRad
Ultrazentrifugenröhrchen	SW41.1 Polyallomer	Beckman

2.1.4 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits sind den folgenden Tab. 8 und Tab. 9 zu entnehmen.

Tab. 8: Chemikalien und Enzyme.

Substanz	Firma
[α - ³² P]-dCTP (10 MBq/25 μ l)	Hartman Analytic
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/ μ l)	Sigma
HotStar <i>Taq</i> Polymerase (5 U/ μ l)	Qiagen
HotStar <i>Taq</i> Polymerase (5 U/ μ l)	Eurogentec
Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Invitrogen
<i>Rsa</i> I Restriktionsendonuklease (10 U/ μ l)	Roche
DNase I (RNase frei; 10 U/ μ l)	Roche
MMLV Reverse Transkriptase	BD Clontech
100 bp-DNA Leiter 1 kb-DNA Leiter	PeqLab
Röntgenfilme (Biomax MR)	Kodak

Tab. 9: Kits.

Kit	Firma
Advantage 2 PCR Kit	BD Clontech
NucleoSpin Nucleic Acid Purification Kit	BD Clontech
PCR Product Purification Kit	Roche
PCR-Select cDNA Subtraction Kit	BD Clontech
qPCR Core Kit for SYBR Green	Eurogentec
SMART PCR cDNA Synthesis Kit	BD Clontech
Wizard DNA Clean-up System	Promega

2.1.5 Lösungen und Puffer

Tab. 10: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Tris/EDTA (TE)-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 0,1 mM EDTA (pH 8,0) <i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
10 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	50 x TAE verdünnt 1: 5 mit <i>Aqua dest.</i> : 242 g Tris-Base 57,1 ml (100 %) Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) <i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
1 x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	5 × TBE verdünnt 1: 5 mit <i>Aqua dest.</i> : 54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) <i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
Formamid-Ladungspuffer	9 ml Formamid 20 µl 5 N NaOH (pH 8.0) 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8.0) 1 ml Farbstofflösung (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol)
6 x Bromphenolblau (BFB)-Ladungspuffer (Agarosegel-Ladungspuffer)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 30 % Glycerol in Wasser

2.2 Methoden

2.2.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient zur *in vitro*-Amplifizierung von Nukleinsäurefragmenten. Diese von Kary Mullis 1984 veröffentlichte Methode ist heute eine der am meisten benutzten Standardmethoden der Molekularbiologie. Der Reaktionsansatz besteht im Wesentlichen aus doppelsträngiger DNA, zwei Arten spezifischer Oligonukleotide von ca. 15-25 Basen Länge - den *Primern* -, die jeweils einem Abschnitt am 3'-Ende der Zielsequenz des entsprechenden DNA-Einzelstranges komplementär sind, und der hitzebeständigen *Taq* DNA-Polymerase. Das Reaktionsmuster der PCR besteht im Prinzip aus drei sich zyklisch wiederholenden Schritten: Zunächst werden die DNA-Doppelstränge durch Hitzeeinwirkung denaturiert. Danach binden bei niedriger Temperatur - der *sog. annealing*-Temperatur - die beiden ausgewählten Oligonukleotide jeweils am 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Bereichs. Diese Primer dienen im nächsten Reaktionsschritt der *Taq* DNA-Polymerase als Ansatzpunkt zur Synthese des jeweils komplementären DNA-Abschnitts der DNA-Einzelstränge, so daß „neue“ DNA-Doppelstränge entstehen. Werden diese Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation nun mehrfach wiederholt, kommt es zur exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz.

Praktisch wurden die PCR-Reaktionen in einem Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt. Nachfolgend sind die prinzipielle Zusammensetzung der Pipettieransätze und der Programmablauf des Thermocyclers dargestellt:

Matrizen-DNA	20-50 ng
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTPs (je 2 mM)	2,5 µl
Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Taq DNA Polymerase (5 u/µl)	0,2 µl
Aqua dest.	ad 25 µl

1. Schritt	95°C	5 min	Initiale Denaturierung	
2. Schritt	95°C	30 s	Denaturierung	
3. Schritt	T _m	30 s	Annealing	35-40
4. Schritt	72°C	30 s	Elongation	Zyklen
5. Schritt	72°C	5 min	Auffüllen der Doppelstränge	
6. Schritt	4°C	bis zur Entnahme aus dem Thermocycler		

Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert. Für die jeweiligen Oligonukleotidprimer wurden die PCR-Bedingungen bezüglich der Annealingtemperatur und der Zugabe von Detergenzien, wie Formamid oder Dimethylsulfoxid, optimiert.

2.2.2 Mutationsanalyse mittels Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP)-Methode

Die Analyse von sog. „*single strand conformation polymorphisms*“ (SSCP) oder Einzelstrang-Konformationspolymorphismen ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Mutationssuche. Ihr liegt folgendes Konzept zugrunde: Nukleinsäurestränge haben eine starke Neigung zur Basenpaarung. RNA und einzelsträngige DNA paaren, in Abwesenheit eines komplementären Stranges, mit sich selbst und nehmen dabei bestimmte Konformationen ein, die hoch komplex und kaum vorhersagbar sind. Die Konformation ist von verschiedenen Faktoren abhängig, unter anderem von der Sequenz und der Temperatur. Durch Veränderung verschiedener Parameter, wie Temperatur (4°C und RT) und Polymervernetzung, kann man solche Bedingungen finden, bei der die Mutation einer einzigen Base zu einer Konformationsänderung führt, welche die Laufeigenschaften des zu untersuchenden PCR-Fragmentes im Polyacrylamid-Gel verändert. Hat man diese Bedingungen gefunden, kann man mit dieser Methode viele DNA-Proben in relativ kurzer Zeit untersuchen.

Für die SSCP-Mutationsanalyse des *BMPR1A* Gens wurden die gewünschten DNA Fragmente mittels PCR amplifiziert. Die Fragmente wurden denaturiert und auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (PAA-Gel) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde eine Silberfärbung zur Anfärbung der DNA-Banden durchgeführt. Danach stellen sich im oberen Bereich des Gels die Einzelstrangbanden dar. Im unteren Bereich des PAA-Gels liegen die renaturierten Homoduplexbanden. Die optimale Größe der PCR-Fragmente für eine SSCP-

Analyse liegt zwischen 150 und 250 bp, da es bei kleineren Fragmenten nicht zur Ausbildung einer Sekundärstruktur kommt und bei Fragmenten über 250 bp die Empfindlichkeit zur Detektion von Ein-Basenpaar-Substitutionen mit zunehmender PCR-Amplikonlänge nachlässt. Für jede Probe lässt man Gele unter verschiedenen Bedingungen laufen, um die Möglichkeit des Nachweises eines abweichenden Laufverhaltens zu erhöhen [41, 42].

In der vorliegenden Arbeit wurden die 11 Exone des *BMPRI1A* Gens in 16 verschiedene PCR-Fragmente aufgeteilt, um optimale Amplikongrößen für die SSCP-Mutationsanalyse zu erhalten (Tab. 5). Die Polyacrylamid-Gele wurden aus einer 40 % Acrylamid-Lösung (AA) und einer 2 % N,N'-Methylen-bis-Acrylamid-Lösung (BAA) mit den entsprechenden Mengenanteilen (Tab. 11) in 1 x TBE in einem Gesamtvolumen von 70 ml zusammenpipettiert. Zur Polymerisierung werden anschließend 20 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 200 µl 5 % Ammoniumpersulfat (APS) zugegeben. Das AA:BAA Verhältnis wurde für jedes *BMPRI1A* Amplikon ausgetestet, um eine optimale Auftrennung der DNA in ihre Einzelstränge zu erhalten (Tab. 11).

Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Gel zur Fixierung der DNA für 20 min in eine Lösung mit 10 % Ethanol und 1 % Eisessig gegeben. Danach wurde das PAA-Gel 15 min in einer 0,2 % Silbernitratlösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel mit *Aqua dest.* gespült, um nicht-komplexierte Silberionen zu entfernen. Durch Zugabe einer Entwicklerlösung aus 1,2 % Natriumhydroxid und 0,5 % Formaldehyd wurde eine pH-Änderung herbeigeführt, die die Reduktion der komplexierten Silberionen zu elementarem Silber zur Folge hat. Die Reduktion wurde durch Zugabe einer natriumcarbonathaltigen Fixierungslösung beendet.

2.2.2.1 Bedingungen für die Gelelektrophorese und die PCR bei der SSCP-Analyse

Alle SSCP-Gelelektrophoresen wurden bei Raumtemperatur mit jeweils zwei unterschiedlichen Gelzusammensetzungen, die vorab für jedes PCR-Fragment getestet wurden, bei 120 Volt durchgeführt. Die Laufzeit betrug jeweils 12 Stunden. In der folgenden Tab. 11 sind die entsprechenden PAA-Gel- und PCR-Parameter aufgelistet.

Tab. 11: Wichtige Parameter der PAA-Gelelektrophorese.

Amplikon	Primer	Länge (bp)	PCR-Parameter (T_m, Zyklenzahl)	Gelzusammensetzung (Konzentration, AA:BAA,)
ALK3	ALK3-F1/R2	133	56 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
	ALK-3F2/R	211	58 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
ALK4	ALK4-F/R2	157	52 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
	ALK4-F2/R1	173	54 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
ALK5	ALK5-F/R	205	54 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
ALK6	ALK6-F/R	164	54 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
ALK7	ALK7-F/R	236	54 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
ALK8	ALK8-F/R2	220	54 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
ALK9	ALK9-F/R2	152	54 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
	ALK9-F2/R	173	54 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
ALK10	ALK10-F/R2	210	54 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
	ALK10-F2/R1	222	54 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
ALK11	ALK11-F1/R2	160	58 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
	ALK11-F2/R	149	58 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
ALK12	ALK12-F/R	198	54 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69
ALK13	ALK13-F/R	233	58 °C, 40 Zyklen	1.) 10 %, 1:29 2.) 12 %, 1:69

2.2.3 Suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH)

Mit der suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH) können differentiell exprimierte Transkripte zweier mRNA-Populationen - in der vorliegenden Arbeit von Primärtumor (= Population A) und Rezidiv (= Population B) desselben Patienten - angereichert werden. Dabei werden gemeinsame Transkripte durch Hybridisierung entfernt. Die Population, deren stärker exprimierte Transkripte angereichert werden sollen, wird als *Tester* bezeichnet. Die Population, mit der gemeinsame Transkripte entfernt werden, wird als *Driver* bezeichnet. Wird also Population A als *Tester* und Population B als *Driver* verwendet, werden nur solche Transkripte angereichert, die im Primärtumor stärker bzw. im Rezidivtumor schwächer oder gar nicht exprimiert werden. Vertauscht man nun *Tester* und *Driver*, erhält man diejenigen Transkripte, die im Rezidivtumor stärker bzw. im Primärtumor schwächer oder gar nicht exprimiert werden. Nachfolgend ist ein Überblick über die einzelnen Arbeitsschritte der suppressiven Subtraktionshybridisierung dargestellt:

- I. cDNA-Synthese/Amplifikation (SMART PCR cDNA Synthesis Kit von Clontech): Tester und Driver RNAs werden in cDNA transkribiert
 1. First-Strand cDNA Synthese
 2. cDNA Amplifikation mit LD PCR→ds cDNA
 3. Aufreinigung mit Promega Wizard Purification System
 4. RSA I Digestion: cDNAs werden zu kleineren, *blunt-end* Fragmenten verdaut
 5. Aufreinigung mit Nucleo spin von Clontech
- II. Adapterligation: Teilung der Tester-Population und Ligation mit zwei verschiedenen Adaptern.
- III. Hybridisierung
 - 1. Hybridisierung
 - 2. Hybridisierung
- IV. PCR Amplifikation:
 - 1. PCR-Amplifikation: nur differentiell exprimierte Sequenzen werden exponentiell amplifiziert (Suppressionschritt)
 - 2. PCR-Amplifikation: Reduktion des Hintergrunds durch Amplifikation der differentiell exprimierten Sequenzen

⇒ **differentiell exprimierte cDNA**

Nach Umwandlung der *Tester*- und *Driver*-RNAs in cDNA wird diese mit der Restriktionsendonuklease *RsaI* verdaut. Hierbei entstehen kleinere, *blunt-end* Fragmente. Die Fragmente der *Tester*-Population werden in zwei gleich große Ansätze geteilt, zu denen verschiedene Adapter gegeben werden (Abb. 3, Adapter 1 und 2R). Anschließend werden die Fragmente beider Ansätze getrennt mit einem Überschuss an *Driver*-Fragmenten (ohne Adapter) nach vorheriger Denaturierung hybridisiert (Abb. 3). Mit diesem Schritt werden die in *Driver*- und *Tester*-Population in äquimolaren Mengen vorhandenen Fragmente „entfernt“ (Molekül c, Abb. 3) und die stark überexprimierten Fragmente der *Tester*-Population reduziert (Abb. 3, Molekül b) sowie die differentiell exprimierten Fragmente als Einzelstrangmoleküle (Molekül a, Abb. 3, 1. Hybridisierung) angereichert. Anschließend werden die beiden Hybridisierungsansätze ohne vorherige Denaturierung mit frisch denaturiertem *Driver* erneut hybridisiert. Hierbei kommt es zur Assoziation der differentiell exprimierten Einzelstrangfragmente (Molekül a, Abb. 3) und es entstehen die Matrizen für die PCR-Amplifikation (Molekül e, Abb. 3, 2. Hybridisierung).

Die Adapter 1 und 2R haben 5'-identische Sequenzen, wodurch eine PCR mit nur einem Primer ermöglicht wird. Bei der ersten PCR-Amplifikation werden die differentiell exprimierten Transkripte (Molekül e, Abb. 3) exponentiell amplifiziert und somit angereichert.

Die äquimolar exprimierten Transkripte aus Primär- und Rezidivtumor werden lediglich linear amplifiziert, da sie nur eine Primerbindungsstelle besitzen (Molekül c, Abb. 3). Der restliche Überschuss an *Driver* und die nicht hybridisierten Einzelstrangmoleküle (Molekül a, Abb. 3) werden nicht amplifiziert. Da die Moleküle vom Typ B (Abb. 3) während des Denaturierungsschrittes der PCR-Reaktion eine kinetisch gegenüber der Primeranlagerung günstigere *Loop*-Struktur (Abb. 3) bilden, werden diese ebenfalls nicht amplifiziert und daher findet in diesem Schritt die Suppression statt. Bei der zweiten PCR-Amplifikation werden weiter 3'-lokalisierte *nested*-Primer verwendet. Hierbei kommt es zur weiteren Anreicherung differentiell exprimierter Transkripte und zur Reduktion des Hintergrundes.

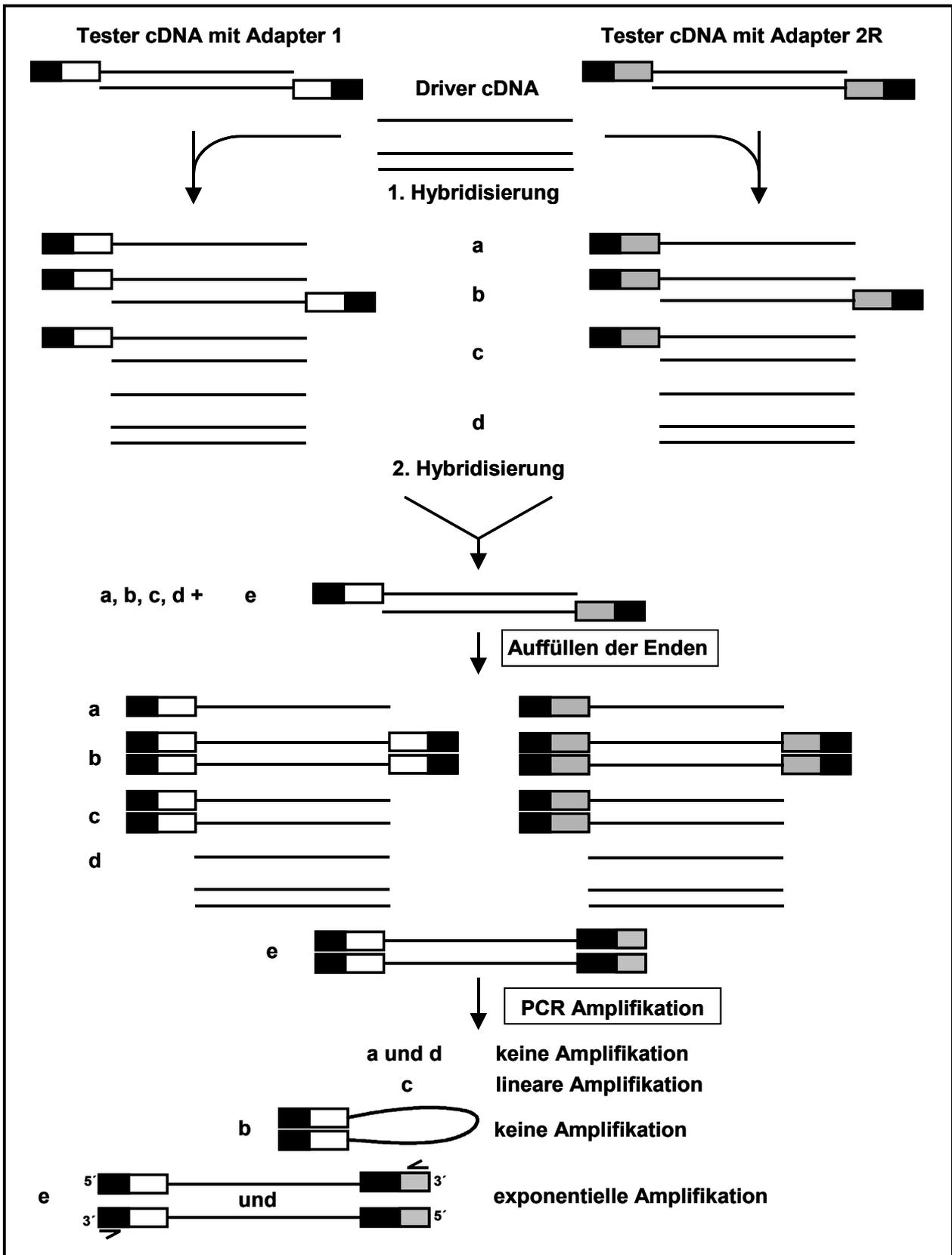


Abb. 3: Schematische Darstellung der suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH) (Einzelheiten siehe Text).

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

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

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

	HS1	HS2R
verdaute Driver-cDNA	1,5 µl	1,5 µl
Adapter 1-ligierter Tester	1,5 µl	-
Adapter 2R-ligierter Tester	-	1,5 µl
4 x Hybridisierungspuffer	1,0 µl	1,0 µl
Gesamtvolumen	4,0 µl	4,0 µl

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

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

	Temperatur	Zeit
27 Zyklen	94°C	25 s
	94°C	10 s
	66°C	30 s
	72°C	90 s

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

	Menge
verdünntes Amplifikationsprodukt	1,0 µl
10 x PCR Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTPs (je 10 mM)	0,5 µl
nested PCR Primer 1 (10 µM)	1,0 µl
nested PCR Primer 2R (10 µM)	1,0 µl
50 x Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5 µl
steriles Wasser	18,5 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl

	Temperatur	Zeit
12 Zyklen	94°C	10 s
	68°C	30 s
	72°C	90 s

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

2.2.3.1 Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte

Die differentiell exprimierten, in der SSH angereicherten Transkripte wurden mit dem Megaprime Labeling Kit (Amersham) gemäß den Herstellerangaben mit radioaktivem [α -³²P]-dCTP markiert und als Sonde für die Sichtung von cDNA-Bibliotheken verwendet. Dabei handelt es sich um "Human UniGene Filtersets" (350-2-519, 350-2-520, 350-6-129, 350-6-130; Ressourcenzentrum und Primäre Datenbank (RZPD) Berlin), die aus jeweils 36000 Klonen bestehen. Die Filter wurden drei Stunden in Church-Puffer (mit humaner Plazenta-DNA) bei 65 °C prähybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde wurde über Nacht bei 65 °C hybridisiert und dreimal 20 min bei 68 °C gewaschen. Die radioaktiven Signale der [α -³²P]-dCTP markierten Sonde wurden durch eintägige Exposition bei -80 °C von Biomax MR Röntgenfilmen (Kodak) detektiert und mit dem Auge ausgewertet. Es wurden nur die stärksten

Signale ausgewählt. Die Signalkoordinaten wurden entsprechend den Angaben des RZPD bestimmt und mit dem Programm `dnsfa.py` (Michael Gutmann, Multimediazentrum, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) dem entsprechenden Imageclone bzw. Gen zugeordnet.

2.2.4 Real-Time Reverse Transkription (RT)-PCR

Zur Verifizierung der Ergebnisse der SSH-Analyse wurde die Expression von zwei der differentiell exprimierten Gene – *BMS1L* und *DPYSL4* – mittels der *Real-Time* RT-PCR (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription von RNA in cDNA) an einer Tumorserie aus primären und sekundären Glioblastomen sowie an Glioblastomzelllinien untersucht. Diese Methode basiert auf einer normalen PCR-Reaktion in Anwesenheit eines Fluoreszenzfarbstoff, der in die doppelsträngige DNA interkaliert. Am Ende eines PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz der gebildeten DNA-Doppelstränge gemessen. Dies ermöglicht eine kontinuierliche Aufzeichnung der Produktbildung über die Zeit. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Produktmenge und wird als sog. *Rn*-Wert (*normalized reporter*; Verhältnis von Reportersignal zu mittlerer Grundintensität der passiven Referenz) angegeben (Abb. 4).

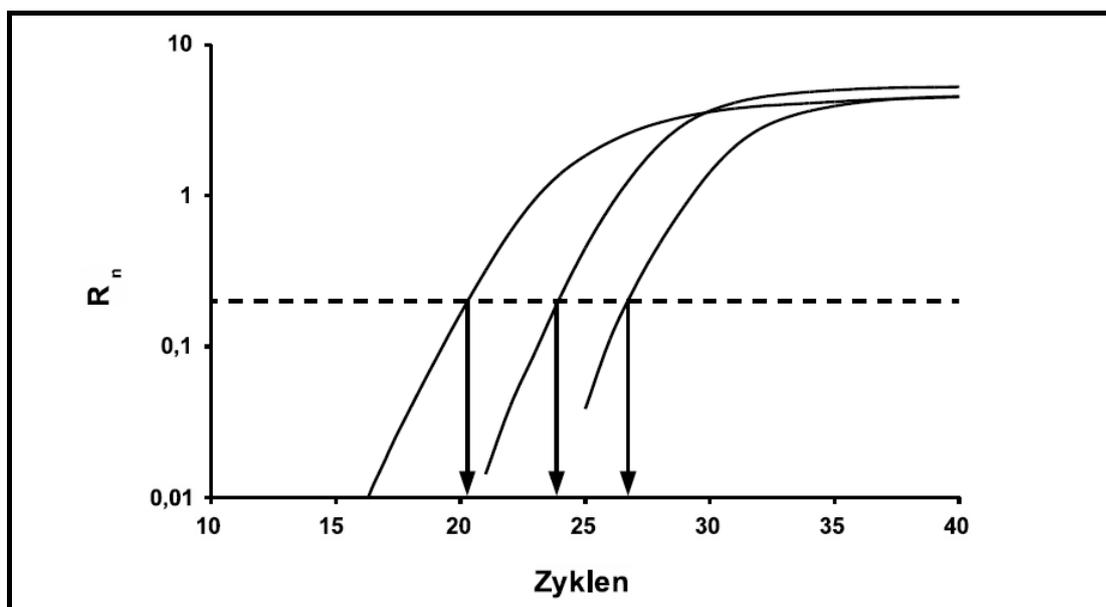


Abb. 4: Beispiel der graphischen Darstellung der Produktamplifikation anhand fiktiver Kurvenverläufe. Die Expressionsstärke nimmt von links nach rechts ab, die selbe Fluoreszenzaktivität (R_n) wird erst bei einer größeren Zyklenzahl erreicht (schwarze Pfeile).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Darstellung der Produktamplifizierung graphisch durch Auftragung der R_n -Werte (Ordinate) gegen die Zyklenzahl (Abszisse) (siehe Abb. 4). Zur Qualitätskontrolle wurde eine Dissoziationskurve des Amplikons in einem Bereich von 60 bis 100°C erstellt. Die Auswertung erfolgte durch

Analyse der C_T -Werte (*threshold cycle*: Schwellenwert; mathematisch: $C_T = \frac{dR_n}{dZyklen}$)

für alle erhaltenen Kurven. Hierzu wurde ein konstanter R_n -Wert festgelegt, der alle Kurven im logarithmischen Amplifikationsbereich schneidet. Die zu diesem R_n -Wert gehörigen Zyklenzahlen (C_T -Werte) wurden als Abszissenwerte der jeweiligen Schnittpunkte der Kurven abgelesen und tabellarisch zusammengestellt. Da bei der *Real-Time* RT-PCR immer dasselbe PCR-Programm benutzt wurde, mussten vorab die optimalen Primerverhältnisse ausgetestet werden. Hierzu wurde eine 3 x 3 Primermatrix für jedes Oligonukleotidpaar erstellt, bei der 100 µM, 600 µM und 1,8 mM des Vorwärtsprimers mit jeweils 100 µM, 600 µM und 1,8 mM des Rückwärtsprimers in einer PCR-Reaktion auf dem GeneAmp 5700 getestet wurden. Für die Expressionsanalyse der beiden Gene an den Tumorserien wurden die Verhältnisse ausgewählt, die in der Dissoziationskurve nur einen Peak bei der errechneten Schmelztemperatur zeigten und den niedrigsten C_T -Wert aufwiesen. Die Primersequenzen sind in Tab. 6 in Kapitel 2.1.2 aufgelistet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Genexpressionsanalysen mit den ermittelten Primerverhältnissen nach folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

Reaktionsansatz für BMS1L:

Volumen	Komponenten
5,0 µl	cDNA (1:50 verdünnt)
12,5 µl	PCR- Reaktionsmix aus <ul style="list-style-type: none"> - 10 x Reaktionspuffer - 25 mM MgCl₂ - 2,5 mM dNTPs (je 2 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - AmpliTaq Gold Polymerase - SYBR Green Lösung (1:2000)
4,5 µl	Vorwärtsprimer
0,25 µl	Rückwärtsprimer
2,75 µl	<i>Aqua dest.</i>
25,0 µl	Gesamtvolumen

Reaktionsansatz für *DPYSL4* und *ARF1* (Referenzgen):

Volumen	Komponente
5,0 µl	cDNA (1:50)
12,5 µl	PCR- Reaktionsmix aus <ul style="list-style-type: none"> - 10 x Reaktionspuffer - 25 mM MgCl₂ - 2,5 mM dNTPs (je 2 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - AmpliTaq Gold Polymerase - SYBR Green Lösung (1:2000)
1,5 µl	Vorwärtsprimer
1,5 µl	Rückwärtsprimer
4,5 µl	Aqua destillata
25,0 µl	Gesamtvolumen

Die PCR-Reaktionen wurden alle entsprechend dem nachfolgenden Schema in einem *Real-Time* PCR-Gerät der Fa. Applied Biosystems durchgeführt:

1.Schritt	10 min	95°C	1 x (Aktivierung der HotStar Taq-Polymerase)
2.Schritt	15 sec	95°C	40 x
3.Schritt	60 sec	60°C	

Für die mathematische Auswertung der Expressionsstärke wurde von jeder cDNA eine Dreifachbestimmung sowohl für das Zielgen als auch für das Referenzgen *ARF1* durchgeführt. Von jedem dieser Triplets wurde der Mittelwert gebildet und die Differenz des Mittels von Ziel- und Referenzgen errechnet (ΔC_T). Die ΔC_T -Werte der beiden nicht-neoplastischen Gehirnproben wurden gemittelt und von den ΔC_T -Werten der Tumorproben subtrahiert ($\Delta\Delta C_T$ -Wert). Um eine übersichtlichere Darstellung zu erlangen, wurden die $\Delta\Delta C_T$ -Werte invers zur Basis 2 potenziert ($2^{-\Delta\Delta C_T} C_T$), so dass Werte > 1 einer stärkeren und Werte < 1 einer schwächeren Expression im Vergleich zum Referenzgewebe entsprechen. Werte $\leq 0,5$ entsprechen einer funktionellen Herunterregulation, d.h. einem funktionell relevanten mRNA-Expressionverlust des jeweiligen Gens.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die univariate statistische Analyse zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionswerte der einzelnen Tumorgruppen mittels eines Student's T-Test wurde mit der GraphPad Prism 4 Software durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der *BMPR1A*-Mutationsanalyse

Die Mutationsanalyse des *BMPR1A* Gens wurde für alle 11 Exone mittels Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP)-Methode durchgeführt. Hierbei wurden alle PAA-Gelelektrophoresen bei Raumtemperatur und mit jeweils zwei unterschiedlichen Gelzusammensetzungen bei 120 Volt durchgeführt (siehe Tab. 11). Insgesamt wurden 42 primäre Glioblastome und 16 sekundäre Glioblastome untersucht. Als Kontrolle wurde aus venösem Blut isolierte DNA (Leukozyten-DNA) von 6 Patienten verwendet. Bei allen untersuchten Proben, Exonen und Bedingungen zeigten sich nach der Silberfärbung ein homogenes Bandenmuster, so dass sich kein Hinweis für eine Mutation des *BMPR1A* Gens in den untersuchten Proben ergab (Abb. 5). Weiterführende Untersuchungen wurden daher nicht durchgeführt.

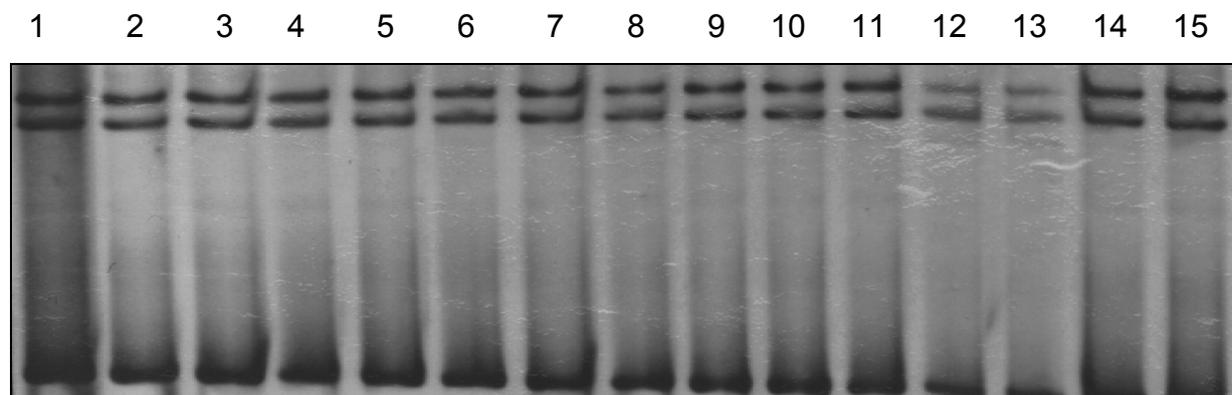


Abb.5: SSCP/Heteroduplex-Muster für Exon 4.2 des *BMPR1A* Gens in Glioblastomen. Tumor- (Spur 1-12) und Leukozyten-DNAs (Spur 13-15) zeigen das gleiche homogene Bandenmuster nach Silberfärbung des Polyacrylamidgels.

3.2 Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels suppressiver Subtraktionshybridisierung (SSH)

Mit der suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH) wurden differentiell exprimierte Transkripte zweier mRNA-Populationen – von Primärtumor (anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III) und Rezidivtumor (Glioblastom WHO-Grad IV) - angereichert, um neue, mit der Gliomprogression assoziierte Gene zu identifizieren. Das spezielle Interesse im Hinblick auf ein mögliches Tumorsuppressorgen galt vor allem Expressionsverlusten auf Chromosom 10 im Rezidivtumor. Hierzu wurde zunächst die aus den Tumoren isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung der SSH-Methode wurden stärker exprimierte Transkripte des Primärtumors durch die Vorwärtssubtraktion (cDNA-Population des Primärtumors minus cDNA-Population des Rezidivs) 500-1000 fach angereichert. Überexprimierte Transkripte des Rezidivs wurden durch die Rückwärtssubtraktion (cDNA-Population des Rezidivs minus cDNA-Population des Primärtumors) amplifiziert. Die differentiell exprimierten, in der SSH angereicherten Transkripte wurden mit radioaktivem [α - 32 P]-dCTP markiert und als Sonde für die Sichtung von cDNA-Bibliotheken verwendet. Dabei handelt es sich um Human UniGene Filtersets (350-2-519, 350-2-520, 350-6-129, 350-6-130; Ressourcenzentrum und Primäre Datenbank (RZPD) Berlin). Die Human UniGene Sets (Library 950) repräsentieren 36000 in der Unigene Datenbank aufgeführte humane Gene und ESTs (*expressed sequence tags*), verteilt auf zwei hoch-dichte Nylonfilter.

3.2.1 Ergebnisse der Vorwärtssubtraktion

Die Hybridisierung der subtrahierten cDNA Population aus der Vorwärtssubtraktion auf die *Human UniGene* Filter (Abb. 6), führte zur Identifizierung von 43 Genen, die im Rezidivtumor eine verminderte Expression zeigten und somit mögliche Tumorsuppressor-Kandidatengene darstellen. Auf Chromosom 10 konnten die beiden Kandidatengene – *BMS1L* (Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog) und *DPYSL4* (Dihydro-pyrimidinase-like 4 protein) - sowie *VIM* (Vimentin) identifiziert werden.

Die Effektivität dieses Subtraktionsansatzes zeigte sich darin, dass mit *HDAC3* (Histone deacetylase 3), *DMXL1* (Dmx-like 1 protein) auf Chromosom 5 und *EFA6R* (ADP-ribosylation factor guanine nucleotidfactor 6) auf Chromosom 8 drei Gene

identifiziert wurden, die bereits in einem vorhergehenden, grösseren Subtraktionsansatz als differentiell exprimiert beschrieben wurden [49]. Alle Gene mit verminderter Expression im Rezidivtumor sind in der folgenden Tab. 12 aufgeführt.

Tab. 12: Kandidatengene, die durch die SSH-Analyse eines Gliompaars (Primärtumor AAll ohne Allelverlust auf 10q26-qter, Rezidivtumor GBIV mit Allelverlust auf 10q26-qter) identifiziert wurden. Die aufgelisteten Gene werden im Primärtumor stärker exprimiert.

Genname	Genlocus	Gentitel
SMP1	1p36.11	Small membrane protein 1
MTX1	1q21	Metaxin 1
GLT25D2	1q25	Glycosyltransferase 25 domain containing 2
DDEF1	1q36.12	Development and differentiation enhancing factor-like 1.
SF3B1	2q33.1	Spliceosomal protein SAP 155
FACL3	2q34-q35	Fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3
PIP5K3	2q34	Phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase type III
FGB	4q28	Human fibrinogen beta chain gene
PJA2	5q21.3	Praja 2, RING-H2 motif containing
DMXL1	5q23.1	Dmx-like 1 protein
HDAC3	5q31	Histondeacetylase 3
C5orf5	5q31	Potential nuclear protein C5orf5 GAP-like protein
HINT	5q31.2	Proteinkinase C Inhibitor (PKCI-1), Histidine triad Nucleotide-binding protein
ANKHD1	5q31.2	Ankyrin repeat and KH domain containing 1, KIAA1085 protein
NUDT3	6p21.33-p21.2	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 3
MAK	6q22	Male germ cell-associated kinase
EGR3	8p23-p21	EGR3 protein ("early growth response 3")
EFA6R	8pter-p23.3	ADP-ribosylation factor guanine nucleotidfactor 6
INDO	8p12-p11	Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase
NTRK2	9q22.1	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
AK3	9q24.1	Aldolase B, Adenylatkinase 3
PAPPA	9q33.1	Pregnancy-associated plasma protein A
VIM	10p13	Vimentin
BMS1L	10q11.21	BMS1-like, ribosome assembly protein (yeast)
DPYSL4	10q26	Dihydropyrimidinase-like 4 protein
NRIP3	11p15.4	Nuclear receptor-interacting protein 3
OSBP	11q12-q13	Oxysterol binding protein
ARL2	11q13	ADP-ribosylation factor-like protein 2 (ARL2)
CRYAB	11q23.1	Crystallin, alpha B
TUBA3	12q13.12	Alpha-tubulin 3

LOC51067	12q13.11- 12q14.3	CGI-04 protein
TBC1D15	12q21.1	TBC1 domain family member 15 (FLJ12085)
AKAP6	14q12	A kinase (PRKA) anchor protein 6
KNS2	14q32.3	Kinesin 2 (60-70kD)
ARL6IP	16p12.3	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein
LGALS9	17q11.2	Lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)
RHOT1	17q11.2	Ras homolog gene family, member T1 (FLJ11040)
GFAP	17q21	Glial fibrillary acidic protein
NAGLU	17q21	N-acetylglucosaminidase, alpha- (Sanfilippo disease IIIB)
GCN5L2	17q21	GCN5 (general control of amino-acid synthesis, yeast,
ABCA10	17q24	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 10
C21orf19	21q21.1	Chromosome 21 open reading frame 91, YG81
DNAL4	22q13.1	Dynein light chain 4, axonemal

3.2.2 Ergebnisse der Rückwärtssubtraktion

Die Hybridisierung der subtrahierten cDNA-Population aus der Rückwärtssubtraktion auf die Human UniGene Filter führte zur Identifizierung von 50 Genen, die im Rezidivtumor eine höhere mRNA-Expression zeigten und damit potentielle Onkogen-Kandidaten darstellen.

Tab. 13: Kandidatengene, die durch die SSH-Analyse (GBIV mit Allelverlust auf 10q26-qter minus AAIII ohne Allelverlust auf 10q26-qter) eines Gliompaars identifiziert wurden. Die aufgelisteten Gene werden im Rezidivtumor stärker exprimiert .

Genname	Genlocus	Gentitel
USP48	1p36.12	Ubiquitin specific protease 48, FLJ11328
C1orf38	1p35.3	Basement membrane-induced gene
CACHD1	1p31.3	Cache domain containing 1, KIAA1573 protein
HLX1	1q41	H2.0 (Drosophila)-like homeo box 1
ENAH	1q42.12	Enabled protein homolog
PCGF1	2p13.1	Polycomb group ring finger 1 (MGC10882)
IGKC	2p12	Immunoglobulin kappa constant
MAP2	2q34	Microtubule-associated protein 2
BHLHB2	3p26	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2
RBM6	3p21.31	RNA binding motif protein 6
TNFSF10	3q26	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
APOD	3q26.2-qter	Apolipoprotein D
C4orf14	4q12	C4orf14 protein, hypothetical protein MGC3232
PRDM8	4q21	PR domain containing 8

HMGCS1	5p12	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)
SRP19	5q22.2	Signal recognition particle 19kD
HLA-DQA1	6p21.32	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
HLA-DRA	6p21.32	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha
VEGF	6p12	Vascular endothelial growth factor
BCALF1	6q23.3	BCL2-associated transcription factor 1, KIAA0164 protein
WTAP	6q25.3	Wilms-tumour1-associating protein
MGC5618	6q25	Hypothetical protein MGC5618
PDGFA	7p22	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
GNGT1	7q21.3	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma
ASPH	8q12.3	Aspartate beta-hydroxylase
ARFGEF1	8q13.2	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein
HSF1	8q24.3	Heat shock factor protein 1
KIAA0143	8q24.22	KIAA0143 protein
CDK9	9q34.1	Cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)
NCOA4	10q11.2	Nuclear receptor coactivator 4
ADD3	10q25.1	Adducin 3 (gamma)
RELA	11q13	Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit
ATM	11q22.3	Ataxia telangiectasia mutated
CD4	12q13.31	Human T-cell surface glycoprotein T4 mRNA
RAB21	12q21.1	RAB21, member RAS oncogene family, KIAA0118 protein
NUDT4	12q22	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4
C14orf131	14q32.32	C14orf131 protein, hypothetical protein FLJ11132
PHF23	17p13.1	PHD finger protein 23 (MGC2941)
CD68	17p13.1	CD68 antigen"
ULK2	17p11.2	Unc-51-like kinase 2 (C. elegans), KIAA0623 gene product
SOCS7	17q12	Suppressor of cytokine signaling 7, NAP4
ATXN7L3	17q21.31	Ataxin 7-like 3 (DKFZp761G2113)
FSCN2	17q25.3	Fascin homolog 2, actin-bundling protein, retinal
NAPA	19q13.32	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha
XRN2	20p11.22	5'-3' Exoribonuclease 2
MYL9	20q11.23	Myosin, light polypeptide 9, regulatory
GP1BB	22q11.21	Glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide
NCF4	22q13.1	Neutrophil cytosolic factor 4 (40kD)
AKAP4	Xp11.2	A kinase (PRKA) anchor protein 4
IGSF1	Xq26.1	Immunoglobulin superfamily, member 1

3.3 Validierung der Tumorsuppressor-Kandidatengene *BMS1L* und *DPYSL4* mittels *Real-Time* RT-PCR

Zur Validierung der mit der SSH-Analyse identifizierten Tumorsuppressor-Kandidatengene *BMS1L* und *DPYSL4* auf Chromosom 10q wurde die *Real-Time* RT-PCR als unabhängige Methode verwendet. Die Zunahme an Amplifikationsprodukt ist dabei semiquantitativ in Echtzeit bestimmbar durch Interkalieren des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green in die doppelsträngige DNA. Um die mRNA-Expression der zwei ausgewählten Kandidatengene in Abhängigkeit von der Progression astrozytärer Gliome zu überprüfen, wurde eine Tumorserie von Gliomen, bestehend aus primären und sekundären Glioblastomen WHO-Grad IV sowie Astrozytomen WHO-Grad II und III untersucht. Hierbei wurden die Expressionslevel der zwei Kandidatengene auf das ubiquitär exprimierte Referenzgen *ARF1* (*ADP ribosylation factor 1*) normalisiert und relativ zu nicht-neoplastischem Hirngewebe bestimmt. Werte >1 entsprechen einer verstärkten, Werte <1 einer verminderten Expression relativ zum Normalgewebe, Werte $\leq 0,5$ entsprechen einer deutlichen Herunterregulation des jeweiligen Gens.

3.3.1 Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR Expressionsanalyse des *BMS1L*-Gens

Die Bestimmung des relativen Expressionsniveaus von *BMS1L* in 39 primären Glioblastomen mittels *Real-Time* reverser Transkriptase-PCR zeigte in 20 der Tumoren (51 %) eine im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe deutlich erniedrigte Expression des Gens ($\leq 0,5$; Abb. 6). Bei 17 (44 %) Glioblastomen lag die Expressionshöhe zwischen 0,5 und 1,5 und zwei Tumoren hatten eine erhöhte mRNA-Expression ($> 1,5$) relativ zur *BMS1L* Expression in normalem Hirngewebe.

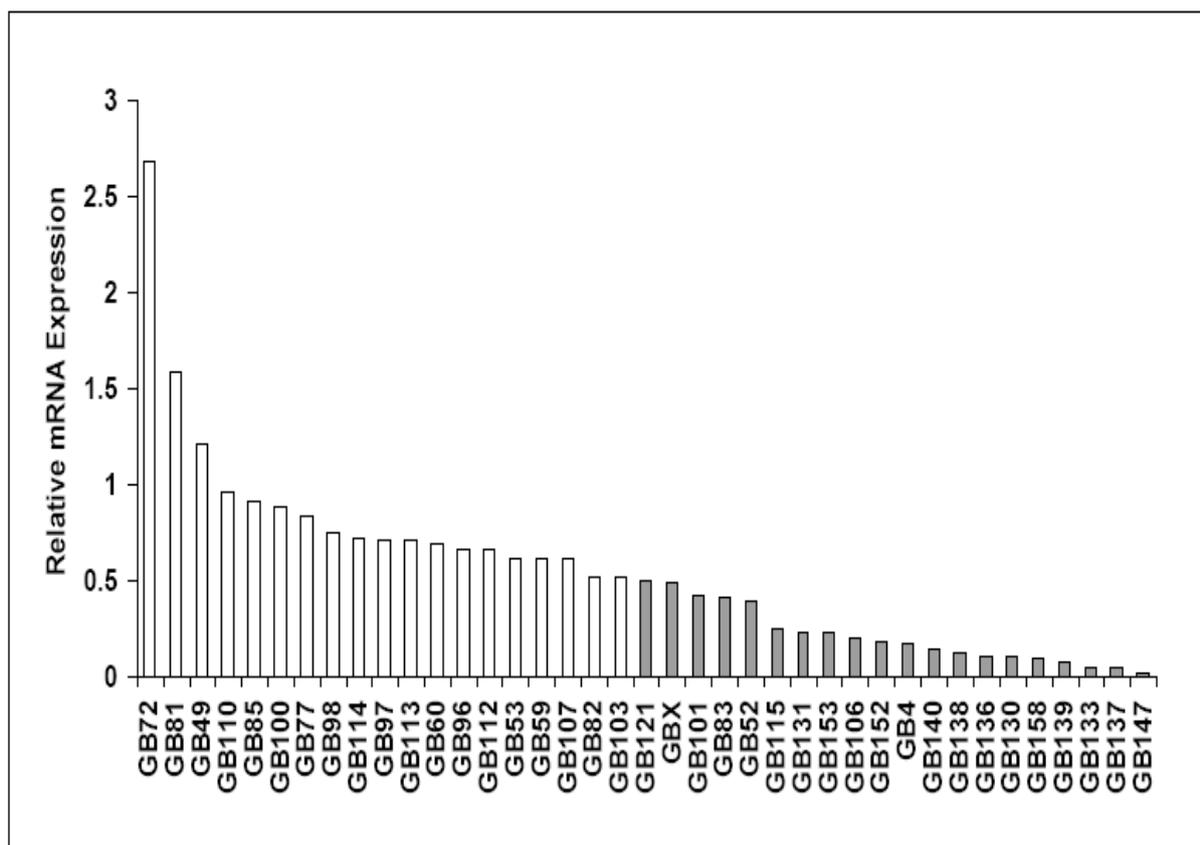


Abb.6: Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR Analyse des *BMS1L* Gens in 39 primären Glioblastomen WHO-Grad IV. Werte $\leq 0,5$ entsprechen einer deutlich verminderten Genexpression (graue Säulen).

Bei den sekundären Glioblastomen ($n = 8$) konnte in keinem der untersuchten Tumoren eine deutlich erniedrigte Genexpression nachgewiesen werden. Dagegen zeigten zwei Tumoren (sGB748 und sGB234, Abb. 7) sogar eine deutlich erhöhte *BMS1L* Expression im Vergleich zu normalem Hirngewebe.

In der Mehrzahl der untersuchten niedriggradigen ($n = 6$) und anaplastischen Astrozytomen ($n = 5$) war das *BMS1L*-Expressionsniveau entsprechend dem in nicht-neoplastischem Hirngewebe (Abb. 7). Zwei Astrozytome WHO-Grad II (A207 und A181) zeigten eine deutlich verminderte mRNA-Expression.

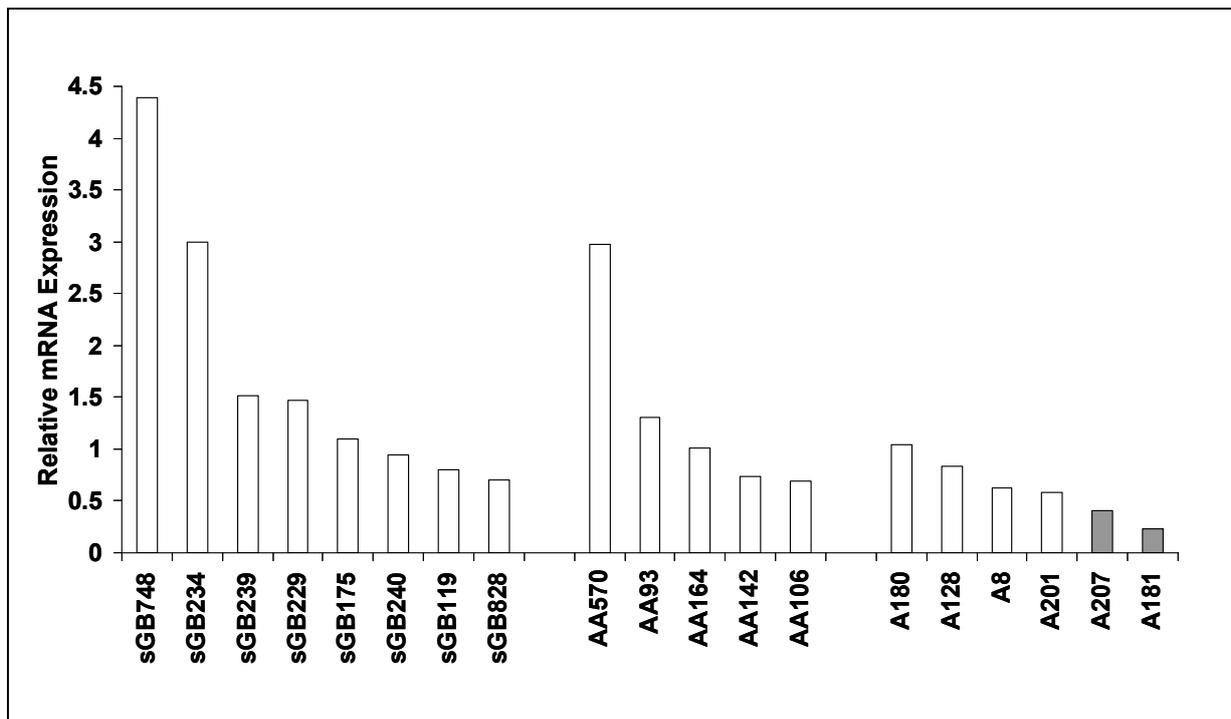


Abb. 7: Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR Analyse des *BMS1L* Gens in acht sekundären Glioblastomen (sGB) WHO-Grad IV, fünf anaplastischen Astrozytomen (AA) WHO-Grad III sowie in sechs Astrozytomen (A) WHO-Grad II. Werte $\leq 0,5$ entsprechen einer deutlich verminderten Genexpression (graue Säulen).

Im Vergleich der Expressionsniveaus der einzelnen Tumorgruppen zueinander konnte für die primären Glioblastome nur im Vergleich zu den sekundären Glioblastomen eine signifikant niedrigere *BMS1L*-Expression nachgewiesen werden (Student's T-Test, p-Wert = 0,0305, Tab. 14). Erstaunlicherweise ergab sich auch für die Astrozytome WHO-Grad II eine signifikant niedrigere *BMS1L* Expression als in den sekundären Glioblastomen (Student's T-Test, p-Wert = 0,0459; Tab. 14).

Tab. 14: Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionswerte der einzelnen Tumorgruppen mittels eines 2-Gruppen Student's T-Test (All vs. AAIII, All vs. pGBIV, All vs. sGBIV, AAIII vs. pGBIV und pGBIV vs. sGBIV).

	p-Wert		p-Wert
All vs. AAIII	0,1635	AAIII vs. sGBIV	0,5393
All vs. pGBIV	0,5975	pGBIV vs. sGBIV	0,0305
All vs. sGBIV	0,0459	All vs. GBIVges*	0,4625
AAIII vs. pGBIV	0,1300	AAIII vs. GBIVges*	0,2341

Signifikante Werte sind fett markiert. *ges, Gruppe aus primären und sekundären Glioblastomen.

Zur näheren Untersuchung möglicher Mechanismen, die zu der erniedrigten Expression von *BMS1L* in der Mehrzahl der primären Glioblastome führen, wurde die Expression des Gens in Glioblastomzelllinien vor und nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A untersucht. 5-Aza-2'-Deoxycytidin, ein Cytidinanalog, wird bei der Zellteilung in den neu-synthetisierten DNA-Strang eingebaut und kann, im Gegensatz zu Cytidin, nicht an seiner C5-Position methyliert werden. Zusätzlich hemmt die Substanz die DNA-Methyltransferase 1 irreversibel. Trichostatin A (TSA) ist ein Histondeacetylasehemmer. Beide Substanzen verändern die DNA-Struktur dahingehend, dass eine Transkription von epigenetisch abgeschalteten Genen wieder stattfinden kann.

Bei den Glioblastomzelllinien (n = 4) zeigten drei (CCF-STTG1, T98G und TP365MG, Abb. 8), die mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und TSA behandelt wurden, eine höhere *BMS1L*-Expression als die jeweiligen unbehandelten Zellen. Bei A172 zeigte sich kein expressionsfördernder Effekt durch die Behandlung.

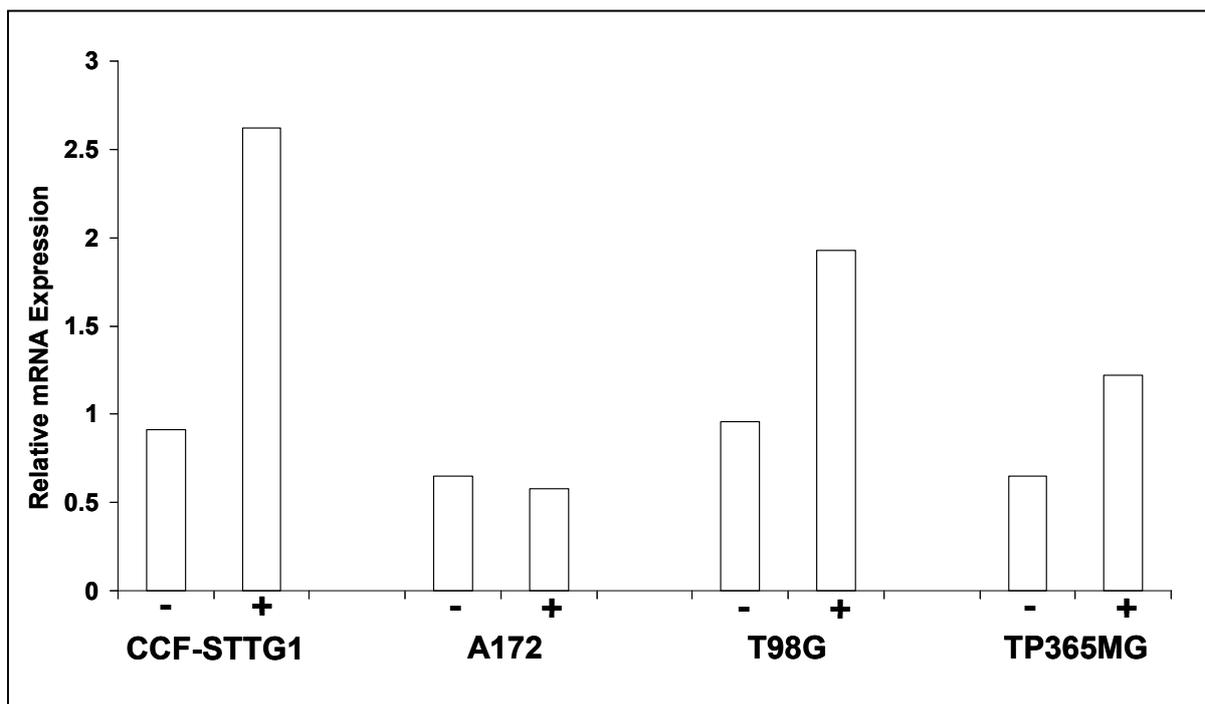


Abb. 8: Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR Analyse des *BMS1L*-Gens in vier mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und TSA behandelten (+) bzw. unbehandelten (-) Glioblastomzelllinien.

3.3.2 Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR Expressionsanalyse des *DPYSL4*-Gens

DPYSL4 (*Dihydropyrimidinase-like 4/CRMP3/ULIP 4*) kartiert auf Chromosom 10q25.2-q26 und wurde in dieser Arbeit als Gen identifiziert, welches im Rezidivtumor eine niedrigere Expression aufweist als im niedriggradigeren Primärtumor. Eine Expressionsanalyse des Gens in 33 primären Glioblastomen ergab in 25 der Tumoren (76 %) eine um mindestens um die Hälfte niedrigere Transkriptlevel als in normalem Hirngewebe (Abb. 9). Acht Tumoren zeigten ein dem normalen Hirngewebe vergleichbares Expressionsniveau.

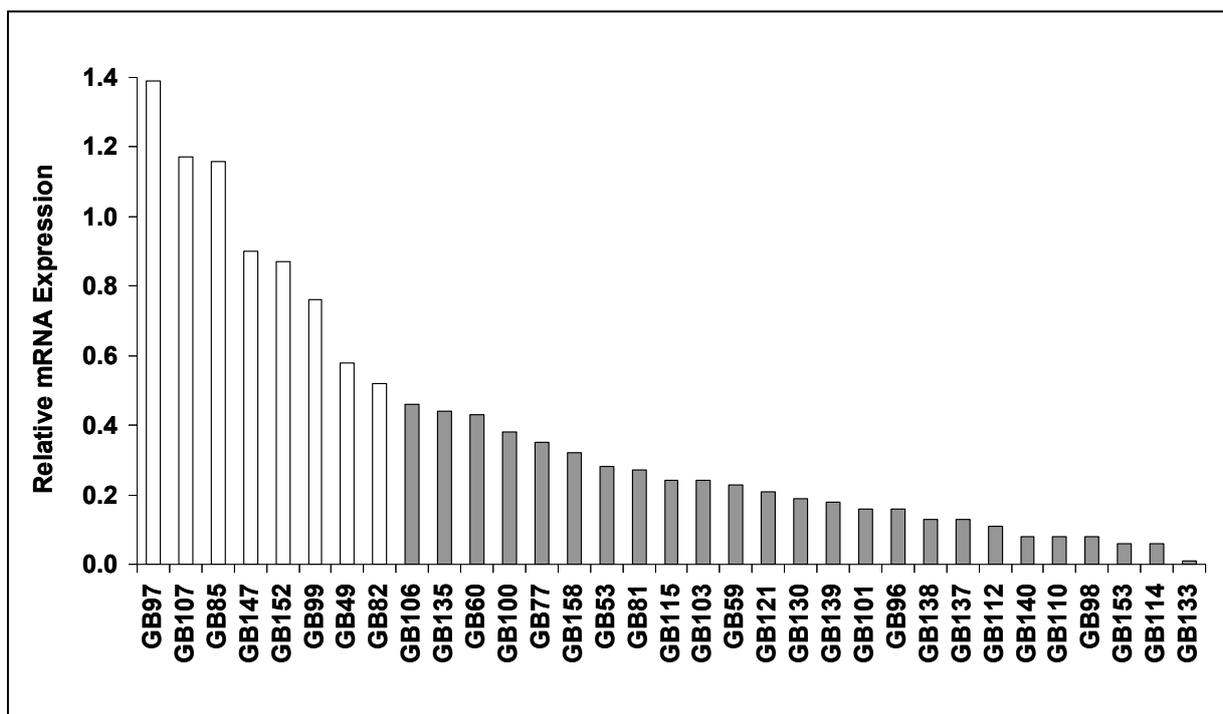


Abb. 9: Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR Analyse des *DPYSL4* Gens in 33 primären Glioblastomen WHO-Grad IV. Expressionswerte $\leq 0,5$ entsprechen einer deutlich verminderten Genexpression (graue Säulen) im Vergleich zu nicht neoplastischem Hirngewebe (Expressionslevel =1).

Bei den sekundären Glioblastomen (n = 10), anaplastischen Astrozytomen (n = 11) und niedriggradigen Astrozytomen (n = 11) konnte in 9 (90 %), 4 (36 %) und 5 (45 %) der Tumore eine deutlich verminderte *DPYSL4* Expression im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden ($\leq 0,5$; Abb.10 - 13).

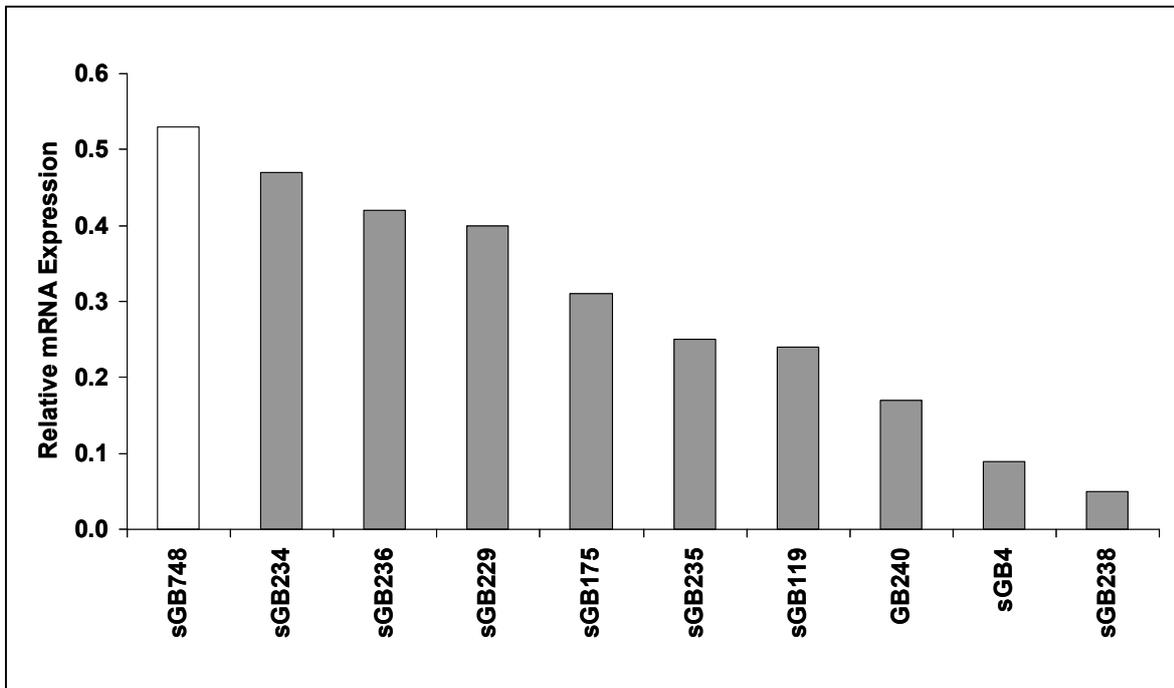


Abb. 10: Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR Analyse des *DPYSL4* Gens in 10 sekundären Glioblastomen WHO-Grad IV. Expressionswerte $\leq 0,5$ entsprechen einer deutlich verminderten Genexpression (graue Säulen) im Vergleich zu nicht neoplastischem Hirngewebe (Expressionslevel =1).

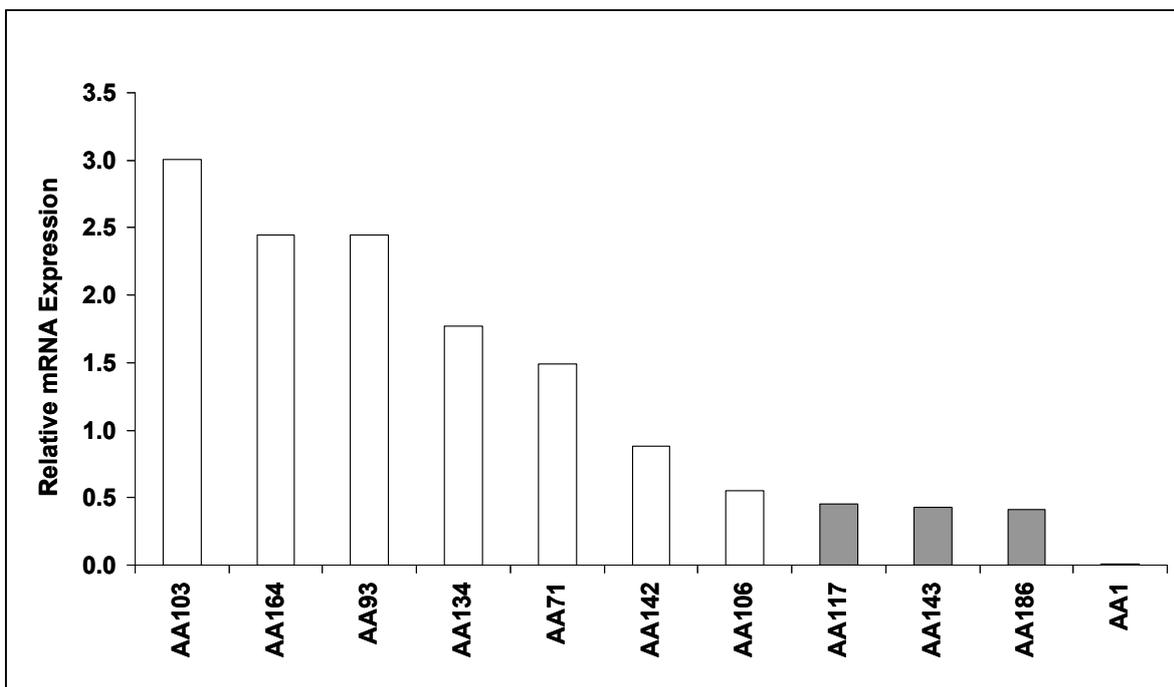


Abb. 11: Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR Analyse des *DPYSL4* Gens in 11 anaplastischen Astrozytomen (AA) WHO-Grad III. Expressionswerte $\leq 0,5$ entsprechen einer deutlich verminderten Genexpression (graue Säulen) im Vergleich zu nicht neoplastischem Hirngewebe (Expressionslevel =1).

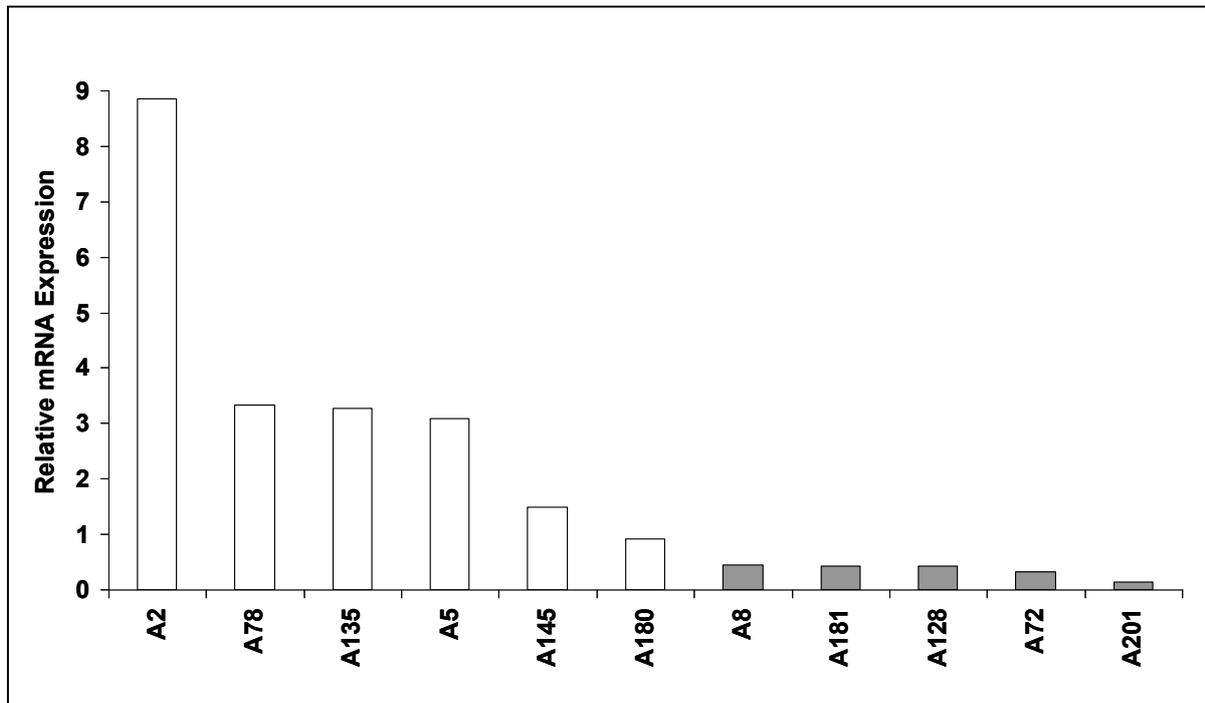


Abb. 12: Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR Analyse des *DPYSL4* Gens in 11 Astrozytomen (A) WHO-Grad II. Expressionswerte $\leq 0,5$ entsprechen einer deutlich verminderten Genexpression (graue Säulen) im Vergleich zu nicht neoplastischem Hirngewebe (Expressionslevel =1).

Zusammengefaßt zeigt *DPYSL4* eine progressionsassoziierte Verminderung der Expression in astrozytären Tumoren (Abb. 13). Während der Mittelwert der mRNA Expression bei niedriggradigen Astrozytomen noch bei 2,1 relativ zur Expression in nicht-neoplastischem Hirngewebe liegt, fällt er bei den anaplastischen Astrozytomen auf 1,3 und sinkt bei den primären und sekundären Glioblastomen auf 0,4 bzw. 0,3 ab. Signifikante Expressionsunterschiede finden sich dabei zwischen der Gruppe der anaplastischen Astrozytome und den Glioblastomen sowie den WHO-Grad II Astrozytomen und den sekundären Glioblastomen (Tab. 15).

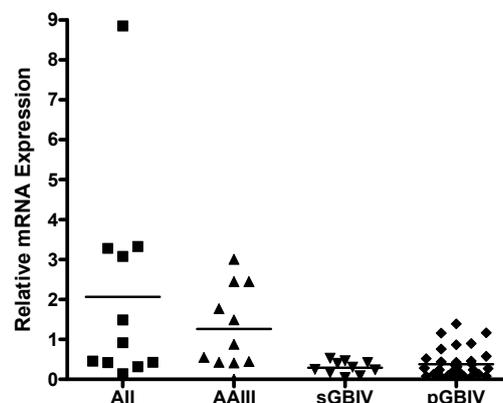


Abb. 13: Graphische Darstellung der Expressionsverteilung von *DPYSL4* in den vier Tumorguppen. *Horizontale Linie*, Mittelwert der *DPYSL4* Expression in der jeweiligen Tumorgruppe.

Tab. 15: Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionswerte der einzelnen Tumorgruppen mittels eines 2-Gruppen Student's T-Test (All vs. AAll, All vs. pGBIV, All vs. sGBIV, AAll vs. pGBIV und pGBIV vs. sGBIV).

	p-Wert		p-Wert
All vs. AAll	0,3552	AAll vs. sGBIV	0,0106
All vs. pGBIV	0,0560	pGBIV vs. sGBIV	0,2727
All vs. sGBIV	0,0460	All vs. GBIVges*	0,0534
AAll vs. pGBIV	0,0176	AAll vs. GBIVges*	0,0155

Signifikante Werte sind fett markiert. *ges, Gruppe aus primären und sekundären Glioblastomen.

Bei der Expressionsanalyse von Glioblastomzelllinien (n = 5) zeigten alle mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und TSA behandelten Zellen eine höhere *DPYSL4* Expression als die jeweiligen unbehandelten Kontrollen (Abb. 14)

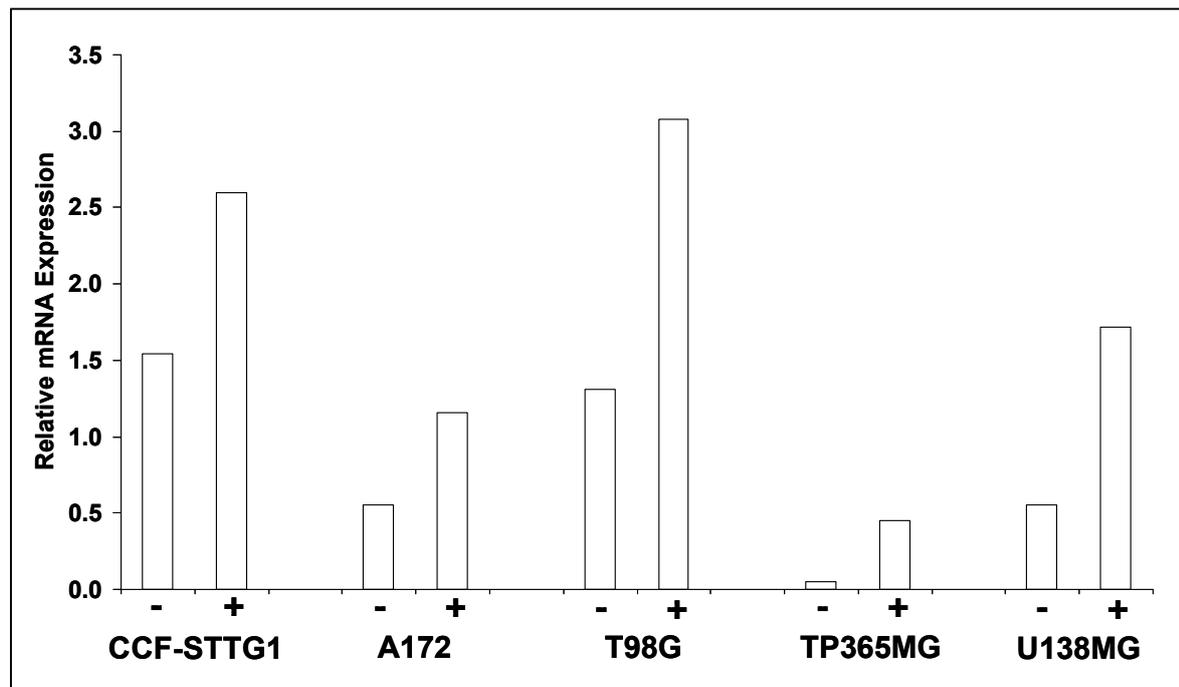


Abb.14: Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR Analyse des *DPYSL4* Gens in fünf mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und TSA behandelte (+) bzw. unbehandelte (-) Glioblastomzelllinien.

4 Diskussion

Glioblastome sind die häufigsten Gehirntumoren beim Erwachsenen und ihr infiltratives Wachstum macht eine vollständige Resektion in der Regel unmöglich, so dass die Prognose für den Patienten äußerst schlecht ist. Die Standardtherapie ist bislang der neurochirurgische Eingriff sowie die postoperative Bestrahlung und Chemotherapie. In zahlreichen molekulargenetischen Untersuchungen der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der genetischen und chromosomalen Veränderungen vom diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) über das anaplastische Astrozytom bis zum Glioblastom (WHO-Grad IV) signifikant zunimmt. Somit ist also die maligne Progression offensichtlich mit einer Akkumulation molekularer Aberrationen assoziiert. Diese Aberrationen führen funktionell meist zu abnormen Expressionen wichtiger Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene. Ein spezifisches genetisches Merkmal von Glioblastomen sind Allelverluste auf Chromosom 10. Bisher konnte mit *PTEN* (*Phosphatase and tensin homology*) auf 10q23 ein Tumorsuppressorgen identifiziert werden, das jedoch nur in 30-40 % der primären Glioblastome und in 5 % der sekundären Glioblastome Mutationen aufweist (siehe 1.2.3). Somit besteht ein Missverhältnis zwischen der Häufigkeit von Allelverlusten auf Chromosom 10 und der Häufigkeit von *PTEN*-Mutationen, so dass die Wahrscheinlichkeit für ein weiteres Tumorsuppressorgen auf Chromosom 10 sehr gross ist [2].

4.1 Mutationsanalyse des *BMPR1A* Gens

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher eine Mutationsanalyse des potentiellen Tumorsuppressorgens *BMPR1A* (10q22) durchgeführt. Das *BMPR1A*-Gen auf Chromosom 10q22 kodiert für den *Bone Morphogenetic Protein Receptor Typ A* der zur TGF- β (*Transforming growth factor β*) Superfamilie gehört. Zu dieser Superfamilie gehören mehr als 25 Signalproteine, die an transmembranöse Rezeptoren mit einer zytoplasmatischen Serin/Threonin Kinase-Domäne binden, die wiederum nachgeschaltete Signalproteine der SMAD-Proteinfamilie phosphorylieren (sog. R-SMAD). Diese verbinden sich mit einem weiteren SMAD-Protein (sog. Co-SMAD), welches wiederum zur Translokation des aktivierten SMAD-Proteinkomplex

in den Zellkern und dort zur direkten Beeinflussung der Genexpression (siehe Abb. 15) führt [40]. Somit besitzen die Signalproteine der TGF- β Superfamilie ein breites Spektrum an biologischen Effekten, wie die Kontrolle von Zelltod, Zelldifferenzierung und Zellproliferation [44]. Die genaue Wirkung hängt von dem jeweiligen Rezeptortyp und Signalprotein sowie der Genexpressionsstruktur der Zielzelle ab. Im zentralen Nervensystem konnte für die BMPs/BMPRs wichtige Funktionen in der Embryonalentwicklung [45] sowie an den komplexen Vorgängen der Neuroplastizität gezeigt werden. Diese Effekte betreffen sowohl Neurone als auch Gliazellen [46, 47]. In Arbeiten über das Juvenile Polyposis Syndrom (JPS) wurde das *BMPR1A*-Gen als potentiell Tumorsuppressorgen identifiziert. Hier konnten in einer signifikanten Untergruppe von JPS-Patienten, in denen keine *SMAD4*-Mutation vorlag, eine Keimbahnmutation des *BMPR1A* Gens nachgewiesen werden [38, 39]. Zuvor konnte bereits an einer grossen Gruppe von JPS-Patienten eine *SMAD4*-Keimbahnmutation mit entsprechendem Funktionsverlust gezeigt werden [48]. Somit spielt der BMPR1A/SMAD4 vermittelte Signaltransduktionsweg (Abb. 15) in diesen Fällen eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese.

Die Lokalisation auf dem langen Arm von Chromosom 10, die oben beschriebene Funktion als Mitglied der TGF- β Familie und die Rolle als Tumorsuppressorgen für das Juvenile Polyposis Syndrom machen das *BMPR1A* Gen auch als Tumorsuppressor-Kandidatengen in Glioblastomen interessant.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch für keinen der mittels der SSCP/Heteroduplex-Analyse untersuchten Tumoren ein Hinweis für eine Mutation gefunden werden. Somit ist eine Inaktivierung dieses Gens durch eine Mutation unwahrscheinlich und anhand der vorliegenden Untersuchung läßt sich eine Rolle als Tumorsuppressor in Glioblastomen nicht zeigen. Man sollte hierbei jedoch bedenken, dass die Sensitivität der SSCP-Methode nur bei ca. 90 % liegt [41, 42] und somit mögliche Mutationen eventuell nicht erfasst wurden, so dass man eine Rolle als Tumorsuppressor in Glioblastomen nicht endgültig ausschliessen kann.

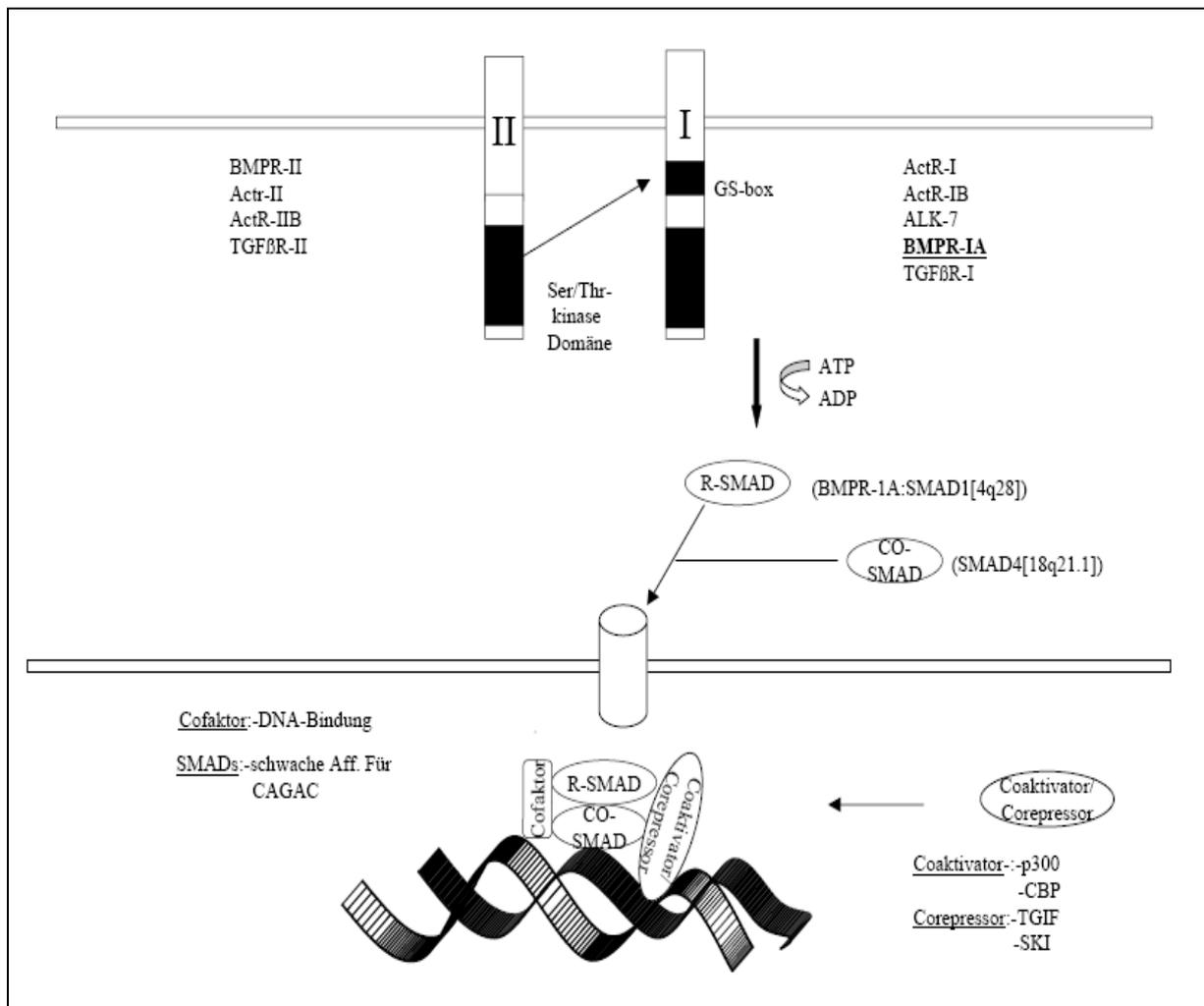


Abb.15: Schematische Darstellung des BMPR1A/SMAD4 vermittelten Signaltransduktionsweges. Die transmembranösen Rezeptoren bilden nach Aktivierung Heterooligomere aus je 2 Typ I und Typ II Rezeptoren. Nach Aktivierung durch den Typ I Rezeptor phosphoryliert die Ser/Threonin Kinase Domäne des Typ II Rezeptors das sog. R-SMAD (im Falle von BMPR1A: SMAD 1), welches sich mit dem Co-SMAD (SMAD4) verbindet und in den Zellkern gelangt. Dort bindet es in Anwesenheit von spezifischen Cofaktoren an CAGAC DNA-Sequenzen und beeinflusst mit weiteren Coaktivatoren/Corepressoren die Genexpression.

4.2 Identifizierung von neuen Gliomprogressions-assoziierten Kandidatengenen mittels suppressiver Subtraktionshybridisierung

Im einem zweiten Versuchsansatz wurde mittels suppressiver Subtraktionshybridisierung (SSH) versucht, neue Tumorsuppressor-Kandidatengene, die in der malignen Progression von Gliomen eine Rolle spielen, anzureichern. Unser besonderes Interesse galt dabei solchen Kandidatengenen mit erniedrigter Expression im Rezidivtumor, die auf dem langen Arm von Chromosom 10 lokalisiert sind. Daher wurde für den Subtraktionsansatz ein Tumorkomplex bestehend aus einem anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III, Primärtumor mit Retention auf Chromosom 10q) und einem sekundärem Glioblastom (WHO-Grad IV) als Rezidivtumor mit einem Allelverlust auf 10q26-qter ausgewählt. Die Effizienz dieser Subtraktionshybridisierung zeigt sich darin, dass solche Gentranskripte angereichert wurden, die bereits in einem früheren ähnlichen Versuchsansatz identifiziert wurden [49], wie *HDAC3* (*Histon deacetylase 3*), *DMXL1* (*Dmx-like 1 protein*) und *EFA6R* (*ADP-ribosylation factor guanine nucleotidefactor 6*).

Das **DMX** (*D. melanogaster X chromosomal gene*) Gen wurde erstmals bei einer vergleichenden Suche nach geschlechtsbestimmenden Genen der Mücke *Chironomus piger* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert [50]. Das humane Homolog *DMXL1* (*DMX-like 1*) ist auf Chromosom 5q23.1 lokalisiert und wird hauptsächlich im fetalen, jedoch nicht im adulten Gehirngewebe exprimiert. *DMXL1* gehört zu einer Proteinfamilie, die WD-Motive aufweisen, und an der Signaltransduktion, der Transkriptionsregulation, dem prä-mRNA Spleißen, der Zytoskelettorganisation sowie der Vesikelfusion beteiligt sind [51]. In der Arbeit von van den Boom *et al.* [49] konnte bei drei Tumorkomplexen ein Expressionsverlust des *DMXL1*-Gens im Rezidivtumor nachgewiesen werden. In der anschließenden Validierung mittels *Real-Time* RT-PCR Analyse zeigte sich ein Expressionsverlust bei primären und sekundären Glioblastomen des WHO-Grades IV im Vergleich zu Astrozytomen des WHO Grades II und Normalgewebe sowie bei sekundären Glioblastomen im Vergleich zu primären Glioblastomen [49]. Auch in der SSH-Analyse der vorliegenden Arbeit konnte ein Expressionsverlust des *DMXL1*-Gens im Rezidivtumor gezeigt werden. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf eine größere Bedeutung des Expressionsverlustes von *DMXL1* in sekundären Glioblastomen hin, der möglicherweise mit einer Aberration auf Chromosom 5 korreliert.

Bislang wurden jedoch noch keine Allelverluste auf Chromosom 5 in der Literatur beschrieben, die mit der malignen Progression assoziiert sind.

Das Kandidatengen **EFA6R** (Exchange factor for ADP-ribosylation factor guanine nucleotide factor 6) [52] ist auch bekannt als *KIAA0942*, *HCA67* (*Hepatocellular carcinoma-associated antigen 67*) [53] oder *PSD3* (*Pleckstrin and Sec domain contain 3*). Das *EFA6R* Genprodukt ist ein aus 534 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Die Funktion dieses Proteins ist bisher noch unbekannt. Auf der Suche nach neuen Antigenen, die mit Leberzellkarzinom-Zelllinien assoziiert sind, wurde das *HCA67*-Gen identifiziert [53]. Ein Vergleich von Darmkrebszellen mit normalen Darmzellen zeigte eine *HCA6*-Expression in den neoplastischen, aber nicht in den normalen Zellen [53]. Andere Autoren berichten jedoch im Sinne unserer Ergebnisse bei Gliomen über eine erniedrigte Expression des *EFA6R*-Gens in gering differenzierten Ovarialkarzinomen im Vergleich zu höher differenzierten Ovarialkarzinomen und normalem Ovarialgewebe [52]. In der van den Boom *et al.* Arbeit [49] zeigte sich ebenfalls bei drei Tumorpaaaren eine verminderte Expression des *EFA6R*-Gens im Rezidivtumor und auch in der anschließenden Validierung mittels *Real-Time* RT-PCR Analyse zeigte sich eine geringere Expression in primären und sekundären Glioblastomen im Vergleich zu niedriggradigen Astrozytomen und Normalgewebe [49]. In der SSH-Analyse der vorliegenden Arbeit ließ sich dieser Befund bestätigen. Somit scheint die verminderte Expression von *EFA6R* zur malignen Progression in mehreren Tumorarten beizutragen [49].

Beim **HDAC3**-Gen zeigte sich in der Arbeit von van den Boom *et al.* [49] eine verstärkte Expression beim Rezidivtumor, aber interessanterweise ließ sich dies in der nachfolgenden Validierung mittels *Real-Time* RT-PCR Analyse nicht bestätigen, sondern es zeigte sich eine Expressionsverminderung des *HDAC3*-Gens in den Glioblastomen [49]. Dies bestätigt das Ergebniss der SSH-Analyse der vorliegenden Arbeit, in der sich eine erniedrigte Expression im Rezidivtumor zeigte. Das *HDAC3* (*Histone deacetylase 3*)-Gen auf 5q31 kodiert für die Histondeacetylase 3. In Hefen und in Säugetieren führt die Deletion der Histondeacetylasen zur Expressionsveränderung vieler Gene [54, 55, 56]. Histonacetylierung reguliert die Genaktivität über die Modulation der Histonassemblierung und die Entfaltung der DNA [57]. Eine Histondeacetylierung hingegen ist mit einer transkriptionellen

Geninaktivierung gekoppelt [58]. Ein Expressionsverlust von *HDAC3* während der malignen Progression von Gliomen könnte somit zu einer stärkeren Acetylierung des Euchromatins und einer erhöhten Genexpression führen. Dies könnte möglicherweise einen Wachstumsvorteil verschaffen, wenn hierdurch Protoonkogene verstärkt exprimiert würden. *In vitro* Experimente mit HeLa S3-Zellen ergaben allerdings eine verminderte Proliferation, Hyperacetylierung von Histonen und eine erhöhte Apoptoserate bei Transfektion mit siRNAs gegen *HDAC3*, die nachweislich dessen Transkript- und Proteinlevel reduzierten [59].

In dieser Arbeit konnten durch die subtraktive Hybridisierung mit ***BMS1L*** und ***DPYSL4*** zwei neue Tumorsuppressor-Kandidatengene auf dem Chromosomenarm 10q identifiziert werden.

Das ***BMS1L*** (*KIAA0187*) Gen auf 10q11.21 kodiert für ein Protein (*Ribosome assembly protein*) mit bisher unbekannter Funktion [60]. In der *Real-Time* RT-PCR Expressionsanalyse des *BMS1L*-Gens konnte bei 20 von 39 primären Glioblastomen eine deutlich erniedrigte Expression des Gens gezeigt werden. Somit ist es durchaus denkbar, dass die Inaktivierung dieses Gens mit der Gliomprogression assoziiert ist und insbesondere bei primären Glioblastomen eine Rolle spielt. Das *BMS1L*-Gen enthält eine CpG-Insel, so daß eine Promotorhypermethylierung als möglicher Inaktivierungsmechanismus in Betracht kommt. Dafür spricht vor allem die Tatsache, dass sich in drei von vier Glioblastomzelllinien, die mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A behandelt wurden, eine deutlich stärkere mRNA-Expression als ohne Behandlung zeigte. Für die sekundären Glioblastome ergibt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse kein Anhalt für eine mögliche Rolle des *BMS1L*-Gens als Tumorsuppressor. Auch konnte für die gesamte Gruppe der untersuchten primären Glioblastome nur im Vergleich zu den sekundären Glioblastomen ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau gezeigt werden. Insgesamt ist es also fraglich, ob das *BMS1L*-Gen wirklich eine entscheidende Rolle in der Gliomprogression als Tumorsuppressor spielt, es bleibt jedoch als potentielles Kandidatengen für primäre Glioblastome interessant.

Das ***DPYSL4*** (*Dihydropyrimidinase-like 4/CRMP3/DRP4/ULIP4*) Gen auf 10q26 kodiert für ein Genprodukt, das zur Familie der CRMPs (*Collapsin response mediator protein*) gehört. Die CRMP-Familie besteht aus insgesamt fünf cytosolischen

Phosphoproteinen [61]. Die CRMPs sind mit dem *unc-33* Genprodukt von *Caenorhabditis elegans* verwandt [62] und im Verlauf der Evolution hoch konserviert (92 % Homologie des *DPYSL4* Gens zwischen Maus und Mensch). Die Homologie der einzelnen CRMPs untereinander beträgt innerhalb einer Spezies 75%. Sequenzvergleiche haben mehrere hochgradig konservierte Domänen und Subdomänen gezeigt, zu denen auch eine aus 32 Aminosäuren bestehende Region gehört, die von einer bakteriellen Hydantoinase bis zu den menschlichen CRMPs hochgradig konserviert ist [63]. Die Expressionslevel der CRMPs sind während der Gehirnentwicklung extrem hoch. Viele Untersuchungen weisen auf zahlreiche wichtige Funktionen der CRMPs in verschiedenen zellulären und molekularen Vorgängen wie Apoptose/Proliferation, Zellmigration und Zelldifferenzierung hin. Beim Erwachsenen finden sich insgesamt deutlich geringere Expressionslevel bei jedoch noch vorhandener Genexpression. Diese ist besonders hoch in Regionen, die die Fähigkeit zur Regeneration und Neuroplastizität erhalten haben [61]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die CRMPs - und somit auch *DPYSL4* - sehr wahrscheinlich eine wichtige Funktion in der Kontrolle der neuronalen Differenzierung insbesondere im Bezug auf die Entwicklung des Nervensystems und die Neuroplastizität haben [61, 63]. Bei neurodegenerativen Erkrankungen wurde ein verändertes Genexpressionsmuster der CRMPs und darauffolgend eine mögliche Schlüsselrolle der CRMPs in der Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen beschrieben [61]. Bei Untersuchungen von Gehirnen von Feten mit Down-Syndrom nach Abort konnte eine aberrante Expression der CRMPs -2,-3 und -4 auf Proteinebene gezeigt werden [64]. Ausserdem konnten die CRMPs – und hier insbesondere *DPYSL4* - als Zielstrukturen von Autoantikörpern bei paraneoplastischen neurologischen Syndromen im Rahmen verschiedener systemischer Malignomerkrankungen identifiziert werden [65]. In der *Real-Time* RT-PCR Expressionsanalyse des *DPYSL4* Gens hat sich in den eigenen Untersuchungen in 25 von 33 der primären Glioblastomen sowie bin neun von zehn sekundären Glioblastomen eine um mindestens die Hälfte erniedrigte Expression des Gens im Vergleich zu normalem Hirngewebe gezeigt. Die sekundären Glioblastome wiesen dabei eine signifikant niedrigere mRNA-Expression auf als WHO-Grad II und III Astrozytome. Diese Ergebnisse, die Funktion der CRMPs und ihre Rolle bei anderen neurologischen Erkrankungen mit Störungen von Zelldifferenzierung und Entwicklung weisen daraufhin, dass die Inaktivierung dieses Gens wahrscheinlich mit der Gliomprogression assoziiert ist und sowohl bei primären als auch bei sekundären

Glioblastomen eine Rolle als Tumorsuppressor spielen könnte. Das *DPYSL4*-Gen enthält ebenfalls eine CpG-Insel im Promotorbereich, so dass auch hier eine aberrante Methylierung als möglicher Inaktivierungsmechanismus in Betracht kommt. Dies wird durch die Ergebnisse der mRNA-Expression der Glioblastomzelllinien untermauert: Bei allen fünf Zelllinien führte die Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A zu einer deutlich höheren mRNA-Expression als ohne Behandlung. Bisher sind noch keine Methylierungsanalysen des *DPYSL4* Gens durchgeführt worden. Dies ist somit ein experimenteller Ansatz, der auf dieser Arbeit aufbaut und die mögliche Rolle in der Gliomprogression weiter aufklären kann. Die hieraus resultierenden Ergebnisse und weitere funktionelle Analysen können sowohl zum Verständnis der molekularbiologischen Grundlagen der Gliomprogression als auch zum weiteren Verständnis der physiologischen Rolle des *DPYSL4* Gens beitragen.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Cavenee WK, Furnari FB, Nagane M, Huang H-JS, Newcomb EW, Bigner DD, Weller M, Berens ME, Plate KH, Israel MA, Noble MD, Kleihues P (2000). Astrocytic Tumors. In: Kleihues P and Cavenee WK "World Health Organization Classification of Tumors - Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System", IARC Press, 2000.

- [2] Reifenberger G, Kramm C, Bilzer T, Kiwit J (1999). Gliale Neoplasien. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg): Handbuch der Molekularen Medizin, Band 5: Erkrankungen des Zentralnervensystems. 450-509 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).

- [3] Lantos PL, Vandenberg SR, Kleihues P (1996). Tumors of the nervous system. In: Graham DI, Lantos PS (Hrsg) Greenfields Neuropathology, 6. Auflage, 583-879 (London).

- [4] Neglia JP, Meadows AT, Robinson LL (1991). Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. N Engl J Med 325:1330-1336.

- [5] Burger PC, Vogel FS, Grenn SB, Strike TA (1985). Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathological criteria and prognostic implications. Cancer 46: 1179-1186.

- [6] Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinhoRA (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. Genes Dev 15:1311-1333.

- [7] Collins VP (1999). Progression as exemplified by human astrocytic tumors. Semin Cancer Biol 9 (4): 267-76.

- [8] Schmidt EE, Ichimura K, Goike HM, Moshref A, Liu L, Collins VP (1999). Mutational profile of the PTEN gene in primary human astrocytic tumors and cultivated xenografts. J Neuropathol Exp Neurol 58 (11): 1170-83.

- [9] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA (1997). Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15: 356-362.
- [10] Li J, Yen C, Liaw D (1997). PTEN, a putative protein tyrosin phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943-1947.
- [11] Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W (1997). DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumors. *Nat Genet* 17: 32-39.
- [12] Thoma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1998). PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57 (7): 684-9.
- [13] Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1999). Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol* 155 (2): 387-94.
- [14] Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman HA, Fuchs HE, Bigner DD (1995). Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 1;10 (11): 2243-6.
- [15] Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goika HM, Collins VP (1998). Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer* 22 (1): 9-15.
- [16] Nakamura J, Yoshida M, Tsuiki H, Ito K, Ueno M, Nakao M, Oka K, Tada M, Kochi M, Kuratsu J, Ushio Y, Saya H (1998). Identification of a human homolog of the *Drosophila* neuralized gene within the 10q25.1 malignant astrocytoma deletion region. *Oncogene* 26; 16 (8): 1009-19.

- [17] Pulst S-M, Reifenberger G (2000). Primary Tumors of the Nervous System. In: Pulst S-M (Hrsg.) Neurogenetics, Oxford University Press.
- [18] Sasaki H, Zlatescu MC, Betensky RA, Ino Y, Cairncross JG, Louis DN (2001). PTEN is a target of chromosome 10q loss in anaplastic oligodendrogliomas and PTEN alterations are associated with poor prognosis. *Am J Pathol* 159 (1): 359-67.
- [19] Sommerville RP, Chernova O, Liu S, Shoshan Y, Cowell JK (2000). Identification of the promoter, genomic structure, and mouse ortholog of LGI1. *Mamm Genome* 11 (8): 622-7.
- [20] Cavenee WK (2000). High-grade gliomas with chromosome 1p loss. *J Neurosurg* 92 (6): 1080-1.
- [21] Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers JM, Oberstrass J, An H-X, Niederacher D, Wechsler W, Reifenberger G (1996). Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 824-833.
- [22] Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996). Overexpression of EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6: 217-223.
- [23] Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP (1996). Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16^{INK4a}, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 13: 1065-1072.
- [24] Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, Deimling A von, Louis DN (1996). CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56: 150-153.

- [25] Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP (1994). CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54: 6321-6324.
- [26] James CD, Carlom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjöld M, Collins VP, and Cavenee WK (1988). Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 48: 5546-5551.
- [27] Collins VP (1995). Gene amplification in human gliomas. *Glia* 15: 289-296.
- [28] Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP (1991). Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 51: 2164-2172.
- [29] Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP (1990). Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Nat Acad Sci USA* 87: 8602-8606.
- [30] Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, Olson JJ, Liu L, Collins VP, James CD (1994) Functional characterisation of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene* 9: 2313-2320.
- [31] Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJS (1994). A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 7727-7731.
- [32] Kleihues P & Ohgaki H (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neurooncol* 1: 44-51.

- [33] Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, Cavanee WK (2000). Glioblastoma. In: Kleihues P and Cavanee WK. Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. WHO Classification of Tumors. Lyon, France: IARC Press. 29-39.
- [34] Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001). Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest* 81: 77-82
- [35] Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 539-543.
- [36] Reifenberger G & Collins VP (2004). Pathology and Molecular Genetics of Astrocytic Gliomas. *J Mol Med.* 82(10):656-70.
- [37] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 352 (10): 987-96.
- [38] Zhou XP, Woodford-Richens K, Lehtonen R, Kurose K, Aldred M, Hampel H, Launonen V, Virta S, Pilarski R, Salovaara R, Bodmer WF, Conrad BA, Dunlop M, Hodgson SV, Iwama T, Jarvinen H, Kellokumpu I, Kim JC, Leggett B, Markie D, Mecklin JP, Neale K, Phillips R, Piris J, Rozen P, Houlston RS, Aaltonen LA, Tomlinson IP, Eng C (2001). Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. *Am J Hum Genet* 69(4): 704-11.
- [39] Kinzler KW, Vogelstein B (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science* 280:1036–1037.

- [40] Massague J (2000). How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169–178.
- [41] Hayashi K (1992). PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl. Jun;9(3):73-9*.
- [42] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Seyika T (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Nat Acad Sci* 86: 2776-2780.
- [43] Kingsley DM (1994). The TGF- β superfamily: new members, new receptors and new genetic tests of function in different organisms *Genes Dev* 8: 133-146.
- [44] Hogan BLM (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes* 10: 1580-1594.
- [45] Graff JM (1997). Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that is the question. *Cell* 89: 171-174.
- [46] Mehler MF, Mabie PC, Zhang D, Kessler JA (1997). Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 20: 309-317.
- [47] Ebendal T, Bengtsson H, Söderström S (1998). Bone morphogenetic proteins and Their Receptors: Potential Functions in the Brain. *J Neurosci Res* 51: 139-146.
- [48] Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, Tomlinson IPM, Houlston RS, Bevan S, Mitros FA, Stone EM, Aaltonen LA (1998). Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 280: 1086-1088.
- [49] Van den Boom J, Wolter M, Blaschke B, Knobbe C, Reifenberger G (2006). Identification of novel genes associated with astrocytoma progression using suppression subtractive hybridization and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Int J Cancer*. 2006 Jul 24; [Epub ahead of print].

- [50] Kraemer C, Weil B, Christmann M, Schmidt ER (1998). The new gene DMX from *Drosophila melanogaster* encodes a novel WD-repeat protein. *Gene* 216: 267-276.
- [51] Kraemer C, Enklaar T, Zabel B, Schmidt ER (2000). Mapping and structure of DMXL1, a human homologue of the DMX gene from *Drosophila melanogaster* coding for a WD repeat protein. *Genomics* 64: 97-101.
- [52] Pils D, Horak P, Gleiss A, Sax C, Fabjani G, Moebus VJ, Zielinski C, Reinhaller A, Zeillinger R, Krainer M (2005). Five genes from chromosomal band 8p22 are significantly down-regulated in ovarian carcinoma: N33 and EFA6R have a potential impact on overall survival. *Cancer* 104(11): 2417-29.
- [53] Wang Y, Han KJ, Pang XW, Vaughn HA, Qu W, Dong XY, Peng JR, Zhao HT, RuiJA, Leng XS, Cebon J, Burgess AW, Chen WF (2002). Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol* 169(2): 1102-1109.
- [54] Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM, Grunstein M (1996). HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci* 93:14503-14508.
- [55] Vidal M & Gaber RF (1991). RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 6317-6327.
- [56] van Lint C, Emiliani S, Verdin E (1996). The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Exp* 5: 245-253.
- [57] Grunstein M (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389: 349-352.

- [58] Durrin LK, Mann RK, Kayne PS, Grunstein M (1991). Yeast histone H4 N terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell* 65: 1023-1031.
- [59] Glaser KB, Li J, Staver MJ, Wei R-Q, Albert DH, Davidsen SK (2003). Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 17;310(2):529-36.
- [60] Crosier M, Viggiano L, Guy J, Misceo D, Stones R, Wei W, Hearn T, Ventura M, Archidiacono N, Rocchi M, Jackson MS (2002). Human paralogs of KIAA0187 were created through independent pericentromeric-directed and chromosome-specific duplication mechanisms. *Genome Res.* Jan;12(1):67-80.
- [61] Charrier E, Reibel S, Rogemond V, Aguera M, Thomasset N, Honnorat J. (2003). Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 28(1): 51-64.
- [62] Byk T, Dobransky T, Cifuentes-Diaz C, Sobel A (1996). Identification and molecular characterization of Unc-33-like phosphoprotein (Ulip), a putative mammalian homolog of the axonal guidance-associated unc-33 gene product. *J Neurosci.* 16(2): 688-701.
- [63] Byk T, Ozon S, Sobel A (1998). The Ulip family phosphoproteins - common and specific properties. *Eur J Biochem.* 1998 May 15;254(1):14-24.
- [64] Weitzdoerfer R, Fountoulakis M, Lubec G (2001). Aberrant expression of dihydropyrimidinase related proteins-2,-3 and -4 in fetal Down syndrome brain. *J Neural Transm Suppl.* 61: 95-107.
- [65] Honnorat J, Byk T, Kusters I, Aguera M, Ricard D, Rogemond V, Quach T, Aunis D, Sobel A, Mattei MG, Kolattukudy P, Belin MF, Antoine JC (1999). Ulip/CRMP proteins are recognized by autoantibodies in paraneoplastic neurological syndromes. *Eur J Neurosci.* 11(12): 4226-32.

- [66] Acquati F, Morelli C, Cinquetti R, Bianchi MG, Porrini D, Varesco L, Gismondi V, Rocchetti R, Talevi S, Possati L, Magnanini C, Tibiletti MG, Bernasconi B, Daidone MG, Shridhar V, Smith DI, Negrini M, Barbanti-Brodano G, Taramelli R (2001). Cloning and characterization of a senescence inducing and class II tumor suppressor gene in ovarian carcinoma at chromosome region 6q27. *Oncogene*. 20(8): 980-8.
- [67] Sers C, Emmenegger U, Husmann K, Bucher K, Andres AC, Schafer R (1997). Growth-inhibitory activity and downregulation of the class II tumor-suppressor gene H-rev107 in tumor cell lines and experimental tumors. *J Cell Biol*. 136(4):935-44.
- [68] Stupp R., Weber DC. (2005). The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma. *Onkologie* 28(6-7):315-7
- [69] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 10;352(10):997-1003.
- [70] Tews B, Roerig P, Hartmann C, Hahn M, Felsberg J, Blaschke B, Sabel M, Kunitz A, Toedt G, Neben K, Benner A, von Deimling A, Reifenberger G, Lichter P. (2007). Hypermethylation and transcriptional down-regulation of the *CITED4* gene at 1p34.2 in oligodendroglial tumors with allelic losses on 1p and 19q. *Oncogene*, im Druck.

6 Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Anregungen zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger.

Frau Dr. rer. nat. Marietta Wolter danke ich herzlich für die intensive und exzellente Betreuung während der Durchführung sämtlicher Experimente, der Auswertung der Ergebnisse sowie für die Korrekturen und geduldigen Ratschläge bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Neuropathologischen Instituts für die überaus freundliche Aufnahme im Institut und die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente im Labor. Hierbei gilt mein Dank insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Peter Roerig und Herrn Dr. rer. nat. Jörg van den Boom.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Tina und meinen Eltern, sowie allen, die mir die Kraft gegeben haben diese Arbeit durchzuführen und zu einem guten Ende zu bringen.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Steiger bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

7 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Rouwen Jan Riediger
Geburtsdatum: 24.03.1975
Geburtsort: Reutlingen
Familienstand: verheiratet mit
Dr. med. dent. Tina Riediger
Tochter Tabea Carolina, geb. am 28.10.2005
Tochter Abelina Maia, geb. am 14.05.2008
Eltern: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dieter Riediger
Dr. med. dent. Marion Riediger
Geschwister: Dr. med. Carina Riediger

Schulbildung

1982 – 1986 Eduard-Spranger-Grundschule in Reutlingen
1986 – 1995 Friedrich-List-Gymnasium in Reutlingen
1995 Abitur (Note: 1,8)

Zivildienst

1995 - 1996 Universitätsklinikum Aachen, Neurologische Klinik
im Pflegedienst

Studium

- 1996 - 1998 Studium des Wirtschaftsingenieurwesens
an der Universität Karlsruhe
- 1998 - 2004 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf
- 2004 Abschluss des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf;
Abschlussnote: sehr gut (1,49)

Promotion

- 2008 Promotion am Institut für Neuropathologie der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf zum Thema
„Molekulargenetische Untersuchung und Identifizierung
neuer Tumorsuppressor - Kandidatengene auf dem
langen Arm von Chromosom 10 in Glioblastomen“
bei Prof. Dr. med. Guido Reifenberger;
Note: magna cum laude

Facharztausbildung

- 2004 Beginn der Weiterbildung zum Facharzt für Chirurgie bei
Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel, Klinik für
Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

8 Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der häufigste und zugleich bösartigste Hirntumor des Menschen. Eine wichtige genetische Veränderung in Glioblastomen sind Allelverluste auf dem Chromosom 10, die in bis zu 90 % der Fälle nachweisbar sind. Mit dem *PTEN* Gen auf 10q23 konnte bisher ein erstes Tumorsuppressorgen identifiziert werden, das in 30-40 % der primären und ca. 5 % der sekundären Glioblastome Mutationen aufweist. Das Missverhältnis zwischen Häufigkeit von Allelverlusten auf Chromosom 10 und *PTEN* Mutationen spricht zusammen mit dem Nachweis von terminalen 10q-Deletionen distal von *PTEN* in einzelnen Glioblastomen dafür, dass noch mindestens ein weiteres Tumorsuppressorgen auf dem Chromosom 10 lokalisiert ist, dessen Inaktivierung in Glioblastomen von pathogenetischer Bedeutung ist.

Im ersten Ansatz dieser Arbeit wurde daher eine Mutationsanalyse des *BMPR1A*-Gens (10q22) durchgeführt, welches in Arbeiten über das Juvenile Polyposis Syndrom (JPS) als mögliches Tumorsuppressorgen beschrieben wurde. Das *BMPR1A* Gen kodiert für den *Bone morphogenetic protein receptor*, der zur TGF- β Superfamilie gehört und an der Kontrolle von Zelltod, Zelldifferenzierung und Zellproliferation beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch in keinem von 42 primären und 16 sekundären Glioblastomen Mutationen im *BMPR1A* Gens nachgewiesen werden.

Im zweiten Ansatz dieser Arbeit wurden mittels Suppressiver Subtraktionshybridisierung (SSH) differentiell exprimierte Transkripte angereichert, die sich in ihrer Expressionsstärke zwischen einem anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) als Primärtumor und einem sekundären Glioblastom als Rezidivtumor des selben Patienten unterscheiden. Diese SSH-Analyse konnte einerseits die in der Publikation von van den Boom *et al.* (Int J Cancer 2006, 119:2330-8) erstmals beschriebene differentielle Expression der Gene *HDAC3*, *DMXL1* und *EFA6R* bestätigen und andererseits neue Gliomprogressions-assoziierte Tumorsuppressor-Kandidatengene identifizieren. An einer unabhängigen Tumorserie aus diffusen und anaplastischen Astrozytomen sowie primären und sekundären Glioblastomen wurde anschließend die differentielle Expression zweier Kandidatengene auf Chromosom 10q, d.h. *BMSL1* und *DPYSL4*, mittels *Real-Time* reverser Transkriptase-PCR überprüft. Für das *BMS1L* Gen ergab sich keine Bestätigung für eine mögliche Rolle in der Progression astrozytärer Tumore. Interessant bleibt *BMS1L* jedoch als potentielles Tumorsuppressor-Kandidatengene für primäre Glioblastome, da es in mehr als 50 % dieser Tumoren eine im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe deutlich erniedrigte mRNA Expression zeigte. Für das *DPYSL4* Gen konnte zudem eine Gliomprogressions-assoziierte erniedrigte Expression in astrozytären Tumoren nachgewiesen werden, d.h. das mRNA-Expressionsniveau war auch in sekundären Glioblastomen signifikant niedriger als in diffusen und anaplastischen Astrozytomen. In 76 % der untersuchten primären Glioblastomen lag das mRNA-Expressionlevel von *DPYSL4* ebenfalls deutlich unter der in nicht-neoplastischem Hirngewebe. Diese Ergebnisse, die Funktion des *DPYSL4* Genprodukts in Zelldifferenzierung und Neuroplastizität, sowie die Rolle bei anderen neurologischen Erkrankungen mit Störungen von Zelldifferenzierung und Entwicklung weisen daraufhin, dass die Inaktivierung dieses Gens möglicherweise die maligne Progression von astrozytären Gliomen fördert und sowohl in der Entwicklung der primären als auch der sekundären Glioblastome eine tumorsuppressive Rolle spielt.