

# 1 Einleitung

Die Langzeitprognose für Patienten mit primären malignen astrozytären Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS) ist trotz des steten Wissenszuwachses nach wie vor ungünstig. Die schlechte Prognose ist oftmals durch Resistenzbildung der Malignome gegenüber konservativen Behandlungsstrategien wie Zytostatika- oder Strahlentherapie bedingt. Daher scheint es sinnvoll, sich mit diesem Thema auseinanderzusetzen und weiter auf diesem Gebiet zu forschen, um beispielsweise die Mechanismen der Resistenzbildung zu identifizieren und so neue effektivere Behandlungskonzepte zu entwickeln.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des Tumorsuppressors „inhibitor of growth 1“ (ING1) bei der proapoptischen Wirkung des Histondeacetylaseinhibitors (HDACi) Trichostatin A (TSA) in Glioblastomzellen. Das Glioblastoma multiforme (GBM) zählt zusammen mit dem anaplastischen Astrozytom zu den häufigsten und bösartigsten primären intrazerebralen Tumoren [1].

## 1.1 Der Typ II-Tumorsuppressor „INhibitor of Growth 1“ (ING1)

Der Zusammenhang zwischen mutierten und dadurch vermindert exprimierten oder in der Funktion veränderten Tumorsuppressorgenen und der Entstehung und Progression von malignen Tumoren ist bekannt. Die Arbeitsgruppen um Prof. Riabowol [2] und Dr. Tallen/Prof. von Deimling [3, 4, 5] haben gezeigt, dass der Tumorsuppressor ING1 bei der Pathogenese, der Progression und der Ansprechbarkeit von humanen Gliomen auf Zytostatika eine Rolle spielt. Im folgenden Abschnitt wird die ING-Proteinfamilie entsprechend dem aktuellen Stand der Wissenschaft vorgestellt.

### 1.1.1 Identifikation und Vorkommen

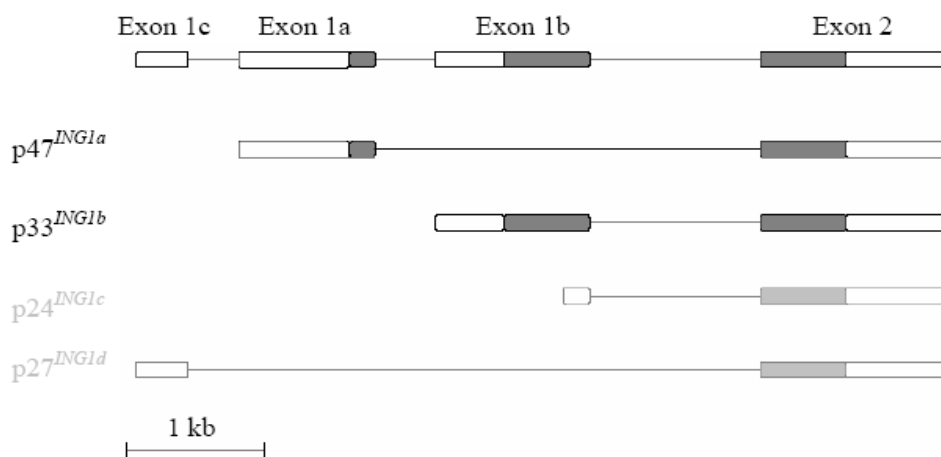
In einem Screeningverfahren zur Identifizierung von Wachstumsinhibitoren wurde im Jahre 1996 von der Arbeitsgruppe um Prof. Karl Riabowol, Southern Alberta Cancer Research Institute, University of Calgary, Canada, das erste Mitglied der ING-Proteinfamilie entdeckt: ING1. Man beobachtete, dass es in Epithelzellen von Säugetieren exprimiert wird, nicht jedoch in transformierten Brustkrebszelllinien [6]. Seit dieser ersten Entdeckung von ING1 wurden die ING-Proteine von zahlreichen Arbeitsgruppen mit verschiedenen Methoden untersucht und beschrieben und als Typ II Tumorsuppressoren identifiziert, bei denen die verminderte

Expression zu einem Verlust der wachstumshemmenden Wirkung führt [7]. Auch in Zellen von Maus, Ratte, Frosch, Kuh, Hefe und anderen Spezies wurden homologe Gene gefunden, was die während der Evolution konservierte Struktur von ING bestätigt. Phylogenetische Analysen haben die Existenz von *ING*-Sequenzen in Pflanzen und Pilzen ergeben [8].

Der *ING1*-Locus befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q33-34) [9], der, wie in 1.2.3.2.4 erläutert, in einem Drittel der höhergradigen Astrozytome mit einem Verlust der Heterozygotie („loss of heterozygosity“, LOH) assoziiert ist [10]. Mutationen von *ING1* sind sehr selten [3]. Die Verminderung der Expression von *ING1* in verschiedenen Tumoren ist dagegen eine häufige Beobachtung und korreliert in Gliomen mit deren histopathologischem Grad [2, 3]. Man findet sie in Brust-, Magen-, Blut- und Lungenkrebs, Ösophagus- und Gehirntumoren. Sie ist mit einer schlechten Prognose für Patienten mit fortgeschrittenem Neuroblastom assoziiert [11]. Diese Feststellungen unterstreichen die Funktion von *ING1* als Typ II-Tumorsuppressorgen [12].

### 1.1.2 Aufbau des *ING1*-Gens und Strukturmerkmale der ING-Proteinfamilie

Die *ING*-Familie besteht aus mindestens 5 Genen (*ING1* - *ING5*), von denen einige verschiedene Isoformen generieren. *ING1* besitzt drei bisher bekannte Exone, welche durch alternatives Spleißen die drei bisher bekannten Isoformen  $p27^{ING1d}$ ,  $p33^{ING1b}$  und  $p47^{ING1a}$  generieren, und zwei Introne (siehe Abb. 1.1). Zusätzlich wird durch interne Initiation das theoretische Protein  $p24^{ING1c}$  erzeugt [6].



**Abb. 1.1** Die Struktur des *ING1*-Gens nach Feng et al. [13] und die durch alternatives Spleißen entstehenden Isoformen. Die Linien stellen die Introne, die Balken die Exone dar, wobei es sich bei den grauen Balken um die kodierenden Regionen handelt.  $p27^{ING1d}$  und  $p24^{ING1c}$  sind hellgrau dargestellt, da sie in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden.

Alle ING-Proteine haben einen sehr ähnlichen Aufbau: (siehe Abb. 1.2)

1. „*plant homeodomain*“ (*PHD*): C-terminal befindet sich eine PHD, die in allen ING-Proteinen konserviert ist. Hierbei handelt es sich um eine während der Evolution erhalten gebliebene, zinkfingerartige Region, welche in eukaryontischen Proteasomen, vor allem bei Proteinen gefunden wird, die eine Rolle bei der Veränderung der Chromatinstruktur („Chromatin-Remodelling“) spielen [14]. Die Funktion dieser Domäne ist aktuell nicht abschließend geklärt. Sie wird z.B. mit der Regulierung der Ubiquitinierung in Verbindung gebracht [15]. Proteine mit Mutationen in dieser Domäne sind in die Tumorentstehung, in die Pathogenese von Immundefizienz- und Autoimmunsyndromen und verschiedene andere genetische Störungen verwickelt.

Neue Erkenntnisse zeigen, dass diese Domäne dreifach methyliertes Histon H3 (H3K4me3) bindet. Diese Bindung ist bei Verlust der Methylierung nicht möglich. H3K4me3 wird vor allem an aktiven Genen gefunden und fördert die Genexpression über transkriptionsaktivierende Moleküle. Als Antwort auf Schädigung der DNA erkennt die PHD von ING2 H3K4me3 und stabilisiert den mSin3-HDAC Komplex. Dies deutet auf einen neuen Mechanismus hin, mit dem H3K4me3 durch die Bindung an PHD bei der Unterdrückung der Transkription mitwirkt [16, 17].

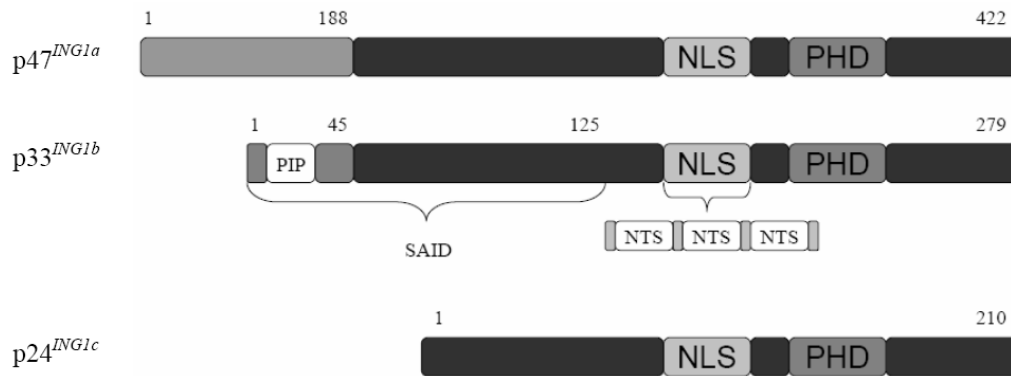
2. „*protein interacting motif*“ (*PIM*): Eine in ING1 und ING2 C-terminal befindliche Region für Interaktion mit anderen Proteinen (*PIM*) stabilisiert Proteine mit bestimmten posttranslationalen Veränderungen [8].

3. „*nuclear localization signal*“ (*NLS*): Des Weiteren besitzen alle Mitglieder der ING-Familie ein NLS. Innerhalb dieser Domäne befinden sich zwei identische „nucleolar translocation sequences“ (*NTS*), welche für die Translokation von ING in den Nukleolus, die nach UV-Schädigung der DNA stattfindet, verantwortlich sind [18] - ein wichtiger Vorgang bei der ING1 assoziierten Apoptose nach UV-Bestrahlung. Obwohl *ING1*-Mutationen selten sind, wurde bei mehreren humanen Krebsarten, auch in malignen Gliomen [2], ein Verlust des nukleären ING beobachtet, so dass vielleicht die über NLS gesteuerte verminderte Translokation von ING in den Nukleus und konsekutiv eine behinderte Stressantwort der Zelle in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt.

4. „*PCNA interacting protein*“ (*PIP*) und „*SAP30 interacting domain*“ (*SAID*): Am N-terminalen Ende befindet sich eine Protein-Protein-Interaktions-Region. Hier erfolgt der Großteil der Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, wie z.B. die Interaktion zwischen

p33<sup>ING1b</sup> und dem „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) an der PIP-Domäne [19] und mit dem „sin3-associated protein 30“ (SAP30) an entsprechender Domäne [20].

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die ING-Proteine ihre biologischen Funktionen durch die Zusammenarbeit mit bestimmten Partnern, wie z.B. Komponenten von HAT- und HDAC-Komplexen, ausüben [20, 21, 22].



**Abb. 1.2** Charakteristische Strukturen der ING1-Proteinisoformen nach Feng et al. [13]. Erläuterungen siehe Text.

### 1.1.3 Funktion der ING-Proteine

Die ING-Proteine sind in die Onkogenese, die Apoptose in verschiedenen Tumorzellen, zum Teil in Abhängigkeit von funktionellem p53 [23, 24], in die Hemmung der Angiogenese [25], in wachstumsregulierende Mechanismen, darunter auch „Chromatin-Remodelling“-Prozesse, unter anderem durch Induktion von p21<sup>WAF1</sup>, assoziiert mit dem proapoptotischen Faktor „Bcl (engl. „B-cell lymphoma“-)-2-associated X protein“ (Bax) [20, 21, 26] und in die Zellzyklusregulation involviert und zusammen mit dem PCNA an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt [19]. Die Hauptisoform p33<sup>ING1b</sup> ist in gesunden Zellen, entsprechend seiner Aufgabe der Wachstumsregulierung, im Nukleus lokalisiert [9]. Die Hemmung von *ING1* führt *in vitro* zur Zellfokussierung und *in vivo* zur Tumorentstehung [6]. Eine ektope Überexpression von p33<sup>ING1b</sup> führt zu Stillstand in der G1-Phase des Zellzyklus und zur Apoptose [6, 24].

Die Veränderung der Genexpression über strukturelle und funktionelle Wechselwirkung von ING-Proteinen mit Komponenten der chromatinverändernden Histonacetyltransferase- (HAT-) und Histondeacetylase- (HDAC-) Komplexen stellt einen Signalweg dar, über den diese zellulären Prozesse reguliert werden [20-22, 27-30]. Die PHD der ING-Proteine bindet methylierungsabhängig vor allem die Kernhistone H3 und H4 [16, 17, 31, 32]. Die Mikroinjektion von p33<sup>ING1b</sup> führte spezifisch zur Induktion von acetyliertem H3 und H4 [21]. Diese Beobachtungen stützen die Vermutung, dass die ING-Proteinfamilie eine Rolle in der

Regulierung des Acetylierungs- beziehungsweise Deacetylierungsgrades der Histone spielt.

Es wurde von einer Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen ING und anderen Proteinen berichtet, die in Stresssignalwege involviert sind. In erster Linie ist eine der PHD folgende polybasische Region von ING1 Angriffspunkt von durch Stress induzierten Molekülen der Lipidsignalwege [33]. Diese führen nach Zellschaden wahrscheinlich zur Aktivierung von p53 und so letztendlich zur Apoptose. In Melanomzellen konnte ING3 mit dem Fas/Caspase-8 Signalweg in Verbindung gebracht werden [34].

Die vermehrte Expression von p33<sup>ING1b</sup> führte in humanen Tumorzellen zum einen p53-abhängig [35] und zum anderen unabhängig von p53 [24, 36, 37] zur Apoptose. In humanen Fibroblasten kam es durch ektope p33<sup>ING1b</sup>-, jedoch nicht durch ektope p47<sup>ING1a</sup>-Überexpression in Zusammenarbeit mit p53 oder p21<sup>WAF1</sup> in Abhängigkeit vom Zellalter zur vermehrten Apoptose [36]. Kürzlich wurde eine strukturelle und funktionelle Wechselwirkung von p33<sup>ING1b</sup> mit dem Tumorsuppressorprotein „alternate reading frame“ (engl., p14<sup>ARF</sup>) beschrieben [38]. p14<sup>ARF</sup> ist ein Tumorsuppressor, der eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von p53 während der Onkogenese spielt und für den Zellzyklusstillstand durch p21<sup>WAF1</sup> gebraucht wird. p14<sup>ARF</sup> bindet p33<sup>ING1b</sup> am N-terminalen Ende und bewirkt unter anderem eine Translokation von p33<sup>ING1b</sup> vom Nukleus in den Nukleolus. Die PIP-Domäne, bis dato nur bei der p33<sup>ING1b</sup>-Isoform der ING-Familie gefunden, ermöglicht eine direkte Interaktion mit PCNA, welche durch Schädigung der DNA durch ultraviolette (UV-) Strahlen spezifisch induziert wird und zur Apoptose führt [19]. Die Induktion des Hitzeschockproteins HSP70 ist ein weiterer Mechanismus, über den p33<sup>ING1b</sup> möglicherweise den programmierten Zelltod fördert. Dies geschieht wahrscheinlich über den für das Überleben einer Zelle genutzten TNF- $\alpha$ -NF- $\kappa$ B-Caspase-8-Signalweg [39]. Die Arbeitsgruppe um Dr. Tallen / Prof. von Deimling konnte zeigen, dass neben der UV-Strahlung auch andere die DNA schädigende Agenzien, wie Etoposid oder Cisplatin, bei der Induktion der Apoptose in malignen Gliomzelle mit ING1-Proteinen zusammenarbeiten [5, 40].

Zusammenfassend kann man sagen, dass grundlegende Vorgänge in einer Zelle, wie die Regulierung der Acetylierungsspiegel oder der verschiedenen Signalwege des programmierten Zelltodes, die funktionelle und strukturelle Wechselwirkung von ING mit anderen wachstumsregulatorischen Proteinen benötigen, damit die Zellen von dem Zellzyklusarrest, ausgelöst durch DNA-Schädigung, in die Apoptose übergehen. Da diese Funktionen einer Zelle in den verschiedensten Tumorarten jedoch sehr häufig verändert sind, müssen weitere Untersuchungen über die Rolle der ING1-Proteine bei den für die jeweilige Tumorzelle spezifischen Überlebensmechanismen durchgeführt werden, um einen besseren Einblick in die

Entstehung und Progression von Tumoren zu gewinnen und so die aktuellen Therapiekonzepte zu verbessern.

## 1.2 Astrozytäre Gliome

Gliome sind Tumoren, die aus maligne entarteten Zellen oder Vorläuferzellen des Nervensystems entstehen. Es handelt sich um primäre Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS). Der historische Begriff „Gliom“ bezieht sich auf die vermeintliche Ursprungszelle dieser Tumoren - die Gliazelle. Die Neuroglia stellt das Hüll- und Stützgewebe des Nervensystems dar. Sie übernimmt Aufgaben des Stoffaustausches und ist an der Reizübertragung zwischen den Nervenzellen und anderen Vorgängen des ZNS beteiligt. Entsprechend der Lokalisation der Gliazellen im gesamten ZNS kommen die Gliome in allen Regionen von Gehirn und Rückenmark vor.

Im folgenden Kapitel sollen insbesondere die Grundlagen aktueller konventioneller und experimenteller Behandlungsstrategien für Patienten mit malignen Gliomen dargestellt werden. Es wird deutlich, dass weitere (molekulargenetische) Ursachenforschung dringend erforderlich ist, um spezifischere Therapieansätze entwickeln und so die Prognose von Patienten mit einem malignen Gliom verbessern zu können.

### 1.2.1 Epidemiologie und Inzidenz

Sekundäre, aus einem anderen Gewebe des Körpers entspringende, jedoch in das Gehirn metastasierende ZNS-Tumoren stellen die häufigsten dar, sollen aber aufgrund ihrer unterschiedlichen Ursprungszellen und damit verbundenen, von Gliomen unterschiedlichen Ätiologie, Pathogenese und Therapien hier nicht weiter besprochen werden.

In den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) traten in den Jahren 1997-2001 primäre maligne Gehirntumoren mit einer Häufigkeit von 7,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf, bei den primären benignen Hirntumoren waren es 6,8 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr [41]. Ähnliche Inzidenzraten werden für die Industrieländer Westeuropas und Australien angegeben [42]. Bei 42 % aller primären ZNS-Tumoren handelt es sich um Gliome [41]. Höhergradige Gliome wie das Glioblastoma multiforme (GBM) machen je nach Altersstufe sogar bis zu 90 % der primären Hirntumoren aus [1] und sind damit die am häufigsten vorkommenden primären intrakraniellen Neoplasien. Einige Studien konnten zeigen, dass Kaukasier häufiger von ZNS-Tumoren betroffen sind als Menschen afrikanischer oder

asiatischer Abstammung [43]. Diese Studien spiegeln jedoch eher Unterschiede im sozioökonomischen Status der Patienten als genetische Prädispositionen wider.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines GBM sind die meisten Patienten im Alter zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr. Von den ersten Symptomen bis zur endgültigen Diagnose vergehen im Durchschnitt 3-5 Monate. Männer erkranken doppelt so häufig wie Frauen [1].

### 1.2.2 Histopathologie

Zu den Gliazellen des ZNS zählen die Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia (Hortega-Zellen) und Ependymzellen des zentralen Nervensystems. Dementsprechend werden die Gliome nach ihrer Ursprungszelle in Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome und Ependymome unterteilt, von denen viele Varianten existieren. Gliome werden von der Weltgesundheitsorganisation („World Health Organisation“, WHO) nach histologischen Kriterien, die sowohl die Herkunft als auch das Wachstumsverhalten und somit die Malignität der Tumoren berücksichtigen, in vier Grade eingeteilt. Zu den lichtmikroskopischen Malignitätszeichen, die zu der in Tabelle 1.1 aufgeführten Unterscheidung von Gliomarten führen, gehören beispielsweise Kernatypien und -polymorphien, Zelldichte, Nekrosebildung, mitotische Aktivität und Endothelproliferation. Gliome niedrigen Malignitätsgrades werden als Grad-I- und Grad-II-Tumoren bezeichnet. Bei den Grad-III- und Grad-IV-Tumoren handelt es sich um äußerst aggressiv und schnell infiltrativ wachsende, hochgradig maligne Gliome mit entsprechend ungünstiger Prognose. Das GBM besteht aus extrem undifferenzierten, sich schnell teilenden Gliazellen. Makroskopisch zeigt sich ein buntes Bild mit Blutungen, Nekrosen, Verkalkungen, Verfettung und einem perifokalen Ödem. Histologisch findet man im Gegensatz zu Grad-III-Tumoren Einschmelzungen des umliegenden Gewebes.

Unterschiede bei den verschiedenen Formen von Gliomen bezüglich des Wachstumsverhaltens und der bevorzugten Lage im ZNS wirken sich auf die Therapierbarkeit und Prognose der Patienten aus und müssen bei der Wahl der Therapiestrategie berücksichtigt werden.

**Tab 1.1:** Einteilung der Gliome nach WHO-Graden

Grad I	Pilozytisches Astrozytom Subependymales Riesenzellastrozytom Myxopapilläres Ependymom Subependymom	niedrigmaligne
Grad II	Fibrilläres Astrozytom Protoplasmatisches Astrozytom Gemistozytisches Astrozytom Pleomorphes Xanthoastrozytom Oligodendrogliom Oligoastrozytom Ependymom	
Grad III	Anaplastisches Astrozytom Anaplastisches Oligodendrogliom Anaplastisches Oligoastrozytom Anaplastisches Ependymom Gliomatosis cerebri	hochmaligne
Grad IV	Glioblastoma multiforme Riesenzellglioblastom Gliosarkom	

**Tab. 1.1** gibt die Einteilung der verschiedenen Gliomarten in die vier Grade der WHO wieder. Die Grad-I- und Grad-II-Tumoren zählen zu den niedrigmalignen, wohingegen die Grad-III- und Grad-IV-Tumoren zu den hochmalignen Gliomen zählen.

### 1.2.3 Ätiologie

Tumorzellen sind umgewandelte körpereigene Zellen, die je nach Malignitätsgrad ungehemmt und unter Zerstörung von umliegendem Gewebe infiltrierend wachsen und, ebenfalls abhängig von der Bösartigkeit des Tumors, sich hämatogen oder lymphogen ausbreiten und so tumorferne Absiedlungen, so genannte Metastasen, bilden können.

Nur zum Teil sind die Ursachen, die an der Entstehung von ZNS-Tumoren beteiligt sind, bekannt. Dazu gehören beispielsweise Faktoren, die zur Mutation von körpereigenen Zellen beitragen und somit die Onkogenese (Tumorentstehung) begünstigen oder sogar auslösen. Sowohl eine genetische Prädisposition als auch Umwelteinflüsse zählen zu solchen Faktoren. Bei



den meisten Patienten mit Gliomen sind jedoch keine dieser krankheitsbegünstigenden Faktoren bekannt.

#### *1.2.3.1 Allgemeine Ursachen von ZNS-Tumoren*

Verschiedene Umweltfaktoren, wie Ernährung, Telefonieren mit Mobiltelefonen, chemische Substanzen, Tabakrauch, Virusinfektionen und Entzündungen und ihr Einfluss auf die Entstehung von ZNS-Tumoren werden von zahlreichen Forschungsgruppen untersucht [44-49]. Eindeutige Zusammenhänge konnten allerdings bis dato in den meisten Fällen nicht gefunden werden. Dies liegt zum einen an der im Vergleich zu anderen Malignomen niedrigen Inzidenz von primären ZNS-Tumoren und den damit verbundenen geringen Fallzahlen, die eine zentrale Dokumentation und die Zusammenarbeit von verschiedenen Zentren für eine effektive Studie essentiell machen. Zum anderen handelt es sich bei den ZNS-Tumoren um eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren, die eventuell durch verschiedene molekulare Mechanismen entstehen und somit eines differenzierteren Studiendesigns mit Fokussierung auf einzelne Formen von ZNS-Tumoren bedürfen. Hinweise für eine erhöhte Inzidenz von Glioblastomen ergaben sich beispielsweise bei der Exposition gegenüber Vinylchlorid [44]. In einer anderen Studie galt die Exposition gegenüber Arsen, Quecksilber und Petroleum als Risikofaktor für die Entwicklung von Gliomen [45]. Die vermehrte Aufnahme von Nitriten in bestimmten Nahrungsmitteln konnte in einigen Studien mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Glioms in Verbindung gebracht werden [46-48]. Bei häufiger Ernährung mit Früchten und Gemüse und der vermehrten Aufnahme von Vitamin C konnte ein gegenteiliger Effekt festgestellt werden [46, 48]. Brenner et al. [49] berichtete von einem verminderten Auftreten von Gliomen bei jeglicher Anamnese einer Allergie oder Autoimmunkrankheit. Diese Beobachtung legt einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Gliomen und immunologischen Faktoren nahe. Der einzige bisher als Risikofaktor für die Tumorentstehung anerkannte Umwelteinfluss ist die ionisierende Strahlung [50, 51]. Beispielsweise erhöht bereits eine geringe auf das Gehirn einwirkende Strahlendosis im Kindesalter im Rahmen der Therapie eines Retinoblastoms oder der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) das Risiko für die spätere Entwicklung eines ZNS-Tumors merklich [52, 53]. Selten finden sich bei Kindern und Jugendlichen mit primären ZNS-Tumoren vererbte oder neu aufgetretene Mutationen der Keimzellen, wohingegen somatische Mutationen regelmäßig gefunden werden. Warum diese genetischen Veränderungen auftreten und warum sie bei einigen Patienten zur Tumorentstehung führen, bei anderen jedoch nicht, bleibt in den meisten Fällen

unklar. Die genetische Prädisposition bei bestimmten Syndromen wie der Neurofibromatose vom Recklinghausen-Typ-I [57, 58] oder dem Li-Fraumeni-Syndrom [59] erhöhen das Risiko für die Entwicklung von malignen Gliomen und geben Hinweise auf mögliche erblich bedingte Faktoren für die Entstehung von ZNS-Tumoren. Die Prävalenz dieser Syndrome ist allerdings gering.

### *1.2.3.2 Molekulargenetische Veränderungen in malignen Gliomen*

Der Prozess der Karzinogenese ist vor allem durch Mutationen von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen, welche die Transformation der normalen Zelle in eine neoplastische Zelle bestimmen und ihr so einen Wachstumsvorteil verschaffen, charakterisiert.

Die Idee, dass ein oder mehrere genetische Elemente das Wachstum von Tumorzellen beeinflussen können, wurde das erste Mal an Hybridzellen getestet. Die Zellen entstanden *in vitro* aus der Fusion von Tumorzellen, welche in der Lage waren, in einem Tier ein Tumorstadium hervorzurufen, und normalen nicht tumorigenen Zellen. Ein Teil der Hybridzellen hatte die Fähigkeit verloren, in einem Organismus einen Tumor entstehen zu lassen, der andere Teil besaß diese Fähigkeit noch immer. Bei genauer Untersuchung letzterer Zellen fiel auf, dass sie ein oder mehrere Chromosomen verloren hatten, deren Produkt offensichtlich die Tumorentstehung verhinderte. Es handelte sich um Tumorsuppressorgene [60]. In den folgenden Jahren begann Knudson mit epidemiologischen Studien über einen im Säuglings- und Kleinkindesalter vorkommenden Tumor, das Retinoblastom [61]. Aufgrund seiner Beobachtungen, dass der Verlust oder Defekt beider Allele des Retinoblastom-Gens (*RB*) auf dem langen Arm von Chromosom 13 zum Auftreten dieses Tumors führte, postulierte er die „Zwei-Stufen-Hypothese“ in Bezug auf den Funktionsverlust von Tumorsuppressoren. Diese besagt, dass beide Allele eines Tumorsuppressorgene defekt sein müssen, um das Tumorstadium auszulösen. Tumorsuppressorgene verhalten sich demnach rezessiv, so dass das nicht defekte Allel das normale Zellwachstum aufrechterhält. Nach heutigem Kenntnisstand der Wissenschaft tritt in einem Allel zunächst eine Punktmutation auf, wobei die Inaktivierung des zweiten Allels zumeist mit dem Verlust eines größeren Chromosomenabschnittes einhergeht.

Wie auch bei anderen humanen Tumorarten ist die Entstehung von Gliomen und das fortschreitende Wachstum mit Aktivierung von Onkogenen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, dem Verlust von proapoptotisch wirkenden Proteinen und Dysregulation von Reparaturgenen der DNA vergesellschaftet, welche die genetische Stabilität der Zellen nicht

mehr aufrechterhalten können, wodurch diese anfälliger für mutationsbedingte Veränderungen werden [62].

Mutierte Protoonkogene können zu gesteigerter Proliferation führen und so zur Tumorentstehung beitragen. Tumorsuppressorproteine hingegen hemmen das Zellwachstum, so dass ihr Funktionsverlust die Tumorentstehung begünstigt. Des Weiteren gibt es Gene, deren Produkte wichtig für den Schutz von Protoonkogenen beziehungsweise Tumorsuppressorgenen vor Mutationen sind und die somit ebenfalls die Entstehung eines Tumors beeinflussen.

Die Molekulargenetik eröffnet durch die Beurteilung der biologischen Heterogenität von GBM die Möglichkeit, dass neue Herangehensweisen an Diagnose und Behandlung auf objektivierbaren biologischen Parametern basieren.

Im Folgenden werden die molekulargenetischen Veränderungen, die nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft mit der Entstehung und Progression von malignen Gliomen in Zusammenhang gebracht werden, erläutert:

#### 1.2.3.2.1 Überexpression von Wachstumsfaktoren ((engl.) „growth factor“, GF)

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren oder Onkogenen wird in malignen Gliomen überexprimiert [63]. Dadurch erzielen die neoplastischen Zellen einen Wachstumsvorteil. Folgend einige Beispiele von überexprimierten GF oder ihren Rezeptoren in malignen Gliomen: (engl.) „platelet-derived growth factor“ (PDGF), (engl.) „platelet-derived growth factor receptor“ (PDGFR), (engl.) „epidermal growth factor receptor“ (EGFR), (engl.) „basic fibroblast growth factor“ (bFGF, FGF-2), (engl.) „transforming growth factor“ (TGF)-alpha, (engl.) „insulin-like growth factor“ (IGF)-1.

Beispielsweise wird bei ungefähr einem Drittel aller GBM EGFR überexprimiert [64, 10]. Diese entstehen zumeist *de novo* und werden bei älteren Patienten gefunden.

#### 1.2.3.2.2 Verlust der Zellzykluskontrolle

Der Zellzyklus einer gesunden Zelle unterliegt komplexen Kontrollmechanismen. Gliomzellen, vor allem jene höhergradiger Gliome entwickeln jedoch Wege, diese Kontrollen zu eliminieren, was ihnen wiederum einen Wachstumsvorteil verschafft. Die größte Bedeutung kommt dabei dem Übergang der G1- zur S-Phase des Zellzyklus zu. Bei einem Hauptsignalweg, welcher diesen wichtigen Schritt kontrolliert, wirken beispielsweise p16, die Cyclin abhängige Kinase-4 ((engl.) „cyclin dependend kinase“, CDK), Cyclin D und das Retinoblastom-Protein (Rb-Protein) mit. Bei dem größten Teil der GBM findet man Veränderungen der genannten Proteine [10]. Bei

zwei Dritteln der höhergradigen Astrozytome und der GBM liegt eine homozygote Deletion der Region von Chromosom 9p vor, die die *CDKN2A*- und *CDKN2B*- Genloci enthält.

#### 1.2.3.2.3 Fehlregulation des programmierten Zelltodes (Apoptose)

Die meisten Zellen aktivieren verschiedene Signalwege der Apoptose, als Antwort auf eine DNA-Schädigung oder starke Proliferation. Durch die Apoptose kann der Organismus geschädigte oder ungewollte Zellen eliminieren. Über 99,9% der Zellen, die im Laufe des Lebens eines Menschen entstehen, sterben durch Apoptose [65]. Tumorzellen haben Mechanismen entwickelt, mit denen sie die Apoptose ausschalten können. Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber den verwendeten Medikamenten, der Strahlentherapie, aber auch experimentell eingesetzten Medikamenten wie TSA (siehe 1.2.6.2) kommt zu einem Teil durch die Resistenz von Gliomzellen gegenüber dem durch die verschiedenen Therapien ausgelösten programmierten Zelltod zustande. Genetische oder epigenetische Fehlregulationen in den Malignomen, wie *TP53*- oder (engl.) „phosphatase and tensin homolog“- (*PTEN*-) Mutationen, die Inaktivierung von Kontrollsignalwegen des Zellzyklus wie *Rb1/Cdk4/p16<sup>INK4a</sup>* oder *p53/Mdm2/p14<sup>ARF</sup>*, aber auch die Beeinträchtigung anderer Signalwege, die die Aktivierung der Caspase-Kaskade, insbesondere der Caspasen 8 und 3 beinhalten, führen zu dem Funktionsverlust von Tumorsuppressoren und somit zur Umgehung der Apoptose. Die Identifikation weiterer in GBM mutierter und somit dysfunktionaler Tumorsuppressoren sowie das bessere Verständnis der der Apoptose zugrunde liegenden Mechanismen könnte für die Entwicklung effektiverer Therapien entscheidend sein.

Die Korrelation zwischen einer verminderten *ING1*-Expression und einem steigenden histopathologischen Grad von astrozytären Gliomen [2, 3], die Beobachtung von Deletionen des *ING1*-Locus 13q34 in GBM-Zelllinien [66] und das Mitwirken von *ING* bei der Regulierung der Angiogenese in Gliomen [25, Tallen et al. (noch unveröffentlichte Daten)] sprechen für eine Rolle des Tumorsuppressors *ING* (1) bei der Pathogenese und Progression von malignen Gliomen.

#### 1.2.3.2.4 Instabilität des Genoms und Fortschreiten der Malignität

Unterschiedliche Kombinationen von genetischen Veränderungen werden mit spezifischen Typen von malignen Gliomen, mit bestimmten Tumorgaden, unterschiedlicher Genese [67] und mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Therapien assoziiert.

Ein Kennzeichen von niedriggradigen Gliomen ist die Entwicklung von höhergradigen Veränderungen im Laufe der Zeit. Die Instabilität des Genoms, in zahlreichen Tumoren vorhanden, erleichtert die Entstehung von weiterem genetischem Schaden, wodurch eventuell die Selektion eines bösartigeren Klonen stattfindet. Bei einem Drittel der GBM beobachtet man eine Inaktivierung des Tumorsuppressors *TP53* [64]. Von diesem entwickelt sich ungefähr ein Sechstel aus niedriggradigen Astrozytomen und ungefähr zwei Drittel kommen bei jüngeren Patienten vor. Bei Fortschreiten eines niedriggradigen Astrozytoms zu einem anaplastischen Astrozytom wird eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen auf Chromosom 9p, 13q und 19q beobachtet. Ein Verlust des Chromosoms 13q, welches unter anderem den *RB*-Genort beinhaltet, tritt in ungefähr einem Drittel der höhergradigen Astrozytome auf [10]. Glioblastome entwickeln sich demnach zum einen aus niedriggradigen Gliomen (sekundäre GBM) oder entstehen *de novo* (primäre GBM) [68].

Die *de novo* Entstehung eines GBM wird regelmäßig mit der Inaktivierung des *PTEN*-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 10 assoziiert [1, 64, 69]. Bei 60 % - 85 % der GBM tritt ein Verlust auf Chromosom 10 auf [70], wobei in 15 % - 40 % der Fälle eine *PTEN*-Mutation vorliegt [64, 71].

#### 1.2.3.2.5 Migration und Invasion

Die diffuse Infiltration des umgebenden Neuropils durch die Tumorzellen ist ein weiteres Kennzeichen maligner Gliome [72]. Es gibt zwar keine eindeutigen Erklärungen für diesen Mechanismus, aber es existieren Theorien: die veränderte Expression verschiedener Moleküle der extrazellulären Matrix und Oberflächenrezeptoren, die in die Migration der Zelle involviert sind, könnte zur Veränderung von Signaltransduktionswegen führen und somit die Migration und Invasion maligner Gliome beeinflussen [73].

#### 1.2.3.2.6 Angiogenene

Beim Übergang eines anaplastischen Astrozytoms in ein GBM finden dramatische Veränderungen der Gefäßversorgung statt [74]. Maligne Gliome besitzen die Fähigkeit, ihre eigenen Gefäße zu bilden und sind daher sehr gut vaskularisiert. Eine Ursache für die vermehrte Gefäßversorgung ist die besonders in GBM vermehrte Expression von proangiogenen Molekülen, wie beispielsweise „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) sein [75]. Ein weiterer Grund könnte beispielsweise die signifikant verminderte Expression des Tumorsuppressorproteins *ING4* im Vergleich zu normalem Gehirngewebe sein. In Mäusen

wuchsen humane Glioblastomzellen mit vermindertem ING4 deutlich schneller und waren gefäßreicher als Kontrolltumorzellen [25]. Noch unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass auch ING1 in die Neoangiogenese von GBM involviert ist.

#### 1.2.3.2.7 Epigenetische Veränderungen in malignen Gliomen

Neben molekulargenetischen Veränderungen haben sich epigenetische Abläufe für die Tumorentstehung als wichtig herausgestellt [76]. Tumorsuppressorgene können demnach sowohl durch Mutationen als auch durch epigenetische Veränderungen wie Promotermethylierung oder Veränderung der Histonacetylierung inaktiviert werden. Allelverluste in GBM sind regelmäßig vorkommende Ereignisse, von denen jedoch selten die Genloci der Tumorsuppressorgene betroffen sind. Ein alternativer Mechanismus, der zu einer verminderten Genexpression von Tumorsuppressoren führen kann, ist die Methylierung von Promoterregionen. Die Methylierung durch Methyltransferasen ist demnach ein wirksamer Mechanismus für die Inaktivierung von Genen („gene silencing“), der in fast allen Tumorzellen verändert ist [76]. In GBM konnten regelmäßig Hypermethylierungen der Promoter von *CDKN2A* und *RBI* nachgewiesen werden [77-79]. In einer kürzlich durchgeführten Studie konnte die Hypermethylierung eines Cytosin-Guanin- (CG-) reichen Fragments auf dem langen Arm von Chromosom 14 (14q32.12) in oligodendroglialen, nicht jedoch in astrozytischen Tumoren festgestellt werden [80]. Dies spricht für eine wichtige Rolle epigenetischer DNA-Veränderungen in dieser speziellen Gliomart. Die regelmäßige Methylierung von bestimmten Genen wie „*testis-specific protein Y-linked like 5*“ (*TSPYL5*), „*Cystatin*“ (*CST6*), „*tumor-associated calcium signal transducer 2*“ (*TACSTD2*), „*Tachykinin*“ (*TAC1*), „*Bcl-2 interacting killer*“ (*BIK*), „*chloride intracellular channel 3*“ (*CLIC3*) in Gliomzelllinien verglichen mit Zellen aus unverändertem Nervengewebe sprechen ebenfalls für die Tumorspezifität der Methylierung [81]. Inhibitoren der DNA-Methylierung wie 5-aza-2'-Desoxycytidin ermöglichen die erneute Expression von epigenetisch inaktivierten Tumorsuppressorgenen und stellen die Kontrolle über das Zellwachstum wieder her oder induzieren Apoptose [82].

Die posttranslationale Modifikation des N-terminalen Endes der Histone stellt einen Schlüsselmechanismus in der Veränderung der Zugänglichkeit des Chromatins dar. Zu solchen Modifikationen zählen die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung. Es wird angenommen, dass bestimmte Histonveränderungen durch verschiedene DNA- und Chromatineffektormoleküle erkannt werden und so beispielsweise Apoptose und Inaktivierung von Genen auslösen. Demnach führen molekulare Strukturveränderungen des Chromatins über

die Histone zu spezifischen funktionellen Ereignissen.

Auch durch HDACi wie TSA werden inaktivierte Gene induziert (siehe auch 1.2.6.2). Die Kombination beider Inhibitoren führt jedoch zu einem synergistischen Effekt in Bezug auf die Reaktivierung von Genen [83]. Da epigenetische Veränderungen frühe Ereignisse darstellen und häufiger als individuelle genetische Veränderungen zu beobachten sind, könnte ihre Bestimmung im Tumorgewebe als nützliches Mittel für die Diagnose und Prognoseeinschätzung von Gliomen genutzt werden. Das bessere Verständnis der epigenetischen Veränderungen, die zu der Inaktivierung bestimmter Gene führen, würde zugleich das Verständnis der Ätiologie von ZNS-Tumoren verbessern und dadurch neue Therapiemöglichkeiten eröffnen.

#### 1.2.4 Klinische Symptomatik

Die Klinik eines hochmalignen Glioms wird vor allem durch seine Lokalisation und Ausbreitung im ZNS bestimmt. Allgemeine, unspezifische Symptome kommen durch die intrakranielle Druckerhöhung zustande. Dies geschieht einerseits durch den direkten Druck des Tumors auf gesundes Hirngewebe, zum anderen durch Zirkulationsstörungen des Liquors. Es kann zu Konzentrationsstörungen, Wesensveränderungen, Gedächtnisstörungen, Kopfschmerzen, Nüchternerebrechen, Gewichtsverlust oder Bewusstseinsstörungen kommen. Lokalisierte, spezifische Symptome kommen durch den Funktionsverlust bestimmter Hirnareale zustande und geben so Hinweise auf die Lokalisation des Tumors im ZNS. Es kann zu Lähmungen, gesteigerten Muskeleigenreflexen, Krampfanfällen, Seh-, Sprach-, Gleichgewichts- und Verhaltensstörungen oder zum Ausfall bestimmter Hirnnervenfunktionen kommen.

#### 1.2.5 Diagnostik

Die Anamneseerhebung und die klinische Untersuchung sind wie bei jeder anderen Erkrankung der erste Schritt auf dem Weg zur Diagnosestellung. Die Kernspintomographie steht in der neuroradiologischen Diagnostik an erster Stelle. Durch die verschiedenen Bildebenen, -kontraste und -wichtungen gewinnt man wesentliche Informationen hinsichtlich Differentialdiagnose, Ausbreitung und umgebendes Ödem. Die Computertomographie stellt eine schnellere Untersuchungsmethode dar. Die offene Tumorsektion zählt sowohl zur therapeutischen Intervention als auch, wie die stereotaktische Biopsie, zu einem diagnostischen Mittel, da eine spezifische Therapieempfehlung die histologische Identifikation des Glioms voraussetzt.

## 1.2.6 Aktuelle Therapiekonzepte für maligne Gliome

### 1.2.6.1 Konventionelle Behandlungsstrategien

Im Rahmen der konventionellen Therapie der malignen Gliome werden zur Zeit drei Behandlungsprinzipien angewandt: Operation, Bestrahlung und Chemotherapie. In welcher Kombination diese Verfahren zur Anwendung kommen, hängt von der Ausbreitung, Lokalisation und Art des Tumors sowie dem Alter und dem Gesundheitszustand des Patienten ab.

#### 1. Operation

Es wird in der Regel eine operative Resektion angestrebt. Aufgrund des diffusen infiltrativen Wachstums von malignen Gliomen und der Möglichkeit der irreversiblen Schädigung lebenswichtiger Hirnfunktionen ist eine radikale Resektion oder „Resektion im Gesunden“ im onkologischen Sinne nicht möglich, aber eine Verminderung der Tumormasse ist in jedem Fall indiziert. So kann vor allem die Raumforderung und damit der Druck auf benachbartes Gewebe und dadurch die akuten Symptome vermindert werden. Des Weiteren erhält man auf diesem Wege die histologische Diagnose des Glioms, die die Planung der adjuvanten Therapie ermöglicht.

#### 2. Radiotherapie

Die Strahlentherapie hat sich neben der neurochirurgischen Resektion zur Standardbehandlung maligner Gliome entwickelt. Durch sie sollen die nach chirurgischer Therapie verbliebenen Gliomzellen abgetötet und so das Risiko für die Entstehung eines Rezidivs verringert werden. Die Effektivität ist unter anderem von der Histologie und damit der Radiosensibilität der jeweiligen Gliomart abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Radiotherapie und anschließender Behandlung mit Temozolomid bei Patienten mit einem GBM zu einer Verlängerung der mittleren Überlebensdauer führt [54].

#### 3. Chemotherapie

Da astrozytäre Gliome durch die Entwicklung von Resistenzen gegenüber den verwendeten Medikamenten oft wenig chemosensitiv sind, besitzt die Chemotherapie in der Behandlung von malignen Gliomen einen geringeren Stellenwert als die Radiotherapie. Jedoch wird durch die systemische Applikation der Medikamente im Gegensatz zur Resektion oder lokalen Radiatio,



bei denen es sich um Lokaltherapien handelt, eine Wirkung erzielt, durch die vorhandene Mikrometastasen im gesamten Organismus erreicht und deren Zellen abgetötet oder ihre weitere Ausbreitung verhindert wird.

Zu den häufig in Kombination mit Bestrahlung verwendeten Medikamenten zählt beispielsweise Temozolomid, dessen aktiver Metabolit die DNA-Replikation durch Methylierung von Guanin verhindert. Des Weiteren werden beispielsweise das zu den Alkylantien zählende Carmustin/ Bis-Chlorethyl-Nitrosourea (BCNU), das Topoisomerase II-inaktivierende Zytostatikum Etoposid, das Antiöstrogen Tamoxifen, interkalierende Zytostatika wie Doxorubicin, Platinkomplexe wie Carboplatin, das alkylierende Cyclophosphamid und der Antimetabolit Methotrexat in der Therapie des GBM eingesetzt. Durch die Kombination mehrerer der genannten Medikamente werden die unterschiedlichen Wirkmechanismen und Angriffspunkte der verschiedenen Zytostatika genutzt, um Resistenzbildungen gegenüber dem Mechanismus eines Zytostatikums entgegenzuwirken. Jedoch liefert auch eine Kombinationstherapie wenig hoffnungserweckende Ergebnisse [55, 56, 84]. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit unter anderem mit der Analyse von Wirkmechanismen experimenteller Therapieansätze mit dem Ziel zu einem besseren Verständnis der dem Therapieversagen oft zugrunde liegenden Resistenzbildungen von malignen Gliomzellen gegenüber konventionellen Therapien beizutragen, um langfristig die Prognose für Patienten mit GBM durch den gezielten Einsatz bestimmter Substanzen zu verbessern.

#### 1.2.6.2 experimentelle Therapieformen

Aufgrund der optimierungsbedürftigen Ergebnisse konventioneller Therapien und der damit verbundenen kurzen Überlebenszeit von Patienten mit malignen Gliomen werden immer mehr experimentelle Therapieansätze wie die Immuntherapie, die Gentherapie [85], Methoden, mit denen die Blut-Hirn-Schranke umgangen werden kann [86] oder biologische Agenzien, wie Interferon [87] in klinischen Studien untersucht. Auch der Einsatz von HDACi zählt zu den experimentellen Therapieansätzen.

HAT und HDAC befinden sich in großen Proteinkomplexen, die die Genexpression über eine Veränderung der Chromatinstruktur durch Acetylierung beziehungsweise Deacetylierung von Histonen regulieren (siehe auch 1.2.8). Diese Veränderungen der Lysinreste der Histone neutralisieren ihre positive Ladung. So wird die Wechselwirkung zwischen den Kernhistonen und der DNA vermindert und das Chromatin wird für die Transkription zugänglicher. Die

Deacetylierung dagegen führt zu einer Hemmung der Transkription. Man kann demnach sagen, dass HAT und HDAC als allgemeine Aktivatoren beziehungsweise Unterdrücker der Genexpression wirken (siehe auch Abb. 5.2). Die Fehlregulation der Genexpression ist eine häufige molekulare Veränderung, die während der Onkogenese gefunden wird und stellt somit einen möglichen Angriffspunkt für neue Therapiestrategien dar.

Die HDACi hemmen die Histondeacetylasen, indem sie an ihr katalytisches Zentrum binden und dieses somit für Substrate blockieren. HDACi wie TSA führen in transformierten Zellen *in vitro* und in Tumoren *in vivo* zu Wachstumsstillstand, Zelldifferenzierung oder programmiertem Zelltod (intrinsischer Apoptoseweg) sowie zur Hemmung der Angiogenese [88, 89]. Sie verhindern das Tumorwachstum im Tiermodell und beeinflussen das Wachstum normaler Zellen kaum oder überhaupt nicht, so dass sie in vielen Studien als Alternative zur konventionellen Tumorthherapie untersucht werden [89-91]. Sie führen zur Ansammlung von acetylierten Histonen sowohl in den Tumoren als auch in normalen Zellen, was als Marker für die Wirksamkeit von HDACi genutzt wird. Trotz der Wirkung in gesundem Gewebe scheint der wachstumshemmende und apoptotische Effekt auf transformierte Zellen beschränkt zu sein [92]. Ihre Effektivität bei der Therapie von Neoplasien wird *in vitro* und in klinischen Phase-I- und Phase-II-Studien sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Chemotherapien geprüft. Sie werden gut vertragen und zeigen klinisch eine objektivierbare Tumorregression [89, 90]. Allerdings bedarf es einer Optimierung der eingesetzten Dosis, des Zeitpunktes der Gabe, der Therapiedauer und der Identifizierung anderer synergistisch wirkender Medikamente.

### 1.2.7 Prognose für Patienten mit malignen Gliomen

Die 5-Jahres-Überlebensrate von GBM Patienten beträgt 3 % [64]. Das Alter gehört zu den aussagekräftigsten prognostischen Faktoren, wobei jüngere Patienten eine bessere Prognose haben als ältere Patienten [64, 93].

Die Mortalitätsrate von ZNS-Tumoren aller histologischer Typen, einschließlich Meningeome, in Westeuropa, Nordamerika und Australien beträgt bei Männern ungefähr 4 – 7 pro 100 000 Einwohner pro Jahr und bei Frauen ungefähr 3 – 5 pro 100 000 Einwohner pro Jahr [94, 95].

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Prognose und Therapiemöglichkeiten für Patienten mit malignen Gliomen. Zu diesen gehören neben dem Alter auch der Karnofsky Index und histopathologische Parameter wie der histologische Typ und der Tumorgrad.

Bei der konservativen Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit beim GBM 14 Wochen, bei alleiniger chirurgischer Resektion 20 Wochen, 36 Wochen bei der Kombination aus Resektion und Bestrahlung. Die Kombination aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie erreicht immerhin eine mittlere Überlebenszeit von 40 bis 50 Wochen [97]. Wie entscheidend das Ausmaß der resezierten Anteile für die Prognose ist, wird kontrovers diskutiert. In zahlreichen prospektiven und retrospektiven Studien konnte das Ausmaß der chirurgischen Resektion nicht mit einer prognostischen Relevanz in Verbindung gebracht werden [98, 99]. Andere Studien konnten zeigen, dass eine maximale Resektion die Überlebenszeit verlängert [100-102].

Trotz der Fortschritte der chirurgischen und klinischen Neuroonkologie sind die Überlebensraten von Patienten mit einem malignen Gliom nach wie vor ungünstig. Daher untersucht die vorliegende Arbeit unter anderem die Sensibilität von GBM-Zellen gegenüber der durch TSA ausgelösten Apoptose in Abhängigkeit von der Höhe der ING1-Spiegel. Vielleicht könnte ING1 als neuer prognostischer Marker zu der Identifizierung von TSA-sensiblen GBM dienen und so die Überlebensraten durch eine gezielte Therapie verbessern.

### 1.3 Der Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin A

Es gibt verschiedene strukturelle Klassen der HDACi: kurzkettige Fettsäuren, Hydroxysäuren, zyklische Tetrapeptide und Benzamide, wobei eine homologe Region von 390 Aminosäuren, der die Hemmung der Deacetylasen zugeschrieben wird, bei allen vorhanden ist.

TSA gehört zu den Hydroxysäuren und besitzt als solche eine polare Region (Hydroxygruppe), eine aus sechs Kohlenstoffatomen bestehende methylierte Region, eine zweite polare Region und eine endständige hydrophobe Gruppe. Es wurde initial als Mittel gegen Pilze entwickelt. TSA inhibiert sowohl in hämatologischen, als auch in soliden Tumoren, wie den malignen Gliomen, die HDAC-Aktivität aller drei HDAC-Klassen reversibel und führt über die Ansammlung von acetylierten Histonen und die Aktivierung der Caspase-Kaskade zum mitochondrialen Weg der Apoptose. In nanomolaren Konzentrationen führt es zur Wachstumshemmung von Gliomzellen durch Zellzyklusarrest und Apoptose [103]. TSA blockiert den Zellzyklus sowohl in der G1-, als auch in der G2/M-Phase [104]. TSA inhibiert die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* [105]. Bei der Behandlung von Zellkulturen mit TSA wird die Transkription von ungefähr 2% der exprimierten Gene um das zweifache erhöht oder erniedrigt [88], was für seine Selektivität spricht. Die Aktivierung der Transkription trifft unter anderem auf den Tumorsuppressor p14<sup>ARF</sup>/p16<sup>INK4a</sup> [106] und die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/AKT zu, die PTEN aktiviert [107]. Des

Weiteren findet durch TSA induziert wie auch durch andere HDACi über die Acetylierung des Transkriptionsfaktors „specificity protein 1“ (Sp1) eine Ansammlung und Aktivierung des Inhibitors der CDK p21<sup>WAF1</sup> in Tumorzellen statt [103, 108]. Man findet gleichzeitig eine vermehrte Acetylierung der mit den Genen von p21<sup>WAF1</sup> in Verbindung stehenden Histone [109].

TSA löst auch die Hypermethylierung von Promoterregionen von zahlreichen in die Signalwege der Todesrezeptoren involvierten Molekülen aus. Dazu gehört beispielsweise der die Apoptose auslösende, mit dem Tumornekrosefaktor verwandte Ligand ((engl.) „tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand“, TRAIL) [110, 111]. Die Aktivierung der Caspase 3 durch TSA wurde in verschiedenen humanen Tumorarten [112] einschließlich malignen Gliomen [103] beobachtet. Diese Studien identifizieren TRAIL und die Caspasen als Vermittler der antitumorösen Aktivität der HDACi. Da diese durch TSA induzierten Signalwege des programmierten Zelltodes, die funktionelles p14<sup>ARF</sup> und/oder die Aktivierung der Caspasen beinhalten, in GBM regelmäßig verändert sind, bedarf es weiterer Untersuchungen der zelltypspezifischen Antwort auf TSA, um neue prognostische Marker zu identifizieren und gleichzeitig die viel versprechenden Effekte von TSA für GBM Patienten zu optimieren.