

**Universitätsklinikum Münster
Institut für Neuropathologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Paulus**

**Evolutionär konservierte Gene aus
Drosophila melanogaster in humanen
Glioblastomen**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae**

**der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**Vorgelegt von Steidl, Corinna
aus Gütersloh
2007**

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt
1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. W. Paulus
2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Moskopp
Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Neuropathologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Paulus
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Paulus
Koreferent: Prof. Dr. D. Moskopp

Zusammenfassung

Evolutionär konservierte Gene aus *Drosophila melanogaster* in Glioblastomen

Glioblastome als die häufigsten und gleichzeitig bösartigsten Hirntumore sind bislang keiner Therapie zugänglich und führen oft innerhalb weniger Monate nach der Diagnose zum Tod. Sämtliche Therapieansätze sind unzureichend und gehen mit schweren Nebenwirkungen einher. Es gibt Hinweise, dass Entstehung und Invasivität von Glioblastomen auf evolutionär konservierten Prozessen beruhen. Ziel dieser Arbeit war es, auf Ebene der Genexpression anhand spezifischer Expressionsmuster erste Hinweise auf evolutionär konservierte Mechanismen glialer Proliferation und Invasion in humanen Glioblastomen aufzudecken, um diese Erkenntnis langfristig therapeutisch zu nutzen. Ausgangspunkt waren gesicherte Erkenntnisse über das ZNS der *Drosophila melanogaster*, das aufgrund von zellulären, strukturellen und molekularen Ähnlichkeiten als Modell für das wesentlich komplexere Vertebraten ZNS herangezogen werden kann. Folgende identifizierte Gene der *Drosophila melanogaster* mit bekannter Funktion in embryonaler Migration und Proliferation dienten als Ausgangspunkt: *BREATHLESS*, *GLIOTACTIN*, *KÄSTCHEN*, *LOCO*, *NONSTOP*, *ROBO* und *SCHIZO*. Die zugehörigen humanen Homologen wurden mittels BLAST-Recherche ermittelt: FGFR1 und FGFR2, Neuroligin1, Neuroligin2 und Neuroligin3, LIV-1 und similar to KIAA 1265, RGS12 und RGS 14, USP22 und UBP41, Robo 1, Robo2 und Neogenin sowie EFA6B. Mittels RT-PCR wurde die Genexpression der Homologe in Glioblastomzelllinien und -biopsaten im Vergleich zu normalem Hirngewebe untersucht.

Es stellte sich heraus, dass der Großteil der untersuchten Gene abweichend von normalem Hirngewebe in humanen Glioblastomen exprimiert wird und somit möglicherweise neoplastische Proliferation und Invasion über embryonale, evolutionär konservierte Mechanismen stattfindet. Aufgrund der nachgewiesenen Homologie der untersuchten Gene könnte das ZNS der *Drosophila melanogaster* im Umkehrschluss in begrenztem Ausmaß für zukünftige Funktionsanalysen und Therapieansätze von Glioblastomen möglicherweise ebenfalls ein geeignetes Modell darstellen.

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2007

FÜR BRUNO

Abkürzungsverzeichnis

Abl	Abelson
AChE	Acetylcholin-Esterase
ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	Aminomethanphosphonsäure
ARF	ADP-Ribolisation Factor (<i>engl.</i>)
β-ME	β-Mercaptoethanol
CC	Coiled Coil (<i>engl.</i>)
CD	Oberflächen- Antigen
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase 2A, Tumorsuppressorgen
cDNA	complementary DNA (<i>engl.</i>)
CLAM	Cholesterine Esterase Like Adhesion Molecules (<i>engl.</i>)
Comm	Commissureless (<i>engl.</i>), Gen der Drosophila melanogaster
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1
CXCL	CXC Chemokine Ligand (<i>engl.</i>)
CXCR	CXC Chemokine Receptor (<i>engl.</i>)
Da	Dalton, molekulare Größeneinheit
DCC	Deleted in Colorectal Cancer (<i>engl.</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (<i>engl.</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy Nucleine Acid (<i>engl.</i>)
ECM	extracellular matrix (<i>engl.</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFA	Exchange Factor for ARF
EGF(R)	Epidermal Growth Factor (Receptor) (<i>engl.</i>)
Ena	Enabled
ERBB	Gen, das EGFR kodiert
FGF(R)	Fibroblast Growth Factor (Receptor) (<i>engl.</i>)
GABA	Gamma-Amino-Butyric-Acid
GAP	GTPase Activating Proteine (<i>engl.</i>)
GDI	Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor (<i>engl.</i>)
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor (<i>engl.</i>)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (<i>engl.</i>)
GTP	Guanosine Triphosphate
GTPase	Guanosine Triphosphate spaltendes Enzym
HPLC-Wasser	High Performance Liquid Chromatography (<i>engl.</i>)
IL	Interleukin
KGF(R)	Keratinocyte Growth Factor (Receptor) (<i>engl.</i>)
LZT	LIV subfamily of ZIP Zinc Transporters (<i>engl.</i>)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDM2	Mouse Double Minute (Gen) (<i>engl.</i>)
MMAK	Mutated in Multiple Advanced Cancer, Gen (<i>engl.</i>)
MMP	Matrix- Metalloproteinase
MOPS	3-Morpholinopropanesulfonic Acid
mRNA	messenger RNA (<i>engl.</i>)
MRT	Magnetresonanztomographie

NLGN	Neurologin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	Phosphate Buffered Saline (<i>engl.</i>)
PCR	Polymerase Chain Reaction (<i>engl.</i>)
PDGF(R)	Platelet Derived Growth Factor (Receptor) (<i>engl.</i>)
PI- 3	Phosphatidylinositol-3
PNS	Peripheres Nervensystem
PSD	Post-Synaptic Density Proteine (<i>engl.</i>)
PTEN	Phosphatate and Tensin Homology, Gen
RB	Retinoblastom- Gen
RBP	Rap Binding Proteins (<i>engl.</i>)
RGM	Repulsive Guidance Molecule (<i>engl.</i>)
RGS	Regulator of G-Protein Signalling (<i>engl.</i>)
RNA	Ribosomal Nucleine Acid (<i>engl.</i>)
Robo	Roundabout (<i>engl.</i>), Gen der Drosophila melanogaster
RT- PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
SynCAM	Synaptisches C-Adhäsionsmolekül
TGF	Tumor Growth Factor (<i>engl.</i>)
TRIS	Hydroxymethyl-Aminomethan
UBP, USP	Ubiquitin-spezifische Protease
VEGF(R)	Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor) (<i>engl.</i>)
WDR-Gen	WD-Repeat Gene (<i>engl.</i>)
WHO	World Health Organisation (<i>engl.</i>)
ZNS	Zentrales Nervensystem

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	GLIOBLASTOME.....	1
1.2	THERAPEUTISCHE STRATEGIEN.....	2
1.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE EIGENHEITEN VON GLIOBLASTOMEN.....	3
1.3.1	<i>Entstehung und Progression primärer und sekundärer Glioblastome</i>	<i>3</i>
1.3.2	<i>Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren</i>	<i>5</i>
1.3.3	<i>Angiogenese.....</i>	<i>5</i>
1.3.4	<i>Migration und Invasion</i>	<i>6</i>
1.3.5	<i>Proteasen.....</i>	<i>6</i>
1.3.6	<i>Immunmodulation.....</i>	<i>7</i>
1.4	FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT.....	7
2	MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1	MATERIAL.....	9
2.1.1	<i>Allgemeine Chemikalien.....</i>	<i>9</i>
2.1.2	<i>RNA-Isolierung.....</i>	<i>10</i>
2.1.3	<i>PCR</i>	<i>10</i>
2.1.4	<i>DNA Größenstandard.....</i>	<i>10</i>
2.1.5	<i>Puffer und Lösungen.....</i>	<i>10</i>
2.1.6	<i>Medien und Lösungen zur Kultur eukaryotischer Zellen.....</i>	<i>10</i>
2.1.7	<i>Eukaryotische Zelllinien</i>	<i>11</i>
2.1.8	<i>Geräte und sonstige Hilfsmittel</i>	<i>11</i>
2.2	METHODEN	12
2.2.1	<i>BLAST-Recherche.....</i>	<i>12</i>
2.2.2	<i>Auftauen und Anzuchten humaner Gliomzelllinien.....</i>	<i>12</i>
2.2.3	<i>RNA-Isolierung aus Zelllinien</i>	<i>13</i>
2.2.4	<i>RNA-Isolierung aus Gewebeprobe n</i>	<i>14</i>
2.2.5	<i>RNA aus humanem Kortex, normal</i>	<i>15</i>
2.2.6	<i>Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung.....</i>	<i>16</i>
2.2.7	<i>RNA-Gelelektrophorese.....</i>	<i>16</i>
2.2.8	<i>First-Strand cDNA-Synthese</i>	<i>17</i>
2.2.9	<i>RT-PCR mit HOT STAR TAQ DNA Polymerase</i>	<i>19</i>
2.2.10	<i>Gelelektrophorese.....</i>	<i>22</i>
2.2.11	<i>Auswertung.....</i>	<i>23</i>
3	ERGEBNISSE	24
3.1	BLAST-RECHERCHE.....	24
3.2	PRIMER.....	26
3.3	RNA-GELELEKTROPHORESE.....	27
3.4	PCR-ERGEBNISSE	28
3.4.1	<i>GAPDH-Kontrolle</i>	<i>28</i>
3.4.2	<i>BREATHLESS-Homologe.....</i>	<i>29</i>
3.4.3	<i>GLIOTACTIN-Homologe</i>	<i>30</i>
3.4.4	<i>KÄSTCHEN-Homologe</i>	<i>31</i>
3.4.5	<i>LOCO-Homologe</i>	<i>32</i>
3.4.6	<i>NONSTOP-Homologe</i>	<i>33</i>
3.4.7	<i>ROBO-Homologe.....</i>	<i>34</i>
3.4.8	<i>SCHIZO-Homologe.....</i>	<i>35</i>
3.4.9	<i>Zusammenfassung der RT-PCR-Ergebnisse in Tabellenform</i>	<i>35</i>

4	DISKUSSION	37
4.1	<i>BREATHLESS</i> /FGFR	38
4.1.1	<i>BREATHLESS</i>	38
4.1.2	<i>FGFR1</i>	38
4.1.3	<i>FGFR2</i>	39
4.2	<i>GLIOTACTIN</i> /NEUROLIGIN	41
4.2.1	<i>GLIOTACTIN</i>	41
4.2.2	<i>Neuroigin</i>	41
4.2.3	<i>NLGN1</i>	42
4.2.4	<i>NLGN2</i>	43
4.2.5	<i>NLGN3</i>	44
4.3	KÄSTCHEN/LIV-1	44
4.3.1	<i>KÄSTCHEN</i>	44
4.3.2	<i>LIV-1</i>	45
4.3.3	<i>simKIAA 1265</i>	46
4.4	LOCO/RGS	46
4.4.1	<i>LOCO</i>	46
4.4.2	<i>RGS</i>	46
4.4.3	<i>RGS12</i>	47
4.4.4	<i>RGS14</i>	48
4.5	NONSTOP/UBIQUITIN-SPEZIFISCHE PROTEASEN	48
4.5.1	<i>NONSTOP</i>	48
4.5.2	<i>Ubiquitin-Spezifische Proteasen</i>	49
4.5.3	<i>USP22</i>	49
4.6	<i>ROBO</i> /ROUNDAABOUT	51
4.6.1	<i>ROBO</i>	51
4.6.2	<i>Humanes ROBO</i>	51
4.6.3	<i>Humanes ROBO1</i>	51
4.6.4	<i>Humanes ROBO2</i>	52
4.6.5	<i>Neogenin</i>	53
4.7	<i>SCHIZO</i> /ARF6, EFA6	53
4.7.1	<i>SCHIZO</i>	53
4.7.2	<i>EFA6B</i>	54
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	56
6	AUSBLICK.....	57
7	LITERATURVERZEICHNIS	58
8	ANHANG	83
9	DANKSAGUNG	84
10	LEBENS LAUF	85

1 Einleitung

1.1 Glioblastome

Glioblastome sind Hirntumore, die durch ihre Häufigkeit und Malignität eine besondere Stellung unter den neuroepithelialen Tumoren des Gehirns einnehmen. In der WHO-Klassifikation werden Hirntumore in vier Malignitätsgrade eingeteilt: vom benignen WHO-Grad I bis zum hoch malignen WHO-Grad IV, dem Glioblastome zuzuordnen ist und der mit einer geschätzten Überlebenszeit von maximal 24 Monaten einhergeht. Dabei werden vier morphologische Kriterien berücksichtigt (38,120):

- Kernatypien (Hyperchromasie und/oder deutliche Form- und Größenvariabilität)
- (regelrechte oder atypische) Mitosen
- Mikrovaskuläre Endothelproliferationen
- Flächenhafte Nekrosen

Zur Diagnose eines hochmalignen Tumors WHO-Grad IV wie des Glioblastoma multiforme müssen mindestens drei der genannten Kriterien erfüllt sein (38,120). Das histopathologische Bild wird weiter bestimmt von pathologischen Gefäßen, arteriovenösen Anastomosen mit hoher Neigung zu Einblutungen und Nekrosen sowie radiär um nekrotische Areale angeordnete Tumorzellkerne (Pallisadenstellung). Makroskopisch ergibt diese Vielfalt der Tumoranteile ein „buntes“ Schnittbild mit unscharfer Begrenzung (244-246).

Aufgrund der morphologischen Heterogenität sollen zu prognostischen Aussagen in neuen Klassifikationen neben weiteren Kriterien wie vorherrschender Zelltyp, Proliferations-tendenz, mikrovaskuläre Proliferation und Vorkommen von Apoptosen, Alter und Gesundheitszustand des Patienten, Tumorlokalisierung und assoziierte Symptomen zunehmend auch molekulargenetische Erkenntnisse Berücksichtigung finden (10,18,75).

Glioblastome treten meist ab dem 50. Lebensjahr mit Bevorzugung des männlichen Geschlechts auf (14). Sie sind meist in den Großhirnhemisphären lokalisiert und breiten sich gelegentlich als sogenannte Schmetterlingsgliome über den Balken symmetrisch auf die kontralaterale Hemisphäre aus (244-246).

Klinisch führen Glioblastome je nach Lokalisation und Wachstumsgeschwindigkeit zu Hirndruckzeichen wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, progredienten psychopathologischen Veränderungen oder zu fokalen neurologischen Störungen, wie z.B. späten epileptischen Anfällen oder motorischer, bzw. sensibler Hemiparese. Gerade bei rasch zunehmendem Wachstum kann die Erstmanifestation vor allem durch Herniationen einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen. Diagnostisch sind primär bildgebende Verfahren führend: Im CT, bzw. im MRT zeigen sich neben typischen girlandenförmigen Kontrastmittelanreicherungen um zentrale Tumornekrosen oft ausgeprägte Marklagerödeme sowie Zysten und Einblutungen (244-246). Zur prä-, intra- und post-operativen Diagnostik und Verlaufskontrolle gewinnen zunehmend ergänzend nuklearmedizinische Verfahren an Bedeutung, wie die ^{18}F -Fluorodeoxy-Glukose(FDG)- und ^{11}C -Methionin (Met)-PET (160,168). Beide Verfahren scheinen zudem prognostische Hinweise auf den Verlauf geben zu können: vermehrte Anreicherung von Methionin im Tumor korreliert mit zellulärer Proliferation, während die von ^{18}F -FDG auf gesteigertem Glukose-Metabolismus beruht (114).

1.2 Therapeutische Strategien

Da aufgrund der sehr diffusen Invasivität der Glioblastome eine R_0 -Resektion quasi nicht möglich ist, erfolgt als Therapiestandard eine Kombination aus operativer Tumorentfernung mit anschließender Nachbestrahlung (60Gy) unter antiödematöser Therapie. Oft treten allerdings schon nach kurzer Zeit Rezidive auf (245).

Weitere Ansätze umfassen eine maximale operative Entfernung des Tumors, ganzheitliche Hirnbestrahlung zum Teil kombiniert mit gezielter, hoch dosierter Bestrahlung des Tumors und intensiver Chemotherapie. Sämtliche radiotherapeutischen Ansätze führten als Monotherapie bislang zu keiner signifikant verbesserten Prognose, sondern längerfristig zu Neuronenuntergang und kognitiven Defiziten (148). Erst durch Hinzunahme von Temozolamid scheint eine statistisch signifikante Verlängerung der Überlebenszeit möglich zu sein (202). Auch diverse chemotherapeutische Ansätze blieben bislang ohne durchschlagenden Erfolg. Dies beruht sowohl auf der Schwierigkeit, die hoch toxischen Chemotherapeutika lokal an den Tumor zu applizieren und gleichzeitig deren schädlichen

Auswirkungen auf gesundes Gewebe (Leukenzephalopathie) zu verhindern als auch auf intrinsischer Chemoresistenz des Tumors (32,59).

Durch Kenntnis molekulargenetischer Proliferations- und Invasionsmechanismen soll therapeutisch gezielt in tumorspezifische Prozesse blockiert und ein Progress verhindert werden. Neuere Therapieansätze umfassen z.B. die chemotherapeutische Blockade von Wachstumsfaktoren und dysregulierten Signaltransduktionen, Eindämmung von Tumorinvasivität durch Protease-Inhibitoren und Unterbrechung stark neoplastischen Wachstums durch antiangiogenetische Chemotherapeutika (siehe Kap.1.4.5). Gute Ergebnisse wurden mit alkylierendem Temozolamid insbesondere bei postoperativen Tumorrezidiven erzielt. Einen Progressionsstillstand von bis zu 2 Jahren konnte auch die Kombination von Nitro-Harnstoffen (Hydroxyurea) mit Imatinib bewirken, einem Inhibitor der Tyrosine-Kinase von Bcr-Abl, dem PDGF-Rezeptor und dem Kit-Rezeptor (44).

Zu einem signifikanten Anstieg der Überlebenszeit führte jedoch keine der aufgeführten Strategien in der Therapie maligner Glioblastome. Große Hoffnung ruht auf Kombination neuer Therapieansätze (z.B. Radiotherapie kombiniert mit anti-VEGF, um vermutlich strahleninduzierte, VEGF-vermittelte Therapieresistenz zu umgehen) sowie auf den potentiellen Möglichkeiten der Gentherapie, die jedoch bislang auch aufgrund technischer Schwierigkeiten beim Gentransfer nur unzuverlässige Ergebnisse erbringen konnte (14,211).

1.3 Molekularbiologische Eigenheiten von Glioblastomen

1.3.1 Entstehung und Progression primärer und sekundärer Glioblastome

Aktuelle Hypothese ist, dass Astrozytome aus neuroepithelialen Vorläuferzellen entstehen, die sich während normaler Entwicklung zu Astrozyten differenzieren, zum Teil intrazerebral persistieren und im Verlauf entarten können (56,122). Dazu werden in typischer, wenn auch nicht spezifischer Weise, bestimmte Onkogene und Tumorsuppressorgene in Glioblastomen abnorm exprimiert (14). Es werden zwei Arten von Glioblastomen unterschieden, die auf unterschiedlichen genetischen Wegen entstehen, primäre und sekundäre Glioblastome (104). Primäre Glioblastome treten bevorzugt in höherem Alter auf, entstehen de novo und zeichnen sich durch einen kürzeren Krankheitsverlauf aus (246,247). Als typische genetische Alteration bestehen in 60-90%

der Fälle Deletionen des Chromosom 10p und 19q, die zum Teil mit Mutation des Tumorsuppressorgen PTEN/MMAC einhergehen (phosphatase and tensin homology“ oder „mutated in multiple advanced cancer“) (86,197). PTEN reguliert über PI-3-Kinase Zellproliferation, Überleben und Wachstum. Auch vermehrte EGFR-Aktivität führt zu proliferativ wirkenden Dysregulationen im PI-3-Kinase-Signalweg. EGFR wird vom Gen ERBB1 kodiert, welches in mehr als der Hälfte der Glioblastome überexprimiert wird (4). In 50-70% dieser wiederum liegt die natürlich vorkommende, stark proliferativ wirkende Transkriptionsvariante deltaEGFR (oder auch EGFRvIII und de2-7EGFR) vor, die, zum Teil konstitutionell aktiviert, das Wachstumspotential steigert (14,149). Des Weiteren können Amplifikation, Überexpression und/oder Mutationen des Retinoblastomgens RB1 zu proliferativ wirkenden Dysregulationen im normalen Zellzyklus führen. Das phosphorylierte Rb-Protein funktioniert normalerweise wie ein Schalter, der der Zelle erst nach erfolgtem Korrekturlesen erlaubt, in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten (29,30,84,85). Neoplastische Zellen können diese Kontrolle oft durch Mutationen im RB1-Gen umgehen (246).

In ähnlicher Weise können Dysregulationen in der p53-Signalkaskade zu einem Überlebensvorteil neoplastischer Zellen führen. p53 wird bei genetischen Schäden vermehrt exprimiert und initiiert entweder Reparaturmechanismen oder bei nicht zu behebenden DNA-Schäden den Zelluntergang. In vielen Tumoren, so auch in primären Glioblastomen liegen vermehrt Dysregulationen in der p53-Signalkaskade vor, z.B. von den Proteinen pARF14 oder mdm2. Die sonst greifende p53-induzierte Apoptose wird auf diese Weise inaktiviert (19,46,47,57,61,76,84,101,136,147,200,222,228). Mutationen in Genen, die an der p53-Signalkaskade beteiligt sind, wie p53, MDM2, P14ARF, sind in primären Glioblastomen jedoch mit nur 30%, im Vergleich zu 75% in sekundären Glioblastomen, eher selten nachzuweisen (84,85). Sekundäre Glioblastome entstehen schrittweise aus weniger malignen Vorstufen glialer Tumoren und sind auch bei jüngeren Patienten anzutreffen. Initiiert scheint dieser Prozess durch oben erwähnte Mutationen im P53-Gen zu werden, die in über 65% in niedrig-gradigen Astrozytomen anzutreffen sind. In weiteren Stufen kommen unter anderem ein Verlust des Chromosom 19q und Veränderungen im RB-Gen hinzu. Beim Übergang in maligne sekundäre Glioblastome finden sich zudem regelmäßig den primären Tumoren ähnliche Veränderungen: Verlust des Chromosom 10q,

PTEN-Mutationen (insgesamt wesentlich seltener), Verlust der DCC-Expression, sowie Amplifikation des PDGFR- α .(7,78,151,182,205,220)

1.3.2 Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren

Eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren vermag über spezifische Membranrezeptoren, vorwiegend mit Tyrosinkinase-Aktivität, den Übergang von Zellen in die G1-Phase des Zellzyklus zu steuern und somit Zellwachstum zu regulieren (248,249). Neoplastische Transformation kann auf jeder Stufe der Wachstumsfaktor-aktivierten Signalkaskade ausgelöst werden und Einfluss nehmen auf Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Migration und Angiogenese.

Verschiedene Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sind heute als Expressionsprodukte von Onkogenen identifiziert. Die Aktivierung der Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren erfolgt zum Teil durch simultane Produktion durch Tumorzellen und/oder umliegendes Gewebe, zum Teil auch durch konstitutive Aktivierung der Rezeptoren durch Mutationen (77,230). Als Beispiele sind unter anderen zu nennen: VEGF/VEGFR als Induktoren der Tumorangiogenese und das TGF Zielgen EGF/EGFR, das zusammen mit FGF/FGFR mitverantwortlich für neoplastische Transformation und Tumorentstehung ist (vgl. Kap.4.1) (66,110,142).

1.3.3 Angiogenese

Angiogenese bezeichnet Aussprossen neuer Kapillaren aus vorbestehenden Blutgefäßen durch Proliferation und Migration endothelialer Zellen und wird ebenfalls zum großen Teil über Wachstumsfaktoren vermittelt (45). Die gefäßumgebende Basalmembran wird dabei enzymatisch degradiert, damit endotheliale Zellen in die entstandenen Freiräume migrieren und neue Gefäße bilden können. Bei normalem Wachstum wird Angiogenese von pro- und antiangiogenetischen Faktoren streng reguliert (59). Durch ihr schnelles Wachstum sind Glioblastome auf zusätzliche Blutversorgung angewiesen. Dazu können sich die Tumorzellen zum einen vorbestehender Gefäße bedienen (Koooption). Zum anderen führen relative Ischämie und Hypoxie im Tumorgewebe gleichzeitig zu Expression proangiogenetischer Faktoren, wie VEGF, die zusätzlich Angiogenese induzieren (105,242). Die Notwendigkeit der Angiogenese für das Tumorwachstum und -zellüberleben will man sich mit anti-angiogenetischen Therapieansätzen zu Nutze machen. Allerdings weisen erste

Untersuchungen darauf hin, dass durch Blockade des VEGF, bzw. von VEGF-Rezeptoren Gliomzellen in ihrer Invasivität unterstützt werden und vermehrt vom Primärtumor entfernte Satelliten Tumoren auftreten (124,184).

1.3.4 Migration und Invasion

Invasion von Tumorzellen ist ein Prozess, der aus mehreren Einzelschritten besteht. Im Falle von Glioblastomen müssen die Tumorzellen zunächst über hirnspezifische Liganden Kontakt mit der extrazellulären Matrix (ECM) aufnehmen und diese dann mit Hilfe sezernierter proteolytischer Enzyme abbauen (16). Durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie VEGF und Scatter Factors/Hepatocyte Growth Factor und Epithelial Growth Factor (EGF), die entweder von den Tumorzellen oder von umgebendem Gewebe sezerniert werden, werden die Tumorzellen zur Migration angeregt (145). Einige dieser Faktoren sind überlappend bei Entstehung und Progression von Glioblastomen beteiligt (117). Zur Invasion müssen sich die Glioblastomzellen aus dem zusammenhängenden Verband der Tumorzellen lösen und mit Proteinen der ECM interagieren. Dieses geschieht vornehmlich über Adhäsionsmoleküle wie Integrine, Cadherine oder CD44. Durch ihre Fähigkeit zur Membransynthese und zur Interaktion mit vorbestehenden Strukturen können Glioblastomzellen Fortsätze in Richtung der erzeugten Lücken ausbilden und aktiv durch die ECM entlang vorbestehender Strukturen migrieren (60,64,65,163). Als Leitstrukturen dienen bevorzugt myelinisierte Fasern, sowie das Gefäß-umgebende Gewebe und die gliale Limitans Externa (59,60).

1.3.5 Proteasen

An der zur Invasion obligaten Degradation und auch Wiederherstellung der ECM sind diverse Proteasen beteiligt, die zum Teil von den Glioblastomzellen sezerniert werden. Entsprechende Studien haben Serinproteasen Plasminogen Aktivatoren (PA), Matrix Metalloproteinasen (MMP) und lysosomale Cystein-Peptidasen, sogenannte Cathepsine, als essentiell für Tumorprogression identifiziert (16,129,176). Ein Problem sublethaler Radiotherapie besteht unter anderem auch darin, dass Expression von MMP angeregt und dadurch möglicherweise die Invasivität von Gliomzellen gefördert wird (232).

Zusammen mit weiteren sezernierten Faktoren wie SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) und Brevican schaffen Proteasen ein für Tumorinvasion günstiges Milieu (150,181). Da diverse Signalwege als gemeinsame Endstrecke Proteaseaktivität anregen, könnte diese einen geeigneten Angriffsort für neue Therapien darstellen (176).

1.3.6 Immunmodulation

Dass sich gliale Hirntumore rasant intrazerebral ausbreiten können wird wahrscheinlich erheblich durch die Abwesenheit eines intrazerebralen lymphatischen Immunsystems begünstigt. Intrazerebrale Immunantworten gehen regulär nur von ortsständiger Mikroglia aus, der Übertritt lymphatischer Zellen wird normalerweise durch die intakte Blut-Hirn-Schranke verhindert. Für gezielte Immunantworten gegen Tumorzellen müssen Immunzellen außerhalb des ZNS aktiviert werden. Im ZNS wirken wiederum immunantagonisierende Mechanismen dem aktivierten Immunsystem entgegen, um immunvermittelten Schäden im ZNS vorbeugen zu können (50). Darüberhinaus ist Gliomzellen die Fähigkeit zueigen, das Immunsystem zusätzlich über diverse immunsuppressive Zytokine, wie TGF β , IL-1 α und β , IL-6, IL-10 und GM-CSF zu modulieren (41).

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Expressionsanalysen sollen zum Verständnis molekularer Mechanismen von Tumorprogression beitragen und neue Perspektiven für effektive Therapiestrategien eröffnen (116,221).

Es gibt Hinweise, dass sich Glioblastome aus neuronalen Stammzellen entwickeln und dementsprechend Migrationsmechanismen neuronaler Vorläuferzellen aus früheren Entwicklungsstufen imitieren, wodurch sich die Tumorzellen auf diese Weise ungestört entlang anatomischer Strukturen in gesundem Hirngewebe ausbreiten können. Dafür spricht, dass einige spezifische Antigene unreifer Hirnzellen in undifferenzierten, anaplastischen Glioblastomzellen nachzuweisen sind (227,241). Eine normale Zelldifferenzierung erfolgt über spezifische Genexpression und ist abhängig von Alter, Gewebe, zellulärer Umgebung und der physiologischen Rolle. Embryonale Zellen haben die Möglichkeit, schnell zu proliferieren, extensiv zu migrieren, Enzyme zu produzieren, Basalmembranen zu degradieren und Faktoren zu sezernieren, die die lokale

Blutversorgung erhöhen. Viele dieser Charakteristiken sind ihnen mit glialen Tumorzellen gemein. Der Verlust eines hohen Differenzierungsgrades oder Reaktivierung embryonaler Genexpressionsmuster in Erwachsenen können Zellen maligne Eigenschaften verleihen (246,248).

So sollte mit dieser Arbeit untersucht werden, ob Entstehung und invasives Wachstum von Glioblastomen möglicherweise auf evolutionär konservierten Prozessen basieren könnte, die bekanntermaßen in embryonalen Entwicklungsprozessen eine Rolle spielen.

Ausgangspunkt waren Erkenntnisse über das ZNS der *Drosophila melanogaster*, das bezüglich Entwicklung, Genexpression und -funktion relativ gut erforscht und verstanden ist. Aufgrund von zellulären, strukturellen und molekularen Ähnlichkeiten, wird das ZNS der *Drosophila melanogaster* gerne als Modell für das wesentlich komplexere Vertebraten ZNS genommen. Als eines der Kriterien für die Vergleichbarkeit gilt das Vorkommen von neuronalen und glialen Zellen, die symmetrisch angeordnet sind und zum Teil die Mittellinie überkreuzen. Grundlegend für diese Arbeit ist die Erkenntnis, dass gliale Zellen entscheidende Funktionen in embryonaler ZNS-Entwicklung übernehmen und gliale Fehlfunktionen zu spezifischen Missbildungen innerhalb des ZNS führen. Gliale Zellen gelten als Leitstrukturen für neuronale Aussprossungen und können diese durch sezernierte Signalfaktoren auch über lange Strecken passgenau in das neuronale Netzwerk des ZNS integrieren. Funktionsfähige Glia ist zudem eine Voraussetzung für die Differenzierung zu intakten Nervenzellen (119).

Anhand einer Reihe identifizierter Gene der *Drosophila melanogaster* mit Funktion in glialen Wachstums- und Migrationsprozessen wurden Expressionsmuster humaner homologer Gene in Glioblastomen auf der Ebene der Genexpression mittels RT-PCR untersucht. So sollen Hinweise auf Unterschiede in evolutionär konservierten Entstehungs- und Invasionsmechanismen von Tumorzellen im Vergleich zu gesundem Hirngewebe aufgedeckt werden. Die ausgewählten Gene der *Drosophila* (kursiv in Großbuchstaben) sind: *BREATHLESS*, *GLIOTACTIN*, *KÄSTCHEN (LIV-1)*, *LOCO*, *NONSTOP*, *ROBO* und *SCHIZO*.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Malinckrodt Baker, Holland
Ethidiubromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 37%-ig, mit CaCO ₃ stabilisiert, (pH > 5)	Roth, Karlsruhe
Formamid, de-ionisiert	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Isopropanol	Braun AG , Melsungen
TRIS	Merck, Darmstadt
Trizol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sonstige Chemikalien für Molekularbiologie	Roche Applied Science, Mannheim Sigma, Deisenhofen QIAGEN GmbH, Hilden
Allgemeine Laborchemikalien und Lösungsmittel* in p.a. Qualität	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe

*für RNA-Arbeiten sind alle Lösungen sind in DEPC-H₂O angesetzt: dazu wurde zu Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Leitfähigkeit < 0,055 µS) mit 1ml/l DEPC vermengt, über Nacht gerührt und abschließend autoklaviert.

2.1.7 *Eukaryotische Zelllinien*

- **U87**, eingefroren am 26.06.2001
Humane Zellen eines Malignen Glioblastom einer weiblichen Patientin.
Vgl. Acta Path Microbiol Scan 1968;74:465
- **U343**, eingefroren am 26.06.2001
Vgl.: Med Biol 1978;56:184
- **U373**, eingefroren am 31.07.2002
Humane Glioblastomzellen eines 61- jährigen männlichen, kaukasischen Patienten
Vgl. Acta Pathol Microbiol Scand 1968;74:465-486
- **86 HG 39**, eingefroren am 08.02.2001
wurden uns freundlicher Weise überlassen von Dr. H. Halfter, Neurologie, Uniklinik Münster.
Vgl. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1991.;418 (4): 281-93

2.1.8 *Geräte und sonstige Hilfsmittel*

Sterilbank Hera Safe HS12	Heraeus, Hanau
Lumat 9507 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau
Tiefkühltruhe (-80°C)	Thermo Life Science, Egelsbach
Mikrodismembrator	Braun Biotech, Melsungen. Germany
Mikroskop BX50	Olympus, Japan
Photometer Gene Quant II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortexer	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Allgemeine Laboratoriumsmaterialien	Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nürnbergrecht; Biozym, Hess. Oldendorf

2.2 Methoden

2.2.1 *BLAST-Recherche*

Als Ausgangspunkt für die BLAST-Recherche nach humanen Homologen migrationsassoziiierter Gene, wurde in Zusammenarbeit mit Hr.Univ.-Prof.Dr.C. Klämbt (Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie WWU Münster) eine Liste an identifizierten Genen der *Drosophila melanogaster* erstellt, die als migrationsassoziiert identifiziert worden waren.

Die Namen dieser Gene wurden unter „NLM pubmed“ eingegeben (<http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html>) und bereits bestehende Registrierungen und Gensequenzen auf verschiedenen Datenbanken (GeneBank, UniGene, LocusLink) ermittelt. Für jedes der Gene wurde die jeweilige cDNA-Sequenz von *Drosophila melanogaster* unter der „NCBI-BLAST“-Funktion „Nucleotide query-proteine db“ eingegeben. Aus den Suchergebnissen an Homologen sämtlicher Spezies wurde eine Liste der maximal zehn erst-aufgeführten humanen homologen Gene erstellt. Als Mindestmaß der Übereinstimmung wurde ein e-Wert von maximal $2e-28$ festgelegt. Dieser entsprach der geringsten Übereinstimmung des *Drosophila melanogaster*-Gens „*LOCO*“ mit dem humanen „*RGS12*“-Gen.

Für das Gen *SCHIZO* war zum Zeitpunkt der Arbeit weder die genaue Funktion noch eine homologe Sequenz bekannt. In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Klämbt ergaben sich erste Hinweise auf eine Homologie zu humanen ARF6b, bzw. EFA6B, woraufhin in dieser Arbeit Expression von EFA6B untersucht wurde. Eine nachträgliche BLAST-Suche bestätigte eine gewisse Übereinstimmung von *schizo* zu EFA6B.

Letztendlich wurde eine Liste der bei der Homologensuche erhaltenen Gene erstellt, die als Grundlage für die Primersuche diente.

2.2.2 *Auftauen und Anzüchten humaner Gliomzelllinien*

Die Expressionsanalysen wurden in einem Ansatz an etablierten humanen Glioblastomzelllinien durchgeführt, die in flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert vorlagen.

Vorgehen:

Die Kryoröhrchen mit den Zelllinien wurden unter Einhaltung von Schutzmaßnahmen (Schutzbrille und Handschuhe) aus der -80°C Kühltruhe entnommen und zum Transport auf Eis gelegt. Die Kryoröhrchen wurden umgehend in ein 37°C warmes Wasserbad zum Schmelzen überführt und anschließend mit Ethanol (70%) desinfiziert. Die aufgetauten Zellen wurden resuspendiert und je 1ml in ein vorbereitetes Sarstedt-Röhrchen mit 9ml Medium pipettiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 5min. bei 25°C und 500xg Beschleunigung zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die erhaltenen Pellets in je 5ml Medium resuspendiert und in je eine Kulturflasche (75cm²) überführt. Als letztes wurde die Flaschen mit je 10ml Medium aufgefüllt und in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Am folgenden Tag wurden die Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert und ein Mediumwechsel vorgenommen. Ein zweiter Mediumwechsel erfolgte vier Tage nach dem Auftauen. Dabei wurden die Flaschen vor dem Auffüllen mit je 15 ml frischem Medium jeweils mit 5ml PBS-Puffer pro Flasche unter vorsichtigem Schwenken gespült.

2.2.3 RNA-Isolierung aus Zelllinien

Das Vorgehen folgte dem Protokoll aus dem RNeasy Mini Handbook (Qiagen) zum Abernten einer Monolayer-Zellkultur. Pro Zellkulturflasche (75cm²) wurden 600µl Buffer RLT aus dem RNeasy-Kit angesetzt und mit jeweils 6µl β-Mercaptoethanol versetzt (gemäß vorgegebenem Verhältnis von 10µl β-ME auf 1ml Buffer RLT).

Sobald lichtmikroskopisch ein locker konfluierendes Wachstumsmuster der Zelllinien zu erkennen war, wurde das Medium zunächst vorsichtig abgesaugt. In jede Zellkulturflasche wurden 600µl Buffer RLT mit β-Mercaptoethanol gegeben, wodurch die Zellen von ihrem Untergrund gelöst wurden und mit einem Plastikschaber abgerntet werden konnten. Die Zelllinien wurden getrennt in 15ml Röhrchen überführt. Nach 30s Vortexen wurden je 600µl Ethanol (70%) zu den Zellen gegeben und das Gemisch durch mehrmaliges pipettieren gut durchmischt.

Jeweils 700µl der einzelnen Proben wurden in je eine RNeasy Säule pipettiert, welche sich in einem 2ml Sammelröhrchen (ebenfalls aus dem RNeasy- Kit) befand, und die Gefäße verschlossen für 15s bei 8000xg zentrifugiert. Der im Sammelröhrchen

aufgefangene flüssige Überstand wurde verworfen. Der zuletzt beschriebene Schritt (zentrifugieren und Überstand verwerfen) wurde so oft wiederholt, bis das Lysat aus den Röhren vollständig abzentrifugiert war.

Im Anschluss wurden 700µl Buffer RW1 (aus dem RNeasy- Kit) in die Säule gegeben und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, der aufgefangene Überstand verworfen. Für das weitere Vorgehen wurde das alte Sammelröhrchen durch ein neues ersetzt, die Säule beibehalten. In die Säule wurden nun 500µl Buffer RLT (aus dem RNeasy-Kit) pipettiert und wiederum für 15s bei 8000xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen. Nach erneuter Zugabe von 500µl Buffer RLT wurde bei 8000xg über 2min zentrifugiert, die RNeasy Säule in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, noch ein Mal für 1min zentrifugiert und Flüssigkeitsreste aus der Säule entfernt.

Zur Elution der isolierten RNA wurde die RNeasy Säule in ein neues Sammelröhrchen überführt und zwei Mal in Folge 50µl RNase-freies Wasser direkt auf die RNeasy-Membran pipettiert, das Gefäß verschlossen und für 1min bei 8000xg zentrifugiert.

Die so isolierte RNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.2.4 RNA-Isolierung aus Gewebeproben

Des Weiteren wurden für die Expressionsanalysen kryokonservierte Gewebeproben von Glioblastopatienten herangezogen.

Vorbereitung:

Die Zentrifugentemperatur wurde auf 4°C vorgekühlt, ein Gefäß mit Eis vorbereitet, je drei Eppendorf-Tubes pro Probe beschriftet und alle notwendigen Reagenzien und Geräte unter einen Arbeitsplatz mit Abzug gestellt. Die Gewebeproben waren sofort nach der operativen Entfernung in der Tumorbank des Instituts für Neuropathologie der Uniklinik Münster archiviert worden und lagerten bis zur Verarbeitung bei -80 °C. Nach Entnahme bis zur Verarbeitung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert.

Homogenisieren mit dem Mikrodismembrator:

Das Gefäß des Mikrodismembrators wurde durch flüssigen Stickstoff auf Gefriertemperatur gehalten. In das Gefäß und in ein Eppendorf-Gefäß wurden je 0,8ml Trizol pipettiert und weiter mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Probe und eine zugehörige Metallkugel wurden im verschlossenen Behälter in den Mikrodismembrator

eingespannt und über 2min bei 2000rpm zertrümmert. Die erhaltene rosa Masse wurde im Trizol-gefüllten Eppendorf-Gefäß über 5min bei Raumtemperatur belassen.

Phasentrennung:

Anschließend wurden 0,3ml Chloroform hinzugefügt, 20s gevortext und 2-3min bei RT stehen gelassen, bevor das Gemisch über 15min erneut zentrifugiert wurde (4°C, 13000rpm), wodurch eine Auftrennung in 3 Phasen erfolgte:

(von oben nach unten)

klar: RNA-haltig, ca. 60% der Trizolmenge

weiß :DNA

rot : Trizol mit Lipiden, Proteinen, etc.

Die RNA-Phase wurde vorsichtig in ein zweites Eppendorf-Gefäß pipettiert. 500µl Trizol und 100µl Chloroform wurden hinzugefügt und das Gemisch für 10-20s gevortext, bis der Inhalt ein homogen-milchiges Aussehen aufwies. Nach erneutem Zentrifugieren über 15min (4°C, 13000rpm) erhielt man zwei Phasen, von denen wiederum die obere, RNA-haltige in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen wurde.

Fällen:

Zu der gewonnenen RNA-haltigen Flüssigkeit wurden 800µl Isopropanol gegeben, das Gemisch geschüttelt und 10min bei Raumtemperatur belassen. Im Anschluss daran wurde für 25-30min zentrifugiert (4°C, 13000rpm) und der Überschuss verworfen. Das am Boden haftende Pellet blieb im Eppendorf-Gefäß zurück.

Waschen:

Das Pellet wurde in 1ml Ethanol 80% (in DEPC-H₂O) unter vorsichtigem Schütteln gelöst und über 15min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Ethanol-Überstand wurde abgegossen und das Pellet vor dem Trocknen noch einmal gewaschen.

Lösen:

Das RNA-Pellet wurde in 20µl DEPC-Wasser gelöst und bei -80°C eingefroren.

2.2.5 RNA aus humanem Kortex, normal

Das Material wurde freundlicherweise von Frau Dr. K. Keyvani und U. Botschen (Institut für Neuropathologie der Universität Münster) zur Verfügung gestellt und konnte direkt zur cDNA-1ststrand-Synthese verwendet werden.

2.2.6 *Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung*

Je 99µl RNase-freies Wasser und 1µl der zu analysierenden Probe, bzw. 100µl RNase-freies Wasser zur Eichung des Photometers bei Messbeginn wurden nacheinander in die vorgesehene Quarz-Küvette pipettiert und die einzelnen RNA-Konzentrationen spektrophotometrisch durch Absorptionsmessung bei 260nm bestimmt. Eine Absorption von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40µg/ml. Die Reinheit der Probe wurde durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260nm zu 280nm überprüft. Bei einem Quotienten von 1,8-2,0 liegt die Reinheit bei 70-95%.

2.2.7 *RNA-Gelelektrophorese*

Für 500ml des MOPS- Puffers wurden zunächst 23,1g MOPS Puffer in 350ml DEPC-Wasser gelöst, 80ml 0,5M Natriumacetat-Lösung (pH= 7,0; DEPC) hinzugegeben und mit 2N NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Vor dem Lösen wurde der pH-Wert von 20ml 0.5M EDTA- Lösung mit DEPC-Wasser auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt, danach mit DEPC-Wasser auf 500ml aufgefüllt und steril filtriert. Die Lösung wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Als Elektrophoresepuffer wurde 1-fach MOPS-Puffer verwendet (50ml 10x MOPS + 500ml DEPC-Wasser).

Gießen des Gels:

Unter Aufkochen (unter einem Abzug) wurden 1,0g Agarose in 290ml DEPC-Wasser gelöst, 10-fach MOPS-Elektrophoresepuffer hinzugefügt und die Lösung auf 65°C abgekühlt. 18ml Formaldehyd (an einem Arbeitsplatz mit Abzug) wurden hinzugegeben und das Gemisch zum Erkalten in einen vorbereiteten Gelträger gegossen.

Probenmix erstellen: (unter dem Abzug)

Für den Probenmix wurden 150µl DEPC-Wasser, 150 µl 10-fach MOPS-Puffer, 200µl Formaldehyd, 500µl Formamid und 1µl Ethidiumbromid in einem Gefäß vorbereitet.

Vorbereitung der RNA- Proben:

1µg der gewonnenen RNA wurden auf ein Volumen von 5µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und 10µl Probenmix hinzugegeben. Das Gemisch wurde bei 65°C zum Denaturieren in ein Wasserbad gegeben und nach 5min auf Eis abgeschreckt. 3µl des Bromphenolblau-Auftragspuffers wurden hinzugefügt, das Gemisch gevortext und kurz zentrifugiert.

Das erhärtete Gel wurde in die mit 1-fach MOPS gefüllte Kammer gesetzt. Nach einem Vorlauf über 15min bei 30V wurden die Geltaschen mit der 1-fach MOPS-Lösung gespült und im Anschluss mit je 18 μ l der RNA-Proben gefüllt. Die Laufzeit des Gels betrug 40min bei 90V. Die Banden wurden in einer Dunkelkammer unter UV-Licht sichtbar. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden das „GDS 7500 Gel Documentation System“ und die „Imagestore 7500 Software“ der Firma UVP (Cambridge, England) eingesetzt.

2.2.8 First-Strand cDNA-Synthese

Folgende Materialien wurden zunächst aufgetaut, kurz gevortext und zentrifugiert:

- RNA-template (auf Eis)
- Primer solutions
- 10-fach Buffer RT, dNTP, RNase-freies Wasser (bei RT)

Der benötigte RNase-Inhibitor wurde mit einer Konzentration von 10Units/ μ l angesetzt:

10-fach Buffer RT wurde im Verhältnis 1:9 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. 1 μ l RNase- Inhibitor mit einer Konzentration von 40Units/ μ l wurden mit 3 μ l des nun 1-fach Buffer RT versetzt, um die benötigte Konzentration von 10Units/ μ l zu erhalten.

Für den Mastermix wurde das RNase-Inhibitor-Buffer RT-Gemisch auf Eis gelegt und folgende Substanzen hinzugefügt:

<u>Substanz/Ansatz</u>	<u>Pro Ansatz + 10% (μl)</u>	<u>Für 4 Ansätze (μl)</u>
10-fach Buffer RT (2 μ l)	2,2	8,8
dNTP Mix(2 μ l)	2,2	8,8
Oligo dT Primer (2 μ l)	2,2	8,8
RNase-Inhibitor	-	4
Omniscript rev. Transkriptase (1 μ l)	1,1	4,4

Tabelle 1: Ein MASTERMIX-Ansatz für die cDNA Synthese betrug 8 μ l. Es wurden je 10% Zusatzvolumen angesetzt.

Zur cDNA-first strand Synthese wurden zu den 8µl Mastermix 12µl RNA gegeben, in denen maximal 2µg RNA enthalten sein durften. Sofern 2µg RNA in weniger als 12µl enthalten waren, wurde das Restvolumen durch RNase-freies Wasser ergänzt.

Zur Berechnung der Volumina der RNA- templates und des RNase- freien Wassers:

$$V(\text{template}) = 2\mu\text{g} / \text{conc.}(\text{template})$$

V = Volumen(µl)

conc. = Konzentration (µg/µl)

$$V(\text{H}_2\text{O}) = 12\mu\text{l} - V(\text{template})$$

<u>Zelllinie</u>	<u>RNA- Konzentration(g/l)</u>	<u>V (template) (µl)</u>	<u>V(H₂O) (µl)</u>
U373	0,176	11,36 *	-
86HG39	0,187	10,7	1,3
U87 (3.1)	0,222	9	3
U343	0,629	3,2	8,8

Tabelle 2: Eingesetztes RNA-Volumen zur cDNA-Synthese

* hier wurden 12µl des templates eingesetzt, die Mengenüberschreitung über die vorgegebenen 2µg dabei in Kauf genommen.

Nach dem Ansetzen wurde die Lösung gevortext und zentrifugiert. Nach 60min Inkubationszeit im Wasserbad bei 37°C wurden die cDNA Proben bei -20°C eingefroren.

2.2.9 RT-PCR mit HOT STAR TAQ DNA Polymerase

2.2.9.1 Primer

Die Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms „primerview“ des Herstellers „Scientific & Educational Software“ (State Line, USA) entworfen. Die cDNA-Sequenzen der homologen humanen Gene wurden in das Programm eingegeben und manuell nach Primern abgesucht.

Die zu erfüllenden Bedingungen für die Primer waren folgende:

- 3 Primerpaare pro Gen
- Lage innerhalb der Exon-Sequenz
- Eine zu amplifizierende Basenpaarlänge von ca. 300 Aminosäuren
- GC-Anteil von 50% bis max. 60%
- Annealing-Temperatur optimum zwischen 68-73°C
- Keine Tertiärstrukturen in Form von Haarnadeln
- Keine Dimere

Primer aufbereiten

Die lyophilisierten Primer wurden mit dem entsprechenden Volumen DEPC-Wasser für eine Konzentration von 100 pmol/µl gelöst, gevortext und zum Auflösen ca. 15min bei RT stehen gelassen. Für die RT-PCR wurde die 100µmolare Stammlösung 1:10 verdünnt: Zu 90µl Wasser wurden je 10µl der Stammlösung in ein neues Eppendorf-Röhrchen pro Primer pipettiert, gevortext und der nun 10µmolare Ansatz bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

2.2.9.2 Ermitteln der optimalen Annealing Temperatur

10-fach PCR Puffer, dNTP-Mix, die Primer-Lösungen und 25mM MgCl₂ wurden vollständig aufgetaut und vor dem Pipettieren kurz gevortext.

Pro Primerpaar wurde ein Mastermix für 5 Proben (vier Zelllinien und eine Kontrolle ohne Zelllinien) in jeweils 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen auf Eis angesetzt und kurz gevortext. Die Zusammensetzung des Mastermix wurde aus dem Hot Star Taq PCR-Handbuch übernommen.

<u>MASTERMIX</u>	<u>Vol/Ansatz (µl)</u>	<u>Volumen für 5 Ansätze(µl)</u>	<u>Gesamtvolumen + 10%(µl)</u>
10-fach PCR Buffer	10	50	55
dNTP-Mix	8	40	44
Polymerase	0,5	2,5	2.75
Primer forward	1	5	5.5
Primer reverse	1	5	5.5
Aqua dest.	78,5	392,5	431,75
Gesamtvolumen (µl) (ohne cDNA-template)	99	495	544,5
cDNA-template	Je 1µl (0,01 µg)		

Tabelle 3 100µl Mastermix Ansatz für RT-PCR im Grading Cycler. Das Gesamtvolumen mit 10% Überschuss wurde für kleine Pipettierverluste eingeplant.

Das Volumen Aqua dest. war aus der Differenz von 100µl pro Ansatz und dem Volumen der eingesetzten Zutaten zu errechnen und wurde als letztes hinzugegeben.

Pro Zelllinie wurden 99µl des Mastermixes in ein 0,2ml-Eppendorf-Gefäß gegeben.

und je 1µl des entsprechenden cDNA-templates hinzupipettiert. Dieser Ansatz wurde zu gleichen Anteilen von je 20µl auf 4 weitere Eppendorf-Gefäße verteilt, um die RT-PCR im Grading Cycler bei verschiedenen Temperaturen laufen zu lassen. Die Kontrollen ohne Zelllinie wurden je 20µl in fünf weitere Eppendorf-Gefäße gegeben und zu den anderen Proben in den Cycler eingeordnet.

2.2.9.3 RT-PCR-Protokoll

	<u>Dauer</u>	<u>Temp.</u>	<u>Vorgang</u>
Initiale Aktivierung	15min	95°C	Polymerase wird aktiviert
3-Schritt-Zyklus	Insgesamt finden 35 Zyklen statt		
Denaturation	1min	94°C	cDNA wird zu 2 Einzelsträngen
Annealing	1min	X°C +/- 4,0°C	Anlagerung der Primer X= angegebene optimale Temperatur
Extension	1min	72°C	Komplementäre Amplifizierung der Primer-spezifischen Sequenz
Abschließende Extension	10min	72°C	

Tabelle 4 Einstellung des Cyclers für die RT-PCR mit Hot Star Taq DNA-Polymerase. X= von der Firma MWG angegebenes Temperaturoptimum der Primer

Die je nach Zusammensetzung und Struktur der Primer von der MWG Biotech AG angegebenen spezifischen Temperaturen lagen ca. 10°C unter denen, die mit dem Programm „primerview“ ermittelt waren und variierten zwischen 57°C und 61°C. Nach der letzten Extension wurden die Proben im PCR Cycler bei 4°C gekühlt bis sie aus dem Gerät zur Weiterverarbeitung entnommen wurden.

2.2.9.4 RT-PCR der Zelllinien und Biopsate

Die RT-PCR für die Untersuchung der Genexpression wurde mit dem Hot Star Taq DNA Polymerase-Kit bei nur einer Annealing-Temperatur standardisiert durchgeführt. Material und Arbeitsschritte entsprachen den oben beschriebenen. Der Mastermix wurde 12 Mal pro Primerpaar angesetzt. Der 13. Ansatz diente als Überschuss bei kleinen Pipettierverlusten.

MASTERMIX	Volumen/Ansatz (µl)	Volumen für 13 Ansätze(µl)
10-fach PCR Buffer	5	65
dNTP- Mix	4	52
Polymerase	0,25	3,25
Primer forward	0,5	6,5
Primer reverse	0,5	6,5
Aqua dest.	38,75	503,75
Gesamtvolumen (µl) (ohne cDNA-template)	49	637
cDNA- template	Je 1µl (0,01 µg)	

Tabelle 5: Mastermix für 12 PCR Ansätze pro Primerpaar für cDNA aus 4 Zelllinien, 6 Glioblastom-Biopsaten, Normalkortex (Broca Region) und einer Kontrolle ohne cDNA.

Von dem Gesamtvolumen wurden je 49µl in 12 Eppendorf-Gefäße pipettiert. Zuletzt wurde je Ansatz 1µl des entsprechenden templates zu dem Mastermix gegeben.

2.2.10 Gelelektrophorese

Gel:

2,8g Agarose wurden zusammen mit 120ml Laufpuffer aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war. In die abgekühlte Lösung wurden 5µl Ethidiumbromid pipettiert und noch in flüssigem Zustand in eine austarierte Gelkammer mit Platzhaltern für 20 Kammern à 0,75mm Stärke gegossen und zum Erkalten und Aushärten stehen gelassen.

Elektrophorese:

Den einzelnen PCR-Proben wurden mit je 1/5 Volumen 5-fach Bromphenolblau-Auftragspuffer versetzt und kurz gevortext. Die Gelkammern wurden mit je 15 µl PCR-Probe gefüllt. Pro Reihe wurde in eine Kammer SmartLadder (Größenstandard 200bp) pipettiert. Das Gel wurde in eine mit 1-fach Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben und für 35min unter 100V Spannung bei 40A gesetzt bis der PCR-Farbstoff eine Laufweite von ca. 3cm aufwies.

2.2.11 Auswertung

Die PCR-Banden wurden unter UV-Licht beurteilt: Durch die PCR im Grading Cycler wurde anhand der optischen Qualität der Banden die weiter zu verwendenden Primerpaare und deren optimale Annealing-Temperatur bestimmt, so dass nur ein Primerpaar pro Gen bei den weiteren PCR-Ansätzen verwendet werden konnte. Ferner wurde überprüft, ob die erwartete Fragmentgröße des Amplifikats korrekt war.

Die Beurteilung der Expression von homologen Genen in den verschiedenen Glioblastomproben kann aus diesem PCR Ansatz grundsätzlich nur qualitativ erfolgen.

3 Ergebnisse

3.1 BLAST-Recherche

Aus der BLAST-Recherche ergaben sich zu den ausgewählten Genen der *Drosophila melanogaster* höchste Übereinstimmungen zu humanen Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFR1 und FGFR2), Neuroliginen, ZIP-Zink Transportern (KIAA1265 und LIV-1), Regulatoren der G-Protein Signalkaskade (RGS), Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBP22 und UBP41), dem humanen Gen Roundabout, sowie zu dem Adenosin-Ribolisations-Faktor 6-EFA6 (ARF-EFA6). Als Maße für die Übereinstimmung zwischen den bekannten Gensequenzen der *Drosophila melanogaster* und deren humanen Homologen dienen die prozentualen Werte für Identität (identische Übereinstimmungen) und Positivität (identische und positive Übereinstimmungen, gemäß der Kriterien der BLAST „Scoring matrix“). Diese werden durch den e-Wert („expected value“) relativiert. Er gibt an, wie wahrscheinlich es ist, dass die gefundenen Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen auf Zufall beruhen und nimmt optimalerweise den Wert Null an. Der e-Wert nimmt mit zunehmender Zahl an einzelnen Übereinstimmungen zwischen zwei Sequenzen ab. Für Analysen kurzer Sequenzen hingegen ergeben sich eher hohe Werte, da hier zufällige Übereinstimmungen wahrscheinlicher sind.

Dros.-Gen (pubmed)	Humane Homologe (pubmed)	Kürzel	Homologe		AS	e-Wert
			Idt.	Pos.		
<i>BREATH-LESS</i> (X57746)	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 IIIb (M97193)	FGFR2	39%	53%	663	e-119
	Human fibroblast growth factor receptor-1(M34641)	FGFR1	38%	52%	667	e-116
<i>GLIO-TACTIN</i> (L39083)	Homo sapiens neuroligin 2 (AF376802)	NLGN2	30%	45%	648	2,00e-69
	Homo sapiens neuroligin 3 (NM_018977)	NLGN3	31%	44%	614	4,00e-67
	Homo sapiens neuroligin1 (KIAA1070) (NM_014932)	NLGN1	30%	44%	610	5,00e-66

Dros.-Gen (pubmed)	Humane Homologe (pubmed)	Kürzel	Idt.	Pos.	AS	e-Wert
<i>KÄST-CHEN*</i>	(XM_047707)	KIAA1265	31%	46%	523	2,00e-57
	estrogene regulated LIV-protein (NM_012319)	LIV-1	58%	78%	155	2,00e-44
<i>LOCO</i> (AF130745) (AF130744)	Homo sapiens regulator of G protein signaling 12 (AF030109)	RGS12	28%	46%	408	4,00e-42
	Homo sapiens regulator of G protein signaling 14 (AF037195)	RGS14	52%	70%	137	8,00e-30
<i>NONSTOP</i> (AF179590)	Homo sapiens ubiquitin-specific protease 22 KIAA1063(AB028986)	USP22	48%	61%	526	e-136
	Homo sapiens ubiquitin-specific protease UBP41 (AF069574)	UBP41	33%	46%	437	e-40
<i>ROUND-ABOUT</i> (AF040989) (AF312579) (AF312580)	Homo sapiens roundabout 1, (NM_133631)	ROBO1	35%	52%	880	e-145
	Homo sapiens roundabout, axon guidance receptor, homolog 2 (Drosophila), (XM_031246)	ROBO2	38%	53%	717	e-131
	Human neogenin mRNA, (U61262)	Neogenin	26%	39%	710	4,00e-59
<i>SCHIZO**</i>	Adenosin-Ribolisation-Factor6-EFA6	ARF6-EFA6				

Tabelle 6 Ergebnisse der Homologiensuche.

Idt = Identität, Maß für identische Sequenzen, **Pos**=Positivität, Maß für Übereinstimmungen, **AS**=Anzahl der Aminosäuren, **e-Wert**=Maß der Homologie, bei identischen Genen nimmt der e-Wert die Zahl 0 an.

*= siehe Anhang

** Analysen des ARF6-EFA6 beruhen auf ersten Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof.Dr.C.Klämbt (Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie WWU Münster)

3.2 Primer

Mit Hilfe des Programms „primerview“ wurden die unten stehenden Primer in 5'-3'-Richtung entworfen, die reversen Primer komplementären Strang zur Ausgangssequenz entworfen. Die Länge der zu amplifizierenden PCR-Sequenz lag zwischen 200 und 400 Basenpaaren. Das Temperaturoptimum (°C) wurde im Grading Cycler ermittelt (siehe Kap. 2.2.9.3).

Homolog	Position	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Seq.	(°C)
FGFR1	1300-1696	tccagtgcacatgaactc	ggcactaccacgatgaca	396	59,5
FGFR2	1917-2278	agctcctccatgaactccaa	gtgcaggctccaagaagatt	361	59,5
NLGN2	1239-1683	tgtggacaacctgtatggct	cttgggtggatgaactgg	444	60,5
NLGN3	1889-2150	atgctcagtgtctgctcat	ggaacatgcatgcaggttg	261	58,5
NLGN1	2599-2923	gtacctgtcacgtcagcctt	cctcatgtggatgaatggac	324	57,5
KIAA1265	2234-2553	ggcttacataggcatgctca	gctgcatggaacattctcg	289	58,2
LIV- 1	1260-1557	agctctaggaggcctgtatt	ctgtggatgagcatgagcta	297	60,6
RGS12	500-746	ggtgtccgctacttctctga	gctgctccttgaacatgtct	246	60,6
RGS14	640-966	aagtctacctggtggcaatga	ttggagatctcacacctgg	356	57,5
USP22	422-719	tgattctgcctctactgt	gtgcagttcgaggtgatctt	297	58,2
UBP41	742-960	ctccatctgaagcggttctc	agtgtgccattctcctgtcc	218	58,2
Robo1	2542-2861	tacagtgtggaagtggcagc	tcgcctcctctctgtaagt	319	59,5
Robo2	2672-2944	aggtcttctcaatgctggtg	atctgtgtcgtggcatatgg	272	58,8
Neogenin	173-485	acgcggtggatacactctca	gaggaaggttctggttgct	312	60,6
EFA6B	2550-2847	cacgcattacaccaagaagc	cggcaggttctctgtagat	297	60,6

Tabelle 7: Die ermittelten Primersequenzen zu den in Tabelle 1 aufgelisteten homologen Genen. Die amplifizierte Sequenzlänge (Seq.) betrug zwischen 200 und 400 Nukleinsäurepaaren.

3.3 RNA-Gelelektrophorese

Nach der Isolierung der RNA wurde mit der Gelelektrophorese überprüft, ob die Extraktion erfolgreich war. Die untereinander stehenden Banden stellen 18S und 28S RNA dar. Durch eine Negativkontrolle konnten Verunreinigungen ausgeschlossen werden. In allen Proben lag reine RNA in ausreichender Menge vor, so dass die cDNA-Synthese angeschlossen werden konnte.

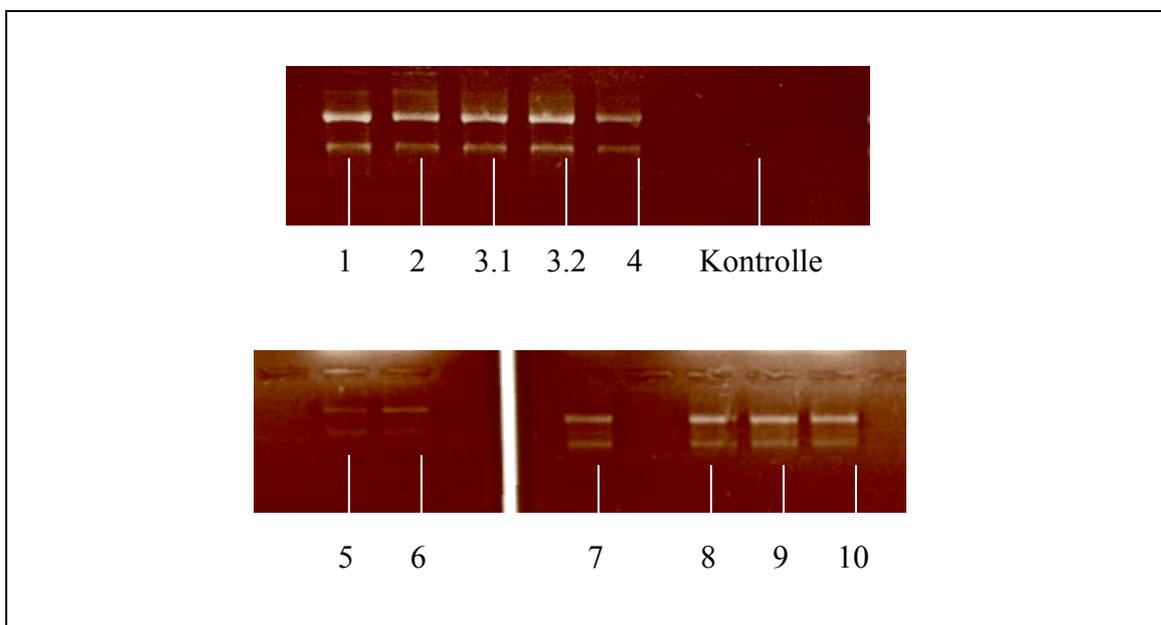


Abbildung 1: RNA-Gelelektrophorese mit 18S RNA (unten) und 28S RNA (oben). 1-4: Zelllinien (U373, 86HG39, U87(in zwei Fraktionen 3.1 und 3.2), U343), 5-10: Glioblastombiopsate. In allen Proben ist reine RNA vorhanden, die Negativ-Kontrolle schließt Verunreinigungen aus.

3.4 PCR-Ergebnisse

Legende für die Abbildungen der PCR-Gele:

1-4: Glioblastom-Zelllinien: **1-** U373 MG, **2-** 86HG39, **3-** U87MG, **4-** U343MG

5-10: Biopsate primärer Glioblastome (WHO IV) (**GBM**)

11 : Humaner Hirnkortex aus der Broca Region (**NH**)

12 : PCR-Kontrolle (**Ko.**) ohne DNA-Probe

13 : DNA-Kontrolle (DNA-Ko.)

***** : Smart Ladder Marker

Seq.: Amplifizierte Sequenzlänge (Anzahl der Nukleinsäurepaare)

3.4.1 GAPDH-Kontrolle

Nach dem DNase-Verdau wurde in einer PCR mit GAPDH-Primern sichergestellt, dass in den Proben cDNA vorhanden ist. Um Verunreinigungen auszuschließen wurde genomische DNA (13) untersucht, die ein Intron zwischen den Primern einschließt und deswegen in der Gelelektrophorese als größeres Fragment imponiert.

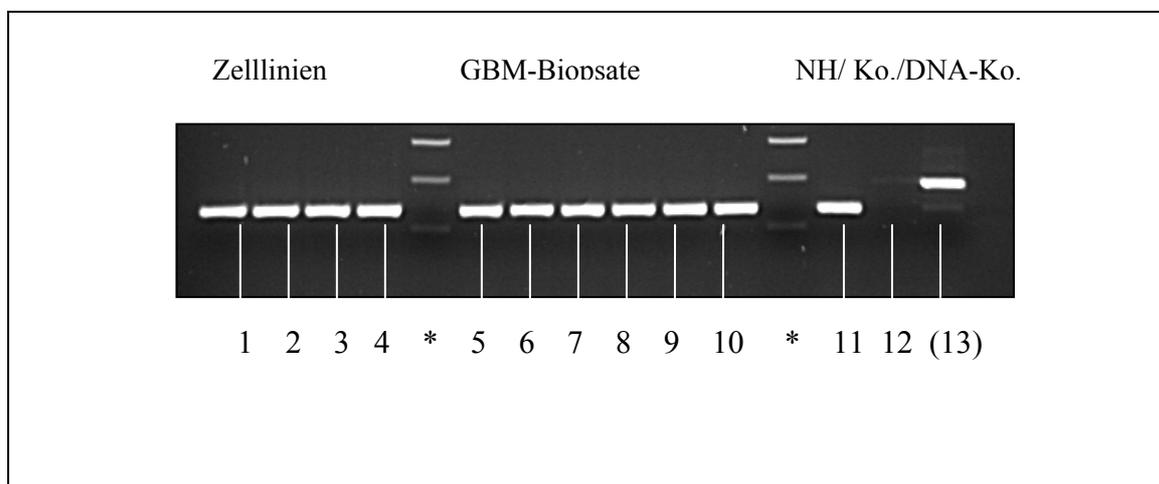


Abbildung 2 GAPDH-PCR: In allen Proben liegt reine cDNA vor, die Kontroll-DNA (13) imponiert als längeres Fragment.

3.4.2 *BREATHLESS-Homologe*

FGFR1 wird in allen Zelllinien und in vier von sechs Biopsaten exprimiert. Dabei scheint in drei Zelllinien und mindestens drei Glioblastombiopsaten eine vermehrte Expression im Vergleich zu normalem Hirnkortex vorzuliegen.

Im Gegensatz dazu wird FGFR2 hauptsächlich in normalem Hirngewebe und in vier von sechs Glioblastombiopsaten exprimiert sowie in der Zelllinie U343. Die Expression in den Glioblastombiopsaten erscheint dabei gegenüber normalem Hirnkortex verstärkt, in den Zelllinien insgesamt vermindert.

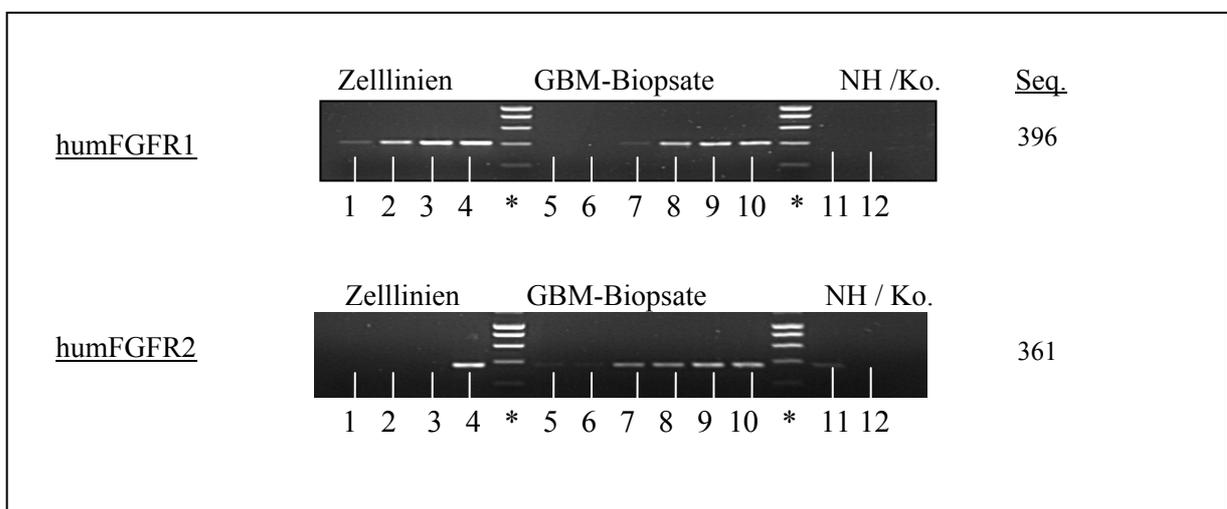


Abbildung 3: RT- PCR für FGFR1 und FGFR2IIIb

Beide FGFR-Gene scheinen in Glioblastomgewebe (1-10) im Vergleich zu normalem Hirnkortex (11) tendenziell vermehrt exprimiert zu werden. In U343 (4) findet sich eine sehr starke Expression von FGFR2, während diese in den anderen Zelllinien fehlt.

3.4.3 *GLIOTACTIN-Homologe*

Für alle Neurologine lässt sich eine Expression sowohl in normalem Hirnkortex, als auch in Gliomgewebe (Zelllinien und Biopsate) nachweisen. Die Expression von Neuroligin2 und Neuroligin3 sticht im Vergleich zu normalem Hirngewebe vor allem in Zelllinie 86HG39 sowie in vier der sechs Glioblastombiopsate (7-10) hervor. Neuroligin1 wird hingegen in allen Proben exprimiert mit leicht schwächerer Signalintensität für die Zelllinien U373 (1) und U84 (3).

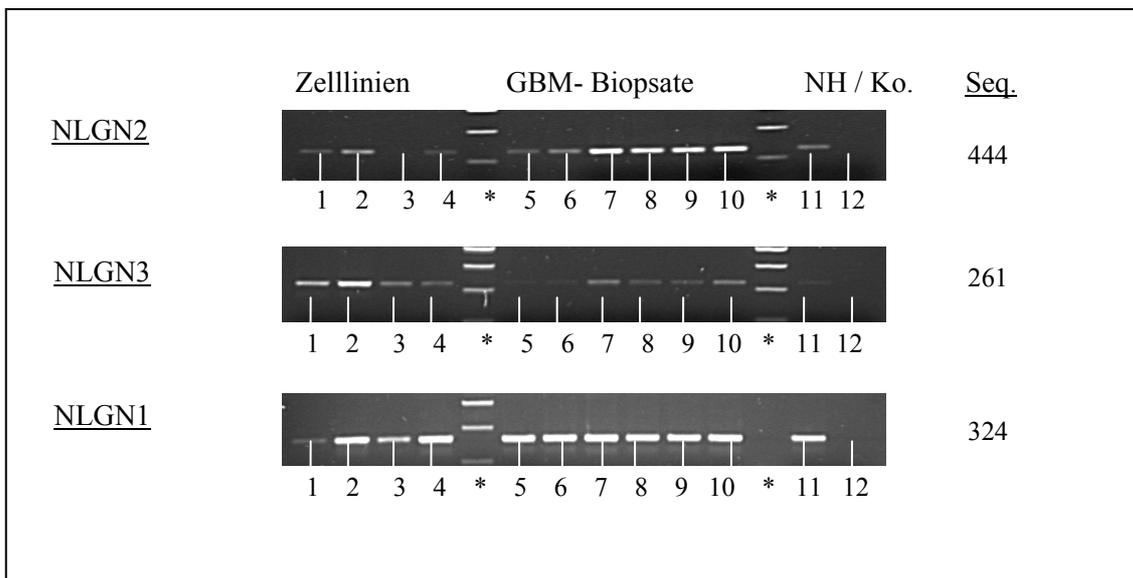


Abbildung 4: RT-PCR der homologen Neurologine NLGN2, NLGN3, NLGN1. NLGN2 und NLGN3 scheinen vor allem in den Glioblastombiopsaten (6-10) und in der Zelllinie 86HG39 gegenüber normalem Hirnkortex (11) vermehrt exprimiert zu werden. Für NLGN1 scheint die Expression in allen untersuchten Proben ungefähr gleich ausgeprägt.

3.4.4 *KÄSTCHEN-Homologe*

Das humane Homolog LIV-1 (solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6 [Homo sapiens]) ist in allen Gliomzelllinien und in vier der sechs Glioblastombiopsate in höherer Signalintensität gegenüber normalem Hirnkortex nachzuweisen.

Das weitere, zum Zeitpunkt der Arbeit nicht weiter charakterisierte Homologe „similar to KIAA1265“ scheint in ähnliche Verteilungsmuster Weise mit insgesamt schwächerer Ausprägung exprimiert zu werden. Mittlerweile wurde der „pubmed“-Eintrag unter NM_020342 als „Homo sapiens solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10 (SLC39A10), mRNA“ identifiziert.

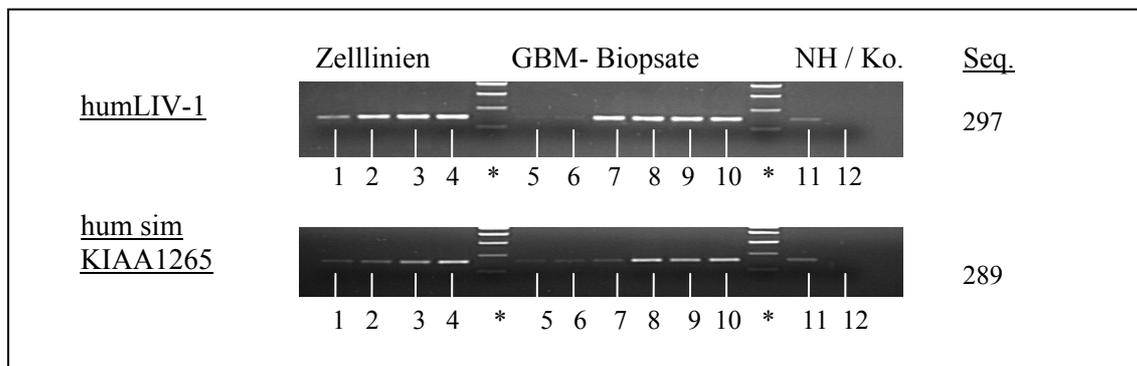


Abbildung 5: PCR der Homologen LIV-1 und humanes simKIAA 1265

Similar to KIAA 1265 wurde mittlerweile als Mitglied 10 der Solute Carrier Family 39 (Zinc Transporter) mit dem Synonym: LZT-Hs2 identifiziert. Beide Homologen, insbesondere LIV-1, scheinen vor allem in Glioblastomgewebe (1-10) im Vergleich zu normalem Hirngewebe (11) vermehrt exprimiert zu werden.

3.4.5 *LOCO-Homologe*

Das Homologe RGS12 wird in jeder untersuchten Probe deutlich exprimiert, ohne eindeutige Unterschiede zwischen gesundem und maligne entartetem Gewebe.

Expression von RGS14 lässt sich hingegen nur sehr schwach darstellen, am deutlichsten für die Zelllinien U373 und U87 und einem Glioblastombiopsat (9) und angedeutet an Position 2 und 3, in zwei weiteren Biopsaten (8,10) und in normalem Hirngewebe (11) erkennbar. Es lassen sich keine Aussagen über Expressionsunterschiede der RGS-Gene zwischen gesundem und malignem Gewebe treffen.

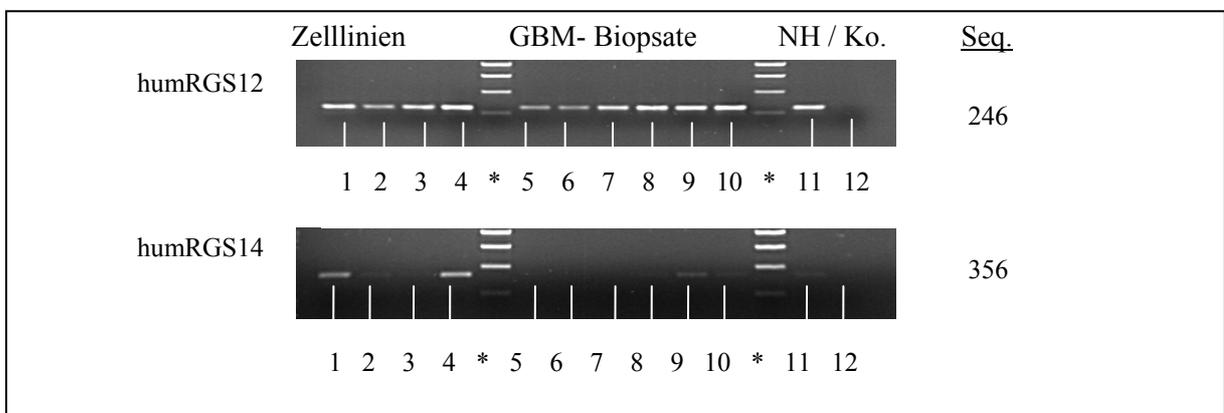


Abbildung 6: PCR der *LOCO*-Homologe RGS12 und RGS14. Während RGS12 in allen Proben nachzuweisen ist, findet sich für RGS14 lediglich in zwei Zelllinien (1,4) eine deutlich stärkere Expression im Vergleich zu normalem Hirngewebe.

3.4.6 *NONSTOP-Homologe*

Beide homologen Gene werden in sämtlichen Proben exprimiert. Für KIAA1063, welches mittlerweile als USP22 identifiziert wurde, treten die PCR-Banden in Glioblastomgewebe im Vergleich zu normalem Hirngewebe insgesamt stärker hervor.

Das Expressionsmuster von UBP41 tritt sehr unregelmäßig in Erscheinung. Es scheint, im Vergleich zu Glioblastombiopsaten und normalem Hirngewebe in Zelllinien eher vermindert exprimiert zu werden.

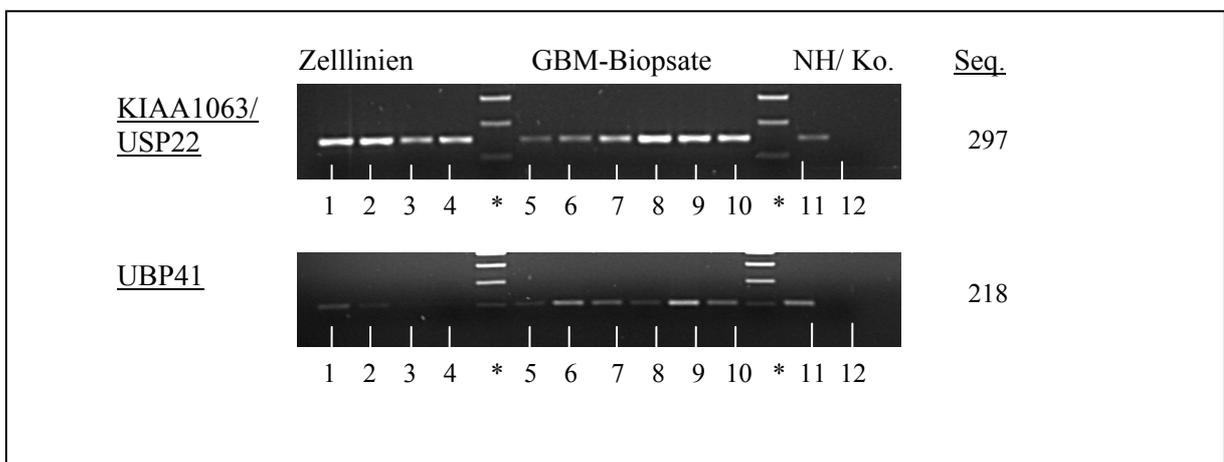


Abbildung 7: RT-PCR der *NONSTOP* Homologe KIAA1063/USP22 und UBP41

Die Homologen wurden mittlerweile identifiziert als Ubiquitin-spezifische Proteasen USP22 und UBP41. KIAA1063 wird in Zelllinien und primären Glioblastomen (1-10) im Vergleich zu normalem Hirnkortex (11) verstärkt exprimiert. Das Expressionsmuster für UBP41 zeigt einen geringfügigen Unterschied zwischen Zelllinien und Biopsatgewebe, ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu normalem Hirngewebe lässt sich nicht erkennen.

3.4.7 *ROBO-Homologe*

Alle Homologen (ROBO1, ROBO2 und Neogenin) sind in sämtlichen Proben nachzuweisen.

ROBO1-Expression findet sich am stärksten in Zelllinie 86HG39. Insgesamt imponiert für alle Zelllinien und mindestens drei Glioblastombiopsate eine vermehrte Signalintensität gegenüber normalem Hirngewebe.

ROBO2 weist in mindestens vier der sechs Glioblastombiopsate (6, 8, 9, 10, evtl. 5) und in der Zelllinie U87 (3) eine höhere Bandenstärke auf im Vergleich zu normalem Hirngewebe.

Expression von Neogenin findet sich verstärkt in mindestens drei Zelllinien (2-4) und in vier Glioblastombiopsaten (7-10), so dass eine vermehrte Expression gegenüber normalem Hirngewebe anzunehmen ist.

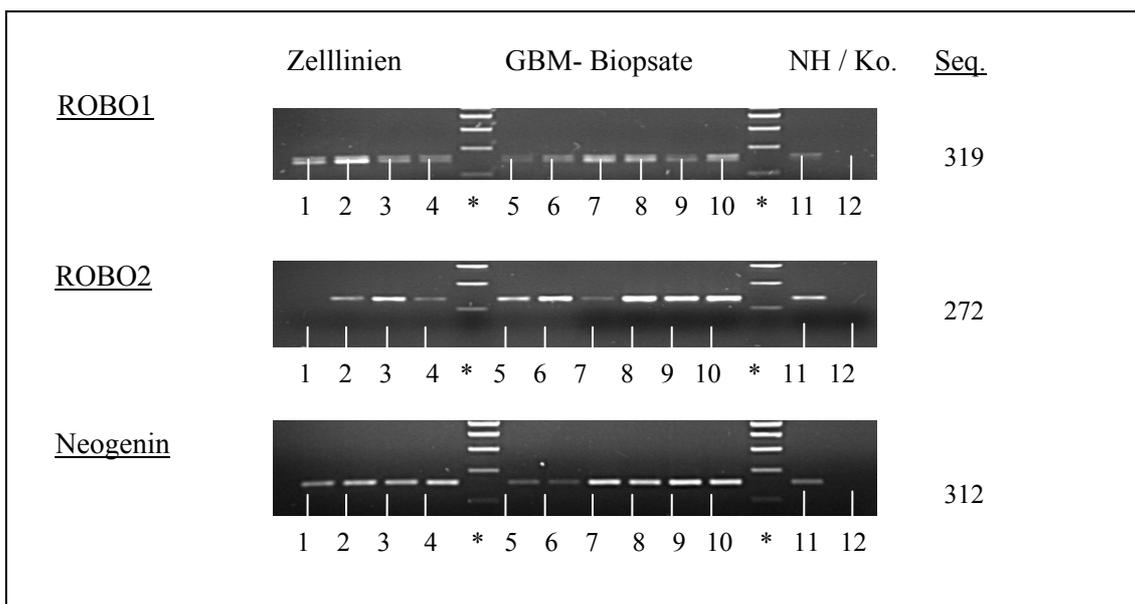


Abbildung 8: RT-PCR der Homologen ROBO1, ROBO2 und Neogenin
Zusammengefasst scheinen alle Homologen in den Zelllinien und Biopsaten (1-10) gegenüber normalem Hirngewebe (11) vermehrt exprimiert zu werden.

3.4.8 *SCHIZO-Homologe*

In normalem Hirngewebe lässt sich keine Expression von EFA6B nachweisen, jedoch in den Zelllinien U373 und U87, sowie in drei der sechs untersuchten Glioblastomgewebe (8-10). Somit scheint EFA6B in neoplastischen Zellen vermehrt exprimiert zu werden.

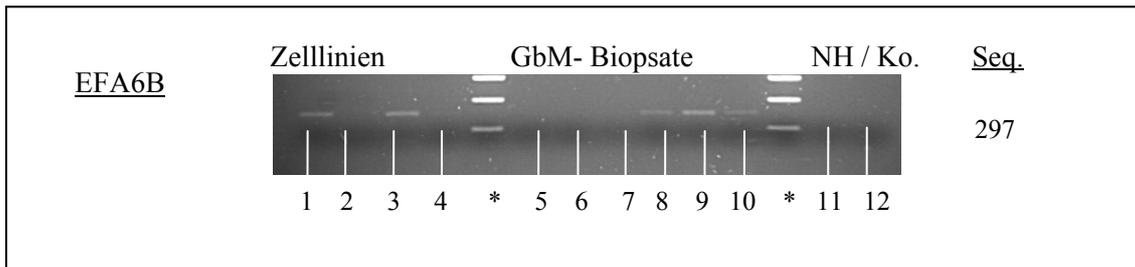


Abbildung 9: PCR des Gens EFA6B mit zum Teil vermehrter Expression in neoplastischem Gewebe.

3.4.9 Zusammenfassung der RT-PCR-Ergebnisse in Tabellenform

Legende:

Zelllinien: 1- U373 MG, 2- 86HG39, 3- U87MG, 4- U343MG; **GBM-Biopsate 5-10:** primäre Glioblastome (WHO IV); **NH 11:** Hum. Hirnkortex der Broca Region
Ko 12: PCR-Kontrolle ohne DNA-Probe

Expression: - keine ± sehr schwach (+) schwach + stark ++ sehr stark

 Qualitativ vermehrte Genexpression im Vergleich zu normalem Hirngewebe

 Qualitativ verminderte Genexpression im Vergleich zu normalem Hirngewebe

Hum. Homolog humanes homologes Gen mit qualitativ verstärkter Expression im Vergleich zu normalem Hirngewebe in mindestens 50% der untersuchten Proben.

Hum. Homolog humanes homologes Gen mit qualitativ vermindelter Expression im Vergleich zu normalem Hirngewebe in mindestens 50% der untersuchten Proben

Expressions- Stärke in Hum. Homolog ...	<u>Zelllinien</u>				<u>GBM-Biopsate</u>						N H	K o
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
FGFR1	(+)	+	++	++	-	-	(+)	++	++	++	-	-
FGFR2	-	-	-	++	(+)	(+)	+	+	++	++	(+)	-
NLGN2	(+)	+	-	(+)	+	+	++	++	++	++	+	-
NLGN3	+	++	(+)	(+)	±	±	(+)	(+)	(+)	(+)	±	-
NLGN1	(+)	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	-
LIV-1	(+)	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+	+	(+)	-
simKIAA1265	(+)	(+)	+	+	(+)	(+)	(+)	+	+	+	(+)	-
RGS12	+	(+)	+	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	-
RGS14	+	±	-	+	-	-	-	±	(+)	±	±	-
USP22	++	++	+	++	+	+	++	++	++	++	+	-
UBP41	(+)	±	-	-	±	+	(+)	±	+	(+)	+	-
ROBO1	+	++	+	+	(+)	+	++	++	+	++	+	-
ROBO2	-	+	+	(+)	+	+	(+)	++	++	++	+	-
Neogenin	+	++	++	++	(+)	(+)	++	++	++	++	+	-
ARF6-EFA6	(+)	-	(+)	-	-	-	-	±	(+)	±	-	-

Tabelle 8: Zusammenfassung der RT-PCR-Ergebnisse in Tabellenform. Insgesamt weisen 11 der 15 untersuchten Gene Expressionsunterschiede zwischen dem untersuchten Glioblastomproben und normalem Hirngewebe auf.

4 Diskussion

Mit dieser Arbeit wurde die Expression homologer Gene zu *Drosophila melanogaster* in Glioblastomen untersucht. Es wurden folgende, in der Tabelle zusammengestellten homologen Gene gefunden.

<u>Dros.-Gen</u>	<u>Humane Homologe</u>	<u>Kürzel</u>
<i>BREATHLESS</i>	Fibroblast Growth Factor Receptor 2 IIIb	FGFR2
	Human fibroblast growth factor receptor-1	FGFR1
<i>GLIOTACTIN</i>	Neurologin 2 (AF376802)	NLGN2
	Neurologin 3 (NM_018977)	NLGN3
	Neurologin1 (KIAA1070), (NM_014932)	NLGN1
<i>KÄSTCHEN*</i>	(XM_047707)	KIAA 1265
	Estrogene-regulated LIV-Protein (NM_012319)	LIV-1
<i>LOCO</i>	Regulator of G-Protein Signaling 12 (AF030109)	RGS12
	Regulator of G-Protein Signaling 14 (AF037195)	RGS14
<i>NONSTOP</i>	Ubiquitin-Specific Protease 22 KIAA1063	USP22
	Ubiquitin-Specific protease UBP41	UBP41
<i>ROUNDABOUT</i>	Roundabout 1	ROBO1
	Roundabout 2	ROBO2
	Neogenin mRNA	Neogenin
<i>SCHIZO</i>	Adenosin-Ribolisation-Factor6-EFA6	ARF6-EFA6

Tabelle 9: Gene der *Drosophila* und die zugehörigen humanen Homologen

Die ausgewählten Gene erfüllen Funktionen bei Entwicklungsprozessen embryonaler Glia der *Drosophila melanogaster*. Es gibt zunehmend Hinweise, dass Genexpression und bestimmte Mechanismen der Signaltransduktion in Glioblastomen zumindest zum Teil auf evolutionär konservierten Prozessen basieren (112,214). Einige Ähnlichkeiten für Entwicklungsvorgänge des menschlichen ZNS, bzw. bei Mechanismen der malignen Transformation in Glioblastomen sind bereits beschrieben (83).

Langfristiges Ziel der Arbeit ist, möglicherweise evolutionär konservierte Mechanismen bei neoplastischer Transformation und Invasion zu verstehen, um effektive therapeutische Ansätze gegen Glioblastome zu entwickeln.

4.1 **BREATHLESS/FGFR**

4.1.1 **BREATHLESS**

Das Gen *BREATHLESS* der *Drosophila melanogaster*, sowie seine humanen Homologen FGFR1 und 2 kodieren für membranassoziierte Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR) mit Tyrosinkinase-Aktivität. Expression von *BREATHLESS* initiiert und kontrolliert Migration und Differenzierung trachealer und glialer Zellen, wahrscheinlich über Regulation von Transkriptionsfaktoren (178,179,199).

4.1.2 **FGFR1**

Humane fgfr-Proteine regulieren Zellwachstum bei der Entwicklung von fetalen ZNS-Strukturen, bei der Anlage von Gliedmaßen und allgemein in der Organisation von Keratinozyten (51,186,187,204). FGFR1-Gentranskripte unterliegen einem RNA-Processing, wodurch diverse Splice-Varianten entstehen, die sich trotz hoher Identität in ihren Bindungseigenschaften bezüglich Rezeptor-Affinität, Ligandenspezifität und Gewebeverteilung unterscheiden. Dysregulationen der FGFR-Aktivität können mit Tumorenstehung und/oder -invasion assoziiert sein (73,94).

In dieser Arbeit wurde eine starke FGFR1-Expression in Glioblastomproben gefunden, die in ausgereiften Astrozyten normalerweise nicht mehr vorhanden ist. Das nachgewiesene FGFR1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome) (GeneBank M34641) ist ein hoch konserviertes Gen auf Chromosom 8p11.2-p11.1, das zur

Gliedmaßenentwicklung beiträgt. Mutationen sind bislang nur für das Pfeiffer- und das Jackson-Weiß-Syndrom beschrieben, bei denen es sich um erbliche Erkrankungen mit Schädeldeformitäten und Syndaktylie handelt (183,233).

In glialen Tumoren liegt häufig anstatt der normalerweise vorhandenen FGFR1 α die Variante FGFR1 β -Variante vor, der eine Immunglobulin-domäne fehlt und eine 10-fach erhöhte Ligandenaffinität sowohl für saure als auch basische FGF aufweist (98). Im Vergleich zu gesundem humanem Hirngewebe wird FGFR1 in humanen Gliomen und Meningeomen vermehrt exprimiert. Dabei besteht eine positive Korrelation zwischen dem FGFR1-Level und dem Anteil an epithelialen Zellen im Tumor (219). Es wird angenommen, dass durch dysreguliertes RNA-Splicing und konsekutiv vermehrter Expression von FGFR-1 β Zellwachstum begünstigt wird (97,99).

Da Unterformen des FGFR1 in Glioblastomen nachzuweisen sind, deren primäre Funktion nicht in der Entwicklung des ZNS liegt, könnte FGFR1 möglicherweise eine grundsätzliche Funktion in der Regulation von Zellwachstum und/oder der Differenzierung einnehmen. Es muss bei dieser Arbeit jedoch kritisch angemerkt werden, dass die entworfenen Primer mehrere FGFR1-Transkriptionsvarianten mit der Bezeichnung „fms-related tyrosinekinase2, Pfeiffer syndrome“ amplifizieren, so dass tumorspezifische Veränderungen nicht zwingend auf die ursprüngliche Variante FGFR1 (GeneBank M34641) zurückzuführen sein müssen.

4.1.3 FGFR2

Im Gegensatz zur vermehrten Expression von FGFR1 in Glioblastomgewebe, ist für die Expression von FGFR2 gegenüber gesundem Hirngewebe ein Verlust durch maligne Transformationsprozesse beschrieben (143,144,238,239).

Die in dieser Arbeit homologe Splice-Variante FGFR2IIIb ist auf Chromosom 10q26 lokalisiert und kodiert für einen Keratinozyten Wachstumsfaktor-Rezeptor (KGF), der bevorzugt saure FGF und KGF bindet. Mutationen von FGFR2 führen wie Mutationen von FGFR1 ebenfalls zu kraniosynostotischen Syndromen (Jackson-Weiß-Syndrom, Crouzon-Syndrom, Pfeiffer-Syndrom) (90,132,162,213).

Zu erklären ist die verminderte Expression von FGFR in Glioblastomen durch den häufig nachzuweisenden Verlust der Heterozygotität von Chromosom 10, bzw.

allelische Deletionen von 10q25-26 (23,52). Dabei können auch benachbarte tumor-suppressive Gene, wie z.B. WDR11, inaktiviert werden und maligne Transformation begünstigen (23).

Die beschriebene Abwesenheit einer FGFR2-Expression lässt sich mit dieser Arbeit nicht ohne Einschränkung bestätigen: Hier wurde für FGFR2IIIb eine vermehrte Expression in vier von sechs Glioblastombiopsaten und auch in einer Zelllinie (U343) gefunden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass nicht Tumorzellen, sondern eingeschlossene epitheliale Zellen FGFR2IIIb exprimieren. In Zervixkarzinomen wurde eine neoplastische FGFR2IIIb-Expression in proliferierenden, metaplastischen Reservezellen, nicht aber in den Tumorzellen nachgewiesen. Es wird vermutet, dass hier über KGF Wachstum und Differenzierung dieser Zellen im Zervixkarzinom vermittelt wird. (125). Ob ein ähnlicher Mechanismus in Glioblastomen zu tragen kommen könnte, ist zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Es gibt Hinweise, dass FGF/FGFR Aktivität adhäsive Interaktionen zu extrazellulärer Matrix sowie pro-angiogenetische VEGF-Expression in Hirntumoren inhibiert. Möglicherweise stellt eine vermehrte FGFR2-Expression in Tumor-umgebendem Gewebe eine Reaktion auf neoplastisches Wachstum dar (5).

Die in dieser Arbeit aberrierenden Ergebnisse können auch auf Unterschiede zwischen den Gewebeproben zurückzuführen sein: Während in den beschriebenen Arbeiten entweder Glioblastomzelllinien oder behandelte, sekundäre Glioblastome untersucht wurden (52,238), beruhen die differierenden Ergebnisse aus dieser Arbeit hingegen auf FGFR2-Expression in unbehandelten, primären Glioblastomgeweben. Unterschiedliche Ausprägungen genetischer Mutationen für primäre, bzw. sekundäre Glioblastome sind beschrieben (53).

Als weitere Erklärung für die differierenden Ergebnisse könnten, ähnlich der Konversion von FGFR1 α zu FGFR-1 β (239), auch für FGFR2 tumorspezifische Mutationen vorliegen. Beschrieben ist dieses z.B. für humane Chondrosarkome sowie für undifferenzierte und diffuse Magenkarzinome, verbunden mit einer schlechten Prognose (92,93). Für Glioblastome sind bislang zwar keine spezifischen FGFR2-Mutationen beschrieben, angesichts der hohen Variabilität der FGFR durch alternatives Splicing aber denkbar.

Anhand der Ergebnisse lässt sich ein Zusammenhang vermuten zwischen FGFR mit Funktion bei der Gliedmaßenentwicklung und neoplastischen Prozessen in Glioblastomen, der bislang nicht ausreichend erklärt werden kann.

4.2 GLIOTACTIN/Neuroigin

4.2.1 *GLIOTACTIN*

Das Gen *GLIOTACTIN* der *Drosophila melanogaster* kodiert für ein transmembranöses Adhäsionsmolekül mit Ähnlichkeit zu Cholinesterasen, allerdings ohne katalytische Aktivität. Durch die extrazelluläre Serin-Esterase-Domäne besteht genetisch Zugehörigkeit zu Zelladhäsionsmolekülen wie *GLUTACTIN* und *NEUROTACTIN* (6). *GLIOTACTIN* wird temporär vor allem in Glia des peripheren Nervensystems exprimiert und ist unentbehrlich für die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke, durch welche Axone geschützt werden. In *Drosophila* führen Genmutationen von *GLIOTACTIN* zu mangelnder Ausreifung von Septate Junctions (ähnlich den Tight Junctions in Vertebraten-Epithelien) und abnormer Permeabilität, was sich in Lähmungen und erhöhter axonaler Vulnerabilität gegenüber kaliumreicher Hämolymphe äußert (6,192).

4.2.2 Neuroigin

Die humanen Homologen gehören der multigenetischen Familie der Neuroigine an mit vorwiegender Expression in Hirngewebe. Die neuronalen Oberflächenproteine binden spezifisch β -Neurexine und beteiligen sich über eine wahrscheinlich retrograde PSD-95 Protein-Signalkaskade an der kontrollierten Ausbildung von Synapsen und interzellulären Junctions. PSD bildet dabei eine postsynaptische Struktur, an der Neurotransmittersignale effizient verarbeitet werden (17,88,130).

Die durchschnittliche Identität der neuroigin-Proteine untereinander von nur 60% lässt funktionelle Unterschiede vermuten. Gemein sind ihnen die hoch konservierten, hirnspezifischen Acetylcholinesterase-Domäne, eine transmembranöse sowie eine zytoplasmatische Domäne (87). Die nicht-katalytische AChE-Aktivität soll für neuronale

Zell-Zell-Erkennungs- und Adhäsionsprozesse von Bedeutung sein (72,100,198). Zudem scheinen in Hirntumoren spezifische Regulationsmechanismen zu Expression verschiedener AchE-Varianten zu führen, die möglicherweise Proliferations- und Adhäsionsprozesse beeinflussen (100,165).

4.2.3 NLGN1

NLGN1 ist postsynaptisch in glutamatergen Synapsen lokalisiert. Es bindet Kalzium-abhängig β -Neurexin (209) und induziert Ausbildung präsynaptischer Vesikel sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Zellen (191). In vitro führt eine Überexpression von NLGN1 morphologisch zu einer erhöhten Anzahl an Synapsen. Funktionell, im Sinne einer erhöhten Glutamatfreisetzung, scheint ein weiteres Gen, SynCAM, von Bedeutung zu sein (190).

In dieser Arbeit wurde NLGN1 Expression in allen Gewebeproben in ungefähr gleich starker Ausprägung nachgewiesen. Obwohl anhand der durchgeführten RT-PCR keine Aussagen zum zellulären Ursprung der nachgewiesenen Genexpression in Biopsatgewebe getroffen werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass im Vergleich mit Expression in normalem Hirngewebe, gleich starke oder stärkere Banden auf Genexpression in Tumorzellen zurückzuführen sind.

Über mögliche funktionelle Folgen lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren:

Es ist bekannt, dass an Glioblastome grenzende Neurone veränderte elektrophysiologische Eigenschaften aufweisen (erhöhte Spontanaktivität, vermehrt epileptogene Aktivität auch nach Entfernung des Tumors) und vermehrt Apoptose unterliegen (12,121,235,240). Beides sind wesentliche Charakteristika des malignen Glioblastoma multiforme, die unter anderem auf erhöhte Glutamatkonzentrationen zurückzuführen sein könnten (13,240). Die entsprechenden spezifischen Kalzium-permeablen AMPA-Rezeptoren für Glutamat werden in Glioblastomen vermehrt exprimiert und sollen neben Funktionen in Signalweiterleitung auch Einfluss nehmen auf Genexpression, Zellproliferation und Migration (89,164,212).

Eine vermittelnde Rolle zwischen Regulation glutamaterger Aktivität, neuronaler Plastizität und NLGN1-Expression könnte dabei nicht-katalytisches AChE einnehmen: Sie soll zum einen während der Synaptogenese hippocampaler Neuronen Aussprossung

von Neuriten fördern, glutamaterge AMPA-Rezeptoren in ihren Bindungseigenschaften modulieren und möglicherweise auch an der Ausbildung exzitatorischer Synapsen beteiligt sein (152,153). Gleichzeitig wirkt sich veränderte AChE-Aktivität auf Expression von Neuroligin und β -Neurexin aus (43).

So könnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter Glutamatkonzentration, möglicher Exzitotoxizität und AMPA-Rezeptoren über Neuroligine und AChE gegeben sein.

4.2.4 NLGN2

NLGN2 wurde postsynaptisch zunächst nur in inhibitorischen Synapsen bei der Ausbildung GABAerger Synapsen nachgewiesen (223). In Abhängigkeit von PSD-95 jedoch findet neben einer NLGN1-Induktion eine Umverteilung von NLGN2 in glutamaterge Synapsen statt, wodurch ein physiologisches Gleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen aufrecht erhalten wird (24,68,173).

In vier der sechs Glioblastombiopsate scheint NLGN2 im Vergleich zu den restlichen Proben und vor allem auch im Vergleich zu normalem Hirngewebe verstärkt exprimiert zu sein. Da sich diese vermehrte Expression für die Zelllinien-Proben nicht konsequent bestätigen lässt, scheint die dysregulierte Expression nicht unbedingt in den Tumorzellen selber stattzufinden. Möglicherweise kann sich auch hier dysregulierte AChE-Expression und -Funktion in Glioblastomgewebe auf postsynaptische Expression von Neuroliginen in anderen Gewebeanteilen auswirken und das synaptische Gleichgewicht zugunsten exzitotoxischer glutamaterger Synapsen verschieben (43).

Unter der Fragestellung der zellulären Lokalisation und Koexpression von NLGN1, NLGN2 und PSD-95 scheint es sinnvoll, Glioblastomgewebe mit immunhistologischen Methoden zu untersuchen, um langfristig mögliche Funktionen in neoplastischem und/oder tumor-umgebendem Gewebe genauer in Betracht ziehen zu können.

4.2.5 NLGN3

Die Expression von NLGN3 in den untersuchten Geweben gleicht der NLGN2-Expression, vor allem in seiner vermehrten Expression im Vergleich zu normalem Hirngewebe, so dass eine funktionelle Koexpression möglich erscheint.

Normalerweise ist gliale Expression von NLGN3 auf frühe Entwicklungsstadien beschränkt (166). Nur in olfaktorischer Glia bleibt die NLGN3-Expression postnatal erhalten und ist an Kontaktpunkten zwischen Glia und Neuronen besonders stark ausgeprägt. Das Besondere an olfaktorischer Glia ist das Vorhandensein von Eigenschaften peripherer Schwann-Zellen trotz zentraler Lokalisation. Dieses äußert sich vor allem in der lebenslangen Regenerationsfähigkeit und Wachstumsförderung olfaktorischer Nervenzellen (11,231). Immunhistochemisch und ultrastrukturell weist periphere olfaktorische Glia auch Gemeinsamkeiten mit zentraler Astroglia und Gliazellen des Plexus myentericus auf, durch welche die außergewöhnliche Interaktion mit zentralen Astrozyten ermöglicht wird (8,169,231).

Bislang ist nicht bekannt, welche Eigenschaften olfaktorischer Glia auf Expression von Neuroliginen, insbesondere NLGN3, zurückzuführen sind. Sollte diese aber mit vermehrter Interaktion zu zentralen Astrozyten einhergehen, bzw. an der Induktion oder Umsetzung wachstumsfördernder Stimuli beteiligt sein, ist eine Assoziation zu maligner Proliferation und Invasivität denkbar. Diese Annahme wird durch einen vermuteten Funktionsverlust von NLGN3 in familiärem Autismus gestützt: Kognitive Defizite und Autismus sollen aus veränderten Genexpressionsmustern resultieren, wodurch Synaptogenese und/oder Funktion der Synapsen beeinträchtigt wird (91,128,226).

4.3 KÄSTCHEN/LIV-1

4.3.1 *KÄSTCHEN*

KÄSTCHEN stellt ein essentielles Gen dar, das in *Drosophila melanogaster* gliale Migrationsprozesse in der Entwicklung steuert. Es scheint allelisch zu dem Gen *Fear-Of-Intimacy* zu sein, welches für ein Oberflächenprotein kodiert, das vornehmlich an gonadalen Entwicklungsprozessen in *Drosophila melanogaster* beteiligt ist.

Kästchen wird in Glia, primordialen Keimzellen, somatischen Muskelzellen und trachealen Zellen exprimiert und lenkt die Migration der einzelnen Zellen zu ihren Zielorten. Das Protein besteht aus acht transmembranösen Domänen. Es wird anscheinend entweder als Zinktransporter oder als Zink-abhängige Protease sowohl an Zelloberfläche als auch in subzellulären Kompartimenten exprimiert (167).

4.3.2 *LIV-1*

Das zu *KÄSTCHEN* ermittelte humane Homolog gehört der LZT-Unterfamilie der Östrogen-regulierten LIV-1-Gene an (*LIV*-subfamily of *ZIP* zinc transporters) mit einem Metalloproteinase-Motiv (217). Die zellulär exprimierten LZT-Proteine weisen eine konservierte Domäne auf, die für Zinktransportern bislang unbekannt war (102). Diverse Unterschiede zu anderen Zinktransportern lassen einen speziellen Einfluss von *ZIP* Zinktransportern auf intrazelluläre Zinkaufnahme und -homöostase vermuten, möglicherweise einhergehend mit pathologischen Prozessen. *LIV-1*-Expression wurde in Brustkrebs, Brustkrebsmetastasen, in hormonell regulierten Geweben und auch im Gehirn nachgewiesen (215-217). Das in dieser Arbeit untersuchte *LIV 1*-Gen scheint in den meisten Glioblastomproben (Zelllinien und Biopsien) stärker als in normalem Hirngewebe exprimiert zu werden. In Anlehnung an die Funktion von *KÄSTCHEN* in *Drosophila melanogaster* könnte dadurch Migration entarteter Zellen begünstigt werden.

Zink ist ein essentieller Kofaktor für viele Enzyme und beteiligt an Aufbau von Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, im Lipidstoffwechsel und an der Kontrolle von Gentranskription, Wachstum, Entwicklung und Differenzierung (217). Im Gehirn sind 10% des Zinkgehaltes in Vesikeln glutamaterger Synapsen gespeichert. Neuronale Zinkaufnahme erfolgt über NMDA- und Kalziumkanäle, über Kalzium-permeable AMPA/Kainat-Kanäle und über Zink-sensitive Membrantransporter. Intrazellulär wird Zink zusätzlich aus Metallothionen und Mitochondrien freigesetzt (196). Eine ausgewogene, neuronale Zink-Homöostase ist Voraussetzung für das Überleben einer Zelle, da sowohl ein zu Wenig als auch ein zu Viel an intrazellulärem Zink neurotoxisch, bzw. Apoptose-fördernd wirkt (25). Zink soll dabei eine größere toxische Potenz als Kalzium aufweisen (196).

Die anzunehmende gestörte Zinkhomöostase durch vermehrte Expression vom Rezeptor LIV-1 in Glioblastomen im Vergleich zu normalem Hirngewebe könnte eventuell zu Neuronenuntergang führen, wodurch der Tumor expandieren könnte. Alternativ könnten aber auch auf indirektem Wege Proteine bzw. Transkriptionsfaktoren über zelluläre Dysregulationen zu neoplastischem Wachstum führen.

4.3.3 *simKIAA 1265*

Das Gen „similar to KIAA1265“ wurde mittlerweile unter der „nucleotide“-Bezeichnung NM_020342 als Mitglied 10 der Solute Carrier Family 39 (Zinc Transporter) identifiziert (<http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html>). Es scheint eine Funktion als Zinktransporter zu erfüllen und wurde in dieser Arbeit tendenziell vermehrt in Glioblastomgewebe nachgewiesen. Genaueres ist bislang jedoch nicht bekannt.

4.4 LOCO/RGS

4.4.1 *LOCO*

LOCO kodiert in *Drosophila melanogaster* für mindestens zwei RGS-Proteine (Regulator of G-Protein Signaling), die über Koexpression und spezifische Interaktion mit der $G\alpha_i$ -Untereinheit G-Protein-Signalwege negativ regulieren (69). *LOCO* steuert gliale Entwicklungsprozesse wie Ausbildung von axonalen Markscheiden und Aufbau der Blut-Hirn-Schranke. In *LOCO*-Mutanten sind durch abnorme gliale Zellkontakte axonale Signaltransduktion und die Blut-Hirn-Schranke in ihrer Funktion beeinträchtigt. *LOCO* scheint als ein Zielgen von *POINTED* an terminaler Differenzierung glialer Zellen über Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren beteiligt zu sein (118).

4.4.2 RGS

In der G-Protein Signalkaskade bindet GTP an die $G\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins, woraufhin die $G\alpha$ - und $G\beta/\gamma$ -Untereinheiten dissoziieren und mit Effektor-Proteinen interagieren, um Signale weiterzuleiten. RGS-Proteine beschleunigen die

GTPase-Aktivität der heterotrimeren G-Proteine (GAP-Aktivität) und beenden die durch GTP eingeleitete Aktivierung (201,206).

Die humanen Homologen RGS12 und RGS14 weisen je eine RGS-box, zwei Rap-bindende Domänen und ein hoch konserviertes GoLoco-Motiv von 19 Aminosäuren auf (82,115). Bislang sind über 20 humane Unterformen klassifiziert, von denen neben RGS7, 8, 11 und 17 vor allem RGS4 stark in Hirngewebe exprimiert wird (126,214). Die physiologische Funktion einzelner RGS-Proteine ist Gegenstand diverser Untersuchungen: Es gibt erste Hinweise auf eine Beteiligung an Entwicklungs- und Migrationsprozessen. So wurde Überexpression von RGS3 und RGS4 in neoplastischen Astrozyten nachgewiesen, wodurch möglicherweise Migration und Adhäsion begünstigt werden. Vermutet wird, dass G-Protein-vermittelte Signaltransduktion in Neoplasien zum Teil auf evolutionär konservierten Prozessen basiert (214).

4.4.3 RGS12

RGS12 weist neben den oben genannten Domänen zudem eine PDZ- und eine PTB-Domäne, sowie eine Coiled-Coil-Region (CC) auf. Das RGS12-Gen kodiert für mindestens 12 alternativ gespleißte Isoformen, die sich in ihren N- und C-terminalen Regionen unterscheiden, was sowohl zu spezifischer Expression in verschiedenen Geweben wie Gehirn, Lunge und Plazenta, als auch zu unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation führt (20).

RGS12 wird in allen untersuchten Geweben exprimiert. Die nachgewiesene Form entspricht der vorwiegend im Hirn exprimierten Isoform RGS12B. Es können keine sicheren Aussagen über Unterschiede in Lokalisation bzw. Expressionsstärke getroffen werden. Aufgrund der durchweg vorhandenen Expression in allen neoplastischen Gewebeproben müsste in weiteren Schritten untersucht werden, ob die in gesundem Gewebe vorhandene RGS12-Expression von maligne entarteten Zellen übernommen wird. Durch nukleäre Lokalisation und die hohe Variabilität durch alternatives Splicing könnte eine erhöhte Störanfälligkeit für Dysregulationen im Zellzyklus bestehen, was unter Umständen zu maligner Entartung führen könnte. Unterstützt wird diese Vermutung durch bereits nachgewiesene RGS12-Mutanten in kolorektalen Tumoren mit hoher Mikrosatellit-Instabilität und weiteren Ergebnisse von Martin-McCaffrey bezüglich des ebenfalls homologen RGS14 (siehe Kap. 4.4.4.) (63,171,172).

4.4.4 RGS14

RGS 14 ist ein bifunktionaler Regulator der $G\alpha_{i/o}$ -Aktivität in verschiedenen Hirngewebspopulationen (26,81,218). Während mitotischer Zellteilung jedoch üben die $G\alpha$ -Untereinheiten zusammen mit dem GoLoco-Motiv, anders als üblich, spezifisch Kontrolle über Vorgänge des Spindelapparates aus (137). RGS14 ist essentiell für die erste mitotische Zellteilung einer befruchteten Zygote und als Mikrotubuli-assoziiertes Protein ubiquitär vorhanden.

Die in normalem Hirngewebe eher schwache Expression von RGS14 im Vergleich zu RGS12 ist konsistent mit quantitativen PCR-Ergebnissen von Larminie et al. (126): Demnach lag das Verhältnis der mRNA-Kopien im ZNS, bzw. in peripheren Nerven für RGS12 zu RGS14 bei ca. 20:1.

Die in den Glioblastomproben verminderte/abwesende Expression könnte möglicherweise mit dem Vorkommen atypischer Mitosen assoziiert sein. Es ist erwiesen, dass eine in vitro verminderte Expression von RGS14 zu multinukleären Zellen führt als Zeichen abnormaler Chromosomenteilung, welche ein wesentliches histopathologisches Kriterium in Glioblastomen darstellt (vgl. Kap. 1.1) (54,106,137).

Bezüglich des funktionellen Vergleiches von Loco und der humanen homologen Gene RGS12 und RGS14 muss bedacht werden, dass für diese Gene die insgesamt geringste Übereinstimmung der in dieser Arbeit untersuchten Gene zu den Drosophila-Homologen besteht.

4.5 NONSTOP/Ubiquitin-spezifische Proteasen

4.5.1 *NONSTOP*

NONSTOP kodiert für eine Ubiquitin-spezifische Protease, die in der Entwicklung des visuellen Systems der *Drosophila melanogaster* exprimiert wird. Projektionen der verschiedenen retinalen Photorezeptoren sind an bestimmte synaptische Schichten im Gehirn gerichtet. Diese Schichten werden durch vorübergehende Ausbildung glialer Zellen gezielt aufgespürt, bevor an den eigentlichen synaptischen Partner gebunden werden kann. *NONSTOP* ist dabei an der zielgerichteten Migration von glialen Zellen in die vorgesehene Schicht des Hirnkortex beteiligt (170).

4.5.2 Ubiquitin-Spezifische Proteasen

Die zu *NONSTOP* homologen Ubiquitin-spezifischen Proteasen gehören aufgrund der konservierten katalytischen Cystein- und Histidin-Domänen zur Familie der deubiquitinierenden UBP, bzw. USP (27,58,234). Die Vielfältigkeit der USP lässt eine Beteiligung an diversen zellulären Prozessen annehmen. Prinzipiell werden durch Ubiquitin markierte Proteine durch enzymatisches Verkürzen, bzw. Entfernen von Polyubiquitinketten entweder vor Degradation bewahrt oder zerstört (34,58).

USP können sowohl als Onkogene (62,70,95) als auch als Tumorsuppressorgene (1,131,133,134) regulierend in das Zellwachstum eingreifen. Eine Überexpression von USP scheint zum Teil auf Stimulation durch Wachstumsfaktoren zurückzugehen und ist mit Malignität in Neuroblastomen, Lungen-, Nieren-, Brust- und Prostata-Tumoren assoziiert. Im ZNS führen Beeinträchtigungen im Ubiquitin-Proteasom-Signalweg zunächst zum Abbruch neuronaler Aktivität und anschließend durch intrazelluläre Akkumulation von Proteinaggregaten zur Einleitung des neuronalen Untergangs (3,28).

4.5.3 USP22

KIAA1063 entspricht USP 22 und weist sehr hohe Übereinstimmung zu *NONSTOP* auf. Der gravierende Unterschied besteht in der Abwesenheit des N-terminalen Endes (170). Die von Ovaa et al. nachgewiesene USP22-Expression in Burkitt-Lymphomen und anderen humanen Zellen aus Tumoren geben einen ersten Hinweis auf einen möglichen Verbindung mit malignen Prozessen (155,156). Mit dieser Arbeit konnte zudem eine ausgeprägte Expression von USP 22 in Glioblastomzelllinien und -biopsaten und vergleichbar schwacher Expression in normalem Hirngewebe nachgewiesen werden. Durch die Beteiligung von deubiquitinierenden Proteasen an apoptotischen und malignen Prozessen ist die Hypothese, dass eine Assoziation zwischen Überexpression von USP22 und maligner Transformation besteht durchaus vertretbar. Angesichts der hohen Übereinstimmung zum Gen *NONSTOP* lässt sich über funktionelle Parallelen spekulieren: Möglicherweise könnte eine Überexpression von USP22 in neoplastischen

Zellen Migration und Invasivität begünstigen. Ebenso könnten Veränderungen in Apoptose-induzierenden Signalwegen (wie z.B. über p53) glialen Tumorzellen einen Überlebensvorteil gewähren.

4.5.3.1 UBP41

Die Übereinstimmung von UBP41 zu *NONSTOP* ist mit einem e-Wert von e-40 im Vergleich zu e-136 für USP22 wesentlich geringer, so dass auch funktionelle Unterschiede anzunehmen sind. Gemein ist den Proteasen das hoch konservierte katalytische Zentrum, essentiell für Apoptose-Induktion. UBP41-Expression findet sich hauptsächlich in Skelettmuskel, Herzmuskel und Niere und nur mäßig im Gehirn (58). Zudem ist eine hormonell regulierte Expression von UBP41 an Proliferation, Differenzierung und Überleben in Osteoblasten beteiligt. UBP41 ist, mit insgesamt unregelmäßiger Verteilung, in allen untersuchten Proben nachweisbar. Eine Tendenz in Richtung vermehrter oder verminderter Expression im Vergleich zu normalem Hirngewebe lässt sich nicht erkennen, jedoch eine insgesamt sehr schwache Expression in den untersuchten Zelllinien. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die nachgewiesene USP41 Expression in Glioblastomgewebe nicht auf die Tumorzellen, sondern auf eingeschlossenes normales Gewebe, wie epitheliale Zellen von Gefäßen und/oder Bindegewebe zurückzuführen sein könnte. Je nach Anteil solcher Strukturen im Tumor ließe sich die Varianz erklären.

UBP41 soll einen direkt apoptotischen Effekt auf Zellen ausüben, erkennbar an signifikanter DNA-Fragmentation und erhöhter Caspase-3-Aktivität. Der Mechanismus dieser direkt apoptotischen Wirkung ist nicht hinreichend geklärt: Möglicherweise kann eine Akkumulation Apoptose-fördernder Proteine neuronalen Zelluntergang einleiten (58,141). Demnach könnte eine verminderte Expression von UBP41 in Glioblastomzellen entweder einen Überlebensvorteil darstellen oder Immortalisierung neoplastischer Zellen bedingen.

Bereits jetzt gelten Ubiquitin-gesteuerte Signalwege als Ziel neuer Therapieansätze bei Erkrankungen, die mit dysreguliertem Zelltod einhergehen (96).

4.6 **ROBO/Roundabout**

4.6.1 **ROBO**

ROBO wurde bei einem Screening für genetische Mutationen in *Drosophila melanogaster*, die mit veränderter Axon- Migration einhergingen, identifiziert (193). Es kodiert für einen Rezeptor aus der Familie der Immunglobulin(Ig)- Proteine (112). Durch Expression von *robo* an der Zelloberfläche axonaler Aussprossungen nach Überschreiten der kommissuralen Mittellinie werden abweisende Signale des *robo*-Liganden *slit* erkannt und ein Zurückkreuzen der Neurone verhindert (108,111-113). Letztendlich wird durch die *slit-robo*-Interaktion die Struktur des zytoplasmatischen Skelettes moduliert und dadurch Zellmigration gesteuert (48,236). Robo-Genprodukte unterliegen starker transkriptionaler Kontrolle durch ein weiteres Gen, *COMM* (*Commissureless*) (33,243). Ferner ist *ROBO* auch an zielgerichtetem Wachstum von Muskeln zu ihren Ansätzen sowie an der Differenzierung serotoninerger Neurone beteiligt (31,123).

4.6.2 **Humanes ROBO**

Axonale Führungsmechanismen in der Mittellinie der Vertebraten ZNS-Entwicklung scheinen evolutionär konserviert zu sein. So kodieren die homologen Gene *Robo1* und *Robo2* ebenfalls für axonale Rezeptoren mit Axon-abweisenden Eigenschaften (111-113,135). Ähnliche Interaktionen sind auch in nicht-neuronalen Zellen vorhanden: durch den *robo*-Liganden *slit* wird über CXCR4-Rezeptoren leukozytäre Chemotaxis verhindert (177,237). Ein weiteres homologes Gen, *Rig1* oder *Robo3* wurde identifiziert. Es soll, ähnlich dem Gen *COMM* in *Drosophila*, Sensitivität gegenüber dem Axon-abweisenden *Slit* regulieren, jedoch ohne direkt Einfluss auf Expression von *Robo1* und *Robo2* zu nehmen (188).

4.6.3 **Humanes ROBO1**

Das homologe humane *ROBO1* weist hohe strukturelle Ähnlichkeit zu *ROBO* der *Drosophila melanogaster* auf mit höchster Übereinstimmung für die zwei ersten Ig-Domänen (112). Für humanes *ROBO1* findet sich in Glioblastomzellen eine vermehrte

Expression gegenüber gesundem Hirngewebe. Zu untersuchen bleibt, inwiefern durch Interaktion von robo mit dem Liganden Slit migratorische Eigenschaften von Glioblastomen beeinflusst werden. Denkbar wäre, dass durch abnorme Expression beider Gene, die abweisenden Eigenschaften von slit aussprossendes Wachstum von Tumorzellen begünstigen.

Neben den bekannten Funktionen in axonalen Führungsmechanismen sind für robo1 auch anti-inflammatorische Wirkung und Assoziation zu diversen Tumoren bekannt (36,37,74,127,135). In Interaktion mit Slit können über den Chemokinrezeptor CXCR4 und dessen Liganden CXCL12 Tumorangiogenese induziert bzw. Immunantworten moduliert werden, was als essentiell für das Fortschreiten maligner Hirntumore gilt (180,185,194,195,229). CXCR4 ist sowohl an Hirnentwicklungsprozessen beteiligt, als auch an (leukozytärer) Chemotaxis und als Ko-Rezeptor zur HIV-Infektion (9).

In Mamma-Karzinomen kann Robo und Slit eine CXCR4/CXCL12-induzierte Metastasierung inhibiert werden. (146,174). Mit zunehmendem Malignitätsgrad werden CXCR4 und CXCL12 auch in primär glialen Tumoren exprimiert, vornehmlich in Regionen pathologischer Gefäße und in degenerativen, nekrotischen Abschnitten (180,189). Ob die vermehrte Expression von ROBO und SLIT in Glioblastomen zu ähnlichen Effekten in Migration und Metastasierung führen könnte oder ob möglicherweise ein Einfluss auf Tumor-Angiogenese überwiegt, müsste in weiteren Ansätzen untersucht werden.

4.6.4 Humanes ROBO2

In den untersuchten Proben scheint das Gen ROBO2 besonders in den untersuchten Biopsaten vermehrt exprimiert zu werden. Zusammen mit nachgewiesener Überexpression von ROBO2 in inflammatorischem Mamma- und Prostata-Karzinomen (15,127) lässt sich eine breite Beteiligung von ROBO2 an neoplastischen Prozessen mit Einfluss auf Migration und evtl. auch auf Immunmodulation vermuten (127). Genaue Regulationsmechanismen und Auswirkungen vermehrter Robo2-Expression sind bislang nicht bekannt. Das Protein robo2 unterscheidet sich von robo1 durch das Fehlen eines intrazellulären CC3-Motivs. Beteiligung an gerichtetem Zellwachstum ist sowohl für neuronale als auch für nicht-neuronale Zellen erwiesen (71,135).

4.6.5 Neogenin

Das eher entfernt homologe Neogenin kodiert für einen transmembranösen Rezeptor, der ebenfalls zur Ig-Superfamilie gehört und während embryonaler Entwicklung breit gefächert exprimiert wird (39,203). Es interagiert zum einen mit Netrinen, steuert dadurch über anziehende Eigenschaften axonales Wachstum und ist an Angiogenese und myogener Differenzierung beteiligt (39,103,107,161,224,225). In Interaktion mit dem membrangebundenen Protein rgm (repulsive guidance molecule) wird zum anderen die proapoptotische Aktivität von Neogenin blockiert (138,139).

Neogenin scheint anhand der vorliegenden PCR-Ergebnisse in Glioblastomen parallel zu den Homologen ROBO1 und ROBO2 vermehrt exprimiert zu werden. Eine in die gleiche Richtung wirkende Funktion bezüglich neoplastischer Prozesse scheint dadurch wahrscheinlich, zumal sich die Signalwege von robo und neogenin über Interaktion mit dem dcc-Rezeptor überschneiden (210).

Neogenin stimmt zu ca. 50% mit dem möglicherweise tumorsuppressiven dcc-Protein überein, einem Netrin-1-Rezeptor, der an Zellmigration und Apoptose beteiligt ist (80). Trotz seiner Lokalisation auf Chromosom 15q22, einer zuweilen modifizierten Region in invasiven Tumoren, wie Lymphomen und gastrointestinalen Tumoren, wurde im Gegensatz zu DCC für Neogenin keine veränderte Expression in Tumoren nachgewiesen, auch nicht in Glioblastomen (140). Möglicherweise kann Neogenin nur im Zusammenspiel mit Netrinen zelluläres Migrationsverhalten beeinflussen, bzw. über RGM gliale Apoptose inhibieren und neoplastisches Wachstum begünstigen.

Zusammenfassend erscheint für alle drei untersuchten humanen Homologen von *ROBO* eine, evtl. sogar gemeinsame, Beteiligung an malignen Proliferations-, Migrations- und Wachstumsprozessen in Glioblastomen möglich.

4.7 *SCHIZO*/ARF6, EFA6

4.7.1 *SCHIZO*

SCHIZO kodiert für mindestens zwei Proteine, die eine konservierte Sec7 und eine Pleckstrin Homologie-Domäne zu enthalten. Letztere ist charakteristisch für Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (GEF = Guanine nucleotide Exchange Factor), die an

ARF-G-Proteinen wirken und Endozytose regulieren. In *Drosophila* scheint *SCHIZO* durch Regulation von Slit- und Netrin-Aktivität (s. o.) das Gleichgewicht zwischen Axon-anziehenden (über Netrin- DCC, bzw. Neogenin-Interaktion) und -abweisenden Signalen (über slit-robo Interaktion) zu steuern. Vermutlich wird Expression von Slit durch Schizo über Endozytose und Exozytose antagonistisch reguliert. *SCHIZO* scheint dabei in der Regulation von *SLIT*-Expression funktionell starke Parallelen zu *COMM* aufzuweisen. Es wird ein posttranskriptionaler Mechanismus hinter dieser Regulation vermutet (154).

4.7.2 EFA6B

ADP-Ribolisations-Faktoren (ARF) bilden eine Gruppe an sechs niedermolekulargewichtigen Ras-verbundenen GTP-Bindungsproteinen, die für intrazelluläre Transportmechanismen benötigt werden (21,22). ARF6 reguliert Exozytose und Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose durch kontrollierte Modellierung des zelleigenen Aktin Zytoskelettes und Wiederaufbau der intakten Plasmamembran (42,55,175). Aktivierte ARF fördern zudem Migration und reguliert Zellverteilung und -haftung (35,157-159,208).

An GDP gebunden ist ARF inaktiv und aktiv, sobald GDP durch GTP ersetzt wird. Der Austausch von GDP zu GTP wird durch bestimmte Guanosin-Austausch-Faktoren (GEF= Guanosin Exchange Factor) katalysiert. Drei solcher GEF sind für ARF6 identifiziert: EFA6, ARNO/Cytohesin und ARF-GEP100 (207). Das in dieser Arbeit nachgewiesene EFA6B enthält eine Sec7-Domäne mit katalytischer, aktivierender GEF-Aktivität ausschließlich für ARF6 und wird zusammen mit ARF6 in Aktin-reichen Membranausstülpungen und Mikrovilli-ähnlichen Strukturen koexprimiert (49).

Zum Zeitpunkt der Arbeit lagen weder gesicherte Erkenntnisse über die Gensequenz noch über die Funktion von *SCHIZO* der *Drosophila melanogaster* vor, es gab lediglich Hinweise auf Strukturähnlichkeit zu humanen ARF-EFA. Mittlerweile wurde herausgefunden, dass die nächsten humanen Homologen EFA6 und ARF-GEP₁₀₀ mit Übereinstimmungen von 32% bzw. 40% sind. Die normalerweise bestehende Genexpression von EFA6 in Hirngewebe, trifft trotz seiner breit gestreuten Expression in

verschiedenen Geweben und Organen nicht auf die untersuchte Form EFA6B zu, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (40). Interessanterweise ist eine Expression von EFA6B jedoch in fünf der untersuchten Glioblastomproben nachzuweisen, was am ehesten für eine Expression in den Tumorzellen selbst spricht.

Eine Assoziation zu Tumoren ist für die GEF zu diesem Zeitpunkt nicht bewiesen. Es gibt jedoch erste Hinweise für eine essentielle Beteiligung von ARF6 an invasiven Eigenschaften in Brustkrebszellen (79). Ferner wurde das zweite bekannte Homologe ARF-GEP100 zusammen mit ARF6 in der humanen Glioblastomzelllinie T98G nachgewiesen (207). Die zusätzlich mit dieser Arbeit nachgewiesene Expression von EFA6B in Tumorgewebe lässt eine Beteiligung der GEF zumindest vermuten.

5 Zusammenfassung

Glioblastome als die häufigsten und gleichzeitig bösartigsten Hirntumore sind bislang keiner Therapie zugänglich und führen oft innerhalb weniger Monate nach der Diagnose zum Tod. Sämtliche Therapieansätze sind unzureichend und gehen mit schweren Nebenwirkungen einher.

Es gibt Hinweise, dass Entstehung und Invasivität von Glioblastomen auf evolutionär konservierten Prozessen beruhen. Ziel dieser Arbeit war es, auf Ebene der Genexpression anhand spezifischer Expressionsmuster erste Hinweise auf evolutionär konservierte Mechanismen glialer Proliferation und Invasion in humanen Glioblastomen aufzudecken, um diese Erkenntnis langfristig therapeutisch zu nutzen. Ausgangspunkt waren gesicherte Erkenntnisse über das ZNS der *Drosophila melanogaster*, das aufgrund von zellulären, strukturellen und molekularen Ähnlichkeiten als Modell für das wesentlich komplexere Vertebraten ZNS herangezogen werden kann. Folgende identifizierte Gene der *Drosophila melanogaster* mit bekannter Funktion in embryonaler Migration und Proliferation dienten als Ausgangspunkt: *BREATHLESS*, *GLIOTACTIN*, *KÄSTCHEN*, *LOCO*, *NONSTOP*, *ROBO* und *SCHIZO*. Die zugehörigen humanen Homologen wurden mittels BLAST-Recherche ermittelt: FGFR1 und FGFR2, Neuroligin1, Neuroligin2 und Neuroligin3, LIV-1 und similar to KIAA 1265, RGS12 und RGS 14, USP22 und UBP41, Robo 1, Robo2 und Neogenin sowie EFA6B. Mittels RT-PCR wurde die Genexpression der Homologe in Glioblastomzelllinien und -biopsaten im Vergleich zu normalem Hirngewebe untersucht.

Es stellte sich heraus, dass der Großteil der untersuchten Gene abweichend von normalem Hirngewebe in humanen Glioblastomen exprimiert wird und somit möglicherweise neoplastische Proliferation und Invasion über embryonale, evolutionär konservierte Mechanismen stattfindet. Aufgrund der nachgewiesenen Homologie der untersuchten Gene könnte das ZNS der *Drosophila melanogaster* im Umkehrschluss in begrenztem Ausmaß für zukünftige Funktionsanalysen und Therapieansätze von Glioblastomen möglicherweise ebenfalls ein geeignetes Modell darstellen.

6 Ausblick

In weiteren Untersuchungen ist besonders den Genen Aufmerksamkeit zu schenken, die im Vergleich zu normalem Hirngewebe eine veränderte Expression in Glioblastomgewebe vermuten lassen, demnach vor allem für Neuroline, LIV-1, ROBO, USP/UBP und EFA6. Für diese Gene scheint eine Assoziation zu extensiver Migration von neoplastischen Zellen möglich.

Nach Quantifizierung der in dieser Arbeit gefundenen Expressionsunterschiede mittels qRT-PCR könnten sich die Untersuchungen auf die letztendlich transkribierten Proteine konzentrieren, zum Beispiel mittels immunhistochemischer Nachweisverfahren auf Lokalisation und Funktion dieser im untersuchten Gewebe. Auswirkungen ermittelter Transkriptionsunterschiede auf Zellwachstum, Differenzierung und vor allem Migration sollten des Weiteren in vitro und in vivo untersucht werden. Es wäre zu versuchen, solche Untersuchungen aufgrund der nachgewiesenen Homologien und möglicherweise ähnlichen Funktionsweisen zunächst am Modell der *Drosophila melanogaster* zu untersuchen. Langfristig sollen zur Unterstützung üblicher Therapieansätze (neurochirurgische Behandlung, Radio-, Chemotherapie) neue therapeutische Strategien entwickelt werden mit besonderem Augenmerk auf gentherapeutische Optionen. Man hofft, durch gezieltes Eingreifen in tumorspezifische Prozesse effektiv gegen Glioblastome vorgehen zu können und gleichzeitig Komplikationen zu umgehen, die entweder zu Therapieresistenz führen und/oder mit Beeinträchtigung oder Zerstörung gesunden Hirngewebes einhergehen. Hier besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass das Modell-ZNS der *Drosophila melanogaster* als Indikator für effektive Strategien einzusetzen ist. Die aktuellen gentherapeutischen Ansätze konzentrieren sich hauptsächlich auf Transgene mit Einfluss auf Zellzyklus und Induktion von Apoptose, Migration/Invasion sowie auf Immun- und Anti-Angiogenese-Gentherapie (67,109). Darüberhinaus werden verschiedene Optionen des Gentransfers in die Tumorzellen über virale Vektoren und migratorische neuronale Stammzellen untersucht (2).

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Homologen in humanen Glioblastomgewebe könnten möglicherweise effektive Angriffsorte für weitere gentherapeutische Ansätze gegen evolutionär konservierte Mechanismen in Glioblastomen darstellen.

7 Literaturverzeichnis

1. Abrenica,B., Gilchrist,J.S. (2000) Nucleoplasmic Ca(2+)loading is regulated by mobilization of perinuclear Ca(2+). *Cell Calcium*, **28**, 127-136.
2. Aghi,M., Rabkin,S. (2005) Viral vectors as therapeutic agents for glioblastoma. *Curr.Opin.Mol.Ther.*, **7**, 419-430.
3. Alves-Rodrigues,A., Gregori,L., and Figueiredo-Pereira,M.E. (1998) Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci.*, **21**, 516-520.
4. Arjona,D., Bello,M.J., Alonso,M.E., Gonzalez-Gomez,P., Lomas,J., Aminoso,C., Lopez-Marin,I., Isla,A., De Campos,J.M., Vaquero,J., Gutierrez,M., Villalobo,A., and Rey,J.A. (2004) Molecular analysis of the erbB gene family calmodulin-binding and calmodulin-like domains in astrocytic gliomas. *Int.J.Oncol.*, **25**, 1489-1494.
5. Auguste,P., Gursel,D.B., Lemiere,S., Reimers,D., Cuevas,P., Carceller,F., Di Santo,J.P., and Bikfalvi,A. (2001) Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res.*, **61**, 1717-1726.
6. Auld,V.J., Fetter,R.D., Broadie,K., and Goodman,C.S. (1995) Gliotactin, a novel transmembrane protein on peripheral glia, is required to form the blood-nerve barrier in *Drosophila*. *Cell*, **81**, 757-767.
7. Baeza,N., Weller,M., Yonekawa,Y., Kleihues,P., and Ohgaki,H. (2003) PTEN methylation and expression in glioblastomas. *Acta Neuropathol.(Berl)*, **106**, 479-485.
8. Barber,P.C., Lindsay,R.M. (1982) Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience*, **7**, 3077-3090.
9. Barbero,S., Bajetto,A., Bonavia,R., Porcile,C., Piccioli,P., Pirani,P., Ravetti,J.L., Zona,G., Spaziante,R., Florio,T., and Schettini,G. (2002) Expression of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 in

- human brain tumors and their involvement in glial proliferation in vitro. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **973**, 60-69.
10. Barker,F.G., Chang,S.M., Larson,D.A., Sneed,P.K., Wara,W.M., Wilson,C.B., and Prados,M.D. (2001) Age and radiation response in glioblastoma multiforme. *Neurosurgery*, **49**, 1288-1297.
 11. Barnett,S.C. (2004) Olfactory ensheathing cells: unique glial cell types? *J.Neurotrauma*, **21**, 375-382.
 12. Beaumont,A., Clarke,M., and Whittle,I.R. (1996) The effects of malignant glioma on the EEG and seizure thresholds: an experimental study. *Acta Neurochir.(Wien.)*, **138**, 370-381.
 13. Beaumont,A., Whittle,I.R. (2000) The pathogenesis of tumour associated epilepsy. *Acta Neurochir.(Wien.)*, **142**, 1-15.
 14. Behin,A., Hoang-Xuan,K., Carpentier,A.F., and Delattre,J.Y. (2003) Primary brain tumours in adults. *Lancet*, **361**, 323-331.
 15. Bieche,I., Lerebours,F., Tozlu,S., Espie,M., Marty,M., and Lidereau,R. (2004) Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. *Clin.Cancer Res.*, **10**, 6789-6795.
 16. Binder,D.K., Berger,M.S. (2002) Proteases and the biology of glioma invasion. *J.Neurooncol.*, **56**, 149-158.
 17. Bolliger,M.F., Frei,K., Winterhalter,K.H., and Gloor,S.M. (2001) Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression. *Biochem.J.*, **356**, 581-588.
 18. Burger,P.C., Shibata,T., and Kleihues,P. (1986) The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am.J.Surg.Pathol.*, **10**, 611-617.
 19. Burke,L., Flieder,D.B., Guinee,D.G., Brambilla,E., Freedman,A.N., Bennett,W.P., Jones,R.T., Borkowski,A., Caporaso,N.A., Fleming,M., Trastek,V., Pairolero,P., Tazelaar,H., Midthun,D., Jett,J.R., Liotta,L.A., Travis,W.D., and Harris,C.C. (2005) Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. *Clin.Cancer Res.*, **11**, 232-241.

20. Chatterjee,T.K., Fisher,R.A. (2000) Novel alternative splicing and nuclear localization of human RGS12 gene products. *J.Biol.Chem.*, **275**, 29660-29671.
21. Chavrier,P., Franco,M. (2001) Expression, purification, and biochemical properties of EFA6, a Sec7 domain-containing guanine exchange factor for ADP-ribosylation factor 6 (ARF6). *Methods Enzymol.*, **329**, 272-279.
22. Chavrier,P., Goud,B. (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **11**, 466-475.
23. Chernova,O.B., Hunyadi,A., Malaj,E., Pan,H., Crooks,C., Roe,B., and Cowell,J.K. (2001) A novel member of the WD-repeat gene family, WDR11, maps to the 10q26 region and is disrupted by a chromosome translocation in human glioblastoma cells. *Oncogene*, **20**, 5378-5392.
24. Chih,B., Engelman,H., and Scheiffele,P. (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*, **307**, 1324-1328.
25. Chimienti,F., Aouffen,M., Favier,A., and Seve,M. (2003) Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. *Curr.Drug Targets.*, **4**, 323-338.
26. Cho,H., Kim,D.U., and Kehrl,J.H. (2005) RGS14 is a centrosomal and nuclear cytoplasmic shuttling protein that traffics to promyelocytic leukemia nuclear bodies following heat shock. *J.Biol.Chem.*, **280**, 805-814.
27. Chung,C.H., Baek,S.H. (1999) Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **266**, 633-640.
28. Chung,K.K., Dawson,V.L., and Dawson,T.M. (2001) The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.*, **24**, S7-14.
29. Collins,V.P. (1999) Progression as exemplified by human astrocytic tumors. *Semin.Cancer Biol.*, **9**, 267-276.
30. Collins,V.P. (2002) Cellular mechanisms targeted during astrocytoma progression. *Cancer Lett.*, **188**, 1-7.
31. Couch,J.A., Chen,J., Rieff,H.I., Uri,E.M., and Condrón,B.G. (2004) robo2 and robo3 interact with eagle to regulate serotonergic neuron differentiation. *Development*, **131**, 997-1006.

32. Croteau,D., Mikkelsen,T. (2001) Adults with newly diagnosed high-grade gliomas. *Curr.Treat.Options.Oncol.*, **2**, 507-515.
33. Crowner,D., Madden,K., Goeke,S., and Giniger,E. (2002) Lola regulates midline crossing of CNS axons in Drosophila. *Development*, **129**, 1317-1325.
34. D'Andrea,M.R., Ilyin,S., and Plata-Salaman,C.R. (2001) Abnormal patterns of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunolabeling in neuronal nuclei and Lewy bodies in Parkinson's disease substantia nigra brain tissues. *Neurosci.Lett.*, **306**, 137-140.
35. D'Souza-Schorey,C., Li,G., Colombo,M.I., and Stahl,P.D. (1995) A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science*, **267**, 1175-1178.
36. Dallol,A., Da Silva,N.F., Viacava,P., Minna,J.D., Bieche,I., Maher,E.R., and Latif,F. (2002) SLIT2, a human homologue of the Drosophila Slit2 gene, has tumor suppressor activity and is frequently inactivated in lung and breast cancers. *Cancer Res.*, **62**, 5874-5880.
37. Dallol,A., Morton,D., Maher,E.R., and Latif,F. (2003) SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.*, **63**, 1054-1058.
38. Dumas-Duport,C., Scheithauer,B., O'Fallon,J., and Kelly,P. (1988) Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*, **62**, 2152-2165.
39. De Breuck,S., Lardon,J., Rooman,I., and Bouwens,L. (2003) Netrin-1 expression in fetal and regenerating rat pancreas and its effect on the migration of human pancreatic duct and porcine islet precursor cells. *Diabetologia*, **46**, 926-933.
40. Derrien,V., Couillault,C., Franco,M., Martineau,S., Montcourrier,P., Houlgatte,R., and Chavrier,P. (2002) A conserved C-terminal domain of EFA6-family ARF6-guanine nucleotide exchange factors induces lengthening of microvilli-like membrane protrusions. *J.Cell Sci.*, **115**, 2867-2879.
41. Dix,A.R., Brooks,W.H., Roszman,T.L., and Morford,L.A. (1999) Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J.Neuroimmunol.*, **100**, 216-232.

42. Donaldson,J.G., Radhakrishna,H. (2001) Expression and properties of ADP-ribosylation factor (ARF6) in endocytic pathways. *Methods Enzymol.*, **329**, 247-256.
43. Dong,H., Xiang,Y.Y., Farchi,N., Ju,W., Wu,Y., Chen,L., Wang,Y., Hochner,B., Yang,B., Soreq,H., and Lu,W.Y. (2004) Excessive expression of acetylcholinesterase impairs glutamatergic synaptogenesis in hippocampal neurons. *J.Neurosci.*, **24**, 8950-8960.
44. Dresemann,G. (2005) Imatinib and hydroxyurea in pretreated progressive glioblastoma multiforme: a patient series. *Ann.Oncol.*, **16**, 1702-1708.
45. Dunn,I.F., Heese,O., and Black,P.M. (2000) Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs. *J.Neurooncol.*, **50**, 121-137.
46. Effert,P.J., Neubauer,A., Walther,P.J., and Liu,E.T. (1992) Alterations of the P53 gene are associated with the progression of a human prostate carcinoma. *J.Urol.*, **147**, 789-793.
47. Elsaleh,H., Powell,B., Soontrapornchai,P., Joseph,D., Gorla,F., Spry,N., and Iacopetta,B. (2000) p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: impact on survival of 388 patients with Dukes' C colon carcinoma. *Oncology*, **58**, 52-59.
48. Fan,X., Labrador,J.P., Hing,H., and Bashaw,G.J. (2003) Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron*, **40**, 113-127.
49. Franco,M., Peters,P.J., Boretto,J., van Donselaar,E., Neri,A., D'Souza-Schorey,C., and Chavrier,P. (1999) EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *EMBO J.*, **18**, 1480-1491.
50. Friese,M.A., Steinle,A., and Weller,M. (2004) The innate immune response in the central nervous system and its role in glioma immune surveillance. *Onkologie.*, **27**, 487-491.
51. Fu,L., Abu-Khalil,A., Morrison,R.S., Geschwind,D.H., and Kornblum,H.I. (2003) Expression patterns of epidermal growth factor receptor and fibroblast growth factor receptor 1 mRNA in fetal human brain. *J.Comp Neurol.*, **462**, 265-273.

52. Fujisawa,H., Kurrer,M., Reis,R.M., Yonekawa,Y., Kleihues,P., and Ohgaki,H. (1999) Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am.J.Pathol.*, **155**, 387-394.
53. Fujisawa,H., Reis,R.M., Nakamura,M., Colella,S., Yonekawa,Y., Kleihues,P., and Ohgaki,H. (2000) Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest*, **80**, 65-72.
54. Fujita,M., Mizuno,M., Nagasaka,T., Wakabayashi,T., Maeda,K., Ishii,D., Arima,T., Kawajiri,A., Inagaki,M., and Yoshida,J. (2004) Aurora-B dysfunction of multinucleated giant cells in glioma detected by site-specific phosphorylated antibodies. *J.Neurosurg.*, **101**, 1012-1017.
55. Galas,M.C., Helms,J.B., Vitale,N., Thierse,D., Aunis,D., and Bader,M.F. (1997) Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J.Biol.Chem.*, **272**, 2788-2793.
56. Galli,R., Binda,E., Orfanelli,U., Cipelletti,B., Gritti,A., De Vitis,S., Fiocco,R., Foroni,C., Dimeco,F., and Vescovi,A. (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.*, **64**, 7011-7021.
57. Gervin,C.M., McCulla,A., Williams,M., and Ouhtit,A. (2003) Dysfunction of p53 in photocarcinogenesis. *Front Biosci.*, **8**, s715-s717.
58. Gewies,A., Grimm,S. (2003) UBP41 is a proapoptotic ubiquitin-specific protease. *Cancer Res.*, **63**, 682-688.
59. Giese,A., Bjerkvig,R., Berens,M.E., and Westphal,M. (2003) Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J.Clin.Oncol.*, **21**, 1624-1636.
60. Giese,A., Westphal,M. (1996) Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery*, **39**, 235-250.
61. Giglia-Mari,G., Sarasin,A. (2003) TP53 mutations in human skin cancers. *Hum.Mutat.*, **21**, 217-228.

62. Gilchrist,C.A., Baker,R.T. (2000) Characterization of the ubiquitin-specific protease activity of the mouse/human Unp/Unph oncoprotein. *Biochim.Biophys.Acta*, **1481**, 297-309.
63. Glavac,D., Volavsek,M., Potocnik,U., Ravnik-Glavac,M., and Gale,N. (2003) Low microsatellite instability and high loss of heterozygosity rates indicate dominant role of the suppressor pathway in squamous cell carcinoma of head and neck and loss of heterozygosity of 11q14.3 correlates with tumor grade. *Cancer Genet.Cytogenet.*, **146**, 27-32.
64. Goldbrunner,R.H., Bernstein,J.J., and Tonn,J.C. (1998) ECM-mediated glioma cell invasion. *Microsc.Res.Tech.*, **43**, 250-257.
65. Goldbrunner,R.H., Bernstein,J.J., and Tonn,J.C. (1999) Cell-extracellular matrix interaction in glioma invasion. *Acta Neurochir.(Wien.)*, **141**, 295-305.
66. Golestaneh,N., Mishra,B. (2005) TGF-beta, neuronal stem cells and glioblastoma. *Oncogene*, **24**, 5722-5730.
67. Gondi,C.S., Lakka,S.S., Yanamandra,N., Olivero,W.C., Dinh,D.H., Gujrati,M., Tung,C.H., Weissleder,R., and Rao,J.S. (2004) Adenovirus-mediated expression of antisense urokinase plasminogen activator receptor and antisense cathepsin B inhibits tumor growth, invasion, and angiogenesis in gliomas. *Cancer Res.*, **64**, 4069-4077.
68. Graf,E.R., Zhang,X., Jin,S.X., Linhoff,M.W., and Craig,A.M. (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell*, **119**, 1013-1026.
69. Granderath,S., Stollewerk,A., Greig,S., Goodman,C.S., O'Kane,C.J., and Klambt,C. (1999) loco encodes an RGS protein required for Drosophila glial differentiation. *Development*, **126**, 1781-1791.
70. Gray,D.A., Inazawa,J., Gupta,K., Wong,A., Ueda,R., and Takahashi,T. (1995) Elevated expression of Unph, a proto-oncogene at 3p21.3, in human lung tumors. *Oncogene*, **10**, 2179-2183.
71. Grieshammer,U., Le,M., Plump,A.S., Wang,F., Tessier-Lavigne,M., and Martin,G.R. (2004) SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev.Cell*, **6**, 709-717.

72. Grisar, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., and Soreq, H. (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.*, **264**, 672-686.
73. Grose, R., Dickson, C. (2005) Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **16**, 179-186.
74. Guan, H., Zu, G., Xie, Y., Tang, H., Johnson, M., Xu, X., Kevil, C., Xiong, W. C., Elmets, C., Rao, Y., Wu, J. Y., and Xu, H. (2003) Neuronal repellent Slit2 inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses. *J. Immunol.*, **171**, 6519-6526.
75. Gudina, I., Pranys, D., and Juozaityte, E. (2004) Impact of morphology and biology on the prognosis of patients with gliomas. *Medicina (Kaunas.)*, **40**, 112-120.
76. Gunther, T., Schneider-Stock, R., Rys, J., Niezabitowski, A., and Roessner, A. (1997) p53 gene mutations and expression of p53 and mdm2 proteins in invasive breast carcinoma. A comparative analysis with clinico-pathological factors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **123**, 388-394.
77. Hamel, W., Westphal, M. (2000) Growth factors in gliomas revisited. *Acta Neurochir. (Wien.)*, **142**, 113-137.
78. Hara, A., Saegusa, M., Mikami, T., and Okayasu, I. (2001) Loss of DCC expression in astrocytomas: relation to p53 abnormalities, cell kinetics, and survival. *J. Clin. Pathol.*, **54**, 860-865.
79. Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A., and Sabe, H. (2004) Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 6647-6652.
80. Hilgers, W., Song, J. J., Haye, M., Hruban, R. R., Kern, S. E., and Fearon, E. R. (2000) Homozygous deletions inactivate DCC, but not MADH4/DPC4/SMAD4, in a subset of pancreatic and biliary cancers. *Genes Chromosomes. Cancer*, **27**, 353-357.
81. Hollinger, S., Ramineni, S., and Hepler, J. R. (2003) Phosphorylation of RGS14 by protein kinase A potentiates its activity toward G alpha i. *Biochemistry*, **42**, 811-819.

82. Hollinger,S., Taylor,J.B., Goldman,E.H., and Hepler,J.R. (2001) RGS14 is a bifunctional regulator of Galphai/o activity that exists in multiple populations in brain. *J.Neurochem.*, **79**, 941-949.
83. Hulleman,E., Helin,K. (2005) Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv.Cancer Res.*, **94**, 1-27.
84. Ichimura,K., Bolin,M.B., Goike,H.M., Schmidt,E.E., Moshref,A., and Collins,V.P. (2000) Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res.*, **60**, 417-424.
85. Ichimura,K., Schmidt,E.E., Goike,H.M., and Collins,V.P. (1996) Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene*, **13**, 1065-1072.
86. Ichimura,K., Schmidt,E.E., Miyakawa,A., Goike,H.M., and Collins,V.P. (1998) Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes.Cancer*, **22**, 9-15.
87. Ichtchenko,K., Nguyen,T., and Sudhof,T.C. (1996) Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *J.Biol.Chem.*, **271**, 2676-2682.
88. Irie,M., Hata,Y., Takeuchi,M., Ichtchenko,K., Toyoda,A., Hirao,K., Takai,Y., Rosahl,T.W., and Sudhof,T.C. (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science*, **277**, 1511-1515.
89. Ishiuchi,S., Tsuzuki,K., Yoshida,Y., Yamada,N., Hagimura,N., Okado,H., Miwa,A., Kurihara,H., Nakazato,Y., Tamura,M., Sasaki,T., and Ozawa,S. (2002) Blockage of Ca(2+)-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Nat.Med.*, **8**, 971-978.
90. Jabs,E.W., Li,X., Scott,A.F., Meyers,G., Chen,W., Eccles,M., Mao,J.I., Charnas,L.R., Jackson,C.E., and Jaye,M. (1994) Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nat.Genet.*, **8**, 275-279.

91. Jamain,S., Quach,H., Betancur,C., Rastam,M., Colineaux,C., Gillberg,I.C., Soderstrom,H., Giros,B., Leboyer,M., Gillberg,C., and Bourgeron,T. (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat.Genet.*, **34**, 27-29.
92. Jang,J.H., Chung,C.P. (2003) Loss of ligand-binding specificity of fibroblast growth factor receptor 2 by RNA splicing in human chondrosarcoma cells. *Cancer Lett.*, **191**, 215-222.
93. Jang,J.H., Shin,K.H., and Park,J.G. (2001) Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res.*, **61**, 3541-3543.
94. Jang,J.H., Shin,K.H., and Park,J.G. (2001) Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res.*, **61**, 3541-3543.
95. Janssen,J.W., Schleithoff,L., Bartram,C.R., and Schulz,A.S. (1998) An oncogenic fusion product of the phosphatidylinositol 3-kinase p85beta subunit and HUMORF8, a putative deubiquitinating enzyme. *Oncogene*, **16**, 1767-1772.
96. Jesenberger,V., Jentsch,S. (2002) Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **3**, 112-121.
97. Jin,W., Bi,W., Huang,E.S., and Cote,G.J. (1999) Glioblastoma cell-specific expression of fibroblast growth factor receptor-1beta requires an intronic repressor of RNA splicing. *Cancer Res.*, **59**, 316-319.
98. Jin,W., Huang,E.S., Bi,W., and Cote,G.J. (1998) Exon sequence is required for regulated RNA splicing of the human fibroblast growth factor receptor-1 alpha-exon. *J.Biol.Chem.*, **273**, 16170-16176.
99. Jin,W., Huang,E.S., Bi,W., and Cote,G.J. (1999) Redundant intronic repressors function to inhibit fibroblast growth factor receptor-1 alpha-exon recognition in glioblastoma cells. *J.Biol.Chem.*, **274**, 28035-28041.
100. Johnson,G., Moore,S.W. (2000) Cholinesterases modulate cell adhesion in human neuroblastoma cells in vitro. *Int.J.Dev.Neurosci.*, **18**, 781-790.
101. Joo,Y.E., Sohn,Y.H., Lee,W.S., Park,C.H., Choi,S.K., Rew,J.S., Park,C.S., and Kim,S.J. (2002) Expression of vascular endothelial growth factor and p53 in pancreatic carcinomas. *Korean J.Intern.Med.*, **17**, 153-159.

102. Kambe,T., Yamaguchi-Iwai,Y., Sasaki,R., and Nagao,M. (2004) Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol.Life Sci.*, **61**, 49-68.
103. Kang,J.S., Yi,M.J., Zhang,W., Feinleib,J.L., Cole,F., and Krauss,R.S. (2004) Netrins and neogenin promote myotube formation. *J.Cell Biol.*, **167**, 493-504.
104. Kato,H., Kato,S., Kumabe,T., Sonoda,Y., Yoshimoto,T., Kato,S., Han,S.Y., Suzuki,T., Shibata,H., Kanamaru,R., and Ishioka,C. (2000) Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. *Clin.Cancer Res.*, **6**, 3937-3943.
105. Kaur,B., Tan,C., Brat,D.J., Post,D.E., and Van Meir,E.G. (2004) Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. *J.Neurooncol.*, **70**, 229-243.
106. Kawano,H., Kubota,T., Sato,K., Goya,T., Arikawa,S., and Wakisaka,S. (1995) Immunohistochemical study of giant cell in glioblastoma. *Clin.Neuropathol.*, **14**, 118-123.
107. Keino-Masu,K., Masu,M., Hinck,L., Leonardo,E.D., Chan,S.S., Culotti,J.G., and Tessier-Lavigne,M. (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell*, **87**, 175-185.
108. Keleman,K., Rajagopalan,S., Cleppien,D., Teis,D., Paiha,K., Huber,L.A., Technau,G.M., and Dickson,B.J. (2002) Comm sorts robo to control axon guidance at the Drosophila midline. *Cell*, **110**, 415-427.
109. Kew,Y., Levin,V.A. (2003) Advances in gene therapy and immunotherapy for brain tumors. *Curr.Opin.Neurol.*, **16**, 665-670.
110. Khazaie,K., Schirmacher,V., and Lichtner,R.B. (1993) EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **12**, 255-274.
111. Kidd,T., Bland,K.S., and Goodman,C.S. (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in Drosophila. *Cell*, **96**, 785-794.
112. Kidd,T., Brose,K., Mitchell,K.J., Fetter,R.D., Tessier-Lavigne,M., Goodman,C.S., and Tear,G. (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell*, **92**, 205-215.
113. Kidd,T., Russell,C., Goodman,C.S., and Tear,G. (1998) Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron*, **20**, 25-33.

114. Kim,S., Chung,J.K., Im,S.H., Jeong,J.M., Lee,D.S., Kim,D.G., Jung,H.W., and Lee,M.C. (2005) 11C-methionine PET as a prognostic marker in patients with glioma: comparison with 18F-FDG PET. *Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging*, **32**, 52-59.
115. Kimple,R.J., De Vries,L., Tronchere,H., Behe,C.I., Morris,R.A., Gist,F.M., and Siderovski,D.P. (2001) RGS12 and RGS14 GoLoco motifs are G alpha(i) interaction sites with guanine nucleotide dissociation inhibitor Activity. *J.Biol.Chem.*, **276**, 29275-29281.
116. Kitange,G.J., Smith,J.S., and Jenkins,R.B. (2001) Genetic alterations and chemotherapeutic response in human diffuse gliomas. *Expert.Rev.Anticancer Ther.*, **1**, 595-605.
117. Kitange,G.J., Templeton,K.L., and Jenkins,R.B. (2003) Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. *Curr.Opin.Oncol.*, **15**, 197-203.
118. Klaes,A., Menne,T., Stollewerk,A., Scholz,H., and Klambt,C. (1994) The Ets transcription factors encoded by the Drosophila gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell*, **78**, 149-160.
119. Klambt,C., Goodman,C.S. (1991) Role of the midline glia and neurons in the formation of the axon commissures in the central nervous system of the Drosophila embryo. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **633**, 142-159.
120. Kleihues,P., Louis,D.N., Scheithauer,B.W., Rorke,L.B., Reifenberger,G., Burger,P.C., and Cavenee,W.K. (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, **61**, 215-225.
121. Kohling,R., Senner,V., Paulus,W., and Speckmann,E.J. (2005) Epileptiform activity preferentially arises outside tumor invasion zone in glioma xenotransplants. *Neurobiol.Dis.*
122. Konopka,G., Bonni,A. (2003) Signaling pathways regulating gliomagenesis. *Curr.Mol.Med.*, **3**, 73-84.
123. Kramer,S.G., Kidd,T., Simpson,J.H., and Goodman,C.S. (2001) Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. *Science*, **292**, 737-740.
124. Kunkel,P., Ulbricht,U., Bohlen,P., Brockmann,M.A., Fillbrandt,R., Stavrou,D., Westphal,M., and Lamszus,K. (2001) Inhibition of glioma angiogenesis and

- growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Res.*, **61**, 6624-6628.
125. Kurban,G., Ishiwata,T., Kudo,M., Yokoyama,M., Sugisaki,Y., and Naito,Z. (2004) Expression of keratinocyte growth factor receptor (KGFR/FGFR2 IIIb) in human uterine cervical cancer. *Oncol.Rep.*, **11**, 987-991.
126. Larminie,C., Murdock,P., Walhin,J.P., Duckworth,M., Blumer,K.J., Scheideler,M.A., and Garnier,M. (2004) Selective expression of regulators of G-protein signaling (RGS) in the human central nervous system. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, **122**, 24-34.
127. Latil,A., Chene,L., Cochant-Priollet,B., Mangin,P., Fournier,G., Berthon,P., and Cussenot,O. (2003) Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. *Int.J.Cancer*, **103**, 306-315.
128. Laumonnier,F., Bonnet-Brilhault,F., Gomot,M., Blanc,R., David,A., Moizard,M.P., Raynaud,M., Ronce,N., Lemonnier,E., Calvas,P., Laudier,B., Chelly,J., Fryns,J.P., Ropers,H.H., Hamel,B.C., Andres,C., Barthelemy,C., Moraine,C., and Briault,S. (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am.J.Hum.Genet.*, **74**, 552-557.
129. Levicar,N., Nuttall,R.K., and Lah,T.T. (2003) Proteases in brain tumour progression. *Acta Neurochir.(Wien.)*, **145**, 825-838.
130. Levinson,J.N., Chery,N., Huang,K., Wong,T.P., Gerrow,K., Kang,R., Prange,O., Wang,Y.T., and El Husseini,A. (2005) Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: Involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroligin induced synaptic specificity. *J.Biol.Chem.*
131. Li,M., Chen,D., Shiloh,A., Luo,J., Nikolaev,A.Y., Qin,J., and Gu,W. (2002) Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*, **416**, 648-653.
132. Li,X., Lewanda,A.F., Eluma,F., Jerald,H., Choi,H., Alozie,I., Proukakis,C., Talbot,C.C., Jr., Vander,K.C., Bird,L.M., and . (1994) Two craniosynostotic syndrome loci, Crouzon and Jackson-Weiss, map to chromosome 10q23-q26. *Genomics*, **22**, 418-424.

133. Li,Z., Na,X., Wang,D., Schoen,S.R., Messing,E.M., and Wu,G. (2002) Ubiquitination of a novel deubiquitinating enzyme requires direct binding to von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J.Biol.Chem.*, **277**, 4656-4662.
134. Li,Z., Wang,D., Na,X., Schoen,S.R., Messing,E.M., and Wu,G. (2002) Identification of a deubiquitinating enzyme subfamily as substrates of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **294**, 700-709.
135. Long,H., Sabatier,C., Ma,L., Plump,A., Yuan,W., Ornitz,D.M., Tamada,A., Murakami,F., Goodman,C.S., and Tessier-Lavigne,M. (2004) Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron*, **42**, 213-223.
136. Lukas,J., Niu,N., and Press,M.F. (2000) p53 mutations and expression in breast carcinoma in situ. *Am.J.Pathol.*, **156**, 183-191.
137. Martin-McCaffrey,L., Willard,F.S., Oliveira-dos-Santos,A.J., Natale,D.R., Snow,B.E., Kimple,R.J., Pajak,A., Watson,A.J., Dagnino,L., Penninger,J.M., Siderovski,D.P., and D'Souza,S.J. (2004) RGS14 is a mitotic spindle protein essential from the first division of the mammalian zygote. *Dev.Cell*, **7**, 763-769.
138. Matsunaga,E., Chedotal,A. (2004) Repulsive guidance molecule/neogenin: a novel ligand-receptor system playing multiple roles in neural development. *Dev.Growth Differ.*, **46**, 481-486.
139. Matsunaga,E., Tauszig-Delamasure,S., Monnier,P.P., Mueller,B.K., Strittmatter,S.M., Mehlen,P., and Chedotal,A. (2004) RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat.Cell Biol.*, **6**, 749-755.
140. Meyerhardt,J.A., Look,A.T., Bigner,S.H., and Fearon,E.R. (1997) Identification and characterization of neogenin, a DCC-related gene. *Oncogene*, **14**, 1129-1136.
141. Monney,L., Otter,I., Olivier,R., Ozer,H.L., Haas,A.L., Omura,S., and Borner,C. (1998) Defects in the ubiquitin pathway induce caspase-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *J.Biol.Chem.*, **273**, 6121-6131.
142. Morrison,R.S., Giordano,S., Yamaguchi,F., Hendrickson,S., Berger,M.S., and Palczewski,K. (1993) Basic fibroblast growth factor expression is required for clonogenic growth of human glioma cells. *J.Neurosci.Res.*, **34**, 502-509.

143. Morrison,R.S., Yamaguchi,F., Bruner,J.M., Tang,M., McKeehan,W., and Berger,M.S. (1994) Fibroblast growth factor receptor gene expression and immunoreactivity are elevated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Res.*, **54**, 2794-2799.
144. Morrison,R.S., Yamaguchi,F., Saya,H., Bruner,J.M., Yahanda,A.M., Donehower,L.A., and Berger,M. (1994) Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor I are implicated in the growth of human astrocytomas. *J.Neurooncol.*, **18**, 207-216.
145. Mueller,M.M., Werbowetski,T., and Del Maestro,R.F. (2003) Soluble factors involved in glioma invasion. *Acta Neurochir.(Wien.)*, **145**, 999-1008.
146. Muller,A., Homey,B., Soto,H., Ge,N., Catron,D., Buchanan,M.E., McClanahan,T., Murphy,E., Yuan,W., Wagner,S.N., Barrera,J.L., Mohar,A., Verastegui,E., and Zlotnik,A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, **410**, 50-56.
147. Navone,N.M., Troncoso,P., Pisters,L.L., Goodrow,T.L., Palmer,J.L., Nichols,W.W., von Eschenbach,A.C., and Conti,C.J. (1993) p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.*, **85**, 1657-1669.
148. Nieder,C., Andratschke,N., Wiedenmann,N., Busch,R., Grosu,A.L., and Molls,M. (2004) Radiotherapy for high-grade gliomas. Does altered fractionation improve the outcome? *Strahlenther.Onkol.*, **180**, 401-407.
149. Nishikawa,R., Sugiyama,T., Narita,Y., Furnari,F., Cavenee,W.K., and Matsutani,M. (2004) Immunohistochemical analysis of the mutant epidermal growth factor, deltaEGFR, in glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.*, **21**, 53-56.
150. Nutt,C.L., Matthews,R.T., and Hockfield,S. (2001) Glial tumor invasion: a role for the upregulation and cleavage of BEHAB/brevican. *Neuroscientist.*, **7**, 113-122.
151. Ohgaki,H., Dessen,P., Jourde,B., Horstmann,S., Nishikawa,T., Di Patre,P.L., Burkhard,C., Schuler,D., Probst-Hensch,N.M., Maiorka,P.C., Baeza,N., Pisani,P., Yonekawa,Y., Yasargil,M.G., Lutolf,U.M., and Kleihues,P. (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.*, **64**, 6892-6899.

152. Olivera,S., Henley,J.M., and Rodriguez-Ithurrealde,D. (2003) AMPA receptor potentiation by acetylcholinesterase is age-dependently upregulated at synaptogenesis sites of the rat brain. *Int.J.Dev.Neurosci.*, **21**, 49-61.
153. Olivera,S., Rodriguez-Ithurrealde,D., and Henley,J.M. (2003) Acetylcholinesterase promotes neurite elongation, synapse formation, and surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurones. *Mol.Cell Neurosci.*, **23**, 96-106.
154. Onel,S., Bolke,L., and Klambt,C. (2004) The Drosophila ARF6-GEF Schizo controls commissure formation by regulating Slit. *Development*, **131**, 2587-2594.
155. Ovaa,H., Kessler,B.M., Rolen,U., Galardy,P.J., Ploegh,H.L., and Masucci,M.G. (2004) Activity-based ubiquitin-specific protease (USP) profiling of virus-infected and malignant human cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **101**, 2253-2258.
156. Ovaa,H., van Swieten,P.F., Kessler,B.M., Leeuwenburgh,M.A., Fiebiger,E., van den Nieuwendijk,A.M., Galardy,P.J., van der Marel,G.A., Ploegh,H.L., and Overkleeft,H.S. (2003) Chemistry in living cells: detection of active proteasomes by a two-step labeling strategy. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, **42**, 3626-3629.
157. Palacios,F., D'Souza-Schorey,C. (2003) Modulation of Rac1 and ARF6 activation during epithelial cell scattering. *J.Biol.Chem.*, **278**, 17395-17400.
158. Palacios,F., Price,L., Schweitzer,J., Collard,J.G., and D'Souza-Schorey,C. (2001) An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *EMBO J.*, **20**, 4973-4986.
159. Palacios,F., Schweitzer,J.K., Boshans,R.L., and D'Souza-Schorey,C. (2002) ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 929-936.
160. Pardo,F.S., Aronen,H.J., Fitzek,M., Kennedy,D.N., Efird,J., Rosen,B.R., and Fischman,A.J. (2004) Correlation of FDG-PET interpretation with survival in a cohort of glioma patients. *Anticancer Res.*, **24**, 2359-2365.
161. Park,K.W., Crouse,D., Lee,M., Karnik,S.K., Sorensen,L.K., Murphy,K.J., Kuo,C.J., and Li,D.Y. (2004) The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **101**, 16210-16215.

162. Park,W.J., Meyers,G.A., Li,X., Theda,C., Day,D., Orlow,S.J., Jones,M.C., and Jabs,E.W. (1995) Novel FGFR2 mutations in Crouzon and Jackson-Weiss syndromes show allelic heterogeneity and phenotypic variability. *Hum.Mol.Genet.*, **4**, 1229-1233.
163. Paulus,W., Tonn,J.C. (1995) Interactions of glioma cells and extracellular matrix. *J.Neurooncol.*, **24**, 87-91.
164. Pende,M., Holtzclaw,L.A., Curtis,J.L., Russell,J.T., and Gallo,V. (1994) Glutamate regulates intracellular calcium and gene expression in oligodendrocyte progenitors through the activation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **91**, 3215-3219.
165. Perry,C., Sklan,E.H., Birikh,K., Shapira,M., Trejo,L., Eldor,A., and Soreq,H. (2002) Complex regulation of acetylcholinesterase gene expression in human brain tumors. *Oncogene*, **21**, 8428-8441.
166. Philibert,R.A., Winfield,S.L., Sandhu,H.K., Martin,B.M., and Ginns,E.I. (2000) The structure and expression of the human neuroligin-3 gene. *Gene*, **246**, 303-310.
167. Pielage,J., Kippert,A., Zhu,M., and Klambt,C. (2004) The Drosophila transmembrane protein Fear-of-intimacy controls glial cell migration. *Dev.Biol.*, **275**, 245-257.
168. Pirotte,B., Goldman,S., Massager,N., David,P., Wikler,D., Lipszyc,M., Salmon,I., Brotchi,J., and Levivier,M. (2004) Combined use of 18F-fluorodeoxyglucose and 11C-methionine in 45 positron emission tomography-guided stereotactic brain biopsies. *J.Neurosurg.*, **101**, 476-483.
169. Pixley,S.K. (1992) The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both in vivo and in vitro. *Glia*, **5**, 269-284.
170. Poeck,B., Fischer,S., Gunning,D., Zipursky,S.L., and Salecker,I. (2001) Glial cells mediate target layer selection of retinal axons in the developing visual system of Drosophila. *Neuron*, **29**, 99-113.
171. Potocnik,U., Glavac,D., Golouh,R., and Ravnik-Glavac,M. (2001) Causes of microsatellite instability in colorectal tumors: implications for hereditary non-polyposis colorectal cancer screening. *Cancer Genet.Cytogenet.*, **126**, 85-96.

172. Potocnik,U., Glavac,D., and Ravnik-Glavac,M. (2003) Identification of novel genes with somatic frameshift mutations within coding mononucleotide repeats in colorectal tumors with high microsatellite instability. *Genes Chromosomes.Cancer*, **36**, 48-56.
173. Prange,O., Wong,T.P., Gerrow,K., Wang,Y.T., and El Husseini,A. (2004) A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 13915-13920.
174. Prasad,A., Fernandis,A.Z., Rao,Y., and Ganju,R.K. (2004) Slit protein-mediated inhibition of CXCR4-induced chemotactic and chemoinvasive signaling pathways in breast cancer cells. *J.Biol.Chem.*, **279**, 9115-9124.
175. Radhakrishna,H., Donaldson,J.G. (1997) ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J.Cell Biol.*, **139**, 49-61.
176. Rao,J.S. (2003) Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat.Rev.Cancer*, **3**, 489-501.
177. Rao,Y., Wong,K., Ward,M., Jurgensen,C., and Wu,J.Y. (2002) Neuronal migration and molecular conservation with leukocyte chemotaxis. *Genes Dev.*, **16**, 2973-2984.
178. Reichman-Fried,M., Dickson,B., Hafen,E., and Shilo,B.Z. (1994) Elucidation of the role of breathless, a Drosophila FGF receptor homolog, in tracheal cell migration. *Genes Dev.*, **8**, 428-439.
179. Reichman-Fried,M., Shilo,B.Z. (1995) Breathless, a Drosophila FGF receptor homolog, is required for the onset of tracheal cell migration and tracheole formation. *Mech.Dev.*, **52**, 265-273.
180. Rempel,S.A., Dudas,S., Ge,S., and Gutierrez,J.A. (2000) Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin.Cancer Res.*, **6**, 102-111.
181. Rempel,S.A., Golembieski,W.A., Fisher,J.L., Maile,M., and Nakeff,A. (2001) SPARC modulates cell growth, attachment and migration of U87 glioma cells on brain extracellular matrix proteins. *J.Neurooncol.*, **53**, 149-160.

182. Reyes-Mugica,M., Rieger-Christ,K., Ohgaki,H., Ekstrand,B.C., Helie,M., Kleinman,G., Yahanda,A., Fearon,E.R., Kleihues,P., and Reale,M.A. (1997) Loss of DCC expression and glioma progression. *Cancer Res.*, **57**, 382-386.
183. Roscioli,T., Flanagan,S., Kumar,P., Masel,J., Gattas,M., Hyland,V.J., and Glass,I.A. (2000) Clinical findings in a patient with FGFR1 P252R mutation and comparison with the literature. *Am.J.Med.Genet.*, **93**, 22-28.
184. Rubenstein,J.L., Kim,J., Ozawa,T., Zhang,M., Westphal,M., Deen,D.F., and Shuman,M.A. (2000) Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia.*, **2**, 306-314.
185. Rubin,J.B., Kung,A.L., Klein,R.S., Chan,J.A., Sun,Y., Schmidt,K., Kieran,M.W., Luster,A.D., and Segal,R.A. (2003) A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **100**, 13513-13518.
186. Rubin,J.S., Bottaro,D.P., Chedid,M., Miki,T., Ron,D., Cheon,G., Taylor,W.G., Fortney,E., Sakata,H., Finch,P.W., and . (1995) Keratinocyte growth factor. *Cell Biol.Int.*, **19**, 399-411.
187. Rubin,J.S., Bottaro,D.P., Chedid,M., Miki,T., Ron,D., Cunha,G.R., and Finch,P.W. (1995) Keratinocyte growth factor as a cytokine that mediates mesenchymal-epithelial interaction. *EXS*, **74**, 191-214.
188. Sabatier,C., Plump,A.S., Le,M., Brose,K., Tamada,A., Murakami,F., Lee,E.Y., and Tessier-Lavigne,M. (2004) The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell*, **117**, 157-169.
189. Salmaggi,A., Gelati,M., Pollo,B., Frigerio,S., Eoli,M., Silvani,A., Broggi,G., Ciusani,E., Croci,D., Boiardi,A., and De Rossi,M. (2004) CXCL12 in malignant glial tumors: a possible role in angiogenesis and cross-talk between endothelial and tumoral cells. *J.Neurooncol.*, **67**, 305-317.
190. Sara,Y., Biederer,T., Atasoy,D., Chubykin,A., Mozhayeva,M.G., Sudhof,T.C., and Kavalali,E.T. (2005) Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly. *J.Neurosci.*, **25**, 260-270.

191. Scheiffele,P., Fan,J., Choih,J., Fetter,R., and Serafini,T. (2000) Neuroigin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, **101**, 657-669.
192. Schulte,J., Tepass,U., and Auld,V.J. (2003) Gliotactin, a novel marker of tricellular junctions, is necessary for septate junction development in *Drosophila*. *J.Cell Biol.*, **161**, 991-1000.
193. Seeger,M., Tear,G., Ferres-Marco,D., and Goodman,C.S. (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron*, **10**, 409-426.
194. Sehgal,A., Keener,C., Boynton,A.L., Warrick,J., and Murphy,G.P. (1998) CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J.Surg.Oncol.*, **69**, 99-104.
195. Sehgal,A., Ricks,S., Boynton,A.L., Warrick,J., and Murphy,G.P. (1998) Molecular characterization of CXCR-4: a potential brain tumor-associated gene. *J.Surg.Oncol.*, **69**, 239-248.
196. Sensi,S.L., Jeng,J.M. (2004) Rethinking the excitotoxic ionic milieu: the emerging role of Zn(2+) in ischemic neuronal injury. *Curr.Mol.Med.*, **4**, 87-111.
197. Shapiro,J.R. (2002) Genetic alterations associated with adult diffuse astrocytic tumors. *Am.J.Med.Genet.*, **115**, 194-201.
198. Sharma,K.V., Koenigsberger,C., Brimijoin,S., and Bigbee,J.W. (2001) Direct evidence for an adhesive function in the noncholinergic role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth. *J.Neurosci.Res.*, **63**, 165-175.
199. Shilo,B.Z., Gabay,L., Glazer,L., Reichman-Fried,M., Wappner,P., Wilk,R., and Zelzer,E. (1997) Branching morphogenesis in the *Drosophila* tracheal system. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, **62**, 241-247.
200. Shiraishi,S., Tada,K., Nakamura,H., Makino,K., Kochi,M., Saya,H., Kuratsu,J., and Ushio,Y. (2002) Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. *Cancer*, **95**, 249-257.
201. Siderovski,D.P., Snow,B.E., Chung,S., Brothers,G.M., Sondek,J., and Betts,L. (2002) Assays of complex formation between RGS protein G gamma subunit-like domains and G beta subunits. *Methods Enzymol.*, **344**, 702-723.

202. Simon,J.M., Toubiana,T., Lang,P., Taillibert,S., and Mazon,J.J. (2005) [Radiotherapy for glioblastomas: from radiobiology to concomitant chemotherapy.]. *Cancer Radiother.*
203. Slorach,E.M., Werb,Z. (2003) Epithelial morphogenesis: Netrin comes to a sticky and terminal end. *Curr.Biol.*, **13**, R491-R493.
204. Small,D., Kovalenko,D., Soldi,R., Mandinova,A., Kolev,V., Trifonova,R., Bagala,C., Kacer,D., Battelli,C., Liaw,L., Prudovsky,I., and Maciag,T. (2003) Notch activation suppresses fibroblast growth factor-dependent cellular transformation. *J.Biol.Chem.*, **278**, 16405-16413.
205. Smits,A., Funa,K. (1998) Platelet-derived growth factor (PDGF) in primary brain tumours of neuroglial origin. *Histol.Histopathol.*, **13**, 511-520.
206. Snow,B.E., Antonio,L., Suggs,S., Gutstein,H.B., and Siderovski,D.P. (1997) Molecular cloning and expression analysis of rat Rgs12 and Rgs14. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **233**, 770-777.
207. Someya,A., Sata,M., Takeda,K., Pacheco-Rodriguez,G., Ferrans,V.J., Moss,J., and Vaughan,M. (2001) ARF-GEP(100), a guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor 6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 2413-2418.
208. Song,J., Khachikian,Z., Radhakrishna,H., and Donaldson,J.G. (1998) Localization of endogenous ARF6 to sites of cortical actin rearrangement and involvement of ARF6 in cell spreading. *J.Cell Sci.*, **111 (Pt 15)**, 2257-2267.
209. Song,J.Y., Ichtchenko,K., Sudhof,T.C., and Brose,N. (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 1100-1105.
210. Stein,E., Tessier-Lavigne,M. (2001) Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science*, **291**, 1928-1938.
211. Steiner,H.H., Karcher,S., Mueller,M.M., Nalbantis,E., Kunze,S., and Herold-Mende,C. (2004) Autocrine pathways of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in glioblastoma multiforme: clinical relevance of radiation-induced increase of VEGF levels. *J.Neurooncol.*, **66**, 129-138.
212. Suzuki,T., Tsuzuki,K., Kameyama,K., and Kwak,S. (2003) Recent advances in the study of AMPA receptors. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **122**, 515-526.

213. Tartaglia,M., Di Rocco,C., Lajeunie,E., Valeri,S., Velardi,F., and Battaglia,P.A. (1997) Jackson-Weiss syndrome: identification of two novel FGFR2 missense mutations shared with Crouzon and Pfeiffer craniosynostotic disorders. *Hum.Genet.*, **101**, 47-50.
214. Tatenhorst,L., Senner,V., Puttmann,S., and Paulus,W. (2004) Regulators of G-protein signaling 3 and 4 (RGS3, RGS4) are associated with glioma cell motility. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, **63**, 210-222.
215. Taylor,K.M., Hiscox,S., and Nicholson,R.I. (2004) Zinc transporter LIV-1: a link between cellular development and cancer progression. *Trends Endocrinol.Metab.*, **15**, 461-463.
216. Taylor,K.M., Morgan,H.E., Johnson,A., Hadley,L.J., and Nicholson,R.I. (2003) Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *Biochem.J.*, **375**, 51-59.
217. Taylor,K.M., Nicholson,R.I. (2003) The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim.Biophys.Acta*, **1611**, 16-30.
218. Traver,S., Spingard,A., Gaudriault,G., and De Gunzburg,J. (2004) The RGS (regulator of G-protein signalling) and GoLoco domains of RGS14 co-operate to regulate Gi-mediated signalling. *Biochem.J.*, **379**, 627-632.
219. Ueba,T., Takahashi,J.A., Fukumoto,M., Ohta,M., Ito,N., Oda,Y., Kikuchi,H., and Hatanaka,M. (1994) Expression of fibroblast growth factor receptor-1 in human glioma and meningioma tissues. *Neurosurgery*, **34**, 221-225.
220. Uhrbom,L., Hesselager,G., Ostman,A., Nister,M., and Westermarck,B. (2000) Dependence of autocrine growth factor stimulation in platelet-derived growth factor-B-induced mouse brain tumor cells. *Int.J.Cancer*, **85**, 398-406.
221. van den,B.J., Wolter,M., Kuick,R., Misek,D.E., Youkilis,A.S., Wechsler,D.S., Sommer,C., Reifenberger,G., and Hanash,S.M. (2003) Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am.J.Pathol.*, **163**, 1033-1043.
222. van Rens,M.T., Eijken,E.J., Elbers,J.R., Lammers,J.W., Tilanus,M.G., and Slootweg,P.J. (2002) p53 mutation analysis for definite diagnosis of multiple primary lung carcinoma. *Cancer*, **94**, 188-196.

223. Varoqueaux,F., Jamain,S., and Brose,N. (2004) Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur.J.Cell Biol.*, **83**, 449-456.
224. Vielmetter,J., Chen,X.N., Miskevich,F., Lane,R.P., Yamakawa,K., Korenberg,J.R., and Dreyer,W.J. (1997) Molecular characterization of human neogenin, a DCC-related protein, and the mapping of its gene (NEO1) to chromosomal position 15q22.3-q23. *Genomics*, **41**, 414-421.
225. Vielmetter,J., Kayyem,J.F., Roman,J.M., and Dreyer,W.J. (1994) Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. *J.Cell Biol.*, **127**, 2009-2020.
226. Vincent,J.B., Kolozsvari,D., Roberts,W.S., Bolton,P.F., Gurling,H.M., and Scherer,S.W. (2004) Mutation screening of X-chromosomal neuroligin genes: no mutations in 196 autism probands. *Am.J.Med.Genet.*, **129B**, 82-84.
227. Visted,T., Enger,P.O., Lund-Johansen,M., and Bjerkvig,R. (2003) Mechanisms of tumor cell invasion and angiogenesis in the central nervous system. *Front Biosci.*, **8**, e289-e304.
228. von Eckardstein,K., Gries,H., Bolik,E., Cervos-Navarro,J., Tschairkin,I.N., and Patt,S. (1997) p53 mutation and protein alteration in 50 gliomas. Retrospective study by DNA-sequencing techniques and immunohistochemistry. *Histol.Histopathol.*, **12**, 611-616.
229. Wang,B., Xiao,Y., Ding,B.B., Zhang,N., Yuan,X., Gui,L., Qian,K.X., Duan,S., Chen,Z., Rao,Y., and Geng,J.G. (2003) Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell*, **4**, 19-29.
230. Westphal,M., Herrmann,H.D. (1989) Growth factor biology and oncogene activation in human gliomas and their implications for specific therapeutic concepts. *Neurosurgery*, **25**, 681-694.
231. Wewetzer,K., Verdu,E., Angelov,D.N., and Navarro,X. (2002) Olfactory ensheathing glia and Schwann cells: two of a kind? *Cell Tissue Res.*, **309**, 337-345.
232. Wild-Bode,C., Weller,M., Rimner,A., Dichgans,J., and Wick,W. (2001) Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells:

- implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res.*, **61**, 2744-2750.
233. Wilkie,A.O. (1996) Fibroblast growth factor receptor mutations and craniosynostosis: three receptors, five syndromes. *Indian J.Pediatr.*, **63**, 351-356.
234. Wilkinson,K.D., Tashayev,V.L., O'Connor,L.B., Larsen,C.N., Kasperek,E., and Pickart,C.M. (1995) Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. *Biochemistry*, **34**, 14535-14546.
235. Williamson,A., Patrylo,P.R., Lee,S., and Spencer,D.D. (2003) Physiology of human cortical neurons adjacent to cavernous malformations and tumors. *Epilepsia*, **44**, 1413-1419.
236. Wong,K., Ren,X.R., Huang,Y.Z., Xie,Y., Liu,G., Saito,H., Tang,H., Wen,L., Brady-Kalnay,S.M., Mei,L., Wu,J.Y., Xiong,W.C., and Rao,Y. (2001) Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell*, **107**, 209-221.
237. Wu,J.Y., Feng,L., Park,H.T., Havlioglu,N., Wen,L., Tang,H., Bacon,K.B., Jiang,Z., Zhang,X., and Rao,Y. (2001) The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. *Nature*, **410**, 948-952.
238. Yamada,S.M., Yamaguchi,F., Brown,R., Berger,M.S., and Morrison,R.S. (1999) Suppression of glioblastoma cell growth following antisense oligonucleotide-mediated inhibition of fibroblast growth factor receptor expression. *Glia*, **28**, 66-76.
239. Yamaguchi,F., Saya,H., Bruner,J.M., and Morrison,R.S. (1994) Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **91**, 484-488.
240. Ye,Z.C., Sontheimer,H. (1999) Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res.*, **59**, 4383-4391.
241. Yuan,X., Curtin,J., Xiong,Y., Liu,G., Waschmann-Hogiu,S., Farkas,D.L., Black,K.L., and Yu,J.S. (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, **23**, 9392-9400.

242. Zagzag,D., Friedlander,D.R., Margolis,B., Grumet,M., Semenza,G.L., Zhong,H., Simons,J.W., Holash,J., Wiegand,S.J., and Yancopoulos,G.D. (2000) Molecular events implicated in brain tumor angiogenesis and invasion. *Pediatr.Neurosurg.*, **33**, 49-55.
243. Zlatic,M., Landgraf,M., and Bate,M. (2003) Genetic specification of axonal arbors: atonal regulates robo3 to position terminal branches in the Drosophila nervous system. *Neuron*, **37**, 41-51.

Zitierte Bücher

244. Peiffer,J., Schröder,J.M., Paulus,W. (2002). Neuropathologie, Kapitel 16: Tumoren, Springer-Verlag, Berlin, S.337-394
245. Poeck,K., Hacke,W.(2001). Neurologie, Kapitel 11: Hirntumoren, Springer-Verlag, Berlin, S. 299-323
246. Böcker,W., Denk,H., Heitz, P.U. (2001) Pathologie, Kapitel: Allgemeine Tumorpathologie, Urban und Fischer, S.163-210
247. Stewart, B.W., Kleihues,P., (2003) World Cancer Report. IARC Press, Lyon
248. Crotty,L.E., Sampson,J.H., Archer,G.E., Bigner,D.D. (2001) Cancer Handbook, Section E: In vitro and animal models for human cancer, Chapter 82: Models for CNS Malignancies. Macmillan Publisher
249. Löffler,G., Petrides,P.E.(1998). Biochemie und Pathobiochemie, Kapitel 38: Tumorgewebe, Springer-Verlag, Berlin, S.1089-1112

8 Anhang

* Zu dem Gen Kästchen wurde die folgende Aminosäuren-Sequenz von Herrn Univ.-Prof.Dr.C.Klämbt (Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie der WWU Münster) zur Verfügung gestellt:

MAVCVVCLLC AHRLHCQDHI ELLGPARVT THNSQDQLNA RVYTNLSPSS
ETDTRRQQRS ASGDDDTFNY SISPPSRREK RHAGHEHGPT SESRVPQITQ
YYLEKLMAQD ELMNSSGFDG LLQQLSLHSL ASGASEGTCV PGSRLVHHVQ
PHDHHHAHHH EEEDHSLQLN NCTLIQNGTT SNVICPSLPN NNTHPLGKEA
KNFTLSDKDL LHLCPILLYE LKAQSGGCIE PAILSDIDTT EELLEAEKDK
DIFYVWIYAF ISVFACGILG LVGVAIIPFM GSRYKYIIQ YLVALAVGQD
ERGMIMKGLG CLGGIIFFYV MEHALTMISE WRKSVEKKET KKPSRAKVMR
DPDSSVNNSV AGDKICKQKY SSYPYCYDEI TMNNKQSEWM HLPFDVAAGA
GGDAPSV AEL RNVGDHDGS NDMAAAAESL ISPLHTNCVE MNHHNHNHKKH
NSHQQNHEGQ DSNTIVTDLD GNAVYAVNKA KDKDSRNDHV TVILREHES
HHGHSRHHGH VHSPPETLSA VAWMIIMGDG LHNFTDGMAI GAAFAENIAG
GFSTSLAVFC HELPHELDF AILIKAGMSV KSAVYYNLLT GVLSFIGMIF
GIAFGQSQDV AQWMFAVAAG LFIYIALVDM MPEISASHKS LGQFLLQILG
MLSGVGIMLL IALYEGDLMS AFGTAGAASH QHAH

9 Danksagung

Ich möchte Herrn Univ.-Prof. Dr. Werner Paulus, für die Vergabe dieses Themas sowie für die Förderung und Wertschätzung meiner Arbeit danken.

Gleichfalls danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. C. Klämbt und seiner Arbeitsgruppe vom Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie der WWU Münster für die freundliche Bereitstellung ihrer Forschungsergebnisse, auf deren Grundlage ich diese Arbeit anfertigen konnte.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie für das nette Arbeitsklima und die sehr kollegiale Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. Volker Senner, der mich bei der erfolgreichen Durchführung dieser Arbeit bis zum letzten geschriebenen Wort beriet und unterstützte.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Lars Tatenhorst für seine stets spontane Hilfsbereitschaft.

Der größte Dank gilt meinen Eltern für ihre konsequente Unterstützung.

10 Lebenslauf

Name, Vorname	Steidl , Corinna
Geburtsdatum, -ort	19. Januar 1979, Gütersloh
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Schulische Ausbildung	1985 - 1998 Blücherschule Gütersloh, Grundschule Evangelisches Stiftisches Gymnasium, Gütersloh Juni 1998 Allgemeine Hochschulreife
Medizinische Ausbildung	1999 –2005 Medizinstudium an der Westfälischen- Wilhelms-Universität Münster Seit April 2006 Assistenzärztin, Neurologie Alfried-Krupp-Krankenhaus, Essen
Doktorarbeit	Seit September 2002 Doktorandin am Institut für Neuropathologie der Universität Münster. Mittels RT-PCR wurden Glioblastome auf Expression evolutionär konservierter Gene mit Funktion in Entwicklung und Migration untersucht.
Med. Qualifikationen	Tutorin/ Vorpräparandin im Kurs „Anatomie/ Präparationskurs“, Zertifikat für Problem-orientiertes Lernen (PoL) für die Chirurgische Klinik Münster und Tätigkeit als Tutor für den „PoL-Kurs Chirurgie“

Essen, Juli 2006