

Aus der Klinik für Neurochirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. Hubertus Maximilian Mehdorn)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**BESTIMMUNG DER INTRA- UND INTERINDIVIDUELLEN
GENETISCHEN HETEROGENITÄT BEIM GLIOBLASTOM
MITTELS ARRAY-TECHNOLOGIE, QUANTITATIVER PCR
UND IMMUNHISTOCHEMIE**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

FRANZISKA RUHLAND

aus Wuppertal

Kiel, 2012

1. Berichtersteller:	Prof. Dr. Stark
2. Berichtersteller:	Priv.-Doz. Dr. Schem
Tag der mündlichen Prüfung:	20.08.2013
Zum Druck genehmigt:	20.08.2013
Gez.: Prof. Dr. Nabavi	(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Gliederung

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 Ätiologie.....	1
1.3 Lokalisation.....	2
1.4. Makroskopie und Darstellung in der Bildgebung.....	3
1.5 Histopathologie.....	3
1.6 Klinische Symptomatik.....	4
1.7 Therapie.....	4
1.8 Zielsetzung und Fragestellung.....	5

2. Material und Methoden

2.1 Material.....	7
2.2. Methoden.....	7
<u>2.2.1 RNA Isolierung.....</u>	8
2.2.1.1 Gewebepvorbereitung.....	8
2.2.1.2 Auswaschen des Trizols.....	8
2.2.1.3 Präzipitation und Reinigung der RNA.....	8
2.2.1.4 Messung des RNA-Gehaltes.....	9
2.2.1.5 Reinigung und Lösen der RNA.....	9
<u>2.2.2 GE Oligo-Array (Nylon-basierend)</u>	
2.2.2.1 Herstellung von cDNA.....	9
2.2.2.2 Vervielfältigung der cDNA für die Oligo-Arrays.....	10
2.2.2.3 Prähybridisierung.....	12
2.2.2.4 Hybridisierung.....	12
2.2.2.5 Reinigung der Membranen.....	12
2.2.2.6 Detektion.....	13
2.2.2.7 Auswertung.....	13

2.2.3 Real-Time RT-PCR

2.2.3.1 Einführung	13
2.2.3.2 Herstellung von cDNA für die Real-Time RT-PCR.....	14
2.2.3.3 Durchführung der Real-Time RT-PCR.....	15
2.2.3.4 Auswertung.....	15

2.2.4. RT2-Profiler PCR-Array

2.2.4.1 RNA-Isolierung.....	16
2.2.4.2 RNA-Reinigung.....	16
2.2.4.3 Reverse Transkriptase Reaktion.....	17
2.2.4.4 Auswertung.....	18

2.2.5 Immunhistochemische Färbungen

2.2.5.1 Färbung mit Antikörper gegen EGFR.....	19
2.2.5.2 Färbung mit Antikörper gegen p53.....	20
2.2.5.3 Färbung mit Antikörper gegen MDM2.....	21
2.2.5.4 Färbung mit Antikörper gegen Ki67.....	21
2.2.5.5 Färbung mit Antikörper gegen GAPDH.....	21
2.2.5.6 Statistische Auswertung.....	21

3. Ergebnisse

3.1 Oligo-Arrays.....	22
3.2. Real-Time PCR.....	23
3.3 Real-Time PCR-Array.....	24
<u>3.3.1 Human Cell Cycle</u>	24
<u>3.3.2 Human Embryonic Stem Cell Array</u>	24
3.4 MGMT-Promotor-Methylierung.....	25
3.5 Immunhistochemie.....	25

4. Diskussion	28
5. Zusammenfassung	41
6. Literaturverzeichnis	42
7. Anhang	55
7.1 Material.....	55
<u>7.1.1 RNA-Isolierung und Herstellung der cDNA</u>	55
7.1.1.1 Chemikalien.....	55
7.1.1.2 Material und Geräte.....	55
<u>7.1.2 Real -Time PCR</u>	55
<u>7.1.3 Oligoarrays</u>	56
<u>7.1.4 Real-Time PCR-Arrays</u>	56
<u>7.1.5 Immunhistochemie</u>	57
7.1.5.1 Antikörper.....	57
7.1.5.2 Chemikalien.....	57
7.1.5.3 Material und Geräte.....	58
7.1.5.4 Ansätze und Lösungen.....	58
7.2 Ergebnisse der Oligo-Arrays.....	59
<u>7.2.1 Tab. 5 Ergebnisse des Gen-Arrays „Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules“</u>	59
<u>7.2.2. Tab. 6 Ergebnisse des Gen-Arrays „Human Cell Cycle“</u>	61
8. Danksagung	64
9. Lebenslauf	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAX	BCL-2-associated X-Protein
BCCIP	BRCA2 and CDKN1A interacting protein
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
BRCA2	Breast Cancer 2
CCNG2	Cyclin G 2
CDK	Cyclin-dependent Kinase
CDKN1	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2
cDNA	Copy-DNA
CRABP2	Cellular Retinoic Acid Binding Protein
CT	Threshold Cycle (engl.: Schwellenwertzyklus)
CT	Computertomographie
DES	Desmin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DNM2	Dynamin 2
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EOMES	Eomesodermin
et al.	et alii (lat.: und andere)
G1-Phase	Zwischenphase des ersten Zellzyklus
G2-Phase	Zwischenphase des zweiten Zellzyklus
GADD45A	Growth Arrest and DNA-damage Inducible Protein 45 Alpha
GAL	Galanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GB	Glioblastom

GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HBB	Hämoglobin Beta
JAK-2	Janus-Kinase-2
KM	Kontrastmittel
LAMA	Laminin
LEFTY	Left-Right-Determination Factor
NaCl	Natrimchlorid
MDM2	Mouse Double Minute 2
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MLH1	MutL Homologue 1
MMP	Matrixmetalloproteinase
MT-MMP	Membrane-type MMP
mRNA	Messenger (Boten-)RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH6	MutS Homologue 6
NOG	Noggin
P21	21 kDa CDK-Inhibitor
P53	Tumorprotein p53 (53 kDa)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF α -Rezeptors	Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration (lat. potentia hydrogenii)
PK	Proteinkinase
PTEN	Phosphate and Tensin Homologues
RE	Reverse Transkriptase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SEMA3A	Semaphorin 3A

S-Phase	Ruhephase des Zellzyklus
STAT-3	Signal Transducer and Activator of Transcription-3
Tab.	Tabelle
Taq	Termophilus aquaticus
TIMP	Tissue inhibitor of MMP
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organisation (engl. Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Präfixe für Einheiten, Einheiten und Symbole

°C	Grad Celsius
α	Alpha
β	Beta
Δ	Delta
Da	Dalton
g	Gramm
g	Normwert der Schwerebeschleunigung
Gy	Gray
k	Kilo
l	Liter
m	Milli
n	Nano
min	Minute
sec	Sekunde
μ	Mikro

Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Ergebnisse der GE OligoArray-Analyse	S.22
Abb. 2	EGFR-Färbung des Initialtumors.....	S.25
Abb. 3	EGFR-Färbung des Rezidivtumors.....	S.25
Abb. 4	p53-Färbung des Initialtumors.....	S.26
Abb. 5	p53-Färbung des Rezidivtumors.....	S.26
Abb. 6	MDM2-Färbung des Initialtumors.....	S.26
Abb. 7	MDM2-Färbung des Rezidivtumors.....	S.26

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Vergleich der mRNA-Expression in Initial- und Rezidiv-Tumoren mittels der Real-Time RT-PCR.....	S.23
Tab. 2	Gene mit einer mindestens zweifach erhöhten Expression im Rezidiv-tumor im Vergleich zum initialen Tumor desselben Patienten unter Verwendung des Arrays „Human Cell Cycle“	S.24
Tab. 3	Gene mit einer mindestens zweifach erhöhten Expression im Rezidiv-tumor im Vergleich zum initialen Tumor desselben Patienten unter Verwendung des Arrays „Human Embryonic Stem Cell“	S.25
Tab. 4	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen (n = 55 Patienten)	S.27
Tab. 5	Ergebnisse des Gen-Arrays „Human Extraellular Matrix and Adhesion Molecules“	S.59
Tab. 6	Ergebnisse des Gen-Arrays „Human Cell Cycle“	S.61

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Glioblastom ist der häufigste und bösartigste hirneigene intrakranielle Tumor im Erwachsenenalter. Er tritt bevorzugt in der fünften und sechsten Lebensdekade auf und macht 15-20 % aller intrakraniellen Tumore und 60-75 % aller astrozytären Tumore aus. Die Inzidenz wird in Europa und Nordamerika mit zwei bis drei Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr angegeben. Männer sind häufiger betroffen als Frauen, das Verhältnis liegt bei ca. 1,5 bis 3 zu 1. Die Standardbehandlung besteht in der möglichst vollständigen operativen Entfernung unter Erhalt der neurologischen Funktion („maximum safe resection“). Mit der Einführung der postoperativen kombinierten Strahlen- / Chemotherapie mit Temozolomid nach dem EORTC-Schema hat sich das mediane Überleben auf 14,6 Monate verbessert [Burger et al., 1987; Davis et al., 1998; Salvati et al., 1998; Scott et al., 1998; Stupp et al., 2005].

1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Glioblastoms ist weitgehend unbekannt. Die Entstehung wird als sporadisch beschrieben, da bisher keine eindeutigen Risikofaktoren nachgewiesen werden konnten. Eine seltene Ausnahme bildet das Li-Fraumeni-Syndrom. Hierbei handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Keimbahnmutation des p53-Tumorsuppressorgens. Die Patienten zeigen ein charakteristisches Auftreten von Mammakarzinomen, Weichteil- und Knochensarkomen, Leukämien, Nebennierenrindenzinomen und hirneigenen Tumoren, wobei es sich zumeist um Glioblastome handelt [Boecker et al., 2004].

Glioblastome werden bezüglich ihrer Genese in primäre und sekundäre Tumore eingeteilt. Diese zwei Subtypen wurden bereits 1940 von Scherer aufgrund morphologischer und klinischer Kriterien beschrieben [Scherer, 1940]. Primäre Glioblastome machen ungefähr 80% aller Glioblastome aus und manifestieren sich vor allem bei älteren Patienten. Charakteristisch sind eine kurze Anamnese (meist kürzer als drei Monate) und die „de novo“ Entstehung, das heißt, die Patientenanamnese ist frei von vorbestehenden niedriggradigeren Astrozytomen, wie z.B. einem Astrozytom WHO Grad II-III [Louis et al., 2007].

In primären Glioblastomen findet sich gehäuft eine Amplifikation und/oder Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (epidermal growth factor receptor, EGFR) und des zellulären Onkogens MDM2 (murine double minute 2), sowie eine Deletion des

Tumorsuppressorgens p16 und Mutationen des PTEN-Gens (phosphate and tensin homologues) [Kleihues et al., 1999; Louis et al., 2007].

Im Gegensatz hierzu steht das sekundäre Glioblastom, welches sich aus niedriggradigeren Astrozytomvorstufen meist in einem Zeitraum von vier bis fünf Jahren entwickelt und die höchste Inzidenz bei Patienten im mittleren Lebensalter hat. Beim sekundären Glioblastom lässt sich in mehr als 65 % der Fälle eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 feststellen; ebenso wurde eine Überexpression des PDGF α -Rezeptors (platelet-derived growth factor receptor α) beschrieben [Burton et al., 2002; Kleihues et al., 1999; Kleihues et al., 2000; Simmons et al., 2001; Von Deimling et al., 1995].

1.3 Lokalisation

Das Glioblastom wächst bevorzugt in der weißen Substanz der Großhirnhemisphären und findet sich vor allem frontal, temporal und parietal. In einer von Ohgaki und Kleihues durchgeführten Studie an 987 Patienten zeigten sich folgende Tumorlokalisationen: 31 % temporal, 24 % parietal, 23 % frontal und 16 % occipital [Ohgaki et al., 2005]. Eine ähnliche Häufigkeitsverteilung findet sich im eigenen Patientengut. Stark et al. untersuchten 492 Glioblastompatienten des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Die Tumorlokalisationen innerhalb dieser Patientengruppe war wie folgt: 27 % temporal, 19 % frontal, 7 % parietal, 4 % occipital, 42 % multilobulär, 1,2 % befanden sich im Hirnstamm oder im Kleinhirn [Stark et al., 2012].

Das Wachstum des Glioblastoms ist gekennzeichnet durch eine diffuse Infiltration des umgebenden Gewebes. Die Tumorzellen nutzen für eine rasche Migration kompakte Myelinbahnen wie z.B. die des Corpus callosum als Ausbreitungswege. So kann es zur Ausbildung multifokaler Glioblastome kommen. Zumeist ist der Tumor unilateral lokalisiert; findet jedoch eine Migration entlang des Corpus callosum statt, so können sich auch auf der gegenüberliegenden Hemisphäre Tumorzellen ausbreiten. Entsteht hierbei eine bilaterale symmetrische Struktur, wird dies als Schmetterlingsgliom bezeichnet. Seltener bildet sich das Glioblastom auch im Hirnstammbereich (sogenanntes malignes Hirnstammgliom), den Basalganglien, dem Thalamus oder dem Cerebellum aus.

Trotz des invasiven und infiltrativen Wachstums kommt es nur extrem selten zur Metastasierung außerhalb des ZNS. In älteren Serien aus der Zeit vor der Behandlung mit Temozolomid wurden spinale Abtropfmetastasen in ca. 1-2% der Fälle beschrieben [Kleihues et al., 2000; Boecker et al., 2004].

1.4 Makroskopie und Darstellung in der Bildgebung

Der ursprünglich vom Erstbeschreiber Rudolf Virchow vergebene Name „Spongioblastom“ wurde von Charles Bailey und Harvey Cushing in „Glioblastoma multifome“ umbenannt, da der Tumor makroskopisch eine „bunte“ Schnittfläche mit gelblichen Nekrosen, grauer Tumormasse und rot-bräunlichen Hämorrhagie-Zonen zeigt [Louis et al., 2007]. Nekrosen können bis zu 80 % der gesamten Tumormasse ausmachen.

In der Computertomographie (CT) zeigt sich im Nativbild ein iso- bis hypodenses Areal mit einem oft ausgedehnten perifokalen Ödem. Durch die Gabe von Kontrastmittel kommt es zu einem ringförmigen Enhancement. In der Magnetresonanztomographie (MRT) zeigt der Tumor in der T1-Wichtung ein gemischtes Signal, in der T2-Wichtung ein unregelmäßig hyperintenses Signal mit zentralen Einschmelzungen und Blutungen sowie markantem perifokalen Ödem. Nach KM-Gabe zeigt sich wiederum ein typischerweise ringförmiges heterogenes Enhancement [Boecker et al., 2004; Louis et al., 2007].

1.5 Histopathologie

Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird die Dignität der Tumore des Zentralnervensystems anhand von histologischen Kriterien (1) bezüglich des Zellursprungs benannt und (2) bezüglich der Dignität in vier Gruppen eingeteilt (Grad I=benigne bis Grad IV=maligne) [Louis et al., 2007]. Das Glioblastom entspricht dem Grad IV. Die Zellen sind in ihrer Entdifferenzierung weit fortgeschritten, so dass die eindeutige Zuordnung zu einer Zellart der Neuroglia durch den immunhistochemischen Nachweis von glial fibrillary acidic protein (GFAP) nicht immer gelingt. Es handelt sich histologisch um meist polymorphe, zellreiche Tumore, die das umliegende Gewebe diffus infiltrieren. Die Tumorzellen weisen eine sehr hohe Mitoserate (Wachstumsfraktion 8 - 25 %) sowie Zellkernpolymorphismen auf. Entscheidend für die Diagnose eines Glioblastoms sind zudem flächenhafte oder strichförmige Nekrosen, um die sich die Tumorzellen palisadenartig anordnen, sowie ausgeprägte Kapillarproliferationen, die mit der Ausbildung von glomeruloiden Strukturen einhergehen können. Es lassen sich histologisch drei Glioblastom-Varianten bestimmen, welche ebenfalls zur WHO Gruppe IV gehören [Louis et al., 2007]:

- Das kleinzellige Glioblastom zeigt eine Anhäufung von monomorphen kleinen, rundlichen, dicht gepackten Zellen mit hoher proliferativer Aktivität.
- Das Riesenzellglioblastom ist geprägt von ungewöhnlich bizarr geformten und großen

Zellen (< 500 µm Durchmesser) mit bis zu 20 Nuklei.

- Das Gliosarkom zeichnet sich durch eine Mischung von sarkomatösen und gliomatösen Zellen aus.

1.6 Klinische Symptomatik

Die Anamnese ist aufgrund des schnellen Wachstums und der Invasivität des Tumors zumeist kurz. Über 50 % der Glioblastome werden in weniger als drei Monaten symptomatisch [Scherer, 1940; Louis et al., 2007], darunter viele in wenigen Tagen bis Wochen. Zu den fünf häufigsten Symptomen gehören in absteigender Reihenfolge: Paresen, Zeichen erhöhten intrakraniellen Druckes, Aphasien, Krampfanfälle und neuropsychologische Veränderungen [Stark et al., 2005; Stark et al., 2012]. Zusammenfassend kann man zwischen (1) Herdsymptomen wie Paresen, Sensibilitätsstörungen, Aphasien, Sehfeld einschränkungen oder Störungen der Hirnnerven sowie (2) unspezifischen Symptomen erhöhten intrakraniellen Druckes wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen unterscheiden. Letztere entstehen zumeist zumindest teilweise durch ein ausprägendes Begleitödem. Selten kommt es, bedingt durch Einblutungen in den äußerst gefäßreichen Tumor, zu einem plötzlichen, „apoplektiformen“ Symptombeginn bzw. zu einer drastischen Symptomverschlechterung. In seltenen Fällen werden Glioblastome als Zufallsbefund, z.B. bei Screeninguntersuchungen, diagnostiziert.

1.7 Therapie

Bei der operativen Glioblastom-Behandlung ist zu beachten, dass durch das infiltrative Wachstum des Tumors eine mikroskopisch vollständige Resektion unmöglich ist. Die Entstehung von Rezidiven ist unausweichlich. Selbst unter vorteilhaften Bedingungen versterben die meisten Patienten innerhalb von zwei Jahren [Buckner, 2003; DeAngelis, 2001].

Die Standard-Therapie des Glioblastoms beinhaltet heute die möglichst vollständige sichere Entfernung des Tumors unter Verwendung der Mikrochirurgie, der Neuronavigation und der fluoreszenzgestützten Therapie [Stummer et al., 2006; Stummer et al., 2008]. Optional kommen nach Verfügbarkeit intraoperative Methoden der Bildgebung, z.B. die intraoperative Magnetresonanztomographie und/oder die Sonographie, dazu. Ferner gibt es Verfahren zur additiven lokalen Chemotherapie [Nabavi et al., 2009; Westphal et al., 2006]. Nach der Operation wird die kombinierte Radio-/Chemotherapie mit Temozolomid, gefolgt von einer

Temozolomid-Erhaltungstherapie, durchgeführt. Damit kann das Überleben unter Studienbedingungen im Median bis 14,6 Monaten verlängert werden [Stupp et al., 2005].

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer methylierten Promotorregion der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) von der Temozolomid-Behandlung deutlich mehr profitieren als Patienten, die dieses Merkmal nicht aufweisen [Hegi et al., 2005]. Die Methylierung der Promotorregion führt dabei zu einer MGMT-Depletion, wodurch die DNA-Reparatur-Aktivität zurückgeht und die durch das Chemotherapeutikum verursachten DNA-Alkylierungen zum erwünschten Zelluntergang führen können. 2009 wurde von Stupp et al. eine Fünf-Jahres-Analyse der EORTC-NCIC-Studie veröffentlicht. Durch den neuen Therapiestandard mit konkomitanter Radiochemotherapie und adjuvanter Temozolomid-Chemotherapie konnte eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von zehn Prozent erreicht werden. Bei Patienten mit methyliertem MGMT-Promoter lag dieser Wert sogar bei 14 Prozent [Stupp et al., 2009].

1.8 Zielsetzung und Fragestellung

Es konnten bereits mehrere Gene identifiziert werden, die in der Entwicklung eines initialen Glioblastoms eine wichtige Rolle spielen. Über die Genexpressionsmuster des Glioblastom-Rezidivs, respektive die Veränderung des Expressionsprofil vom initialen zum Glioblastomrezidiv ist jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt wenig bekannt. Vereinzelt immunhistochemische Studien lassen jedoch vermuten, dass es bedeutsame Unterschiede in den Proteinexpressionsmustern gibt. Es wurde beschrieben, dass in Glioblastomrezidiven die Expression anti-apoptotischer Faktoren steigt, während die Expression pro-apoptotischer Faktoren sinkt [Strik et al., 1999]. Stark et al. führten 2003 immunhistochemische Färbungen an Gewebeproben von Initial- und Rezidivglioblastomen durch. Es wurde eine reduzierte p53, mdm2- und EGFR-Expression beschrieben. Zudem zeigte sich, dass nach Gabe von Chemotherapie (in dieser Studie wurde noch nicht mit Temozolomid behandelt, sondern vor allem mit Cisplatin und Tamoxifen) mit reduzierter msh2-Expression einherging [Stark et al., 2003]. In einer aktuellen Studie von 2010 konnte die Arbeitsgruppe auf Proteinebene signifikante Unterschiede in der Genexpression von DNA-Fehlpaarungs-Reparatur-Proteinen bei Initial- und Rezidivtumoren feststellen. Die Expression von MLH1 und MSH6 zeigten eine Korrelation zum Patienten-Überleben [Stark et al., 2010].

Studien auf der Basis von mRNA-Untersuchungen gibt es hingegen nur sehr wenige. Martinez et al. haben 2010 in einer Studie anhand von 20 Glioblastom-Fällen zeigen können,

dass der p53-Mutationsstatus weitestgehend stabil bleibt bei gleichzeitiger EGFR-Amplifikation [Martinez et al., 2010].

Ziel dieser Studie ist es, die Genexpressionsmuster von Initial- und Rezidivtumoren auf intra- und interindividuelle Unterschiede hin zu untersuchen, um Gene zu identifizieren, die für das Rezidivwachstum von Bedeutung sind. Es wurden ausschließlich gepaarte Tumorproben verwendet. Dabei kamen verschiedene Techniken zum Einsatz:

- Nylon-basierte OligoArrays wurden zur optischen Darstellung der Expressionsunterschiede und -Gemeinsamkeiten verwendet
- Ausgewählte Ergebnisse wurden durch die quantitative Real-Time RT-PCR validiert
- Bei einem Patienten wurden zwei kostenintensive quantitative Real-Time RT-PCR-Arrays durchgeführt
- Bei 55 Patienten wurden immunhistochemische Färbungen mit ausgewählten Antikörpern durchgeführt

Insgesamt wurde ein Schwerpunkt auf diejenigen Gene gelegt, die mit der Tumorerinvasion und der Zellproliferation assoziiert sind, da Glioblastomzellen hohe Invasivität und hohe Proliferationsraten zeigen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Es wurden insgesamt Tumorproben von 55 Patienten eingeschlossen, die zwischen 2000 und 2007 in der neurochirurgischen Universitätsklinik in Kiel erstmals an einem Glioblastom (WHO IV) operiert wurden. Die Einschlusskriterien waren wie folgt:

- (1) primäre Tumorgenese
- (2) makroskopisch vollständige Tumorresektion bei der ersten Resektion
- (3) mindestens eine Re-Kraniotomie bei Tumorrezidiv
- (4) supratentorielle Lokalisation
- (5) Patientenalter ≥ 21 Jahre bei der initialen Operation
- (6) Vorhandensein der Paraffinpräparate und der schockgefrorenen Präparate beider Tumore (Initial- und Rezidivtumor)

Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Präparate von allen 55 Patienten wurden für die Immunhistochemie verwendet. Zehn in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Tumorproben aus diesem Kollektiv wurden für die molekularbiologischen Analysen verwendet.

Der Resektionsgrad wurde durch die innerhalb von 24 Stunden nach der Operation durchgeführte Computertomographie vor/nach Kontrastmittelgabe (2000 bis 2002) bzw. durch die innerhalb von 72 Stunden durchgeführte Magnetresonanztomographie bestimmt. Die Klassifizierung der Proben nach der WHO erfolgte durch den Neuropathologen der Klinik.

2.2 Methoden

Die cDNA-Array-Technologie ermöglicht es, mit einer Untersuchung die Expression vieler Gene zu analysieren. Die Anwendung von GE Oligo-Arrays auf Nylonmembranen ist ein semiquantitatives Verfahren, dessen Ergebnisse durch quantitative Verfahren validiert werden müssen. Dies geschah durch Anwendung der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time PCR). Während der Durchführung dieser Studie wurden quantitative Real-Time RT-PCR Arrays (RT2 Profiler PCR-Array) erhältlich, die eine genauere, quantitative Aussage über die Expressionsunterschiede zulassen. Mit den Array-Verfahren und der Real-Time PCR wurden jeweils immer gepaarte Tumorproben von

initialen und Rezidiv-Glioblastomen identischer Patienten untersucht. Die Immunhistochemie diente zur semiquantitativen Darstellung einiger Faktoren auf der Proteinebene.

2.2.1 RNA-Isolierung

2.2.1.1 Gewebepvorbereitung

Von den in Stickstoff eingelegten Proben wurde jeweils ein 50-100 µl schweres Gewebstückchen mit dem Skalpell herausgeschnitten, ohne das Gewebe auftauen zu lassen. Die Tumorproben wurden nun zur Homogenisierung mit dem Ultra-Turrax in ein Reagenzglas mit 1-2 ml Trizol überführt. Durch Homogenisierung ist die Gewinnung der Nukleinsäuren möglich, da bei diesem Vorgang sowohl Zellmembranen als auch Organellen zerstört werden. Das Gerät wurde vor und nach jeder Benutzung gereinigt, indem es nacheinander mit Natronlauge, autoklaviertem Wasser, 70 % Ethanol und wiederum autoklaviertem Wasser gespült wurde. Anschließend wurde je 1 ml der Suspension in ein Eppendorf - Cup überführt und für 10 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert.

2.2.1.2. Auswaschen des Trizols

Der Überstand wurde in ein neues Reagenzglas überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform zur Phasentrennung wurde das Reagenzglas für 15 Sekunden von Hand geschüttelt und erneut für 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Hierauf folgte die Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000 x g und 4°C. Die RNA befand sich nun in der oberen wässrigen Lösung, welche in ein neues Cup überführt wurde, die Trizolschicht wurde verworfen.

2.2.1.3. Präzipitation und Reinigung der RNA

Zu der sich in wässriger Lösung befindlichen RNA wurden 500 µl 100 % Isopropylalkohol hinzugefügt und für 10 Minuten bei 15-30°C stehengelassen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000 x g und 4°C befand sich die RNA als Pellet am Boden des Cups. Um die RNA zu reinigen wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Ethanol gelöst und erneut zentrifugiert für 5 Minuten bei 7500 x g und 4°C.

Der Überstand wurde von dem nun sichtbaren Pellet vorsichtig entfernt und das Cup mit offenem Deckel für circa 15-20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um das Pellet trocknen zu lassen. Es musste jedoch darauf geachtet werden, das Pellet nicht ganz austrocknen zu lassen. Nach der Resuspension mit 20-50 µl autoklaviertem Wasser wurde das Cup für 10 Minuten bei 60°C im Thermomixer inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

2.2.1.4. Messung des RNA-Gehaltes

Um den genauen RNA-Gehalt der Probe zu bestimmen wurde eine Küvette mit autoklaviertem Wasser gefüllt und das Photometer bei 260 Nanometer geeicht. Die Probe wurde 1:100 verdünnt (5 µl der Probe wurden in 495 µl autoklaviertem Wasser gelöst) in der Küvette gemessen. Zur Berechnung der Konzentration wurde die Extinktion E mit dem Verdünnungsfaktor V (100) und dem Extinktionskoeffizienten e für RNA (0,04 µg/µl) multipliziert.

2.2.1.5. Reinigen und Lösen der RNA

2 µg RNA und autoklaviertes Wasser wurden - je nach Konzentration der RNA - so in ein Cup gegeben, dass das Gesamtvolumen 7 µl betrug. Zusammen mit 1 µl DNase Puffer und 1 µl DNase wurde die Probe für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe der DNase konnte sichergestellt werden, dass sich keine DNA-Reste mehr in der Probe befanden. Anschließend wurde 1 µl EDTA hinzupipettiert und die Lösung für 10 Minuten auf 65°C erhitzt. Hierdurch wurde die Aktivität der DNase gestoppt.

2.2.2 GE Oligo-Array (Nylon-basierend)

Mit Verwendung der Oligo-Arrays können 96 Gene in einer Probe untersucht und einer anderen Probe gegenübergestellt werden. 16 Kontroll- und Referenzgene komplettieren die Anzahl der untersuchten Sequenzen auf 112. Es wurden zwei verschiedene Oligo-Arrays an jeweils drei Probenpaaren angewendet: „Human Cell Cycle“ und „Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules“. Die Untersuchungen wurden nach Angaben des Herstellers (Biomol, Hamburg, Germany) durchgeführt, als „signifikante“ Änderungen wurde ein mindestens zweifacher Expressionsunterschied zwischen initial- und Rezidivtumor bezeichnet. Im Folgenden wird die Durchführung der Oligo-Array-Untersuchung tabellarisch beschrieben:

2.2.2.1 Herstellung von cDNA

Zusammenstellung des „Annealing Mix“ in einem Eppendorf- Cap:

- 3 µg RNA (RNA+H₂O = 7 µl)
- ad 9 µl RNase freies Wasser
- 1 µl RT Primer (P)

Die Reagenzien wurden gemischt, anzentrifugiert und in den entsprechend programmierten Thermocycler gestellt.

- Inkubation für 3 Minuten bei 70°C
- Abkühlung auf 37°C
- erneute Inkubation für 10 Minuten

Erstellung des „RT Cocktail“ in einem Eppendorf-Cap:

- 8 µl Buffer BN
- 8 µl RNase-freies H₂O
- 2 µl RNase Inhibitor (RI)
- 2 µl Reverse Transkriptase (RE)

Pro Array wurden nun 10 µl zu 10 µl „Annealing Mix“ gegeben.

- Inkubation bei 37°C für 25 Minuten
- Temperaturerhöhung für 5 Minuten auf 85°C
- Kühlung auf Eis

2.2.2.2 Vervielfältigung der cDNA für die Oligo-Arrays

Einführung:

Um die hergestellte cDNA zu vervielfältigen, erfolgte als nächster Schritt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR ist einem natürlichen Schritt der DNA-Replikation nachempfunden. Durch diesen Vorgang ist es möglich, DNA-Sequenzen exponentiell zu vervielfältigen; dies wird auch Amplifikation genannt und ist von großer Bedeutung, um mit Detektionsverfahren arbeiten zu können, welche eine bestimmte Menge von DNA benötigen.

Die PCR erfolgt in drei Schritten:

(1) Denaturierung : Wird DNA einer großen Hitze ausgesetzt (ca. 90°C), so lösen sich die Wasserstoffbrücken der Komplementärbasen des DNA-Doppelstranges. Die kovalenten Bindungen zwischen Dexoyribosen und Phosphaten, die für die lineare Bindung der Einzelstränge verantwortlich sind, bleiben jedoch stabil. Dies führt dazu, dass die doppelsträngige DNA in zwei Einzelsträngen vorliegt.

(2) Primer Annealing (Anlagerung des Primers an die Ziel-DNA-Sequenz): Nach erfolgter Denaturierung kann sich ein Primer-Paar an eine spezifische DNA-Sequenz binden. Dies

erfolgt für gewöhnlich bei Temperaturen zwischen 50°C und 65°C.

(3) Elongation: Haben die Primer-Paare an die DNA-Zielsequenz gebunden, werden sie von der DNA-Polymerase erkannt. Diese beginnt analog zur Sequenz des Einzelstranges damit, das Anhängen von Nukleotiden zu katalysieren. Am Ende dieses Prozesses sind aus den zwei Einzelsträngen erneut zwei Doppelstränge geworden. Aufgrund der hohen Temperaturen während eines PCR-Zyklus muss eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet werden. Zu diesen Zwecken isolierte man die DNA-Polymerase aus Bakterien, welche in der Nähe von heißen Geysiren leben (z.B. *Thermus aquaticus*). Die sogenannte Taq-Polymerase hat ihr Temperatur-Optimum bei 72°C.

Durch ein PCR-Gerät (Thermocycler) können diese Temperaturveränderungen in einem Zyklus gezielt durchlaufen und zudem zahlreich wiederholt werden. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt exponentiell (2^n , n = Zykluszahl) und wird auch Amplifikation genannt. Nach Beendigung der gewünschten Zykluszahl erfolgt eine Inkubation bei 72° C für 5-10 Minuten, wodurch die Polymerisationsvorgänge beendet werden.

Durchführung:

Erstellung des „LPR Cocktail“:

- 36 µl Buffer L
- 18 µl Buffer AF
- 4 µl Biotin-16-dUTP
- 2 µl DNA-Polymerase (LE)

Pro Array wurden 30 µl des LPR Cocktails zum Versuchsansatz hinzu gegeben und mit einer Pipette vermischt. Anschließend durchlief der Ansatz die Polymerase-Kettenreaktion im Cycler nach folgendem Protokoll:

- 5 Minuten bei 85°C, dann dreißig Zyklen:
- 1 Minute bei 85°C
- 1 Minute bei 50°C
- 1 Minute bei 72°C

Als letzte Schritte folgten:

- 5 Minuten bei 72°C

- 2 Minuten bei 94°C

dann Probe auf Eis.

2.2.2.3 Prähybridisierung

Während der Polymerasekettenreaktion kann die Prä-Hybridisierung vorbereitet werden. Hierzu wurde die Flasche mit der GEAhyp-Lösung unter Schwenken auf 60°C erwärmt. 100 µl Lachssperma-DNA wurden für 5 Minuten lang bei 100°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. 60 µl denaturierte Lachs-DNA wurde nun zu 6 ml angewärmter GEAhyp-Lösung gegeben (Zielkonzentration = 100 µg/ml), die resultierende GEAprehyp-Lösung wurde bei 60°C aufbewahrt. Die Array-Membranen wurden mit 5 ml autoklaviertem Wasser angefeuchtet. Nach Abgießen des Wassers folgte die Hinzugabe von 2 ml GEAprehyp-Lösung. Zur Prähybridisierung wurden die Zylinder in Falcon-Röhrchen und diese in Hybridisierungsgläser gegeben. Bei 5-10 Umdrehungen pro Minute inkubierten die Membranen für 2 Stunden bei 60°C.

2.2.2.4 Hybridisierung

Die denaturierte DNA wurde zu 750 µl 60°C warmer GEAprehyp-Lösung gegeben und die resultierende GEAhyp-Lösung anschließend geschüttelt. Die sich in den Zylindern befindliche GEAprehyp-Lösung wurde verworfen und die neu angesetzte GEAhyp-Lösung auf die Membranen gegeben. Die Hybridisierung fand bei 60°C und 5-10 Umdrehungen pro Minute über Nacht statt. Die Lage der Zylinder musste waagrecht sein, um den Erfolg der Hybridisierung gewährleisten zu können.

2.2.2.5 Reinigung der Membranen

Zur Vorbereitung des Waschvorgangs wurden die beiden Waschlösungen (I und II) auf 60°C erwärmt. Die GEAhyp-Lösung wurde in Eppendorf-Cups überführt. Die Membranen wurden nun in den Zylindern jeweils zweimal mit 5 ml Waschlösung I im Hybridisierungssofen bei 20-30 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten inkubiert. Derselbe Vorgang wurde mit Waschlösung II wiederholt.

2.2.2.6 Detektion

Die Membranen wurden aus den Zylindern entnommen und vorsichtig in Frischhaltefolie eingeschlagen. In der Dunkelkammer wurden sie für mit jeweils unterschiedlichen, definierten Belichtungszeiten auf eine Filmplatte belichtet. Überall dort, wo sich markierte cDNA-Stränge an die sich auf der Membran befindlichen cDNA-Stränge gebunden hatten, zeichneten sich die entstehenden Lichtimpulse auf der Filmplatte ab. Die Filmplatten wurden anschließend in einen Metallrahmen eingespannt und für jeweils 5 Minuten in ein Wasserbad, Entwicklerlösung und Fixierlösung getaucht und anschließend an der Luft getrocknet.

2.2.2.7 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm „GelProAnalyzer“. Hier wurde über die eingescannten Array-Fotofilme ein digitales Rasterschema gelegt. Das Programm analysierte nun die Stärke der Lichtintensität bezogen auf die Expressionsstärke von einem Kontrollgen (GAPDH). Bei einem direkten Vergleich der Expressionsmuster von Initial- und Rezidivtumor eines Patienten erstellte das Programm für jedes Gen den Wert für die Expressionsstärke des Rezidivs dividiert durch Expressionsstärke des Initialtumors (Exp.2/Exp.1).

2.2.3 Real-Time RT-PCR

2.2.3.1 Einführung

Mithilfe der Real-Time RT-PCR wurden ausgewählte Ergebnisse der Oligo-Array-Untersuchungen validiert. Es wurden insgesamt neun Gensequenzen in gepaarten Tumorproben von zehn Patienten untersucht. Die Real-Time RT-PCR ermöglicht im Gegensatz zur konventionellen PCR eine quantitative Aussage über das Genprodukt. Dies gelingt durch Detektion und Quantifizierung eines Fluoreszenz-Signals während der PCR, welches exponentiell mit der Menge der amplifizierten DNA-Sequenz ansteigt. Dies geschieht in einem PCR-Gerät, welches Thermocycling, Fluoreszenz-Detektion und Software-Analyse miteinander vereint und automatisiert ablaufen lässt. Es wird eine Oligonukleotid-Sonde verwendet, die mit zwei Fluoreszenz-Farbstoffen verbunden ist. Das erste Molekül befindet sich am 5'-Ende und wird als Fluoreszenz-Reporter bezeichnet; hierbei handelt es sich um Fluorescein (FAM). Das zweite Molekül befindet sich am 3'-Ende und wird Quencher genannt (Rhodamin, TAMRA). Die Sonde bindet sich spezifisch an eine bestimmte Ziel-Sequenz, welche sich zwischen den beiden Primern innerhalb des zu amplifizierenden DNA-Bereichs befindet. Ist die Sonde intakt, so sind beide Farbstoffe in

einem bestimmten Abstand voneinander entfernt und die Reporter-Fluoreszenz wird durch die Nähe der Quencher-Fluoreszenz supprimiert. Dieses Phänomen wird als Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) bezeichnet. Beginnt nun während der PCR die DNA-Polymerase den Polymerisationsprozess und trifft auf die Oligonukleotid-Sonde, wird diese von ihr hydrolysiert. Ohne die Nähe zum Quencher beginnt der Reporter ein Fluoreszenz-Signal zu senden, welches sich proportional zur amplifizierten DNA-Menge verhält und somit im Verlauf der PCR exponentiell ansteigt. Dieses Signal wird von dem Real-Time PCR-Gerät mit einer speziellen Kamera aufgefangen. Es erfolgt eine Software-gestützte Berechnung der Zykluszahl, bei welcher die Reporter-Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert überschritten hat. Dieser wird als „threshold cycle“ oder „CT-Wert“ bezeichnet.

2.2.3.2 Herstellung von cDNA für Real-Time RT-PCR

Zu den nach dem oben genannten Schema isolierten RNA-Proben (2.2.1) wurden im nächsten Schritt jeweils 2 µl „random hexamer“ hinzu pipettiert, welche daraufhin für 5 Minuten bei 70°C im Cycler inkubierten. Bei dieser Temperatur liegt RNA denaturiert vor, so kann es zum „Annealing“ des Primers kommen, d.h. zur Interaktion und Anlagerung des Primers am RNA-Strang. Anschließend wurde die Probe auf Eis gekühlt

Nun wurde für jede Probe folgender Ansatz hergestellt:

- 4 µl 5x Reaction Buffer
- 2 µl dNTP-Mix
- 1 µl autoklaviertes Wasser

Der Reaktionsansatz wurde gemischt, anzentrifugiert und zur Inkubation bei 25°C für 5 Minuten zur Probe in das Cup gegeben. Als letzter Schritt wurde zu der Probe 1 µl Reverse Transkriptase gegeben, welche anschließend nach folgendem Protokoll behandelt wurde:

- 10 Minuten bei 25°C
- 60 Minuten bei 42°C
- 10 Minuten bei 70°C, dann auf Eis

Zuletzt wurden 20 µl autoklaviertes Wasser zur neu entstandenen cDNA-Probe hinzugegeben, wodurch eine Endkonzentration von 50 ng/µl erfolgte. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Proben bei - 20°C.

2.2.3.3 Durchführung der Real-Time RT-PCR

Für die Real-Time RT-PCR wurde jede Probe zwei Ansätze vorbereitet. In der ersten Versuchsreihe wurden die cDNA-Proben unverdünnt eingesetzt, in der zweiten in der Verdünnung 1:10:

Reihe 1: 100 µg (unverdünnt)

Reihe 2 : 10 µg (1 µl cDNA + 9 µl H₂O)

Nun wurde ein 20 µl Ansatz vorbereitet, bestehend aus:

- 2 µl cDNA (entspricht 100 µg bzw. 10 µg)
- 10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix
- 7 µl H₂O
- 1 µl Primer

Dieser wurde nun jeweils in eine Kammer einer 96-well Platte gegeben. Als intrinsische Positivkontrolle wurde jede Probe auf die Expression von GAPDH untersucht, als Negativkontrollen wurden mindestens drei 20 µl-Versuchsansätze ohne cDNA verwendet. Die 96-well Platte wurde anschließend fest mit einer Spezialfolie verschlossen und in den Thermocycler gestellt. In dem PCR-Gerät wurden nun folgende Zyklen durchlaufen:

- 2 Minuten bei 50°C
- 10 Minuten bei 95°C, anschließend 40 Zyklen
- 15 Sekunden bei 95°C
- 1 Minute bei 60° C

2.2.3.4 Auswertung

Zur relativen Quantifizierung wird der Threshold Cycle eines jeden Gens mit dem Threshold Cycle des Standard-Gens GAPDH verglichen. Hierzu wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\Delta CT = ((10^{CT_x} - 3,3 + 100^{CT_x})/2) - ((10^{CT_{GAPDH}} - 3,3 + 100^{CT_{GAPDH}})/2)$$

Es wurde ein Mittelwert gebildet aus dem CT-Wert der Probe mit 10 ng -3,3 und der Probe mit 100 ng. Dieses erfolgte analog mit den beiden CT-Werten der auf GAPDH untersuchten Probe. Für das Ergebnis wurde nun der Mittelwert des Kontrollgens von dem des zu untersuchenden abgezogen. Das Ergebnis wird als Δ CT bezeichnet.

Um nun bestimmen zu können, wie sich die Expressionsmuster zwischen Initialtumor und Rezidivtumor unterscheiden, also wie groß der x-fache Unterschied ist, erfolgt ein weiterer Rechenschritt:

$$\frac{2^{-\Delta CT_{\text{rezidiv}}}}{2^{-\Delta CT_{\text{initial}}}}$$

2.2.4 RT2-Profilier PCR-Array

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Die Vorgänge sind dem unter 2.2.1 genannten Protokoll weitestgehend ähnlich bei geringen Abweichungen:

Gewebevorbereitung und Trizol-Auswaschung analog zu 2.2.1.1 und 2.2.1.2.

Zur Präzipitation wurde 400 μ l 100% Isopropylalkohol verwendet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 12.000 g bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend mit 200 μ l 70% Ethanol gewaschen und erneut bei RT für 10 Minuten bei 12.000g zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde, wurde das Pellet bei RT für 5 Minuten stehen gelassen, um das Pellet trocknen zu lassen.

Dann wurde das Pellet in 30-50 μ l RNase-freiem Wasser gelöst. Nach der Resuspension wurden 350 μ l Lyse- und Bindungs-Puffer hinzugegeben und das Cup wurde gevortext.

2.2.4.2 RNA-Reinigung

- 350 μ l 70% Ethanol wurden zur Probe hinzugegeben und mit Hilfe einer Pipette vorsichtig vermischt.
- Das ganze Volumen (750 μ l) wurde in die „Spin Column“ (Säule) gefüllt und für 30 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen.
- 350 μ l Desalting Buffer wurden hinzugefügt und die Probe für 60 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde wiederum verworfen; nun wurde die Säule auf ein neues Sammelröhrchen überführt
- 8 μ l RNase-freie DNase und 90 μ l DNase Reaktionspuffer wurden gemischt und zusammen

in die Säule gegeben. Dieses Gemisch wurde 15 min bei RT inkubiert.

- 200 µl Vorwasch-Puffer wurde nun in die Säule gefüllt und diese für 30 Sekunden bei 11.000 zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen.
- 600 µl Wasch-Puffer wurden in die Säule gegeben und 30 Sekunden lang bei 11.000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Die Säule wurde anschließend auf ein neues Sammelröhrchen überführt.
- 250 µl Wasch-Puffer wurden erneut in die Säule gefüllt. Diese wurde für 3 Minuten bei 11.000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Die Säule wurde aus dem Sammelröhrchen genommen und in das Elutionsröhrchen gesetzt.
- 50 µl RNase-freies Wasser wurden in die Säule geben und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Röhrchen 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert.
- RNA kann nun für 2 - 4 Tage bei -20 °C oder bis zu sechs Monate bei -80°C gelagert werden

2.2.4.3 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Für jede zu untersuchende Probe wird in einem separaten Röhrchen folgender Ansatz bereitet:

„Genomic DNA Elimination Mixture“

- 1 µg Totale RNA
- 2 µl GE (5 x g DNA Elimination Buffer)
- RNase freies Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl

Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei 42°C inkubiert und kam danach für mindestens 1 Minute sofort auf Eis.

Nun wurde der „RT Cocktail“ vorbereitet:

Folgender Ansatz wurde pro zu untersuchender Probe angesetzt (Gesamtvolumen 10 µl)

- 4 µl BC3 (5X RT Buffer 3)
- 1 µl P2 (Primer and External Control Mix)
- 2 µl RE3 (RT Enzyme Mix 3)
- 3 µl H₂O, RNase-frei

Die Röhrcchen wurden nun kurz anzentrifugiert bis sich der Inhalt auf dem Boden des Röhrcchens befand. 10 µl des RT-Cocktails wurden zu den 10 µl „Genomic-DNA-Elimination-Mixture“-Röhrcchen gegeben, in welchen sich die gereinigte RNA befand. Der Ansatz wurde anschließend für exakt 15 Minuten bei 42°C inkubiert. Um die RNA zu hydrolysieren und die Reverse Transkriptase zu inhibieren, wurden die Proben danach sofort für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Es wurden anschließend 91 µl H₂O zu der Probe hinzugegeben. Es entsteht ein Gesamtvolumen von 111 µl pro Probe. Nun konnten die Röhrcchen auf Eis überführt werden und im Verlauf für den Real-Time PCR-Array verwendet werden.

Für den Real-Time PCR-Array wurde nun folgender Ansatz hergestellt:

- 1275 µl qPCR Master Mix
- 102 µl cDNA
- 1173 µl H₂O

- 2550 µl totales Volumen

Von diesem Ansatz wurden dann jeweils 25 µl in ein Well der 96-Well-Platte pipettiert. Es wird folgendes Programm im Real-Time-PCR-Gerät durchlaufen:

- 1 Zyklus 10 Min bei 95°C
- 40 x (15 sek 95°C und 1 Min 60°C).

2.2.4.4 Auswertung

Die Auswertung des Real-Time PCR-Arrays erfolgte mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode:

Zunächst wurden die Δ CT-Werte der zu untersuchenden Gene bestimmt, indem von dem jeweiligen CT-Wert der CT-Wert eines Kontrollgens abgezogen wurde. Nun konnten Initial- und Rezidivtumorproben miteinander verglichen werden. Der Δ CT-Wert des Initialtumors wurde vom Δ CT-Wert des Rezidivs abgezogen, es entstand der $\Delta\Delta$ CT-Wert:

$$\Delta \text{ CT rezidiv} - \Delta \text{ CT initial} = \Delta\Delta \text{ CT}$$

In einem letzten Schritt wurde folgende Rechnung durchgeführt:

$2^{-\Delta\Delta CT}$ = Wert des Expressionsunterschiedes.

Zahlenwerte größer 1 beschreiben eine Überexpression, Zahlenwerte kleiner 1 beschreiben eine Unterexpression.

2.2.5 Immunhistochemische Färbungen

Ergänzend zu den molekulargenetischen Untersuchungen führten wir an den Initial- und Rezidivtumorproben von 55 Patienten (insgesamt pro Färbung 110 Proben) durch, um einen semiquantitativen Nachweis von fünf ausgewählten Genprodukten auf Proteinebene durchzuführen: EGFR, MDM2, p53, GAPDH und Ki67. Hierfür wurden 3 µm dünne Schnitte von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Glioblastom-Proben hergestellt.

2.2.5.1 Färbung mit Antikörper gegen EGFR

- Entparaffinieren in 100% Xylol (3 x 5 Minuten)
- Entwässern in absteigender Alkoholreihe (je 5 Minuten):
100%, 100% , 96%, 70%
- Spülen in Aqua dest.
- Inkubation mit Protease für 5 Minuten im Wasserbad bei 37°C
- 5 Minuten Spülen in Aqua dest.
- 3 x 5 Minuten Spülen in TRIS-Puffer
- Aufbringen des Primärantikörpers Verdünnung 1:100
- 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 5 Minuten spülen in Aqua dest
- 3 x 5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- Aufbringen des Histofine detection kit
- Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur
- 5 Minuten spülen in Aqua dest
- 3 x 5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- Aktivierung des AEC mit H2O2
- Aufbringen des AEC und 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 5 Minuten Spülen in Aqua dest
- 3 x 5 Minuten Spülen in TRIS-Puffer

- 5 Minuten Inkubation in Hämalaun nach P.Mayer
- 5 Minuten Bläuen in Leitungswasser
- Überführung in Aqua dest.
- Eindeckelung mit Aquatex
- Trocknen

2.2.5.2 Färbung mit Antikörper gegen p53

- Entparaffinieren in 100% Xylol (3 x 5 Minuten)
- Entwässern in absteigender Alkoholreihe (je 5 Minuten):
100%, 100% , 96%, 70%
- Spülen in Aqua dest.
- 4 Minuten Kochen im Citratpuffer pH 6
- 5 Minuten Spülen in Aqua dest.
- 3 x 5 Minuten Spülen in TRIS-Puffer
- Aufbringen des Primärantikörpers Verdünnung 1:1000
- Einwirken über 30 Minuten
- 5 Minuten spülen in Aqua dest
- 3 x 5 Minuten spülen in TRIS-Puffer
- Aufbringen des Histofine detection kit
- Einwirken über 15 Minuten
- 5 Minuten Spülen in Aqua dest
- 3 x 5 Minuten Spülen in TRIS-Puffer
- Aktivierung des AEC mit H₂O₂
- Aufbringen des AEC und 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 5 Minuten Spülen in Aqua dest
- 3 x 5 Minuten Spülen in TRIS-Puffer
- 5 Minuten Inkubation in Hämalaun nach P.Mayer
- 5 Minuten Bläuen in Leitungswasser
- Überführung in Aqua dest.
- Eindeckelung mit Aquatex
- Trocknen

2.2.5.3 Färbung mit Antikörper gegen MDM2

Protokoll wie oben genannt, bis auf:

- Verdünnung des Antikörpers 1:1000
- Kochen für 4 min statt in Citratpuffer in EDTA-Puffer pH 7,8

2.2.5.4 Färbung mit Antikörper gegen Ki67:

Protokoll wie oben genannt, bis auf:

- Verdünnung des Antikörpers 1:200
- Kochen für 4 min statt in Citratpuffer in EDTA-Puffer pH 7,8

2.2.5.5 Färbung mit Antikörper gegen GAPDH:

- Verdünnung des Antikörpers 1:200
- Keine Vorbehandlung im Sinne von Kochen

2.2.5.6 Statistische Auswertung

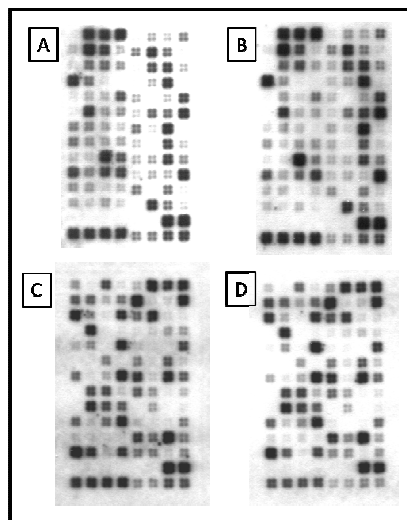
Die statistische Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse erfolgte mit dem Wilcoxon-Test (Rangreihenfolgen). Der mögliche Zusammenhang zwischen der Proteinexpression und dem Überleben der Patienten wurde mit dem Log Rank Verfahren / Kaplan-Meier-Plots (Statistisches Programm WinSTAT[®]) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Oligo-Arrays

Bei den Oligo-Array Untersuchungen zeigte sich bei der Betrachtung mit dem menschlichen Auge, dass sich die Genexpressionsmuster der Glioblastome im intraindividuellen Vergleich zwischen Initialtumor und Rezidivtumor nur wenig unterscheiden (Abbildung 1).

Abb. 1: Ergebnisse der GE OligoArray-Analyse, Vergleich von initialen und Rezidiv-Tumoren.



Legende: A, B: Oligo Array „Human Cell Cycle“ des initialen Tumors (A) und des Rezidivtumors (B) desselben Patienten. C, D: Oligo Array „Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules“ des initialen Tumors (C) und des Rezidivtumors (D) desselben Patienten.

Mit Hilfe der Clusteranalyse konnten Tendenzen zur Überexpression bestimmter Moleküle gefunden werden. Die folgenden Molekülgruppen waren in Glioblastom-Rezidiven überexprimiert:

- Integrine
- Matrix-Metallo-Proteinase (MMP)
- G1-Phase Gene
- DNA-damage/ checkpoint-Faktoren

Bei Betrachtung der interindividuellen Ergebnisse zeigten sich erwartungsgemäß deutliche Unterschiede in Bezug auf die Genexpression. Die Ergebnisliste mit der Übersicht über alle untersuchten Gene befindet sich im Anhang.

3.2 Real-Time PCR

Mittels Real-Time PCR erfolgte die quantitative Analyse der folgenden neun Moleküle aus den oben genannten Genfamilien: MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-3, P53, MDM2, BAX, und EGFR. Die Faktoren wurden jeweils bei zehn Patienten, jeweils in den initialen und den Rezidiv-Tumoren untersucht. Es zeigte sich bei folgenden Genen eine mindestens zweifache Überexpression im Rezidivtumor:

- MMP-2 in 4/10 Patienten
- MMP-9 in 5/10 Patienten
- TIMP-3 in 5/10 Patienten
- BAX in 4/10 Patienten

Die gesamten Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1:

Vergleich der mRNA-Expression in Initial- und Rezidiv-Tumoren mittels der Real-Time RT-PCR.

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMP 1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	↑	N/A	N/A	N/A
MMP 2	↔	↑	↔	↔	↑	↑	↔	↑	↔	N/A
MMP 9	↑	↑	N/A	↔	↑	↑	↓	N/A	↑	N/A
TIMP 2	↑	↓	↑	↓	↑	↔	↔	↓	↓	↓
TIMP 3	↑	↓	↑	↓	↑	N/A	↑	↑	↓	N/A
p53	↑	↔	↔	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑
MDM 2	↔	↔	N/A	↓	↑	N/A	↔	N/A	N/A	N/A
BAX	↑	↔	↔	↓	↑	↑	↔	↔	↓	↑
EGFR	↑	↔	↑	↓	↔	N/A	↔	↓	↓	N/A

Legende: ↑ = mindestens 2-fache Überexpression im Rezidiv-Tumor, ↓ = mind. 2-fache Unterexpression im Rezidiv-Tumor, ↔ = keine Veränderung zwischen Initial- und Rezidivprobe, N/A = nicht messbar

3.3 Real-Time PCR-Array

Mit den Initial- und Rezidivtumorproben eines Patienten wurden die folgenden Real-Time RT-PCR-Arrays durchgeführt: „Human Cell Cycle“ und „Human Embryonic Stem Cell“.

3.3.1 Human Cell Cycle

Bei Verwendung des Human Cell Cycle Arrays konnten die Daten von insgesamt 78 Genen ausgewertet werden. Neun von diesen Genen zeigten eine mindestens zweifache Überexpression im Rezidivtumor.

Tabelle 2 gibt eine genaue Übersicht.

Tabelle 2:

Gene mit einer mindestens zweifach erhöhten Expression im Rezidivtumor im Vergleich zum initialen Tumor desselben Patienten unter Verwendung des Arrays „Human Cell Cycle“:

Gen	ΔCt Initial	ΔCt Rezidiv	$\Delta \Delta Ct$ (ΔCt Rezidiv - ΔCt Initial)	fold change ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
BAX	3,9	2,61	-1,29	2,4
BCCIP	6,42	3,31	-3,11	8,6
CCNG2	4,99	3,51	-1,48	2,8
CDKN1A	3,04	1,97	-1,07	2,1
CDKN2B	8,91	6,81	-2,1	4,3
DNM2	8,69	6,85	-1,84	3,6
GADD45A	6,42	3,82	-2,6	6,1
MKI67	9,92	8,39	-1,53	2,9
TP53	4,86	3,69	-1,17	2,3

Legende: ΔCt = delta CT-Wert, $\Delta \Delta Ct$ = delta-delta CT-Wert, Initial = initiales Glioblastom, Rezidiv = Rezidiv-Glioblastom

3.3.2 Human Embryonic Stem Cell Array

Bei Verwendung des Human Embryonic Stem Cell Array konnten 55 Gene in Hinblick auf das Genexpressionsverhalten bei Initial- und Rezidivtumor miteinander verglichen werden. Es zeigten sich ebenfalls neun Gene, die mindestens eine zweifache Überexprimierung im Rezidivtumor zeigten. Tabelle 3 zeigt diese Gene und die Delta-CT-Werte.

Tabelle 3: Gene mit einer mindestens zweifach erhöhten Genexpression im Rezidivtumor bei einem Vergleich zwischen Initial- und Rezidivtumorproben desselben Patienten unter Verwendung des Human Embryonic Stem Cell Array

Gen	Δ Ct Initial	Δ Ct Rezidiv	$\Delta \Delta$ Ct (Δ Ct Rezidiv - Δ Ct Initial)	fold change ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$)
CRABP2	8,17	5,65	-2,52	5,74
DES	9,29	8,12	-1,17	2,25
EOMES	12,03	10,07	-1,96	3,89
GAL	11,13	6,58	-4,55	23,43
HBB	2,64	-1,57	-4,21	18,51
LAMA1	10,98	9,22	-1,76	3,39
LEFTY2	11,75	8,44	-3,31	9,92
NOG	9,43	6,35	-3,08	8,46
SEMA3A	10,72	7,73	-2,99	7,94

Legende: Δ Ct = Delta CT-Wert, $\Delta\Delta$ Ct = Delta-Delta CT-Wert, Initial = initiales Glioblastom, Rezidiv = Rezidiv-Glioblastom

3.4 MGMT-Promotor-Methylierung

Für diese Untersuchung wurden die Proben von vier Patienten verwendet, welche bis zur Operation des Rezidivtumors keine Temozolomid-Therapie erhalten hatten. Es wurden jeweils die Initial- und Rezidivtumorproben untersucht, so dass insgesamt 8 Proben auf eine Methylierung des MGMT-Promotors hin untersucht wurden. Bei zwei Patienten zeigte sich eine Methylierung in Initial- und Rezidivtumorproben, bei zwei Patienten konnte diese nicht nachgewiesen werden.

3.5 Immunhistochemie

In den immunhistochemischen Färbungen wurden die Initial- und Rezidivtumorproben von 55 Patienten auf Unterschiede in den Expression von p53, MDM2, EGFR und GFAP untersucht. Zudem wurde der Ki67 Proliferations-Index bestimmt.

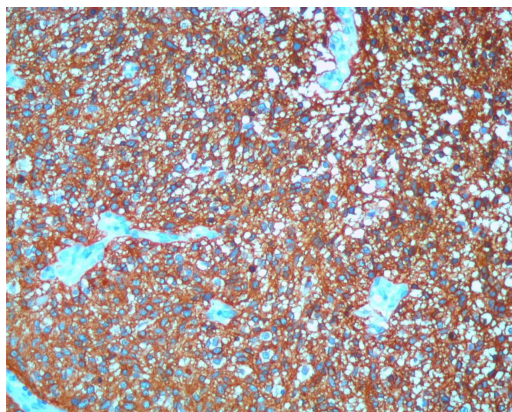


Abb. 2: EGFR-Färbung des Initialtumors
250 x Vergrößerung

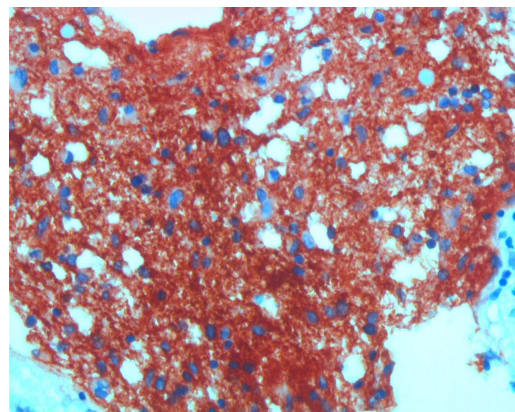


Abb. 3: EGFR-Färbung des Rezidivtumors
250 x Vergrößerung

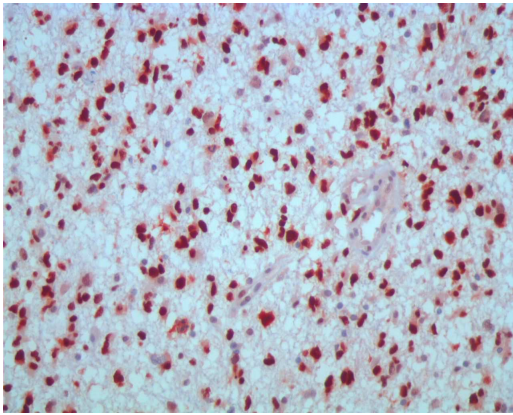


Abb. 4: p53-Färbung des Initialtumors
250 x Vergrößerung

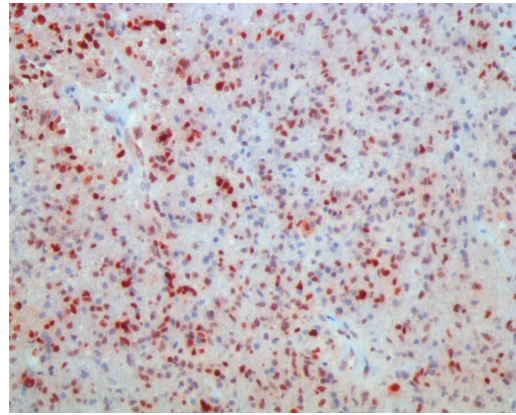


Abb 5: p53-Färbung des Rezidivtumors
250 x Vergrößerung

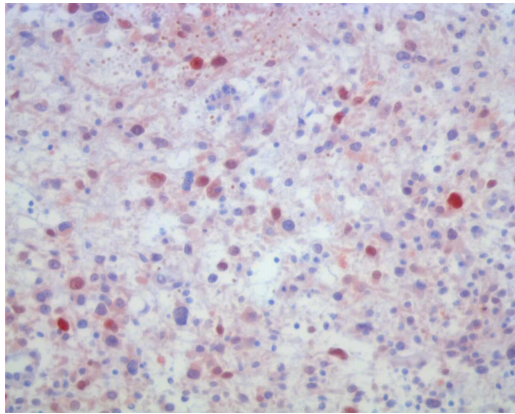


Abb. 6: MDM2-Färbung des Initialtumors
500 x Vergrößerung

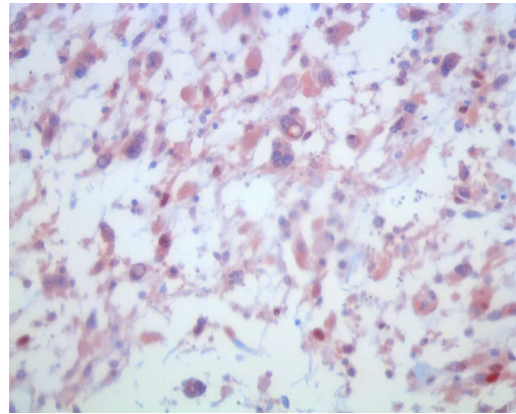


Abb 7: MDM2-Färbung des Rezidivtumors
500 x Vergrößerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Proteinexpression von p53, GFAP und Ki67 im Rezidivtumor signifikant weniger war als in den Initialtumoren. Die Untersuchung von EGFR- und MDM2 ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Initial- und Rezidivtumorgewebe.

Es zeigte sich eine signifikante Assoziation der EGFR-, p53-, MDM2- und GFAP-Expression mit dem Ki67-Proliferations-Index sowohl in den Initial- als auch in den Rezidivtumoren. Die Ergebnisse werden in Tabelle 4 demonstriert:

Tabelle 4:

Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen (n=55 Patienten)

	iGB versus rGB	iGB versus Ki67	rGB versus Ki67
EGFR	n.s.	p<0.001	p<0.001
p53	p=0.02	p=0.0026	p=0.02
MDM2	n.s.	p<0.001	p<0.001
GFAP	p=0.017	p<0.001	p<0.001
Ki67	p=0.017		

Legende: iGB=initiales Glioblastom, rGB= rezidiv Glioblastom, n.s.= nicht signifikanter Unterschied nach Wilcoxon test

Anhand der Kaplan-Meier Methode wurde zudem untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Proteinexpression und dem Überleben der Patienten gab. Es zeigte sich ein Trend zwischen der MDM2-Expression im Rezidivtumor und dem Überleben (p=0,07).

4. Diskussion

Das Glioblastom ist der häufigste und bösartigste hirneigene Tumor im Erwachsenenalter. Charakteristisch ist die diffuse Infiltration des umgebenden Hirngewebes. Das Glioblastom kann sowohl primär („de novo“) innerhalb weniger Monate sowie auch über einen längeren Zeitraum aus niedriggradigeren Vorstufen entstehen [Louis et al., 2007]. Fast ausnahmslos führt der Tumor auch nach makroskopisch vollständiger operativer Entfernung zu Lokalrezidiven und damit schließlich zum Tode des Patienten. Das mediane Überleben liegt aktuell bei maximal 14,6 Monaten [Stupp et al., 2005]. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei zehn Prozent [Stupp et al., 2009].

Bei der Diagnose des regelhaft auftretenden Rezidivs kann eine erneute Operation sinnvoll sein. Therapeutische Alternativen sind ggf. eine fokussierte Bestrahlung und/oder die Fortführung bzw. Dosisänderung der Temozolomid-Behandlung oder der Wechsel auf ein sekundäres Chemotherapeutikum. [Herrlinger et al., 2006; Readon et al., 2005; Schmidt et al., 2006].

Es existieren zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten über genetische Veränderungen bei der Entstehung von Glioblastomen. Dabei können Gendefekte nicht nur einzelnen Stufen der Tumorentstehung, sondern auch der primären oder sekundären Tumorgenese zugeordnet werden [Burton et al., 2002; Kleihues et al., 1999; Kleihues et al., 2000; Louis et al., 2007; Von Deimling et al., 1995]. Auch wurden altersspezifische genetische Veränderungen beschrieben [Newcomb et al., 1998; Simmons et al., 2001; Stark et al., 2003]. Erstaunlicherweise gibt es aber nur wenige Publikationen zur vergleichenden Untersuchung von initialen und Rezidivtumoren hinsichtlich der Genexpression.

Da das Glioblastom als phänotypischer Endpunkt diffus infiltrierender Gliome angesehen werden kann [Louis et al., 2007], ist von einer hohen genetischen Heterogenität bei dem genetischen Vergleich verschiedener Glioblastom-Patienten auszugehen. Daher muss zum Vergleich von Initial- und Rezidivtumoren jeweils Gewebe derselben Patienten verglichen werden (gepaarte Tumorproben). Die wenige Veröffentlichungen, die sich mit genetischen Veränderungen von Initial- versus Rezidivglioblastomen befassen, sind immunhistochemische Studien [Stark et al., 2003; Strege et al., 2004; Strik et al., 1999].

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation wurden mit verschiedenen molekulargenetischen und immunhistochemischen Techniken Genexpressionsprofile von Initial- und Rezidiv-Glioblastomen erstellt. Dabei wurden stets gepaarte Tumorproben untersucht. Die Untersuchungen auf Proteinebene wurden anhand von immunhistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern unter Verwendung von Paraffinschnitten durchgeführt. Die molekularbiologischen Untersuchungen erfolgten unter Verwendung verschiedener Array-Techniken (Nylon-basierende Oligo-Arrays, Real-time RT-PCR-Arrays) sowie der quantitativen Real-Time RT-PCR).

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass die inter-individuelle Heterogenität erwartungsgemäß hoch ist, während die intra-individuelle Heterogenität der Genexpression erstaunlich niedrig ist. Dies zeigte sich sowohl in den Oligoarray-Untersuchungen als auch im quantitativen Real-Time PCR-Array. Dennoch ließen sich signifikante intra-individuelle Expressionsunterschiede mehrerer Gene bei mehreren Patienten nachweisen, auf welche im Folgenden genauer eingegangen werden wird.

Oligo-Arrays und Real-Time PCR-Validierung

Es wurden anhand der Gewebeproben von drei Patienten jeweils zwei verschiedene Arrays durchgeführt (GEArray® Q Series „Human Cell Cycle“, „ Extracellular Matrix & Adhesion Genes“ [Dalla-Torre et al., 2006; Hornberg et al., 2002; Yang et al., 2011]. In der Clusteranalyse zeigten 4 Gen-Familien eine erhöhte Expression im Rezidivtumor: Integrine, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), G1-Phase Gene und DNA-Kontroll-Faktoren. Aufgrund der kleinen Fallzahl und der semi-quantitativen Methode blieb die Aussagekraft eingeschränkt. Neun Gene wurden für die quantitative Real-Time PCR-Analyse ausgesucht. Dabei zeigte sich eine Überexpression von MMP 2 und -9 in 4/10 bzw. 5/10 Patienten sowie eine Unterexpression des Gewebe-Inhibitors der Matrix-Metalloproteinasen 3 (tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase 3; TIMP 3) in 4/10 Patienten.

Matrix-Metalloproteinasen sind eine Familie der Zink-abhängigen Endopeptidasen. Sie haben die Fähigkeit, Komponenten der Extrazellulärmatrix zu hydrolysieren und spielen u.a. bei der Metastasierung, auch in das ZNS, eine wesentliche Rolle [Brinckerhoff et al., 2000; Stark et al., 2007]. Die Familie der Matrix-Metalloproteinasen besteht aus 23 Mitgliedern, von denen 17 als lösliche Enzyme sezerniert werden und sechs membrangebunden vorliegen. Abhängig

von der Substratspezifität und der Struktur ihrer Domänen werden die MMPs in verschiedene Untergruppen eingeteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Matrilysine, Stromelysine, Metalloelastasen, membrangebundene MMPs und andere [McCawley et al., 2000; Nagase et al., 2006]. Die löslichen MMPs werden als Vorstufen in den Extrazellularraum sezerniert und werden dort von Proteasen aktiviert. Der Grad ihrer Aktivität wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst: Auf transkriptioneller Ebene haben bestimmte Zytokine und Wachstumsfaktoren Einfluss auf die Expressierung [Dasu et al., 2003], auf posttranskriptioneller Ebene werden sie durch sogenannte proMMPs aktiviert und durch spezifische endogene Gewebeinhibitoren (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMPs) inhibiert [Nagase et al., 2006].

Nachweise über die wichtige Rolle der Matrix-Metalloproteinasen im Bereich von Angiogenese und Invasion konnten für viele verschiedene Tumorentitäten erbracht werden. Forschungsergebnisse in Bezug auf MMP-1, eine interstitielle Kollagenase, zeigten, dass eine erhöhte Expression beim Mammakarzinom mit einer verstärkten Invasivität und Angiogenese einhergeht [Eck et al., 2009; Zhou et al., 2011]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Studien, welche die Rolle von MMP-1 beim malignen Melanom und dem Nierenzellkarzinom untersuchten [Blackburn et al., 2007; Petrella et al., 2006]. Auch in Bezug auf das Glioblastom gibt es Veröffentlichungen, welche sich mit der Rolle von MMP-1 beschäftigen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Glioblastomen eine signifikante Überexpression von MMP-1 auf Proteinebene vorliegt [McCready et al., 2005]. Zudem konnte in einer aktuellen Studie durch in vitro Versuche, bei welchen Glioblastom-MMP1-knock-out Zelllinien und Glioblastom-Zelllinien mit MMP1-Überexpression miteinander verglichen wurden, gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von MMP1 mit vermehrter Angiogenese und stärkerem Tumorwachstum einhergeht [Pullen et al., 2011].

MMP 2 und 9, beides Gelatinasen, spielen eine besonders wichtige Rolle in den Bereichen Migration und Metastasierung, da sie Komponenten der Basalmembran (Kollagen Typ IV) hydrolysieren können. Die Transkription dieser Gene wird unter anderem durch den JAK-2 (Janus-Kinase-2)/STAT-3 (signal transducer and activator of transcription-3; Signalumwandler und Transkriptionsaktivator-3) reguliert. Die JAK-2 ist ein Aktivator von STAT-3, welcher die Expression von MMP-2 und MMP-9 reguliert [Senft et al., 2011].

Das Protein MMP-2 wird posttranskriptionell aktiviert, indem das membrangebundene MT1-MMP einen Komplex mit TIMP-2 eingeht. Das aktivierte MMP-2 kann über einen weiteren Faktor wiederum MMP-9 aktivieren. Eine Überexpression von MT1-MMP and MMP-2 zeigte beim malignen Melanom sowohl in einem Xenograft-Modell als auch bei der

molekulargenetischen Untersuchung verschiedener Tumorproben eine starke Korrelation mit Tumorprogression und Invasion [Hofmann et al., 2000]. Auch beim Glioblastom haben sich in der aktuellen Literatur insbesondere die Gelatinasen MMP 2 und 9 als relevant herausgestellt [Nakada et al., 2003]. In einer Studie konnte an 163 Glioblastompatienten gezeigt werden, dass eine MMP 9-Überexpression mit einer schlechteren Prognose einhergeht [Yan et al., 2011].

MT1-MMP, MMP-2 und MMP-9 können aufgrund der aktuellen Studienlage möglicherweise als prädiktive Biomarker für Tumoraggressivität, Invasivität und Metastasierungspotential gewertet werden. In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass MMP-9 und MMP-2 in den Rezidivtumoren überexprimiert sind, was als ein Hinweis für eine erhöhtes invasives Potential gewertet werden kann. Den Matrixmetalloproteinasen und der JAK2/STAT3-Signalkaskade könnte eine Schlüsselrolle als Ziel für molekulare Tumortherapiestrategien zukommen.

Ebenfalls überexprimiert zeigten sich im Rezidivtumor verschiedene Mitglieder der Integrinfamilie, u.a. Integrin $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ sowie $\beta 3$ und $\beta 6$. Integrine sind Transmembranproteine; die Heterodimere bestehen aus zwei verschiedenen Arten von Glykoproteinketten, welche Alpha- und Beta-Untereinheiten genannt werden [Hynes, 2002]. Integrine können sich mit diesen Untereinheiten spezifisch an Liganden der extrazellulären Matrix binden wie z.B. Vitronectin, Fibronectin, Laminin, Fibroblastenwachstumsfaktor, MMP-2, Thrombospondin, Fibrin and Fibrinogen [Reardon et al., 2008]. Bestimmte Integrine, hierunter auch die Integrine $\alpha \beta 3$ and $\alpha \beta 5$, erkennen eine bestimmte Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure (RGC) von extrazellulären Liganden [Tabatabai et al., 2011]. Integrine sind ein Bestandteil der Zellmembran und haben so eine wichtige Funktion im Bereich der Signalkaskade vom Extra- zum Intrazellulärraum [Humphries, 2000]. Andererseits können auch Signale vom Intrazellulärraum nach außen tragen. Somit haben sie eine entscheidende Funktion im Bereich der Zellmigration, Zellproliferation und des Zellüberlebens [Raymond et al., 2012]. Eine weitere wesentliche Fähigkeit der Integrine ist es, die Zelle mit anderen Zellen oder Komponenten der extrazellulären Matrix zu verbinden, weswegen sie auch Adhäsionsmoleküle genannt werden [Evans et al., 2007]. Es fokussieren sich aktuell mehrere Studien auf die Bedeutung der Integrine, vor allem in Bezug auf ihre Funktion innerhalb der Signalkaskaden. Eine Studie konnte zeigen, dass die

Expression von Integrin $\alpha 6\beta 1$ in Endothelzellen die proapoptische Signalkaskade, welche von TNF- α ausgelöst wird, inhibieren kann [Huang et al., 2012].

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Integrin $\alpha 5\beta 1$ mit einem aggressiveren Phänotyp in Gliomzellen und mit einem verkürzten Überleben bei höhergradigen astrozytären Tumoren einherging [Janouskova et al., 2012]. Zudem ergab diese Veröffentlichung, dass der durch eine Temozolomid-Therapie erreichte Anstieg von p53 in der Tumorzelle durch Aktivierung von Integrin $\alpha 5\beta 1$ wieder ausgeglichen wurde. Zellen mit einer verringerten Expression von Integrin $\alpha 5\beta 1$ zeigten ein höheres Level von p53 und eine erhöhte Sensitivität für Temozolomid [Janouskova et al., 2012].

Einer Forschungsgruppe der TU München gelang es in Zusammenarbeit mit der pharmazeutischen Industrie, ein sogenanntes „small molecule“, ein zyklisches RDG-Pentapeptid mit dem Namen „Cilengitide“, zu entwickeln. Es besteht aus Arginin (R), Glycin (D) und Asparaginsäure (G) [Mas-Moruno et al., 2010]. Dieses bindet an Rezeptoren der Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$, was wiederum eine Hemmung der Gefäßneubildung bewirkt [Stupp et al., 2007]. Erste präklinische und klinische Studien an Glioblastom-Patienten ergaben hoffnungsvolle Ergebnisse [Paolillo et al., 2009; Reardon et al., 2008], weswegen aktuell in einer randomisierten, offenen, kontrollierten Multicenter Phase-III-Studie untersucht wird, ob bei Patienten mit einem neu diagnostizierten primären Glioblastom mit methylierter MGMT-Promotorregion eine Ergänzung der Standardtherapie um Cilengitide der Standard-Therapie überlegen ist [Reardon et al., 2011]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Integrine ein sehr vielversprechendes Ziel in der Suche nach Angriffspunkten in der modernen Tumorthherapie darstellen.

Ebenfalls überexprimiert zeigten sich die Gruppen der G1-Phase-Gene sowie DNA-Schadenkontrollfaktoren. Zu den G1-Phase-Genen zählen unter anderem Cyclin D1-3, Cyclin E 1-2, Culline sowie diverse Cyclin-abhängige Proteinkinasen und Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren. Zu den DNA-Schadenkontrollfaktoren zählen p53, BAX, BCL-2, MDM2, CHEK-1 und -2, GADD45A, TIMP3. Auf einzelne Faktoren wird im Folgenden noch näher eingegangen.

Real-Time PCR-Array-Analyse

Mit dem quantitativen Real-Time PCR-Array „Human Cell Cycle“ (SABiosciences Corporation, USA) zeigten sich neun Gene im Vergleich zum Initialtumor überexprimiert. Folgende Gene aus dieser Gruppe waren im Rezidiv mindestens vierfach überexprimiert:

1. BCCIP: Das zwischen BRCA2 (breast cancer 2, Brustkrebs 2) und CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1 A, Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 1 A) interagierende Protein (BRCA2 and CDKN1A interacting protein; 10q26.1) wird auch TOK1 genannt und ist ein nukleäres Protein, welches sehr wahrscheinlich als Kofaktor für BRCA2 eine Rolle in der Tumorsuppression spielt. Es zeigte sich von allen untersuchten Genen dieses Arrays als am deutlichsten überexprimiert im Rezidiv (8,6-fach). In einer aktuellen Publikation konnte anhand von PCR-Untersuchungen von verschiedenen Gehirntumoren gezeigt werden, dass nur bei Glioblastomen im Vergleich zu normalen Zellen die Genexpression von BCCIP signifikant geringer war [Liu et al., 2009]. Untersuchungen hinsichtlich einer unterschiedlichen Expression von Initial- und Rezidivtumoren liegen derzeit nicht vor.
2. GADD45A (growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha; durch Wachstumsstopp und DNA-Schaden induzierbares Protein 45 alpha; 1q13.3) wird durch P53 und BRCA1 (breast cancer 1, Brustkrebs 1) reguliert und stressinduziert, es ist an wichtigen Vorgängen in den Bereichen Zellzyklus-Kontrolle, Apoptose, DNA-Reparatur und Zelladhäsion involviert [Ji et al., 2007; Zhan, 2005]. In einer weiteren Veröffentlichung wurde beschrieben, dass bei Brustkrebs eine Aktivierung von GADD45A sowohl eine Tumorsuppression als auch ein vermehrtes Tumorwachstum beobachtet werden kann; die Aktivierung war dabei abhängig vom onkogenetischen Stress und der Aktivierung verschiedener Signalkaskaden [Tront et al., 2010]. GADD45A zeigte sich im Rezidiv 6,1-fach überexprimiert.
2. CDKN2B: Der Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor (cyclin-dependent kinase inhibitor 2 B; 9q21) liegt in vielen Tumoren häufig mutiert oder zerstört vor. Es reguliert das Zellwachstum, indem es den Fortschritt in der G1-Phase kontrolliert [Melin, 2011; Rich et al., 1999].

Die nachfolgenden Gene waren im Rezidivtumor zweifach bis unter-vierfach überexprimiert:

1. BAX (Bcl-2-associated X-Protein, BCL-2-assoziertes X-Protein; 19q13.33) ist ein proapoptotisches Protein aus der BCL-2 (B-cell lymphoma 2, B-Zell-Lymphom 2) - Familie. Eine Publikation von Strik et al. beschrieb zuvor eine Unterexprimierung in Rezidivtumoren auf Proteinebene [Strik et al., 1999]. Eine Überexprimierung auf mRNA-Ebene könnte für ein geschädigtes Proteinprodukt sprechen
2. CCNG2: Dieses Gen kodiert das Protein Cyclin G2. Der Zellzyklus eukaryoter Zellen wird von Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (Cyclin-dependent protein kinases; CDK) kontrolliert, deren Aktivität wiederum von Cyclinen und CDK-Inhibitoren abhängt. Cyclin G2 ist ein CDK-Aktivator [Jensen et al., 1999]. Eine Überexprimierung wurde kürzlich mit einer erhöhten Rezidivrate bei Prostatakarzinomen in Verbindung gebracht [Long et al., 2011].
3. CDKN1A: Das Genprodukt der Cyclin-abhängigen Proteinkinase 1A ist das Protein p21 (auch WAF-1 genannt; 6p21.2). Im Falle eines DNA-Schadens wird p21 durch p53 aktiviert. P21 interagiert mit dem Cyclin/CDK2 Komplex, was das Fortschreiten im Zellzyklus inhibiert und eine Apoptose einleiten kann. Durch diesen Mechanismus wird die Replikation geschädigter DNA verhindert [Cazzalini et al., 2010, Gartel et al., 1996, Gartel et al., 1999]. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass p21 zudem ein Hauptziel des Proto-Onkogens C-Myc ist, welches zu einer p21-Repression führt, was wiederum eine vermehrte Zellproliferation begünstigt [Coller et al., 2000]. Die in dieser Arbeit festgestellte Überexprimierung von CDKN1A könnte für ein geschädigtes Proteinprodukt sprechen. Paradoxe Weise konnte jedoch auch gezeigt werden, dass p21 mit dem D-CDK4/CDK6 Komplex interagiert und hier als positiver Zellzyklus Stimulator wirkt [LaBaer et al., 1997].
4. DNMT2: Dynamin 2 (19p13.2) bezeichnet eine Familie von GTP-bindenden Proteinen, welche wichtig für das Funktionieren der Mikrotubuli ist. Sie werden assoziiert mit Endozytose, Zellbewegung und Knochenresorption [Durieux et al., 2010].
5. MKI67: Das von diesem Gen kodierte Genprodukt wird auch „Antigen, welches durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 identifiziert wird“ genannt. Es ist essentiell für die Zellproliferation. Antikörper gegen Ki-67 werden routinemäßig zur Bestimmung des Proliferationsindex von Tumoren eingesetzt [Bacchi et al., 1993]. Eine aktuelle Studie an Glioblastompatienten konnte zeigen, dass der Ki-67-Index sich als statistisch signifikanter Marker eignete, um Pseudotumorprogression und echte Tumorprogression voneinander zu trennen. Eine Überexpression von Ki-67 geht mit einer schlechteren Prognose einher [Pouleau et al., 2012].

6. P53: Als Antwort auf zellulären Stress kann das Tumorprotein 53, auch p53 genannt, einen Arrest des Zellzyklus verursachen und sogar eine Apoptose einleiten, um die Replikation von geschädigter DNA zu verhindern. P53 war in vorangegangenen Publikationen als in Rezidivtumoren unterexprimiert beschrieben worden [Stark et al., 2003].

Mit Verwendung des Real-Time PCR-Arrays „Human Embryonic Stem Cells“ konnten neun Gene aus der Gruppe der menschlichen embryonalen Stammzellen bestimmt werden, die im Rezidivtumor deutlich überexprimiert waren im Vergleich zum Primärtumor. Bei sechs dieser Gene ließ sich ein mindestens vierfacher Unterschied nachweisen:

1. CRABP2, ein zelluläres Retinäure-bindendes Protein (cellular retinoic acid binding Protein; 1q21.3), ist ein spezifischer Transporter für Moleküle aus der Vitamin-A-Familie. Es ist sehr wahrscheinlich ein wichtiger Bestandteil von Regulierungsprozessen, die sich auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung beziehen. Beim spinozellulären Karzinom des Kopfes und Nackens konnte eine Assoziierung zwischen Fehlen des CRABP2-Proteins und einem verkürzten krankheitsfreien Überleben gefunden werden [Calmon et al., 2009]. Ein ähnlicher Befund wurde aktuell bei Zellen aus malignen Gliomen nachgewiesen, hier zeigte sich in high grade Tumoren eine Unterexpression von CRABP2 [Campos et al., 2011]
2. GAL (11q13.3) kodiert für das zelluläre Galanin Botenstoff-Neuropeptid (galanin cellular messenger neuropeptide), welches sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem nachgewiesen werden kann. Es hat wahrscheinlich eine wichtige Rolle in verschiedenen Entwicklungsprozessen des Nervensystems, es wirkt auch über das Protein GalR2 als trophischer Faktor bei Verletzungen von Nervenzellen des Erwachsenen und unerstickt so das Neuritenwachstum [Hobson et al., 2008]. Es zeigte sich eine 23,4-fache Überexpression im Rezidiv, dies war der größte insgesamt gemessene Expressionsunterschied in diesem Array.
3. HBB (11p15.5) kodiert für Hämoglobin beta, Mutationen in diesem Bereich finden sich bei verschiedenen Erkrankungen des Blutbildes wie die Beta-Thalasämie und Sichelzellanämie [Weatherall et al., 2010].
4. LEFTY2 (1q42.1) (left-right determination factor; links-rechts-Unterscheidungsfaktor) kodiert für ein Mitglied der TGF-beta Proteinfamilie (Tumorstromungsfaktor beta).

Es spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, wurde jedoch auch mit endometrialen Blutungen in Verbindung gebracht [Saijoh et al., 2000].

5. NOG (17q22), auch als Noggin bekannt, bindet Proteine aus der TGF-beta Superfamilie und kann so die TGF-beta Signaltransduktion inhibieren. Es spielt eine Rolle bei der Differenzierung von Neuroren und des Neokortex [Dixon et al., 2001; Li W. et al., 2000; Shimogori, 2004]
6. SEMA3A (Semaphorin 3A; 7q12.1) ist ein Mitglied der Semaphorin-Familie und kodiert für eine Immunglobulin-ähnliche Domäne, welche entweder axonales Wachstum inhibiert oder Dendritenwachstum stimuliert. Dies ist essentiell für eine normale Entwicklung des Nervensystems. Eine Überexprimierung dieses Gens konnte in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden. [Guttmann-Raviv, 2007]. Für Semaphorin 5A konnte gezeigt werden, dass es eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Astrozytomen spielt und unter anderem mit GFAP interagiert. Eine reduzierte Expressierung in hochdifferenzierten Astrozytomen führte zu einer Entdifferenzierung und einer erhöhten Motilität [Li X. et al., 2011]

Die folgenden Gene zeigten eine weniger stark ausgeprägte Überexprimierung (zweifach bis vierfach):

1. DES (Desmin; 2q35) ist das wichtigste Intermediärfilament-Protein des menschlichen Muskels. Mutationen dieses Gens sind assoziiert mit Erkrankungen des Skelettsystems sowie Kardiomyopathien [Bär et al., 2004]. Es gibt noch keine Publikationen, die sich mit einer möglichen Beteiligung des Desmins in der Karzinogenese auseinandergesetzt haben.
2. EOMES (Eomesodermin; 3p24.1) ist ein Aktivator der Transkription und wichtig für die Regulierung von Entwicklungsprozessen. Die von EOMES kodierten Proteine tragen eine DNA-Bindungsstelle, welche T-Box genannt wird, und sind in der Neurogenese involviert. [Arnold et al., 2008]. Studien aus dem Jahr 2010 ergeben Hinweise darauf, dass die von EOMES Proteine wichtig für die Selbsterneuerung von trophoblastischen Stammzellen sind [Kidder et al., 2010].
3. LAMA1 (18p11.3) kodiert Laminin, ein Protein, welchem eine wichtige Mediatorrolle in der Embryonalentwicklung in den Bereichen Zellmigration und der Organisation und Ausreifung von Zellen zu Gewebe zukommt [Siqueira et al., 2010].

Es ließen sich mit der Methode der Real-Time PCR-Arrays quantitative Unterschiede in der Genexpression zwischen Initial- und Rezidivtumoren feststellen. Wie schon in den Oligo-Array-Untersuchungen zeigten sich auch hier mehrere Gene aus dem Bereich der DNA-Schaden-Kontrollgene überexprimiert. Die darstellbare Überexpression von den prinzipiell proapoptotischen Genen p53 und BAX ist überraschend, da vorangegangene immunhistochemische Untersuchungen eine Unterexprimierung zeigten [Stark et al., 2003; Strik et al., 1999]. Möglicherweise ist diese Beobachtung auf ein defektes Genprodukt zurückzuführen. In Bezug auf das als Tumorsuppressor agierende BCCIP liegt eine Veröffentlichung vor, welche mit PCR-Methode eine Unterexprimierung in Glioblastomen in Vergleich zu anderen Gliomzellen zeigte [Liu et al., 2009]. Eine Studie, welche die BCCIP-Expression zwischen Initial- und Rezidivglioblastomen vergleicht, liegt jedoch nicht vor. Für weitere Gene wie CDKN1A (p21) und GADD45A wurde bereits gezeigt, dass sie je nach onkogenetischem Stress und aktivierten Signalkaskaden Tumorstromwachstum sowohl fördern als auch hemmen können [LaBaer et al., 1997; Tront et al., 2010]. In Zukunft werden die diesbezüglichen Zusammenhänge möglicherweise besser verstanden werden können.

In Bezug auf die ausgewählte Methode ist anzumerken, dass sie sehr kostenintensiv in der Durchführung ist, somit wenig breite Anwendung findet. Auch ist trotz der quantitativen Technik eine Validierung notwendig. Aufgrund dessen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit lediglich zwei gepaarte Patientenproben dieser Untersuchung zugeführt. Dies schränkt die Aussagekraft erheblich ein. Dennoch ist die Methode geeignet, um durch eine einzige Untersuchung bei einer hohen Anzahl von Genen quantitative Unterschiede zwischen der Genexpression von Initial- und Rezidivtumoren zu bestimmen. Somit konnten auch bisher in Bezug auf das Glioblastom wenig erforschte Gene wie Noggin, Semaphorin oder das zelluläre Galanin Botenstoff-Neuropeptid als im Rezidiv überexprimiert identifiziert werden. Gerade letzterer zeigte die deutlichste Überexpression in beiden Arrays. Diese Befunde können als Anreiz für eine weitere Forschung an diesen Genen dienen.

Immunhistochemie

Mit Hilfe der Array-Technik entstand ein erster Einblick in das Genexpressionsverhalten von Initial- und Rezidivglioblastomen auf Ebene der RNA-Expression. Danach stellte sich die Frage, ob sich die gefundenen Unterschiede auch auf Proteinebene würden nachweisen lassen. Vorausgegangene Studien haben eine Herunterregulierung von pro-apoptotischen und eine

Hochregulierung von anti-apoptotischen Proteinen in Glioblastomen gezeigt [Strik et al., 1999]. In einer Studie aus dem Jahre 2003 zeigte sich u.a. eine reduzierte Expression des Tumorsuppressorproteins p53 und eine verminderte Anzahl von EGFR- und MDM2-positiven Proben in den Tumorzidiven im Vergleich zu den Initialtumoren [Stark et al., 2003]. In der jetzt vorliegenden Arbeit wurden nun 110 gepaarte in Paraffin eingebettete Proben von 55 Patienten in Bezug auf die Expression von p53, MDM2, GFAP, Ki67 und EGFR auf der Proteinebene miteinander verglichen. Es zeigte sich dabei nach einer statistischen Prüfung nach Wilcoxon eine Unterexpression von p53, Ki67 und GFAP im Rezidivtumor.

P53 kann bei DNA-Schädigung oder zellulärem Stress zu einem Zellzyklusarrest oder zur Einleitung der Apoptose, des „programmierten Zelltods“, führen [Lane et al., 2011; Wang et al., 2009]. P53 ist damit ein wichtiger Bestandteil der zellulären Schutzmechanismen gegen eine Vervielfältigung von geschädigter DNA und beugt somit einer malignen Entartung vor. In sekundären Glioblastomen finden sich frühzeitig in der Tumorgenese Veränderungen im p53-Gen, die zu einer Unterexpression des Proteins führen [Louis et al., 2007; Kleihues et Ohgaki, 1999]. Es bleibt zurzeit noch unklar, ob es sich dabei um spezifische oder unspezifische Regulationsmechanismen handelt. Das Ergebnis unserer Untersuchungen ist interessant, da sich im Real-Time PCR-Array eine Überexpression des p53-Gens zeigte. Dies ließe sich mit einem defekten Genprodukt erklären, da der Antikörper gegen p53 nur an das intakte Protein binden kann.

Dem Onkoprotein MDM2 (murine double minute 2) kommt in der Regulierung der p53-Aktivität eine Schlüsselrolle zu [Michael et al., 2002; Hollstein et al., 2010]. Es besteht jedoch eine enge Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen: MDM2 kann p53 auf Proteinebene durch Bindung an die N-terminale Domäne inaktivieren, die Acetylierung inhibieren und den Transport vom Zellkern ins Zytoplasma fördern [Bálint et al., 2001]. P53 hingegen kann auf transkriptioneller Ebene den Grad der MDM2 Expression steuern. Diese Mechanismen werden auch als „feedback loop“ bezeichnet [Wu et al., 1993]. In der Studie von Burton aus dem Jahr 2002 zeigte sich, dass Glioblastompatienten mit einem kürzerem Überleben (< oder = 1,5 Jahre) im Vergleich zu denen mit einem längeren Überleben (Überleben > oder = 3 Jahre) eine MDM2-Überexpression und eine P53-Unterexpression aufwiesen [Burton et al., 2002]. In Bezug auf MDM2 zeigten sich in der vorliegenden Arbeit auf Proteinebene keine signifikanten Veränderungen zwischen Initial- und Rezidivtumoren, es

zeigte sich jedoch ein Trend zwischen der MDM2-Expression im Rezidivtumor und dem Überleben ($p=0,07$).

Eine signifikante Unterexpression zeigte sich für GFAP. Das saure Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein) ist ein Intermediärfilament und eng verwandt mit Desmin, Vimentin und Peripherin, welche das Zytoskelett der Intrazellularraums ausbilden [Middeldorp et al., 2011]. Es wird vor allem in Zellen des zentralen Nervensystems ausgebildet, wobei seine Funktion noch nicht vollständig verstanden ist, es scheint unter anderem für die Differenzierung und mechanische Stabilität der Zelle wichtig zu sein [Cullen et al., 2007]. GFAP ist ein Marker für Astrozyten und somit auch ein Marker für Tumore astrozytären Ursprungs. In einer 2011 veröffentlichten Studie unter Einschluss von 19 Glioblastom-Patienten mit spinalen Metastasen wurde die GFAP-Expression im Initialtumor mit der in den spinalen Metastasen verglichen. Es zeigte sich im Vergleich zum Primarius eine niedrige Expression von GFAP im Metastasengewebe [Maslehaty et al., 2011]. Dies kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass weniger differenzierte Zellen, also solche mit einer niedrigen GFAP-Expression, eine stärkere Metastasierungs- und Migrationstendenz haben. Eine signifikant erniedrigte GFAP-Expression in den Rezidivtumoren, wie sie in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde ($p = 0,017$), kann also für eine weitere Entdifferenzierung der Zellen des Rezidivtumors sprechen.

Die signifikant verminderte Expression des Proliferationsmarkers Ki67 in Rezidiven lässt sich im Hinblick auf die vorhandene Literatur nicht klar einordnen [Pouleau et al., 2011; Reavey-Cantwell, 2001]. Im PCR-Array zeigte sich eine Überexpression des Ki67-Gens. Die immunhistochemisch nachgewiesene verminderte Expression kann für ein defektes Genprodukt sprechen, welches vom Antikörper nicht erkannt werden kann.

EGFR, der endotheliale Wachstumsfaktorrezeptor, wies im Rezidivtumor im Vergleich mit dem Primärtumor auf Proteinebene keine signifikanten Unterschiede auf. Bereits in der Real-Time PCR zeigte sich in Bezug auf die EGFR-Expression ein sehr heterogenes Bild, so dass sich auch hier kein sicherer Trend aufzeigen ließ. In vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich eine verringerte Expression von EGFR im Rezidivtumor [Stark et al., 2003].

Interessanterweise ergab sich eine signifikante Assoziation zwischen der Expression von EGFR, p53, MDM2 und GFAP mit dem Ki67-Proliferationsindex (Ki67 PI). Eine weitere

immunhistochemische Studie konnte eine signifikante Assoziation der DNA-Schaden-Kontrollgene MSH1, MSH2 und MSH6 und dem Ki67-Proliferationsindex feststellen [Stark et al., 2010]. In Bezug auf die erhöhte Expression von MLH1 und MSH6 im Initialtumor ließ sich zudem eine reduzierte Patientenüberlebenszeit feststellen. Eine signifikante Assoziation zwischen der Ki67-Expression und dem Überleben zeigte sich in dieser Untersuchung jedoch nicht.

4.4 MGMT-Methylierung

Patienten mit einer methylierten Promotorregion der O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) profitieren von der Temozolomid-Behandlung deutlich mehr als Patienten, die dieses Merkmal nicht aufweisen [Hegi et al., 2005]. MGMT ist ein Reparaturenzym, welches die DNA-Schäden, welche Alkylantien verursachen, reparieren kann. Die Aktivität dieses Enzyms hängt vom MGMT-Methylierungsstatus ab. Die Methylierung der Promotorregion führt zu einer MGMT-Depletion, wodurch die DNA-Reparatur-Aktivität zurückgeht. Aktuelle Studien beschrieben eine deutlich längere 5-Jahres-Überlebenszeit bei Glioblastom-Patienten mit positivem Methylierungsstatus [Reifenberger et al., 2011; Salvati et al., 2012; Wick et al., 2012].

In aktuellen Studien wurde beschrieben, dass sich der MGMT-Methylierungsstatus von Patienten mit Glioblastomen im postoperativen Verlauf ändern kann. [Brandes et al., 2010; Jung et al., 2010]. Wir führten an vier Patienten begleitende Untersuchungen zur MGMT-Methylierung durch. Zwei Patienten waren initial MGMT-positiv, zwei MGMT-negativ. Bei den vier Patienten zeigte sich keine Veränderung im MGMT-Status im Rezidiv. Dies kann am ehesten darauf zurückgeführt werden, dass die Anzahl von untersuchten Patienten sehr gering ist.

5. Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der häufigste und bösartigste hirneigene Tumor des Erwachsenen. Es wird eine primäre von einer sekundären Genese aus niedrig maligneren Vorstufen unterschieden. Die Standardbehandlung besteht aus der möglichst vollständigen offenen Tumorresektion und der anschließenden kombinierten Strahlen- /Chemotherapie mit Temozolomid, gefolgt von der Temozolomid-Erhaltungstherapie. Damit können mediane Überlebenszeiten von bis zu 14,6 Monaten erreicht werden. Aufgrund des invasiven Wachstums der Glioblastom-Zellen sind Lokalrezidive nahezu unausweichlich.

Zahlreiche Arbeiten wurden über genetische Veränderungen bei der Entstehung von Glioblastomen publiziert. Es gibt aber bisher kaum Daten über Genexpressionsunterschiede in initialen versus Rezidivtumoren. Hier könnte jedoch ein Schlüssel für die moderne medikamentöse Tumorthherapie liegen.

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation wurden mit verschiedenen molekulargenetischen Techniken (Nylon-basierende Oligoarrays, Real-Time-PCR und Real-Time PCR-Arrays) Genexpressionsprofile von gepaarten Proben von Initial- und Rezidiv-Glioblastomen erstellt. Der Schwerpunkt wurde auf diejenigen Gene gelegt, die mit der Tumorinvasion und der Zellproliferation assoziiert sind. Ergänzend wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um Aufschluss über die Expressionsunterschiede auf Proteinebene zu erhalten.

Insgesamt zeigte sich erwartungsgemäß eine hohe inter-individuelle und eine erstaunlich niedrige intra-individuelle Heterogenität der Genexpression. Dennoch ließen sich auch im intra-individuellen Vergleich signifikante Expressionsunterschiede zwischen Initial- und Rezidivtumoren feststellen. Die folgenden vier Gen-Familien zeigten dabei im Rezidivtumor eine erhöhte Expression: Integrine, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), G1-Phase-Gene und DNA-Schaden-Faktoren. In Bezug auf eine klinische Anwendbarkeit sind Integrin-Rezeptor-Blocker sehr vielversprechend. Andere Gene, die sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit deutlich überexprimiert zeigen, können Grundlage weiterer Forschung sein.

6. Literaturverzeichnis

Arnold S.J., Huang G.J., Cheung A.F., Era T., Nishikawa S., Bikoff E.K., Molnár Z., Robertson E.J., Groszer M.: The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev.* 2008 Sep 15;22(18):2479-84.

Bálint E.E., Vousden KH.: Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer.* 2001 Dec 14;85(12):1813-23.

Bär H., Strelkov S.V., Sjöberg G., Aebi U., Herrmann H.: The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J Struct Biol.* 2004 Nov;148(2):137-52.

Bacchi C.E., Gown A.M.: Detection of cell proliferation in tissue sections. *Braz J Med Biol Res.* 1993 Jul;26(7):677-87.

Blackburn J.S., Rhodes C.H., Coon C.I., Brinckerhoff C.E.: RNA interference inhibition of matrix metalloproteinase-1 prevents melanoma metastasis by reducing tumor collagenase activity and angiogenesis. *Cancer Res.* 2007 Nov 15;67(22):10849-58.

Boecker W., Denk H., Heitz P.: *Pathologie*, 3. Auflage 2004, ISBN 3-437-42381-9, S. 324-325

Brandes A.A., Franceschi E., Tosoni A., Bartolini S., Bacci A., Agati R., Ghimenton C., Turazzi S., Talacchi A., Skrap M., Marucci G., Volpin L., Morandi L., Pizzolitto S., Gardiman M., Andreoli A., Calbucci F., Ermani M.: O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. *Neuro Oncol.* 2010 Mar;12(3):283-8. Epub 2010 Feb 1.

Brinckerhoff C.E., Rutter J.L., Benbow U.: Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2000 Dec;6(12):4823-30.

Buckner J.C.: Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Semin Oncol* 2003; 30:Suppl 19:10-4.

Burger P.C., Green S.B.: Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 1987;59(9):1617- 25.

Burton E.C., Lamborn K.R., Forsyth P., Scott J., O'Campo J., Uyehara-Lock J., Prados M., Berger M., Passe S., Uhm J., O'Neill B.P., Jenkins R.B., Aldape K.D.: Aberrant p53, mdm2, and proliferation differ in glioblastomas from long-term compared with typical survivors. *Clin Cancer Res.* 2002 Jan;8(1):180-7.

Calmon M.F., Rodrigues R.V., Kaneto C.M., Moura R.P., Silva S.D., Mota L.D., Pinheiro D.G., Torres C., de Carvalho A.F, Cury P.M., Nunes F.D., Nishimoto I.N., Soares F.A., da Silva A.M., Kowalski L.P., Brentani H., Zanelli C.F., Silva W.A. Jr, Rahal P., Tajara E.H., Carraro D.M., Camargo A.A., Valentini S.R.: Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. *Neoplasia.* 2009 Dec;11(12):1329-39.

Campos B., Centner F.S., Bermejo J.L., Ali R., Dorsch K., Wan F., Felsberg J., Ahmadi R., Grabe N., Reifenberger G., Unterberg A., Burhenne J., Herold-Mende C.: Aberrant expression of retinoic acid signaling molecules influences patient survival in astrocytic gliomas. *Am J Pathol.* 2011 May;178(5):1953-64.

Cazzalini O., Donà F., Savio M., Tillhon M., Maccario C., Perucca P., Stivala L.A., Scovassi A.I., Prospero E.: P21CDKN1A participates in base excision repair by regulating the activity of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *DNA Repair (Amst).* 2010 Jun 4;9(6):627-35. Epub 2010 Mar 19.

Coller H.A., Grandori C., Tamayo P., Colbert T., Lander E.S., Eisenman R.N., Golub T.R.: Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3260-5.

Cullen D.K., Simon C.M., LaPlaca M.C.: Strain rate-dependent induction of reactive astrogliosis and cell death in three-dimensional neuronal-astrocytic co-cultures. *Brain Res.* 2007 Jul 16;1158:103-15. Epub 2007 May 3.

Dalla-Torre C.A., Yoshimoto M., Lee C.H., Joshua A.M., de Toledo S.R., Petrilli A.S., Andrade J.A., Chilton-MacNeill S., Zielenska M., Squire J.A.: Effects of THBS3, SPARC and SPP1 expression on biological behavior and survival in patients with osteosarcoma. *BMC Cancer.* 2006 Oct 5;6:237.

Davis F.G., Freels S., Grutsch J., Barlas S., Brem S.: Survival rates in patients with primary malignant brain tumors stratified by patient age and tumor histological type: an analysis based on Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) data, 1973-1991. *J Neurosurg* 1998;88(1):1 - 10.

Dasu M.R., Barrow R.E., Spies M., Herndon D.N.: Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts. *Burns.* 2003 Sep;29(6):527-31.

DeAngelis L.M.: Brain tumors. *N Engl J Med* 2001;344(2):114- 22

Dixon M.E., Armstrong P., Stevens D.B., Bamshad M.: Identical mutations in NOG can cause either tarsal/carpal coalition syndrome or proximal symphalangism. *Genet Med.* 2001 Sep-Oct;3(5):349-53.

Durieux A.C., Vignaud A., Prudhon B., Viou M.T., Beuvin M., Vassilopoulos S., Fraysse B., Ferry A., Lainé J., Romero N.B., Guicheney P., Bitoun M.: A centronuclear myopathy-dynamamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum Mol Genet.* 2010 Dec 15;19(24):4820-36. Epub 2010 Sep 21.

Eck S.M., Hoopes P.J., Petrella B.L., Coon C.I., Brinckerhoff C.E.: Matrix metalloproteinase-1 promotes breast cancer angiogenesis and osteolysis in a novel in vivo model. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009 Jul;116(1):79-90

Evans E.A., Calderwood D.A.: Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science* 2007; 316:1148-53

Gartel A.L., Serfas M.S., Tyner A.L.: P21-negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 213: 138–49.

Gartel A.L., Tyner A.L.: Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res.* 1999 Feb 1;246(2):280-9.

Guttmann-Raviv N., Shraga-Heled N., Varshavsky A., Guimaraes-Sternberg C., Kessler O., Neufeld G.: Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *J Biol Chem.* 2007 Sep 7;282(36):26294-305. Epub 2007 Jun 14.

Hegi M.E., Diserens A.C., Gorlia T., Hamou M.F., de Tribolet N., Weller M., Kros J.M., Hainfellner J.A., Mason W., Mariani L., Bromberg J.E., Hau P., Mirimanoff R.O., Cairncross J.G., Janzer R.C., Stupp R.: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.

Herrlinger U., Rieger J., Koch D., Loeser S., Blaschke B., Kortmann R.D., Steinbach J.P., Hundsberger T., Wick W., Meyermann R., Tan T.C., Sommer C., Bamberg M., Reifenberger G., Weller M.: Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. *J Clin Oncol.* 2006 Sep 20;24(27):4412-7.

Hobson S.A., Bacon A., Elliot-Hunt C.R., Holmes F.E., Kerr N.C., Pope R., Vanderplank P., Wynick D.: Galanin acts as a trophic factor to the central and peripheral nervous systems. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Jun;65(12):1806-12.

Hofmann U.B., Westphal J.R., Zendman A.J., Becker J.C., Ruiter D.J., van Muijen G.N.: Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol.* 2000 Jul;191(3):245-56.

Hollstein M., Hainaut P.: Massively regulated genes: the example of TP53.

J Pathol. 2010 Jan;220(2):164-73.

Hornberg J.J., de Haas R.R., Dekker H., Lankelma J.: Analysis of multiple gene expression array experiments after repetitive hybridizations on nylon membranes. *Biotechniques*. 2002 Jul;33(1):108, 110, 112-3, passim.

Huang P., Rani M.R., Ahluwalia M.S., Bae E., Prayson R.A., Weil R.J., Nowacki A.S., Hedayat H., Sloan A.E., Lathia J.D., Rich J.N., Tipps R., Gladson C.L.: Endothelial expression of TNF receptor-1 generates a proapoptotic signal inhibited by integrin $\alpha 6\beta 1$ in glioblastoma. *Cancer Res*. 2012 Mar 15;72(6):1428-37. Epub 2012 Mar 6.

Humphries M.J.: Integrin structure. In: *Biochem. Soc. Trans.* 28, Nr. 4, 2000, S. 311–339.

Hynes R.O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110:673–687.

Janouskova H., Maglott A., Leger D.Y., Bossert C., Noulet F., Guerin E., Guenot D., Pinel S., Chastagner P., Plenat F., Entz-Werle N., Lehmann-Che J., Godet J., Martin S., Teisinger J., Dontenwill M.: Integrin $\alpha 5\beta 1$ plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high grade glioma. *Cancer Res*. 2012 May 16. [Epub ahead of print]

Jensen M.R., Audolfsson T., Keck C.L., Zimonjic D.B., Thorgeirsson S.S.: Gene structure and chromosomal localization of mouse cyclin G2 (Ccng2). *Gene*. 1999 Apr 16;230(2):171-80.

Ji J., Liu R., Tong T., Song Y., Jin S., Wu M., Zhan Q.: Gadd45a regulates beta-catenin distribution and maintains cell-cell adhesion/contact. *Oncogene*. 2007 Sep 27;26(44):6396-405. Epub 2007 Apr 23.

Jung T.Y., Jung S., Moon K.S., Kim I.Y., Kang S.S., Kim Y.H., Park C.S., Lee K.H.: Changes of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation and MGMT protein expression after adjuvant treatment in glioblastoma. *Oncol Rep*. 2010 May;23(5):1269-76.

Kidder B.L., Palmer S.: Examination of transcriptional networks reveals an important role for TCFAP2C, SMARCA4, and EOMES in trophoblast stem cell maintenance. *Genome Res.* 2010 Apr;20(4):458-72. Epub 2010 Feb 22.

Kleihues P., Cavenee W.K.: Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon7 IARC Press; 2000.

Kleihues P, Ohgaki H.: Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncology* 1999;1(1):44 - 51.

LaBaer J., Garrett M.D., Stevenson L.F., Slingerland J.M., Sandhu C., Chou H.S., Fattaey A., Harlow E.: New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 1997; 11: 847-62.

Lane D.P., Brown C.J., Verma C., Cheek C.F.: New insights into p53 based therapy. *Discov Med.* 2011 Aug;12(63):107-17.

Liu J., Lu H., Ohgaki H., Merlo A., Shen Z.: Alterations of BCCIP, a BRCA2 interacting protein, in astrocytomas. *BMC Cancer.* 2009 Aug 4;9:268.

Li W., LoTurco J.J.: Noggin is a negative regulator of neuronal differentiation in developing neocortex." *Dev. Neurosci.* 2000, 22 (1-2): 68-73

Li X., Law J.W., Lee A.Y.: Semaphorin 5A and plexin-B3 regulate human glioma cell motility and morphology through Rac1 and the actin cytoskeleton. *Oncogene.* 2011 Jun 27. doi: 10.1038/onc.2011.256. [Epub ahead of print]

Long Q., Johnson B.A., Osunkoya A.O., Lai Y.H., Zhou W., Abramovitz M., Xia M., Bouzyk M.B., Nam R.K., Sugar L., Stanimirovic A., Williams D.J., Leyland-Jones B.R., Seth A.K., Petros J.A., Moreno C.S.: Protein-coding and microRNA biomarkers of recurrence of prostate cancer following radical prostatectomy. *Am J Pathol.* 2011 Jul;179(1):46-54. Epub 2011 May 3.

Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K.: WHO Classification of the Central Nervous System. IARC Press, Lyon, 2007

Martinez R., Rohde V., Schackert G.: Different molecular patterns in glioblastoma multiforme subtypes upon recurrence. *J Neurooncol* 2010 Feb;96(3):321-9.

Maslehaty H., Cordovi S., Hefti M.: Symptomatic spinal metastases of intracranial glioblastoma: clinical characteristics and pathomechanism relating to GFAP expression. *J Neurooncol*. 2011 Jan;101(2):329-33. Epub 2010 Jun 13.

Mas-Moruno C., Rechenmacher F., Kessler H.: Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010 Dec;10(10):753-68.

McCawley L.J., Matrisian L.M.: Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*. 2000 Apr;6(4):149-56.

McCready J., Broaddus W.C., Sykes V., Fillmore H.L.: Association of a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter with glioblastoma. *Int J Cancer*. 2005 Dec 10;117(5):781-5.

Melin B.: Genetic causes of glioma: new leads in the labyrinth. *Curr Opin Oncol*. 2011 Nov;23(6):643-7.

Michael D., Oren M.: The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Feb;12(1):53-9.

Middeldorp J., Hol E.M.: GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011 Mar;93(3):421-43. Epub 2011 Jan 8.

Nabavi A., Dörner L., Stark A.M., Mehdorn H.M.: Intraoperative MRI with 1.5 Tesla in neurosurgery. *Neurosurg Clin N Am*. 2009 Apr;20(2):163-71.

Nagase H., Visse R., Murphy G.: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb 15;69(3):562-73. Epub 2006 Jan 5.

Nakada M., Okada Y., Yamashita J.: The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front Biosci.* 2003 Jan 1;8:e261-9.

Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL, Miller DC.: Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol.* 1998 Oct;8(4):655–667.

Ohgaki H., Kleihues P.: Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005 Jun;64(6):479-89

Paolillo M., Russo M.A., Serra M., Colombo L., Schinelli S.: Small molecule integrin antagonists in cancer therapy. *Mini Rev Med Chem.* 2009 Oct;9(12):1439-46.

Petrella B.L., Brinckerhoff C.E.: Tumor cell invasion of von Hippel Lindau renal cell carcinoma cells is mediated by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Mol. Cancer* 2006 Dec 1;5:66.

Pouleau H.B., Sadeghi N., Balériaux D., Mélot C., De Witte O., Lefranc F.: High levels of cellular proliferation predict pseudoprogression in glioblastoma patients. *Int J Oncol.* 2012 Apr;40(4):923-8. doi: 10.3892/ijo.2011.1260. Epub 2011 Nov 11.

Pullen N.A., Anand M., Cooper P.S., Fillmore H.L.: Matrix metalloproteinase-1 expression enhances tumorigenicity as well as tumor-related angiogenesis and is inversely associated with TIMP-4 expression in a model of glioblastoma. *J Neurooncol.* 2011 Aug 21. [Epub ahead of print]

Raymond K., Faraldo M.M., Deugnier M.A., Glukhova M.A.: Semin Cell Dev Biol. Integrins in mammary development. 2012 Mar 10.

Reardon D.A., Egorin M.J., Quinn J.A., et al.: Phase II study of imatinib mesylate plus hydroxyurea in adults with recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2005;23:9359 – 9368.

Reardon D.A., Nabors L.B., Stupp R., Mikkelsen T.: Cilengitide: an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008 Aug;17(8):1225-35.

Reardon D.A., Neyns B., Weller M., Tonn J.C., Nabors L.B., Stupp R.: Cilengitide: an RGD pentapeptide $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ integrin inhibitor in development for glioblastoma and other malignancies. *Future Oncol*. 2011 Mar;7(3):339-54.

Reavey-Cantwell J.F., Haroun R.I., Zahurak M., Clatterbuck R.E., Parker R.J., Mehta R., Fruehauf J.P., Brem H.: The prognostic value of tumor markers in patients with glioblastoma multiforme: analysis of 32 patients and review of the literature. *J Neurooncol*. 2001 Dec;55(3):195-204.

Reifenberger G., Hentschel B., Felsberg J., Schackert G., Simon M., Schnell O., Westphal M., Wick W., Pietsch T., Loeffler M., Weller M.: Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *Int J Cancer*. 2011 Dec 3. doi: 10.1002/ijc.27385

Rich J.N., Zhang M., Datto M.B., Bigner D.D., Wang X.F.: Transforming growth factor-beta-mediated p15(INK4B) induction and growth inhibition in astrocytes is SMAD3-dependent and a pathway prominently altered in human glioma cell lines. *J Biol Chem*. 1999 Dec 3;274(49):35053-8.

Saijoh Y., Adachi H., Sakuma R., Yeo C.Y., Yashiro K., Watanabe M., Hashiguchi H., Mochida K., Ohishi S., Kawabata M., Miyazono K., Whitman M., Hamada H.: Left-right asymmetric expression of lefty2 and nodal is induced by a signaling pathway that includes the transcription factor FAST2. *Mol Cell*. 2000 Jan;5(1):35-47.

Salvati M., Cervoni L., Artico M., Caruso R., Gagliardi F.M.: Long-term survival in patients with supratentorial glioblastoma. *J Neurooncol* 1998;36(1):61 - 4.

Salvati M., Pichierri A., Piccirilli M., Floriana Brunetto G.M., D'Elia A., Artizzu S., Santoro F., Arcella A., Giangaspero F., Frati A., Simione L., Santoro A.: Extent of tumor removal and molecular markers in cerebral glioblastoma: a combined prognostic factors study in a surgical series of 105 patients. *J Neurosurg.* 2012 Jun 1. [Epub ahead of print]

Scherer H.J.: Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am J. Cancer.* 1940;40: 159–98.

Schmidt F., Fischer J., Herrlinger U, Dietz K., Dichgans J., Weller M.: PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma. *Neurology.* 2006 Feb 28;66(4):587-9.

Scott J.N., Rewcastle N.B., Brasher P.M., Fulton D., Hagen N.A., MacKinnon J.A., Sutherland G., Cairncross J.G., Forsyth P.: Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study. *Can J Neurol Sci* 1998;25:197- 201.

Senft C., Priester M., Polacin M., Schröder K., Seifert V., Kögel D., Weissenberger J.: Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells. *J Neurooncol.* 2011 Feb;101(3):393-403. Epub 2010 Jun 30.

Shimogori T., Banuchi V., Ng H.Y., Strauss J.B., Grove E.A.: Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. *Development.* 2004 Nov;131(22):5639-47.

Simmons M.L., Lamborn K.R., Takahashi M., Chen P., Israel M.A., Berger M.S., Godfrey T., Nigro J., Prados M., Chang S., Barker F.G., Aldape K.: Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res* 2001;61:1122-8.

Siqueira A.S., Gama-de-Souza L.N., Arnaud M.V., Pinheiro J.J., Jaeger R.G.: Laminin-derived peptide AG73 regulates migration, invasion, and protease activity of human oral squamous cell carcinoma cells through syndecan-1 and beta1 integrin. *Tumour Biol.* 2010 Jan;31(1):46-58. Epub 2009 Dec 9.

Stark A.M., Hugo H.H., Witzel P.: Age-related expression of p53, mdm2, EGFR and msh2 in glioblastoma multiforme. *Zentralbl Neurochir* 2003; 64:30–36

Stark A.M., Witzel P., Strege R.J., Hugo H.H., Mehdorn H.M.: P53, mdm2, EGFR, and msh2 expression in paired initial and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 Jun;74(6):779-83.

Stark A.M., Nabavi A., Mehdorn H.M., Blömer U.: Glioblastoma multiforme - report of 267 cases treated at a single institution. *Surgical Neurology* 63 2005; 162-169

Stark AM, Anuszkiewicz B, Mentlein R, Yoneda T, Mehdorn HM, Held-Feindt J.: Differential expression of matrix metalloproteinases in brain- and bone-seeking clones of metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Neurooncol*. 2007 Jan;81(1):39-48. Epub 2006 Jul 19.

Stark A.M., Doukas A., Hugo H.H., Mehdorn H.M.: The expression of mismatch repair proteins MLH1, MSH2 and MSH6 correlates with the Ki67 proliferation index and survival in patients with recurrent glioblastoma. *Neurological Research* 2010 Oct;32(8):816-20.

Stark A.M., van de Bergh J., Hedderich J., Mehdorn H.M., Nabavi A.: Glioblastoma: Clinical characteristics, prognostic factors and survival in 492 patients. *Clin Neurol Neurosurg*. 2012 Feb 27. [Epub ahead of print]

Strege R.J., Godt C., Stark A.M., Hugo H.H., Mehdorn H.M.: Protein expression of Fas, Fas ligand, Bcl-2 and TGFbeta2 and correlation with survival in initial and recurrent human gliomas. *J Neurooncol*. 2004 Mar-Apr;67(1-2):29-39.

Strik H., Deininger M., Streffer J., Grote E., Wickboldt J., Dichgans J., Weller M., Meyermann R.: BCL-2 family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999 Dec;67(6):763-8.

Stummer W., Reulen H.J., Meinel T., Pichlmeier U., Schumacher W., Tonn J.C., Rohde V., Opperl F., Turowski B., Woiciechowsky C., Franz K., Pietsch T: ALA-Glioma Study Group. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*. 2008 Mar;62(3):564-76

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

Stupp R., Hegi M.E., Mason W.P., van den Bent M.J., Taphoorn M.J. et al.: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. 2009 May;10(5):459-66

Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M. et al.: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.

Tabatabai G., Tonn J.C., Stupp R., Weller M.: The role of integrins in glioma biology and anti-glioma therapies. *Curr Pharm Des.* 2011;17(23):2402-10.

Tront J.S., Huang Y., Fornace A.J. Jr, Hoffman B., Liebermann D.A.: Gadd45a functions as a promoter or suppressor of breast cancer dependent on the oncogenic stress. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9671-81. Epub 2010 Nov 23.

Von Deimling A., Louis D.N., Wiestler O.D.: Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia* 1995;15(3):328- 38.

Wang B., Xiao Z., Ren E.C.: Redefining the p53 response element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 25;106(34):14373-8. Epub 2009 Jul 13.

Weatherall D.J., Williams T.N., Allen S.J., O'Donnell A.: The population genetics and dynamics of the thalasseмии. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010 Dec;24(6):1021-31. Epub 2010 Sep 29.

Westphal M., Ram Z., Riddle V., Hilt D., Bortey E. Executive Committee of the

Gliadel Study Group.: Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir (Wien)*.2006 Mar;148(3):269-75

Wick W., Platten M., Meisner C., Felsberg J., Tabatabai G., Simon M., Nikkhah G., Papsdorf K., Steinbach J.P., Sabel M., Combs S.E., Vesper J., Braun C., Meixensberger J., Ketter R., Mayer-Steinacker R., Reifenberger G., Weller M.: for the NOA-08 Study Group of the Neuro-oncology Working Group (NOA) of the German Cancer Society Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012 May 10. [Epub ahead of print]

Wu X., Bayle J.H., Olson D., Levine A.J.: The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*. 1993 Jul;7(7A):1126-32.

Yan W., Zhang W., Sun L., Liu Y., You G., Wang Y., Kang C., You Y., Jiang T.: Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme. *Brain Res*. 2011 Sep 9;1411:108-15. Epub 2011 Jul 13.

Yang Y., Ge P.J., Jiang L., Li F.L., Zhu Q.Y.: Modulation of growth and angiogenic potential of oral squamous carcinoma cells in vitro using salvianolic acid B. *BMC Complement Altern Med*. 2011 Jul 5;11:54.

Zhan Q.: Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat Res*. 2005 Jan 6;569(1-2):133-43.

Zhou J., Brinckerhoff C., Lubert S, Yang K., Saini J., Hooke J., Mural R., Shriver C., Somiari S.: Analysis of matrix metalloproteinase-1 gene polymorphisms and expression in benign and malignant breast tumors. *Cancer Invest*. 2011 Nov;29(9):599-607.

7. Anhang

7.1. Material

7.1.1 RNA-Isolierung und Herstellung der cDNA

7.1.1.1 Chemikalien

DNase	RQ1 RNA free DNase 1000u Promega, Madison, WI, USA
DNase-Puffer	RQ10 x Reaction Buffer Promega, Madison, WI, USA
Random Hexamer	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
TRIzol®	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland

7.1.1.2 Material und Geräte

Filtergerät zur Zubereitung von RNase-freiem Wasser	Milipore Synthesis A 10, Billerica, MA, USA
Kühlzentrifuge	
Zentrifuge	Heraeus, Biofuge pico, UK
Thermomixer	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler	Mastercycler ep gradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spektralphotometer	Ultraspec 3100, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
Quarzküvette	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Vortex-Gerät MR 3000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Ultra-Turrax Polytron PT 3000	Kinematika, Litauen
Ultra-Turrax-Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Cups	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eismaschine	Scotsman, Glasgow, Scotland

7.1.2 Real-Time PCR

Reverse Transkriptase	RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase, Fermentas, Canada
Lösungspuffer für Reverse Transkriptase	5 x reaction buffer, Fermentas, Canada
dNTP-Mix	dNTP-Mix 25 mM, Fermentas, Canada
MMP1	Applied Biosystems, USA

Code No. HS 00233958_m1	
MMP2 Code No. HS 00244422_m1	Applied Biosystems, USA
MMP9 Code No. HS 00234579_m1	Applied Biosystems, USA
TIMP2 Code No. HS 00234278_m1	Applied Biosystems
TIMP 3 Code No. HS 00165949_m1	Applied Biosystems
BAX Code No. HS 00751844_s1	Applied Biosystems
MDM2 Code No. HS 00234753_s1	Applied Biosystems
EGFR Code No. HS 00193306_m1	Applied Biosystems
GAPDH Cat. No. HS 99999905_m1	TaqMan GAPDH Control Reagents (Human) Applied Biosystems, USA
TaqMan Universal PCR Master Mix Cat. No. 4326708	Applied Biosystems, USA
96-Loch-Platte	Multiplate Low-Profile 96-Well Unskirted PCR Plates, Bio-RAD, München, Deutschland
Abdeckfolie	Viewseal, Greiner Bio-One, USA
Real-Time-PCR-Gerät	MyiQ Single Color Real-Time Detection System, Bio-RAD, UK
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

7.1.3 Oligoarrays

GEArray® Q Series Human Cell Cycle Array Cat. No. HS-001	Biomol, Hamburg, Deutschland
GEArray® Q-Series Extracellular Matrix & Adhesion Gene Array Cat. No. HS-010	Biomol, Hamburg, Deutschland

7.1.4 Real-Time PCR-Arrays

Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array PAHS-013	SABiosciences Corporation, USA
Cell Cycle PCR Array PAHS-020	SABiosciences Corporation, USA
Embryonic Stem Cell Array PAHS-081	SABiosciences Corporation, USA

7.1.5 Immunhistochemie

7.1.5.1 Antikörper

Mouse anti-p53 Code No. MSG 020-05	Zytomed systems, Berlin, Deutschland
Mouse anti-EGF-Rezeptor Code No. MSK 014-05	Zytomed systems, Berlin, Deutschland
Mouse Double Minute 2, Homolog Of; p53-binding Protein (MDM2) Code No. LS-B 163/ 11426	Lifespan Biosciences, Seattle,WA, USA
Ki67 Rabbit monoclonal Code No. RM-9106-S1	NeoMarkers/ Lab Vision, Fremont, CA, USA
GFAP Monoclonal mouse Anti-Human Glial fibrillary Acidic protein Clone 6F2 Code No. M 0761	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Mouse monoclonal to MMP-1 Code No. ab2461	Abcam Ltd, Cambridge, UK
Mouse monoclonal to MMP-2 Code No. ab3158	Abcam Ltd, Cambridge, UK
Rabbit polyclonal to MMP-9 Code No. ab16306	Abcam Ltd, Cambridge, UK

7.1.5.2 Chemikalien

Histofine Simple Stain Max Po (multi) Code No. 414151F	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
AEC + Substrat-Chromogenlösung Code No. K 3461	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
DAB + Substrat- Chromogenlösung Code No. K 3467	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
DAKO antibody diluent with background reducing components, Code No S 3022	DAKO Corporation, Carpintera, CA, USA
Streptavidin Code No. P 0397	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
AEC 3-Amino-9-Ethylcarbazol-Tabletten	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Aquatex 1.08562.0050	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA 1.08418	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tri-Na-Citrat 1.06448	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIS-HCL 1.06404	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
NaCl 1.06404	Merck, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure 1.00244	Merck, Darmstadt, Deutschland
Protease P 5147	Sigma Chemical Company, USA
Ethanol 70%, 96%, 100%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol 100%	Walter, Kiel, Deutschland

Wasserstoffperoxid 7210	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	Walter, Kiel, Deutschland
Mayers Hämalaun	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

7.1.5.3 Material und Geräte

Superfrost Plus Objektträger	Menzel Braunschweig, Deutschland
Deckgläser	Menzel Braunschweig, Deutschland
Wachsstift	DAKO Diagnostika GmbH Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryotom 2800 Frigocut	Reichert-Jung , Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Medax, Neumünster, Deutschland
Wärmeplatte	Medax, Neumünster, Deutschland
Mikrotom (manuelles Schlittenmikrotom)	Jung AG, Heidelberg, Deutschland
Vortex Genie	Scientific industries, New York, USA
Dampfkochtopf	Silit, Riedlingen, Deutschland
Analysewaage A 200 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Brutschrank	Friedrich Polzin, Kiel, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan

7.1.5.4 Ansätze und Lösungen

EDTA-Puffer TEC (ph 7,8)	2,5 g TRIS-Base 5,0 g EDTA 3,2 g Tri-Na-Citrat ad 1000 ml Aqua dest. zum Gebrauch mit 1:10 mit Aqua dest. verdünnen
TRIS-Puffer (TBS)	0,9 g TRIS Base 6,85 g TRIS-HCL 8,78 g NaCL Ad 1000 ml Aqua dest.
Citratpuffer ph 6,0	2,7 g Citronensäure ad 1000 ml Aqua dest.
Acetatpuffer für AEC (50 mM, ph 5,0)	Lösung A.: 11,55 ml Eisessig ad 1l Aqua dest. Lösung B: 27,2 g Tri-Na-Acetat ad 1 l Aqua dest. 74ml Lösung A + 176 ml Lösung B + 750 ml Aqua dest.
Ansatz Protease	Protease 0,1 g ad 100 ml TRIS-Puffer

7.2 Ergebnisse der Oligo-Arrays

7.2.1 Tab. 5. Ergebnisse des Gen-Arrays „Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules“

	ECM 08.02	ECM 24.02	ECM 22.03
Zelladhäsionsmoleküle			
Integrine			
Integrin α 1		↑	↔
Integrin α 2	↔	↔	↓
Integrin α 2b	↔	↔	↔
Integrin α 3	↔		↑
Integrin α 4	↑		↑
Integrin α 5	↔	↔	↔
Integrin α 6	↔		↑
Integrin α 7	↔		↑
Integrin α 8	↔		↑
Integrin α 9	↔	↔	↔
Integrin α 10	↔		↑
Integrin α 11	↔		↓
Integrin α L	↔		N/A
Integrin α M	↔	↔	↔
Integrin α V	↔	↔	↔
Integrin α X		N/A	N/A
Integrin β 1	↔	↔	↔
Integrin β 2		↑	↔
Integrin β 3	↔		↑
Integrin β 4	↔		↑
Integrin β 5	↔	↔	↔
Integrin β 6		↑	↑
Integrin β 7	↔		↑
Integrin β 8	↔	↔	↔
Immunoglobulin Superfamilie			
CEACAM5/ CEA	↔	↔	↔
DCC	↔		↑
ICAM	↔		↑
MICA/ MUC-18	↔		↑
NCAM1	↔		↑
NRCAM	↔	↔	↔
PECAM1	↔	↔	↔
VCAM1		↓	↔
Cadherine and Catenine			
E-cadherin	↔	↔	↔
Catenin α 1	↔		↑
Catenin α like 1	↔		↑
Catenin β 1	↔	↔	↔

Catenin δ 1	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
Catenin δ 2	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
Selectine				
E-selectin/ SELE	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
L-selectin/ SELL	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
P-selectin/ SELP	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
Andere verwandte Gene				
CD44	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
Contactin 1	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
Extrazelluläre Matrix Proteine				
Caveolin-1		\uparrow	\uparrow	\leftrightarrow
Endostatin/COL18A1	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
COL1A1	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
COL4A2	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
ECM1	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
Fibrinogen B		N/A	\leftrightarrow	\leftrightarrow
Fibronectin-1	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
Laminin β 1	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
Laminin β 2	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
SPARC	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
Osteopontin/SPP1/OPN	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
Thrombospondin 1	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
Thrombospondin 2	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
Thrombospondin 3	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
Vitronectin/VTN	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
Proteasen				
Matrix Metalloproteinasen				
ADAMTS1/ Meth1	\leftrightarrow		\downarrow	\leftrightarrow
ADAMTS8/Meth2	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
MMP1/ collagenase-1	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
MMP2/ gelatinase A	\leftrightarrow		1	\leftrightarrow
MMP3/ stromelysin-1	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
MMP7/ matrilysin		\downarrow	\uparrow	\uparrow
MMP8/ neutrophil collagenase	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
MMP9/ gelatinase B	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
MMP10/ stromelysin-2	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
MMP11/ stromelysin-3	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\uparrow
MMP12/ macrophage elastase		\uparrow	\uparrow	\leftrightarrow
MMP13/ collagenase-3	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
MMP14/ MT1-MMP	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
MMP15	\leftrightarrow		\uparrow	\leftrightarrow
MMP16	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\downarrow
MMP17/ MT-4 MMP		\uparrow	\uparrow	\downarrow
MMP20/ enamelysin	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
MMP24	\leftrightarrow	\leftrightarrow		\leftrightarrow
MMP26		N/A	N/A	\leftrightarrow

Serin Poteinasen

Cathepsin G	↔		↑	↔
tPA	↔	↔		↔
uPA	↔		↑	N/A
uPAR	↔		↑	↔
TMPRSS4	↔		↑	↔

Cystein Proteinasen

Caspase8	↔	↔		↔
Caspase9	↔		↑	↔
Cystatin C	↔	↔		↔
Cathepsin B	↔	↔		↔
Cathepsin L	↔	↔		↔

Andere verwandte Gene

Cathepsin D	↔	↔		↔
Heparanase	↔		↑	↔
MGEA5/Hyaluronidasen	↔	↔		↔

Protease Inhibitoren

Serpin b2/PAI-2	↔		↑	↔
Serpin b5/maspin	↔		↑	↔
Serpin 1/PAI-1	↔	↔		↔
TIMP1	↔	↔		↔
TIMP2	↔		↑	↔
TIMP3	↔		↑	↔

7.2.2. Tab. 6Ergebnisse des Gen-Arrays „Human Cell Cycle“**CC 02.02. CC 11.02. CC 10.04.****G1 Phase**

Cyclin D1	↔	↔		↑
Cyclin D2	↔	↔		↔
Cyclin D3	↔	↔		↔
Cyclin E1	↔		↑	↔
Cyclin E2	↔	↔		↔
CDLC7L1/CDC7	↔		↑	↑
CDC34	↔	↔		↑
CDC37		↓	↔	↔
CDK2	↔	↔		↔
CDK4		↑	↔	↔
CDK6	↔	↔		↔
CDKN1A/ p21	↔	↔		↔
CDKN1B/ p27	↔	↔		↔
CDKN1C/ p57		N/A	N/A	↔
CDKN2A/ p16	↔	↔		↔

CDKN2B/ p15	↔	↔	↔	
CDKN2C/ p18	↔	↔	↔	
CDKN2D/ p19	↔	↔	↔	
CKS1/ Cks1p9	↔		↑	↔
CKS2	↔	↔		↔
Cullin1	↔	↔		↔
Cullin2	↔		↑	↑
Cullin3	↔		↑	↔
Cullin4a	↔		↑	↔
Cullin4b	↔	↔		↔
Cullin5	↔		↑	↔
E2F1		↓	↑	↓
E2F2	↔	↔		↔
E2F3	↔		↑	↔
E2F4	↔	↔		↔
E2F5	↔	↔		↔
E2F6	↔	↔		↔
NEDD8	↔		N/A	↔
RB1	↔	↔		↔
RBL1/ p107	↔		↑	↔
RBL2/ p130	↔		↓	↔
SKP1A	↔	↔		↑
SKP2	↔	↔		↔
TFDP1/ DP1	↔		↑	↔
TFDP2/ DP2	↔	↔		↔
S-Phase				
Cyclin A1	↔		↑	↑
Cyclin A2/Cyclin A	↔	↔		↔
Cyclin C	↔	↔		↔
Cyclin G1	↔		↑	↑
Cyclin G2	↔		↑	↔
Cyclin H	↔	↔		↔
CDC25A	↔	↔		↔
CDC45L	↔	↔		↔
CDC6	↔		↑	↔
CDK7	↔	↔		↑
CDK8	↔	↔		↔
MCM2	↔	↔		↔
MCM3	↔	↔		↔
MCM4/ CDC21	↔	↔		↔
MCM5/ CDC46	↔	↔		↓
MCM6/ Mis5	↔	↔		↔
MCM7/ CDC47	↔	↔		↔
MKI67/ Ki67	↔	↔		↔
PCNA	↔	↔		↔
G2-Phase				
Cyclin B1	↔	↔		↓
Cyclin B2	↔	↔		↓

Cyclin F	↔	↔	↔
M-Phase			
CDC2/ CDK1	↔	↔	↓
CDC16	↔	N/A	↔
CDC20/ p55cdc	↔	↔	↔
CDC27	↔	↑	↔
FOXM1/ MPP2	↔	↔	↔
MAD2L1	↔	↔	↑
MAD2L2	↔	↔	↔
PRC1	↔	↔	↔
RBX1	↔	↔	↔
DNA-Schaden-Kontrollgene			
ABL1/ c-Abl	↔	↔	N/A
APAF1	↔	↑	↔
ATM	↔	↑	↔
BCL-2	↔	↑	↔
BAX	↔	↔	↔
BRCA1	↔	↑	↔
CHEK1/chk1	↔	↑	↔
CHEK2/RAD 53/chk2	↔	↑	↔
GADD45A	↔	↔	↔
HUS1	↔	↔	↔
MDM2	↔	↔	↔
MRE11A	↔	↔	↔
MRE11B	↔	↔	↔
NBS1/ nibrin	↔	↑	↑
RAD9	↔	↔	↔
RAD17	↔	N/A	N/A
RAD50	↔	↔	↔
RAD 51	↔	↔	↔
RPA3/ rpa	↔	↔	↑
TIMP3	↔	↔	↔
TP53/ p53	↓	↔	↔
UBC/ubiquitin C	N/A	↓	↔
UBE1	↔	↔	↔
UBE3A (E6-AP)	↔	↔	↔
UBL1/ SUMO-1/sentrin	↔	↔	↔

8. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Räumlichkeiten und der finanziellen Mittel sowie sein Interesse an dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med. A. M. Stark für die hervorragende Betreuung sowie die unkomplizierte und professionelle Zusammenarbeit. Sein persönlicher Erfahrungsschatz, seine wissenschaftlichen Kenntnisse und die stete Gesprächsbereitschaft haben mir während des gesamten Prozesses sehr weitergeholfen. Zudem bedanke ich mich für seine nicht nachlassende Geduld und anhaltende Motivation.

Ich danke Frau Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. J. Held-Feindt für die außerordentlich gute theoretische und praktische Betreuung während des experimentellen Teils dieser Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich für die Anleitung zum selbstständigen Arbeiten, ihr hohes persönliches Engagement und die zahlreichen fachlichen Anregungen.

Ich danke Herrn Dr. med. H.-H. Hugo für die Unterstützung im Bereich der immunhistochemischen Färbungen. Mit seinem hohem Sachverstand stand er mir stets mit fachlichem Rat zur Seite und führte mich in die Welt der mikroskopischen Begutachtung ein.

Den Mitarbeitern im Labor gilt ein besonderer Dank für die herzliche Aufnahme, technische Unterstützung und kollegiale Zusammenarbeit. Besonders hervorheben möchte ich Brigitte Rehmke für die weit überdurchschnittliche persönliche Betreuung und kompetente Anleitung, ebenso Tanja Engel und Bärbel Hufnagel.

Ein letzter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mir eine große moralische Unterstützung waren.

9. Lebenslauf

Zur Person

Franziska Ruhland
Geburtstag 4. September 1983
Geburtsort: Wuppertal

Schulbildung

1989 - 1993 Gemeinschaftsgrundschule Wupper in Radevormwald
1993 - 2002 Röntgen-Gymnasium in Remscheid-Lennep
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife mit der Note „sehr gut“ (1,1)

Studium

2002-2009 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2004 Physikum mit der Note „gut“
05/2008 -10/2008 PJ-Tertial in der Medizinischen Klinik des Klinikums Itzehoe
10/2008 - 01/2009 PJ-Tertial in der Chirurgischen Klinik des UKSH Campus Kiel
05/2009 Zweites medizinisches Staatsexamen im Mai 2009 mit der Note „gut“

Auslandsaufenthalte

07/1999 - 01/2000 Besuch der Ashburton High School in Ashburton, Neuseeland
10/2006 - 03/2007 Erasmus-Auslandssemester an der Universidad de Cádiz, Spanien
01/2008 Teilnahme an einer Studierendenkonferenz an der medizinischen Akademie Sechenov, Moskau, mit Vorstellung eigener Forschungsergebnisse
02/2008 -05/2008 PJ-Tertial in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie am Universitätskrankenhaus Puerta del Mar in Cádiz, Spanien

Promotion

Seit 2006 Experimentelle Doktorarbeit in der Klinik für Neurochirurgie des UKSH Campus Kiel zu dem Thema „Genexpressionsprofile von Glioblastomen in Primär- und Rezidivtumoren“ -
Doktorvater: Prof. Dr. med. A. Stark

Stipendien

2001 Teilnahme an der Deutschen Schüler Akademie des Vereins Bildung und Begabung e.V.
2003-2009 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen

2006/2007	Volkes mit Teilnahme an zwei Sommerakademien Erasmus-Stipendium und Auslandsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
01/2008	Stipendium der medizinischen Fakultät der CAU zur Teilnahme an der Studierendenkonferenz an der medizinischen Akademie Sechenov, Moskau
02/2008	PJ-Auslandsstipendium der medizinischen Fakultät der CAU
07/2012	Stipendium der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin zur Teilnahme an der European School of Internal Medicine Summer School in Kusadasi, Türkei

Zitable Abstracts

Stark AM, Ruhland F, Mehdorn HM, Held-Feindt J (2007) Gene expression profiling of initial versus recurrent glioblastoma. Symposium Aktuelle Therapiestrategien bei Gliomrezidiven, München 09.-10.03.2007

Stark AM, Ruhland F, Hugo HH, Mehdorn HM, Held-Feindt J (2008) Molecular profiling of initial versus recurrent glioblastoma: Teilnahme an einer Studierendenkonferenz an der medizinischen Akademie Sechenov, Moskau, mit Präsentation der Forschungsergebnisse 01/2008.

Stark AM, Ruhland F, Hugo HH, Mehdorn HM, Held-Feindt J (2010) Molecular profiling of initial versus recurrent glioblastoma: an attempt using different techniques including Array technology, MGMT-Status and immunohistochemistry. 61. Jahrestagung der DGNC. 61. Abstract-CD Neurowoche 2010. Abstract-Nr. V1547, ISBN 978-3-940017-64-2