

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Differentielle Genexpressionsanalyse in Gliomzellen nach
Interaktion mit Mikroglia

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Tanja Matschulat
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. von Deimling
 2. Prof. Dr. A. Becker
 3. Prof. Dr. rer. nat. R. Schäfer

Datum der Promotion: 14.6.2009

Für meine Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2004 bis Oktober 2005 im Institut für Neuropathologie (Berlin) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. von Deimling erstellt.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn von Deimling für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Themas und für seine freundliche Aufnahme bedanken. Er hat mich stets ermutigt und durch anregende Diskussionen hilfreich unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Anja Elstner, die mir vom Anfang bis zum Ende meiner Doktorarbeit als Betreuerin zur Seite stand und immer auf meine Fragen und Probleme einging. Durch sie habe ich während dieser Zeit ein breites Spektrum wissenschaftlicher Methoden kennen- und anwenden gelernt.

Weitere Personen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, sind Frau Christiane Blechschmidt, die mir bei immunhistochemischen Färbungen nützliche Hinweise gegeben hat, Frau Dr. Harder, die mein neuropathologisches Auge geschult hat und alle anderen Mitarbeiter des Labors: Ihnen danke ich besonders für ihre Hilfsbereitschaft und Geduld.

Ein großes Lob aussprechen möchte ich an Adrian Mehlitz, der oft mit mir mitgelitten hat und mit dem ich oft anregende fachliche Diskussionen geführt habe.

Bei meinen Eltern und meiner Zwillingschwester Andrea möchte ich mich ganz herzlich für ihre Unterstützung bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG.....	4
1. EINLEITUNG	5
1.1 AUFBAU DES GEHIRNS	5
1.2 HERKUNFT UND FUNKTIONEN DER MIKROGLIA IM GEHIRN	6
1.3 ASTROZYTOME.....	7
1.4 GLIOBLASTOMA MULTIFORME (WHO-GRAD IV)	8
1.4.1 Definition und Epidemiologie	8
1.4.2 Klinik und Diagnostik	9
1.4.3 Makro- und Mikroskopie	9
1.4.4 Genetische Veränderungen	10
1.5. KONVENTIONELLE THERAPIE	14
1.6 NEUE THERAPIESTRATEGIEN DES GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....	15
1.7 ROLLE DER MIKROGLIA IN ASTROZYTOMEN	17
1.8 ENTWICKLUNG VON KOKULTURSYSTEMEN ZUR GLIOMCHARAKTERISIERUNG.....	18
1.9 FRAGESTELLUNG	19
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 ZELLKULTUR	21
2.1.1 Anlegen von F98-Rattengliomzellkulturen	21
2.1.2 Passage der Zellen und Vermehrung.....	21
2.1.3 Kryokonservierung	22
2.1.4 Zellzählung	22
2.1.5 Präparation primärer Mikrogliazellkulturen	23
2.1.6 Isolierung der Mikroglia aus den Primärkulturen	24
2.1.7 Anlegen eines Transwell-Kokultur-Systems	24
2.1.8 Gewinnung von konditioniertem Medium aus dem Transwell-Kokultur-System ..	25
2.2 HISTOLOGIE UND IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	25
2.2.1 Tumore und Herstellung von Paraffinschnitten	25
2.2.2 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE-Übersichtsfärbung).....	26
2.2.3 Tomatolektinfärbung	26
2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung	27

2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSEN	28
2.3.1 Vorbereitung der Mikroglia und F98-Rattengliomzellen für die RNA-Isolierung	28
2.3.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Mikroglia und F98-Rattengliomzellen	29
2.3.3 Photometrische Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration	29
2.3.4 RNA-Gelelektrophorese und Bioanalyzer	30
2.3.5 Reverse Transkription von RNA für die Affymetrix [®] -Genchip-Hybridisierung	30
2.3.6 In vitro-Transkription (cRNA-Synthese) und Herstellung der RNA-Sonden	31
2.3.7 Hybridisierung der RNA-Sonden	32
2.3.8 Reverse Transkription von RNA für Real-Time PCR	33
2.3.9 Temperaturgradienten-PCR zur Primer-Optimierung	34
2.3.10 Auftrennung der cDNA-PCR-Produkte im Agarosegel	35
2.3.11 Real-Time quantitative PCR (Theoretischer Hintergrund).....	35
2.3.12 Durchführung der Real-Time quantitativen PCR.....	38
2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	39
2.4.1 Nachweis von Ratten-IL-6 im konditionierten Medium aus dem Kokultur-Assay	39
3.0 ERGEBNISSE	41
3.1 BESTIMMUNG DES VERHÄLTNISSES VON MIKROGLIA ZU TUMORZELLEN	41
3.2 TOMATOLEKTINFÄRBUNG DER MIKROGLIA UND KONFOKALE AUFNAHME	42
3.3 MORPHOLOGIE NACH KOKULTUR	43
3.4 RNA-AUFREINIGUNG DER KOKULTIVIERTEN ZELLEN	45
3.5 HERSTELLUNG VON RNA-SONDEN.....	46
3.6 MIKROARRAY-CLUSTERANALYSE UND GEWINNUNG VON GENKANDIDATEN.....	49
3.7 VERIFIKATION DER MIKROARRAY-DATEN MITTELS QUANTITATIVER RT-PCR	53
3.7.1 Primeroptimierung	53
3.7.2 qRT-PCR-Ergebnisse.....	55
3.8 KONTROLLE DER QRT-PCR AMPLIFIKATE MITTELS GELELEKTROPHORESE	58
3.9. ERGEBNISSE DER IL-6-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG MITTELS ELISA	60
4.0 DISKUSSION.....	63
4.1 BESTÄTIGUNG VON 5/7 KANDIDATENGENEN DER MIKROARRAYANALYSE DURCH qRT-PCR.....	63
4.1.2 SOD3-Repression wirkt tumorfördernd.....	64
4.1.3 HTR1A-Hochregulation wirkt tumorfördernd	66
4.1.4 Antitumorwirkung durch hochreguliertes CREM.....	67

Inhaltsverzeichnis

4.1.5 Antitumorwirkung durch Repression von RIP1	68
4.1.6 Hochregulation von ADRA1D wirkt tumorfördernd	70
4.2 EINFLUß VON ADRA1D, HTR1A UND CREM AUF DIE IL-6-BILDUNG IN GLIOMZELLEN	71
4.3 ERHÖHTE IL-6-KONZENTRATION IM ZELLKULTURÜBERSTAND AUS GEMEINSAM KULTIVIERTEN MIKROGLIA- UND F98-RATTENGLIOMZELLEN	73
4.4 AUSBLICK.....	73
6. CURRICULUM VITAE	91
7. ERKLÄRUNG.....	92

Abkürzungsverzeichnis

ADRA1D	Adrenozeptor 1D
AKT	eng.: alpha serine/threonine-protein kinase
ATF-1	eng.: activating transcription factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD68	eng.: cluster of differentiation 68
CDK2/4	eng.: cyclin dependent kinase
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CREB	eng.: cAMP responsive element binding protein
CREM	eng.: cAMP responsive element modulator
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CTMP	eng.: C-terminal modulator protein
Cy	Cyanin
DAPI	4',6'-Diamidin-2-Phenyl-Indol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	eng.: Dulbeccos' modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetrasäure
EGFR	eng.: epidermal growth factor receptor
eNOS	Endotheliale Stickoxid Synthase
EORTC	eng.: European Organisation for Research on Treatment of Cancer
EST	eng.: expressed sequence tags
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- dehydrogenase

Abkürzungsverzeichnis

GBM	eng.: glioblastoma multiforme, dt.: Glioblastom
GC-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
GFAP	eng.: glial fibrillary acidic protein
Gy	Gray
H.E.	Hämatoxilin Eosin
HBEGF	eng.: heparin binding epidermal growth factor
HER1	Herzeptin 1
HIF-1	eng.: hypoxia inducible factor 1
HPRT	Hypoxantinphosphoribosyltransferase
HTR1A	Hydroxytryptamin Rezeptor 1A
ICER	eng.: inducible cAMP early repressor
IgG	Immunglobulin G
I κ B	eng.: inhibitor of nuclear factor κ B
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin-10
Kb	Kilobasen
LGFC	Labor für funktionelle Genomforschung Charité
LOH	eng.: loss of heterozygosity
MAPK	Mitogen Aktivierende Protein Kinase
MCP-1	eng.: macrophage chemoattractant protein 1
MDM2	eng.: murine double minute 2-Gen
MES	eng.: Morpholine-4-ethanesulfonic acid monohydrate
MGMT	eng.: O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MHCII	eng.: major histocompatibility complex II
MKK3/6	eng.: mitogen-activated protein kinase kinases 3/6
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	eng.: messenger ribonucleic acid
MTOR	eng.: molecular target of Rapamycin
NAD	Nikotinamiddinukleotid
NCI	eng.: National Cancer Institute
NF κ B	eng.: nuclear factor κ B
NRXN2	Neurexin 2
NTC	eng.: no template control

Abkürzungsverzeichnis

OD	Optische Dichte
P21	Protein 21
PBS	eng.: phosphate buffered solution
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	eng.: platelet derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol- 3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PRKCA	Proteinkinase c alpha
PTEN	Phosphat-/Tensingen
RANTES	eng.: regulated on activation, normal T expressed and secreted
RB105	Retinoblastomprotein 105
RIP1	eng.: rieske iron- sulphur protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat
SD	Standardabweichung
SOD3	Superoxiddismutase 3
TBE	Tris Borat EDTA Puffer
TGF α	eng.: transforming growth factor alpha
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
TNF- α	Tumornekrose Faktor alpha
TNF- β	Tumornekrose Faktor beta
TP53	Tumorsuppressorprotein 53
VEGF	eng.: vascular endothelial growth factor
WHO	eng.: World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob sich das Genexpressionsprofil von Gliomzellen verändert, wenn diese mit Mikrogliazellen kokultiviert werden. Es sollte untersucht werden, ob den Mikrogliazellen tumorfördernde oder tumorantagonisierende Eigenschaften auf Gliomzellen zugewiesen werden können.

Rattengliomzellen und primäre Mikrogliazellen wurden einzeln und als Kokultur im Transwell-Kokultur-Assay für 24 h kultiviert. Anschließend erfolgte nach RNA-Isolierung die Ermittlung differentiell exprimierter Gene der einzelnen Populationen (Mikroglia kokultiviert, nicht kokultiviert, F98-Rattengliomzellen kokultiviert, nicht kokultiviert) mittels neurobiologischer, rattenspezifischer Affymetrix®-Genchips. Die Hybridisierung und Auswertung der Expressionsdaten erfolgte im Labor für funktionelle Genomforschung der Charité (LFGC). Zur Bestätigung der Mikroarray-Hybridisierungsdaten wurde die Real-Time quantitative PCR durchgeführt.

Mit Hilfe der cDNA-Mikroarray-Analyse konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Expression von insgesamt 1323 Genen in Rattengliomzellen, die mit Mikrogliazellen kokultiviert worden waren, untersucht werden. Nach der Auswertung der Hybridisierungsdaten zeigte sich, dass nach Kokultur mit Mikrogliazellen ein verändertes Genexpressionsprofil in Rattengliomzellen vorliegt.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mikrogliazellen und Gliomzellen sich gegenseitig beeinflussen, denn es konnten insgesamt 7 Gene ermittelt werden, die nach Kokultur mit Mikrogliazellen differentiell exprimiert in Rattengliomzellen vorlagen. Für 5 von 7 Genen zeigten sich übereinstimmende Expressionsdaten sowohl in der Mikroarray- als auch in der Real-Time-Quantifizierungsanalyse. Unter den 5 differentiell exprimierten Genen hat sich herausgestellt, dass *SOD3*, *HTR1A* und *ADRA1D* das Tumorwachstum unterstützen, während *CREM* und *RIP-1* das Tumorwachstum hemmen. Interessanterweise ergab sich der Hinweis, dass *ADRA1D*, *HTR1A* und *CREM* an der Regulation der IL-6-Bildung in Gliomzellen beteiligt sein könnten. Mit Hilfe eines rattenspezifischen IL-6-ELISA konnte im Zellkulturüberstand der kokultivierten F98-Rattengliom- und Mikrogliazellen tatsächlich eine Erhöhung der IL-6-Sekretion gemessen werden. IL-6 kann in Gliomzellen die GFAP-Expression induzieren und spielt möglicherweise in der Differenzierung von Gliomzellen eine Rolle. Mikrogliazellen scheinen demzufolge über eine Modulation der Expression von *ADRA1D*, *HTR1A* und *CREM* einen wesentlichen Beitrag zur IL-6-Sekretion und der daraus resultierenden Regulation der Tumorprogression in Gliomen zu leisten.

1. Einleitung

1.1 Aufbau des Gehirns

Am Aufbau des zentralen Nervensystems, zu dem das Gehirn und Rückenmark zählen, sind Neurone (etwa 10%) und ein spezielles Binde- und Stützgewebe (90% des Gehirns) beteiligt. Die Neurone sind über Synapsen miteinander verbunden und dienen als Informationsvermittler der Erregungsbildung, -umwandlung und -weiterleitung. Das Bindegewebe setzt sich aus verschiedenen Gliazellen zusammen, zu denen beispielsweise die Astro- und Oligodendrogliazellen gehören. Mikroglia bilden eine eigenständige Gruppe. Ferner können zu den Gliazellen auch Ependymzellen, welche als Plexusepithel am Aufbau des Plexus choroideus beteiligt sind, hinzugerechnet werden.

Gliazellen besitzen im Gegensatz zu ausdifferenzierten Neuronen eine lebenslange Teilungsfähigkeit und können vielfältige Funktionen im Gehirn ausüben. So sind beispielsweise die aus dem Neuroektoderm abstammenden Astroglia bzw. Astrozyten am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke (Abbott, Revest, and Romero, 1992), an der Regulation des Neuritenwachstums (Le Roux and Reh, 1995) und der Aufrechterhaltung der pH-Homöostase beteiligt (Katsura *et al.*, 1994). Oligodendrozyten dagegen umhüllen mit ihren langen Fortsätzen mehrere Axone und sorgen so für eine optimale Erregungsweiterleitung (Malek-Hedayat and Rome, 1994).

Als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke schützen Astrozyten das Gehirn und Rückenmark vor eindringenden Mikroorganismen, indem sie diese phagozytieren (Al Ali and al Hussain, 1996). Ferner sind sie in der Lage, an der Informationsverarbeitung von Neuronen teilzunehmen, indem sie durch exozytotische Freisetzung von Glutamat, welches in ihren intrazellulären Vesikeln gespeichert wird, benachbarte Neurone aktivieren (Tsacopoulos, 2002). Astrozyten besitzen auch eine eigene Informationsleitung, da sie untereinander über *gap junctions* in Verbindung stehen (Kielian and Esen, 2004). Sie können verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. Neurotrophine) freisetzen und dadurch Funktionen übernehmen, die für das Überleben von Neuronen essentiell sind (Gray and Patel, 1992). Nach Hirngewebszerstörung proliferieren die Astrozyten und bilden eine Glianarbe (reaktive Astroglie).

1.2 Herkunft und Funktionen der Mikroglia im Gehirn

Mikroglia üben makrophagenähnliche Funktionen im zentralen Nervensystem (ZNS) aus. Sie sind ferner in der Retina und im Nervus opticus vorzufinden und nehmen einen Anteil von etwa 20% der gesamten Gliapopulation (Kreutzberg, 1995) ein. Da das Gehirn kein eigenes Immunsystem besitzt, stellen sie das eigentliche zelluläre Abwehrsystem des zentralen Nervensystems dar und sind in der Lage, eindringende Mikroorganismen durch Phagozytose zu eliminieren. Sie wurden erstmals von Pio del Rio Hortega als eigenständiger Zelltyp in menschlichen Gehirntumoren beschrieben (Del Rio Hortega, 1921). Aufgrund ihrer morphologischen und funktionellen Ähnlichkeit mit Monozyten wird angenommen, dass sie entwicklungs geschichtlich von Blut-Monozyten abstammen, welche während der Embryogenese in das Gehirn einwanderten (Cuadros and Navascues, 1998). Sie haben daher eine enge Verwandtschaft mit Zellen der peripheren Monozyten-Makrophagen-Linie (Kreutzberg, 1996).

Mikroglia erfüllen im gesunden Gehirn eine überwachende Funktion: Ihre Aufgabe besteht darin, apoptotische Zellen zu phagozytieren und Gehirn und Rückenmark vor eindringenden Mikroorganismen wie z.B. Viren, Bakterien und fremden Zellen zu schützen. Ferner wird ihnen eine bedeutende Rolle bei krankhaften Veränderungen des ZNS (Infektionen, Traumata, neurodegenerative Erkrankungen und Tumore) zugeschrieben. Man unterscheidet 2 Zustandsformen von Mikrogliazellen: den ruhenden und den aktivierten Zustand. Ruhende Mikrogliazellen zeichnen sich durch eine Verminderung der Expression von Oberflächenantigenen auf ihrer Membranoberfläche aus, zudem besitzen sie gegenüber aktivierten Mikrogliazellen im ruhenden, inaktivierten Zustand eine geringere endozytotische und phagozytotische Aktivität (Graeber, Scheithauer, and Kreutzberg, 2002). Nach Eindringen von Mikroorganismen oder fremden Zellen wie z.B. Tumorzellen werden die Mikroglia aktiviert und transformieren von der schmalen, inaktiven Form mit langen Fortsätzen (dem sog. „ramifizierten“ Zustand) zur rundlichen, makrophagen-ähnlichen Form mit breiteren Ausläufern, mit denen die Erreger oder Fremdzellen umschlungen und phagozytiert werden. Die Erreger können auch durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen (Kreutzberg, 1996) und reaktiver Sauerstoffspezies durch die Mikroglia inaktiviert werden. Durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Stimuli können Mikroglia zudem ihr Genexpressionsprofil, ihr Migrationsverhalten - etwa durch Expression von Adhäsionsmolekülen - und ihren Immunphänotyp verändern. Als Beispiel für die Immunphänotypveränderung sei die Umgestaltung des Rezeptormusters auf der

Zelloberfläche, z.B. durch Antigenpräsentation (Perry, 1998) genannt. Ferner sind Mikrogliazellen in der Lage, eine Immuneffektorfunktion auszuüben, indem sie Immunzellen, darunter T-Lymphozyten, durch Freisetzung diverser Zytokine stimulieren.

Zu den weiteren physiologischen Funktionen zählen die Kommunikation mit Neuronen, Endothel- und Gliazellen. Vor allem der mikroglial-astrozytären Kommunikation im gesunden Gehirn und der Mikroglia-Tumor-Kommunikation im pathologischen Gehirn kommt eine bedeutende Rolle zu.

1.3 Astrozytome

Astrozytome leiten sich von entarteten Vorläuferzellen der Astrozyten ab und gehören somit zu den Tumoren neuroepithelialen Ursprungs. Sie schließen ein breites Spektrum an Neoplasien, die sich in ihrer Lokalisation im ZNS, im Malignitätsgrad, der Altersmanifestation, in morphologischen Merkmalen sowie in ihrem genetischen Profil unterscheiden können, ein. Die Astrozytome sind mit einem Anteil von über 60% die häufigsten Gliome (von den Gliazellen abgeleitete Tumore). Man unterscheidet zwei Gruppen:

1. Die Gruppe der diffus in das Hirngewebe einwachsenden astrozytären Tumoren, bestehend aus dem diffusen Astrozytom (WHO-Grad II), dem anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) und dem Glioblastom (WHO-Grad IV).
2. Die Gruppe der astrozytären Tumoren mit besser abgegrenztem Wachstum gegenüber dem Hirngewebe, dessen Hauptvertreter das pilozytische Astrozytom (WHO-Grad I) ist. Ferner sind in dieser benignen Astrozytomgruppe noch das pleomorphe Xanthoastrozytom und das subependymale Riesenzellastrozytom zu nennen.

Die Tumoren der zweiten Gruppe treten vornehmlich bei Kindern und jungen Erwachsenen auf, wachsen relativ langsam und haben eine sehr geringe Neigung zur bösartigen Entartung (<1%). Bei vollständiger operativer Tumorentfernung ist eine Heilung möglich. Im Unterschied dazu treten die Tumoren der ersten Gruppe überwiegend bei Erwachsenen auf, haben eine Neigung zur Bildung von bösartigeren Rezidivtumoren und zeichnen sich durch eine deutlich schlechtere Prognose aus (Hsieh and Lesniak, 2005).

Die Inzidenz der diffus infiltrierenden Astrozytome beträgt 5-7 neue Fälle/100 000 Einwohner pro Jahr (Ohgaki and Kleihues, 2005).

Zur Klassifikation und Graduierung der Astrozytome wird das WHO-Graduierungssystem (siehe Tabelle 1) basierend auf der Präsenz histopathologischer Charakteristika und Malignitätskriterien wie z.B. hohe Zellularität, zelluläre Pleomorphie, hohe mitotische Aktivität, mikrovaskuläre Proliferationen und Nekrosen verwendet (Kleihues *et al.*, 2002).

Tabelle 1: WHO-Gradierungsschema der Astrozytome

WHO-Grad	WHO-Bezeichnung	Histopathologische Kriterien
I	Pilozytisches Astrozytom	-
II	Diffuses Astrozytom	ein Kriterium: nukleäre Atypie
III	Anaplastisches Astrozytom	zwei Kriterien: nukleäre Atypie, mitotische Aktivität
IV	Glioblastoma multiforme	drei Kriterien: nukleäre Atypie, Mitosen, Endothelproliferation und/oder Nekrose

1.4 Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV)

1.4.1 Definition und Epidemiologie

Das Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV) ist der häufigste und bösartigste astrozytäre Tumor, der aus spärlich differenzierten neoplastischen Astrozyten zusammengesetzt ist (Jellinger, 1978). Glioblastome machen ca. 15-20% aller intrakraniellen Neoplasien aus (Poock, 1998). Bevorzugt treten sie im Marklager der Großhirnhemisphären bei Erwachsenen auf. Am häufigsten sind sie temporal lokalisiert (31%), gefolgt vom Parietallappen (24%), Frontallappen (23%) und Okzipitallappen (16%). Eine kombinierte frontotemporale Lokalisation ist typisch. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr, wobei Männer etwas häufiger als Frauen betroffen sind. In den meisten europäischen und nordamerikanischen Ländern beträgt die Inzidenz 2-3 Fälle/100 000 Einwohner/Jahr. Die Mehrheit der Glioblastome tritt *de novo* auf (primäre Glioblastome), die übrigen entwickeln

sich aus differenzierten Astrozytomen oder aus Oligoastrozytomen und werden als sekundäre Glioblastome bezeichnet (Scherer J.H., 1940).

1.4.2 Klinik und Diagnostik

Zu den frühen Symptomen der Patienten zählen Kopfschmerzen und Persönlichkeitsveränderungen, gefolgt von fokalen oder generalisierten zerebralorganischen Krampfanfällen und neurologischen Herdsymptomen (Pace *et al.*, 1998). Je nach Lokalisation des Tumors können Gang- und Sprachstörungen und Gesichtsfeldeinschränkungen auftreten. Eine Rarität beim Glioblastom stellt die extrakranielle Metastasierung dar, welche z.B. in Form von Knochenmarksmetastasen und damit verbundenen Rückenschmerzen imponieren kann. Klinisch erfasste extrakranielle Metastasen treten nach Literaturangaben mit einer Inzidenz von <2% auf (Fakhrai *et al.*, 2004). Als Folge der intrakraniellen Raumforderung kommt es zum rapiden Hirndruckanstieg durch Ödembildung. Verantwortlich für die Ödembildung ist sowohl die erhöhte Permeabilität als auch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke im Tumorgebiet (Papadopoulos *et al.*, 2001). Das wichtigste voroperative Verfahren ist die mit Kontrastmittelgabe durchgeführte Magnetresonanztomografie des Schädels. Sie erlaubt den genaueren Nachweis des Tumors, da eine bessere Einschätzung der Tumoranteile, die Abgrenzbarkeit zwischen Tumor und Ödem und schließlich die Einbeziehung anatomischer Strukturen in den Tumorprozeß möglich sind. Als zweite Wahl kann die kraniale Computertomografie zum Einsatz kommen. Nach Kontrastmittelgabe lassen sich typische Anreicherungen mit girlandenartigen Ringstrukturen erkennen. An weiteren diagnostischen Möglichkeiten sei die Angiographie genannt, die bei der Klärung der Lagebeziehung zwischen Tumor und Gefäßsystem in der präoperativen Phase eine Rolle spielt. Wird nach den Voruntersuchungen ein Glioblastom vermutet, so wird die Diagnose mittels stereotaktischer oder navigationsgestützter Biopsie gesichert (Nowacki *et al.*, 2004).

1.4.3 Makro- und Mikroskopie

Makroskopisch zeigt sich ein heterogenes Schnittbild mit zahlreichen Nekrosen, Einblutungen, der typischen glasartigen Tumormasse sowie einer ausgeprägten Ödembildung. Oft hat der Tumor bei der Erstdiagnose bereits beide Hirnhälften befallen und imponiert als ein sogenanntes „Schmetterlings-Gliom“. Die makroskopisch schlechte Abgrenzbarkeit ist Folge der hohen Invasivität der Tumorzellen, die sich vorzugsweise entlang myeliner

Strukturen ausbreiten. Histologisch (Abb.1) ist der Tumor gekennzeichnet durch ein stark dedifferenziertes pleomorphes Zellbild mit zahlreichen Mitosen, nekrotischen Gebieten, die von Zonen erhöhter Zelldichte - sogenannten Pseudo-Palisaden - umgeben sind, sowie mikrovaskulären Proliferationen und Gefäßthrombosen (Kleihues *et al.*, 2002).

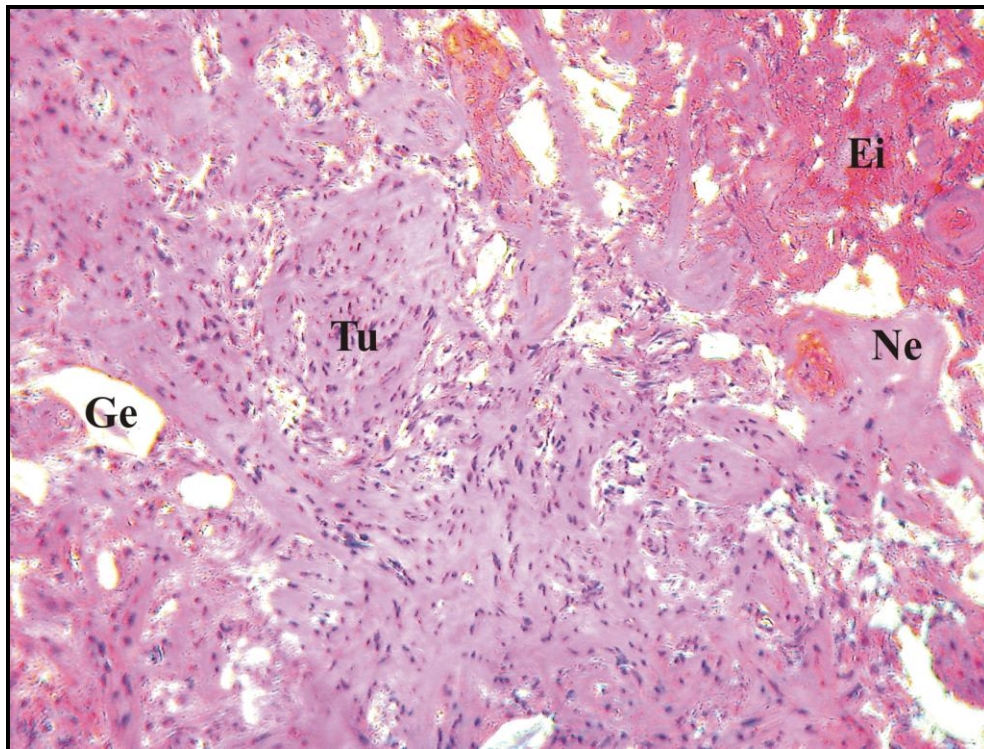


Abb. 1: H.E.-Färbung (200-fache Vergrößerung) eines Glioblastoms: heterogenes histologisches Schnittbild mit Nekrosen (Ne), palisadenartigen Tumorzellanordnungen (Tu) und Gefäßproliferaten (Ge). Rechts oben sind Einblutungen (Ei) zu erkennen.

1.4.4 Genetische Veränderungen

Tumoren können durch verschiedene Faktoren wie z.B. durch chemische und physikalische Kanzerogene, welche eine molekulare Veränderung des Wirtsgenoms bewirken, induziert werden. Bei den Astrozytomen spielen Mutationen von Tumorsuppressorgenen eine bedeutende Rolle. Deren Proteinprodukte fungieren normalerweise als Bremsen im Zellzyklus und verhindern somit eine unkontrollierte Zellteilung. Ein typischer Vertreter ist das Tumorsuppressorgen *TP53*, welches auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert ist und normalerweise den Zellzyklus, die Antwort von Zellen auf DNA-Schäden, Apoptose und die Zelldifferenzierung entscheidend steuert. Ein mit einer *TP53*-Mutation vergesellschafteter Verlust von genetischem Material auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 wird in ungefähr

40% der Astrozytome (WHO Grad II und III) und in etwa 30% der Glioblastome (WHO-Grad IV) beobachtet (von Deimling *et al.*, 1992a).

Das Tumorsuppressorprotein p53 interagiert mit bestimmten Promotoren beziehungsweise den dort gebundenen Transkriptionsfaktoren und transaktiviert sie. Das induziert die Synthese von Proteinen, welche die Zelle in der G1-Phase arretieren und den Übergang in die S-Phase verzögern (Hinds and Weinberg, 1994).

So wird beispielsweise das Protein p21 vermehrt gebildet, das mit cyclinabhängigen Kinasen 2 und 4 (CDK2 und 4, *siehe Abkürzungsverzeichnis*) interagiert und diese hemmt. CDK2 und 4 sind funktionell bei der Phosphorylierung verschiedener Substrate wie dem Retinoblastomprotein 105 (RB105) aktiv (Lundberg and Weinberg, 1998). RB105 wird somit nicht phosphoryliert und bleibt mit den E2F- und DP1-Transkriptionsfaktoren verbunden, die deswegen die Transaktivatorfunktion nicht ausüben können. Die Zelle kann daher nicht von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus übergehen. Das verschafft der Zelle Zeit, entstandene DNA-Schäden zu reparieren. Wenn die Reparatur nicht erfolgreich ist, induziert TP53 die Apoptose (programmierten Zelltod) und verhindert dadurch die Entstehung von Tumoren (Levine *et al.*, 1994). In Tumorzellen führen Veränderungen im *TP53*-Gen zur Synthese von p53-Proteinversionen, die nicht korrekt gefaltet sind, nicht mehr zu Tetrameren im Zellkern assoziieren und so ihre Fähigkeit zur sequenzspezifischen DNA-Bindung und Transaktivierung verloren haben. Oft reichen hierfür Mutationen im *TP53*-Gen eines Allels aus, da sich dann inaktive Heterooligomere aus Wildtyp- und Mutantenproteinen ausbilden.

Für die Regulation des Zellzyklus spielt der p16INK4a-Komplex, welcher durch den *CDKN2A*-Lokus kodiert wird, eine große Rolle, da er eine negativ regulierende Funktion ausübt: Dieser bindet sowohl an CDK4 als auch an CDK6 und verhindert dadurch die Bildung eines CDK/CyclinD-Komplexes (Hegi *et al.*, 1997). Dadurch wird normalerweise der Übergang von der G1- in die S-Phase gehemmt und ein unkontrolliertes Zellwachstum vermieden. Studien haben gezeigt, dass in mehr als 50% der primären Glioblastome entweder einen kompletten Verlust des p16INK4a Lokus oder eine Amplifikation des *CDK4*-Gens aufweisen. Ferner konnte eine Deletion des humanen Chromosoms 19p13.2, auf p19INK4d-Gen lokalisiert ist, nachgewiesen werden (Lam *et al.*, 2000). Durch den Verlust von p16INK4a wird der G1-S-Phase-Kontrollpunkt ohne Hemmung überschritten, es kommt zu einem unkontrollierten Zellwachstum.

Man unterscheidet zwei klinisch-molekulare Subtypen von Glioblastomen: Primäre Glioblastome entstehen häufig bei älteren Patienten *de novo* und exprimieren vorwiegend den *Epidermal growth factor receptor* (EGFR, *siehe unten*), während sich sekundäre

Glioblastome bei jüngeren Patienten von einem niedriggradigen Tumor entwickeln und normalerweise *TP53*-Mutationen aufweisen (Kleihues and Ohgaki, 2000). Diese Terminologie wurde bereits erstmalig im Jahr 1940 benutzt (Scherer et al. 1940), trotzdem handelt es sich bei der Unterscheidung zwischen primären und sekundären Glioblastomen eher um ein Konzept als um diagnostisch etablierte Entitäten. Ein Hauptgrund dafür ist, dass beide Glioblastom-Typen die gleichen histologischen Charakteristika aufweisen, so dass es umstritten ist, ob man beide Typen auch histopathologisch differenzieren kann. Diese Schwierigkeit bei der sicheren histopathologischen Differenzierung macht es ebenfalls schwierig die relativen Häufigkeiten zu bestimmen. Man geht heute allerdings davon aus, dass die primären Tumoren bei weitem überwiegen, etwa in einer Größenordnung von ca. 80% (Dropcho, 1996). *TP53*-Mutationen sind bei sekundären Glioblastomen wesentlich häufiger (>65%) als bei primären Glioblastomen (ungefähr 10%).

Auch Mutationen von Onkogenen sind an der Entstehung von Glioblastomen beteiligt: Diese Gene sind im normalen, d.h. genetisch nicht veränderten Zustand als Schlüsselgene für die Transduktion physiologischer Signale vom Zelläußeren zum Zellkern verantwortlich. Onkogene regulieren normalerweise Signalwege der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Werden diese Gene durch Mutationen wie z.B. Amplifikationen, „*gain of function*“, Überexpression oder durch Veränderung des Aktivierungszustandes modifiziert, so können deren Funktionen als positive oder negative Regulatoren aufgehoben werden.

Das Onkogen *EGFR* wird typischerweise in etwa 50-60% der Glioblastome amplifiziert und neu rearrangiert (Heimberger et al., 2005), was zu einer Überexpression des EGFR führt (Ekstrand et al., 1992). Glioblastome mit *EGFR*-Amplifikation weisen typischerweise einen Verlust des Chromosoms 10 auf (von Deimling et al., 1992b). Eine gleichzeitig gesteigerte Expression der Wildtyp-EGFR-Liganden wie z.B. der *Transforming Growth Factor* α (*TGF- α*) oder *Heparin-Binding-EGF* (*HB-EGF*) wird häufig beobachtet. Diese Mechanismen bilden den wesentlichen Bestandteil einer autokrinen Schleife, welche zur Wachstumsautonomie der Tumorzellen beiträgt (Ramnarain et al., 2006). Eine besondere Bedeutung kommt der EGFR-Mutante (EGFRvIII) zu, welche in 24-67% der Fälle gebildet wird und keine Liganden bindet. Sie vermittelt unabhängig von Liganden Signale und wirkt stärker tumorigen als die Wildtyprezeptoren. Dies zeigt sich auch darin, dass diese Rezeptorvariante über die Aktivierung des RAS-Signalweges in der Lage ist, die Expression von *vascular endothelial growth factor* (*VEGF*) zu stimulieren und so die Angiogeneese, welche charakteristisch für Glioblastome ist, verstärkt (Feldkamp et al., 1999). Als weitere Genamplifikationen wären noch die des *PDGFR* und des *VEGFR* zu nennen, deren genaue Häufigkeit in Glioblastomen

nicht bekannt ist (Joensuu *et al.*, 2005). PDGF und VEGF sind die wichtigsten Zytokine der tumorinduzierten Angiogenese in Glioblastomen. Erst kürzlich wurde herausgefunden, dass unterschiedliche angiogenetische Phänotypen in primären und sekundären Glioblastomen existieren (Karcher *et al.*, 2006).

Das *mouse-double-minute-2*-Onkogen (*MDM2*) liegt ebenso wie das *EGFR* häufig in amplifizierter Form vor (Biernat *et al.*, 1997b). Dessen Genprodukt ist in der Lage, einen Komplex mit p53 zu bilden und seine Transaktivatorfunktion zu blockieren (Burton *et al.*, 2002). Bei einer Amplifikation oder Überexpression des *MDM2*-Gens kann das p53 seine Zellwachstumskontrolle verlieren und die Zellen entarten (Schiebe *et al.*, 2000). *MDM2*-Amplifikationen werden bei über 50% der primären Glioblastome beobachtet, dagegen ca. 8% bei primären Tumoren ohne *TP53*-Mutation und ca. 10% bei sekundären Glioblastomen (Biernat *et al.*, 1997a).

In Zusammenhang mit der *MDM2*-Amplifikation sollte noch die Bedeutung des *CDKN2A*-Lokus, welcher für zwei Genprodukte (p16 und p14(ARF)) kodiert, erläutert werden. 40% der WHO Grad III- und IV-Gliome weisen deletiertes p14(ARF) auf, was zur Beeinträchtigung der p53-Funktion führt (Ichimura *et al.*, 2000). Das Tumorsuppressorprotein p14(ARF) hemmt in normalen Zellen das *MDM2*-Protein, welches den Abbau von p53 reguliert. So ist es verständlich, dass bei Mutation des p14(ARF)-Suppressorgens *MDM2* nicht mehr ausreichend gehemmt wird und so der Abbau von p53 verstärkt wird. Dies führt anschließend zu einer verminderten Aktivität des p53 und der Zellzyklus gerät außer Kontrolle.

Der Verlust der Heterozygotität von Chromosom 10 stellt die häufigste genetische Veränderung (>60%), die mit der Entstehung von Glioblastomen assoziiert ist, dar (Kleihues *et al.*, 1994). Auf Chromosom 10 befinden sich verschiedene Loci, welche für bedeutende Tumorsuppressorgene kodieren. Verluste von einem oder mehreren Tumorsuppressorgenen in diesen Loci spielen eine große Rolle bei der GBM-Formation. Eines dieser Gene ist *MMAC1* (*PTEN*), lokalisiert auf 10q23, welches für eine dualspezifische Proteinphosphatase kodiert (Fulfs *et al.*, 1998). Das *Phosphatase and Tensin Homologue* (*PTEN*) (Chow and Baker, 2006) kontrolliert streng den intrazellulären PIP3-Spiegel und weist in ungefähr einem Drittel aller Glioblastome Mutationen auf (Li *et al.*, 1997). Normalerweise dephosphoryliert es Phosphatidylinositol-(3,4,5)triphosphat und inhibiert dadurch die PI3K-abhängige Aktivierung des Proteinkinase B/Akt-Signaltransduktionsweges (Fiano *et al.*, 2004). Durch die *PTEN*-Aktivität wird folglich das Zellwachstum kontrolliert und der PI3K-Signalweg einschließlich der Akt- und mTOR-Kinasen in seiner Aktivität limitiert (Sansal and Sellers, 2004).

1.5. Konventionelle Therapie

Die konventionelle Therapie des Glioblastoms ist palliativ und umfasst die Operation mit nachfolgender lokaler Strahlentherapie. Als Standardtherapie des Glioblastoms wird eine Strahlentherapie in Dosen von 54-60 Gy gewählt. Durch sie kann eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit um 4-5 Monate erzielt werden (Bleehen and Stenning, 1991). Zusätzlich wird heute meist eine Chemotherapie, entweder direkt nach der Strahlentherapie oder zur Behandlung eines Rezidivtumors eingesetzt (Benouaich-Amiel, Simon, and Delattre, 2005). Hier kann die mittlere Überlebenszeit um immerhin 2-3 Monate gesteigert werden (Stupp R., 2005).

Die Behandlung mit chemotherapeutischen Agenzien ist schwierig, da die Medikamente oftmals nicht die Blut-Hirn-Schranke durchqueren und an ihren Zielort gelangen können. Eine große Herausforderung ist die Bildung von Medikament- und Bestrahlungsresistenzen (Zhang and Chakravarti, 2006), welche die Prognose oftmals verschlechtern. Die mittlere Überlebenszeit beträgt ca. 12 Monate (Puzzilli *et al.*, 1998).

Neben der histologischen Zuordnung sind Lebensalter und Allgemeinzustand des Patienten weitere wichtige prognostische Parameter, die auch bei der Wahl der Therapie berücksichtigt werden müssen. Junge Patienten weisen dabei in gutem Allgemeinzustand mit Überlebenszeiten bis zu über 50 Monaten eine günstige Prognose auf. Für Patienten über 50 Jahre und im schlechtem Allgemeinzustand beträgt die mittlere Überlebenszeit nur etwa 5-6 Monate (Senger, Cairncross, and Forsyth, 2003). Trotz intensiver chirurgischer, radio- und chemotherapeutischer Bemühungen gelang es bislang nicht, die Prognose wesentlich zu verbessern.

Die Ödembildung ist einer der entscheidenden Morbiditätsfaktoren des Glioblastoms (Papadopoulos *et al.*, 2001) und oft sind die dadurch ausgelösten Symptome des erhöhten Hirndrucks die ersten Anzeichen der Erkrankung. Bei primär erhöhtem Hirndruck mit Einklemmungsgefahr sind daher Sofortmaßnahmen der Hirndrucktherapie angezeigt. Die Behandlung erfolgt gewöhnlicherweise mit Kortikosteroiden (vor allem Dexamethason), in Fällen eines ausgeprägten Hirnödems kann sie durch zusätzliche Gabe osmotisch wirksamer Substanzen (Mannitol, Glycerol) unterstützt werden. Die Reduktion des Ödems, insbesondere durch Kortikosteroide ist ein wichtiger palliativer und prognostischer Therapiefaktor (Gundersen, Lote, and Hannisdal, 1996).

1.6 Neue Therapiestrategien des Glioblastoma multiforme

In einer kürzlich durch die EORTC und NCI Canada durchgeführten Phase III Studie, welche ein Kollektiv von 573 Patienten umfasst, erwies sich die adjuvante Temozolomid-Behandlung mit kombinierter Radiotherapie als deutlicher Nutzen für den Patienten: Unter Verwendung dieses Therapieschemas stieg die mittlere Überlebenszeit von 12,1 auf 14,6 Monate und die 2 Jahres-Überlebensrate von 8 auf 26% an (Chinot, 2005). Temozolomid besitzt eine gute orale Bioverfügbarkeit und ist als Derivat der Decarbazine in der Lage, Apoptose in Tumorzellen zu induzieren (D'Atri *et al.*, 1998).

Es konnte auch gezeigt werden, dass bei hoher Expression der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Aktivität, einem DNA-Reparaturenzym, die Sensitivität für eine Temozolomidtherapie erniedrigt ist (Gerson, 2002). Daher wird derzeit geprüft, ob bestimmte Laboruntersuchungen (z.B. Messung der MGMT-Aktivität) als Routine durchgeführt werden sollten, um zu entscheiden, ob im Rahmen der Behandlung auch eine Chemotherapie in Betracht gezogen werden sollte. Als weiterer Ansatzpunkt ist die Gentherapie zu nennen, bei der man versucht, durch gezielte Veränderungen des Erbgutes der Tumorzellen einen therapeutischen Effekt zu erzielen (Wang *et al.*, 2006). In den bisherigen Therapiestudien maligner Gliome gibt es zwei unterschiedliche Strategien zu unterscheiden: direkte und indirekte Gentherapie. In der direkten Gentherapie versucht man durch den Gentransfer von Adenoviren bestimmte Tumorsuppressorgene zu ersetzen. Die zweite Möglichkeit besteht in der Ausschaltung übermäßig aktivierter Onkogene (z.B. Wachstumsfaktoren). In der indirekten Gentherapie dagegen werden keine zellulären Fehlfunktionen korrigiert, sondern virale Vektoren in Tumorzellen übertragen. Auf den Vektoren sind sogenannte „suicide-genes“ („Selbstmordgene“) kodiert. Deren Genprodukte sind bestimmte Enzyme, die nichttoxische Vorstufen chemotherapeutischer Substanzen in toxische Verbindungen umwandeln und so Apoptose in den Tumorzellen induzieren. Ein Beispiel hierfür ist die *virus directed enzymatic prodrug therapy* (VDEPT) (Grove *et al.*, 1999).

Um das Ergebnis der Therapie zu verbessern, versucht man Substanzen zu entwickeln, welche gezielt mit Zell-Oberflächenrezeptoren oder intrazellulären Signalwegen interferieren. Zwischen 40% und 50% der Glioblastome zeigen eine HER1/EGFR-Dysregulation, und fast die Hälfte koexprimieren den konstitutiv aktiven mutierten Rezeptor-Subtyp EGFRvIII, welcher zu dem aggressiven und refraktären Verhalten der Glioblastome beitragen kann (Halatsch *et al.*, 2006). Zahlreiche Studien zeigen eine Beziehung zwischen der aberranten HER1/EGFR-Biologie und Tumorigenität in Glioblastomzellen. Zwei verfügbare

HER1/EGFR Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) sind Gefitinib (Iressa) und Erlotinib (Tarceva) (Penne *et al.*, 2005). Beide erhöhen die Empfindlichkeit der Tumorzellen auf Bestrahlung und weisen Antitumoreffekte *in vitro* und in Tiermodellen von Glioblastomen auf (Raizer, 2005). Da Glioblastome hoch vaskularisiert sind und ihr Wachstum Angiogenese-abhängig ist, stellt die Möglichkeit der Vermeidung maligner Gefäßneubildungen einer der vielversprechendsten therapeutischen Herangehensweisen dar (Kowanetz and Ferrara, 2006). VEGF ist das wichtigste Endothelzellmitogen, das über Endothelzellproliferation, -aktivierung und -migration die Angiogenese reguliert (Dvorak *et al.*, 1995). Verschiedene anti-angiogenetische Strategien, welche die Tumorinvasion und die Metastasierung verhindern sollen, wurden bereits entwickelt: die Inhibition pro-angiogenetischer Faktoren und/oder von Rezeptoren und/oder von VEGF-abhängigen Signalwegen, die Inaktivierung der Endothelzellen und die Hemmung von zellulären Adhäsionsmolekülen. Die heute entwickelten Angiogenese-Inhibitoren werden in endogene Inhibitoren wie z.B. Angiostatin, Trombospondin oder Interferon- α und in natürliche oder synthetische Inhibitoren wie z.B. Thalidomid eingeteilt. Auch Antikörper gegen angiogenetische Wachstumsfaktoren wie VEGF wurden erfolgreich entwickelt (Takano *et al.*, 2003).

Daneben sind Matrixmetalloproteinasen (MMP) in Gliomen von Bedeutung (Vince *et al.*, 2001). So ist das hochinfiltrative Wachstum der Glioblastomzellen darauf zurückzuführen, dass diese in der Lage sind, extrazelluläre Matrixkomponenten mit Hilfe von Metalloproteinasen wie z.B. dem Cathepsin B, zu spalten. In Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass E 64 die Cathepsin B-Aktivität inhibiert und somit die Invasivität der Tumorzellen mindert (Konduri *et al.*, 2001). Diese Proteaseninhibitoren könnten in der Zukunft bei der Tumorthherapie eingesetzt werden.

Die Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase ξ (RPTP ξ) und einer ihrer bedeutenden Liganden Pleiotrophin (PTN), werden in Glioblastomen überexprimiert und könnten sich ebenfalls als gute Angriffspunkte einer Immuntherapie erweisen (Muller *et al.*, 2004). Beide Moleküle werden eine Rolle bei der neuronalen Migration während der Entwicklung des zentralen Nervensystems zugeschrieben und von PTN ist bekannt, dass es am Tumorwachstum und der Angiogenese beteiligt ist (Ulbricht *et al.*, 2003).

Die Entwicklung von Proteaseinhibitoren bildet ebenfalls einen derzeitigen Schwerpunkt klinischer Forschung und Studien. Ein Vertreter ist PS-341, ein Borsäure-Dipeptid, welches bereits proapoptotische und antiproliferative Wirkungen bei Glioblastomzelllinien gezeigt hat (Yin *et al.*, 2005).

1.7 Rolle der Mikroglia in Astrozytomen

1921 entdeckte und beschrieb Rio-Hortega zum ersten Mal die Existenz von Mikrogliazellen im menschlichen Tumorgewebe. Durch Nutzung einer speziellen Silberfärbemethode lieferte Penfield die ersten detaillierten Beschreibungen über die Mikroglia und den Prozeß der Phagozytose in Gliomen (Penfield, 1925).

Bis heute existieren unterschiedliche Hypothesen über die Funktion und Rolle der Mikroglia in diesen Neoplasien: Auf der einen Seite wird angenommen, dass die Mikrogliazellen aufgrund ihrer Immunkompetenz eine Rolle bei der Verteidigung gegen die Tumorzellen spielen könnten (Frei *et al.*, 1994), auf der anderen Seite sollen sie z.B. durch Produktion von IL-10 zur Proliferation und Migration der Tumorzellen beitragen (Wagner *et al.*, 1999). Das hochmaligne Wachstum der Tumorzellen deutet darauf hin, dass die natürlichen Abwehrmechanismen der Mikroglia nicht ausreichen (Graeber, Scheithauer, and Kreutzberg, 2002). Es wird daher vermutet, dass die Mikroglia von den Tumorzellen angezogen werden und unter deren Kontrolle geraten, um Wachstum und Invasion zu fördern (Bettinger, Thanos, and Paulus, 2002). Tatsächlich produzieren die neoplastischen Zellen Chemokine wie z.B. das *macrophage chemoattractant protein-1* (MCP-1) (Prat *et al.*, 2000), welches die Mikroglia mit ihrem spezifischen MCP-1-Rezeptor, CCR2 (Galasso *et al.*, 2000) anlockt.

In Zellkulturexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass lösliche Faktoren, die von Mikroglia freigesetzt wurden, die Metalloprotease-2-Aktivität in Gliomzellen stimulieren. Durch dieses Enzym wird die extrazelluläre Matrix abgebaut und die Invasion von Gliomen gefördert (Markovic *et al.*, 2005).

Der Immunphänotyp der Mikrogliazellen korreliert mit dem Tumorgrad: Im Gegensatz zu Tumoren niedrigen WHO-Grades exprimieren Mikroglia in hochgradigen Tumoren weniger Oberflächenantigene wie z.B. MHC-II, während andere Markermoleküle unverändert bleiben oder sogar ansteigen können (Graeber, Scheithauer, and Kreutzberg, 2002). Mit Hilfe von INF- γ unterdrücken Tumorzellen aktiv die Expression von MHC-II-Molekülen. Die unmittelbare Folge ist eine verminderte Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen, welche normalerweise bei der intakten Immunantwort aktiviert werden und wiederum zytotoxische T-Zellen stimulieren. Möglicherweise ist dies ein Grund für das unaufhaltsame Wachstum der Tumorzellen (Flugel *et al.*, 1999).

1.8 Entwicklung von Kokultursystemen zur Gliomcharakterisierung

Da Gliomzellen durch unkontrollierte Zellproliferation und infiltratives Wachstum ins Hirngewebe charakterisiert sind, wurden Kokultursysteme entwickelt, die es ermöglichen, *in vitro* die Invasion der Tumorzellen zu studieren. Diese Systeme setzen sich aus sogenannten Gliomspheroiden und reaggregierten fetalen Gehirnzellen (Lund-Johansen *et al.*, 1990) zusammen. Bei der Invasion der Gliomzellen scheint vor allem die Kommunikation zwischen Gliomzellen und Astrozyten eine bedeutende Rolle zu spielen, was in einem Matrigel-Invasions-Assay demonstriert werden konnte (Zhang *et al.*, 2003).

Le *et al.* beobachteten in Gegenwart von Astrozyten eine gesteigerte Transmigration von U251N-Gliomzellen durch die extrazelluläre Matrixbarriere einer Boyden-Invasionskammer (Le *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass neben den Astrozyten auch die *gap junctions* zwischen den Gliomzellen einen wesentlichen Beitrag zur Invasion der Tumorzellen durch das Gehirnparenchym leisten (Oliveira *et al.*, 2005).

Studien haben gezeigt, dass residente Astrozyten die ersten Zellen sind, die auf den sie umgebenden Tumor reagieren. In einem Kokultorexperiment von Astrozyten und Astrozytomzellen gelang es, den Einfluß der Astrozyten auf die Tumorformation und Progression der Tumorzellen nachzuweisen (Lal, Ghirnikar, and Eng, 1996a). So konnte gezeigt werden, dass Astrozyten nach Kontakt mit Astrozytomzellen reaktiv werden, erkennbar an der erhöhten GFAP-Expression. Auf der anderen Seite zeigte sich bei der Untersuchung von GFAP-negativen Astrozyten, die mit Neuronen kokultiviert worden waren, dass die Astrozyten fähig waren, Zellfortsätze auszubilden. Dies deutet darauf hin, dass die häufig in Gliomen fehlende fokale GFAP-Expression die Tumorprogression fördert (Pekny *et al.*, 1998).

Seit 1996 wuchs das Interesse an der Entwicklung eines geeigneten Blut-Hirn-Schranken-Modells, mit dessen Hilfe die Interaktionen und morphologischen Eigenschaften der Endothelzellen und der Gliomzellen untersucht werden konnten (Hurst and Fritz, 1996). Hierfür wurden z.B. immortalisierte Endothelzellen aus der Nabelvene (*human umbilical vein endothelial cells*= HUVEC-304) und C6-Rattengliomzellen kokultiviert. Sowohl in Kultur mit Gliomzellen als auch mit deren konditionierten Medium bilden die Endothelzellen über *tight junctions* Komplexe aus.

Um den Einfluß der Gliomzellen auf die Angiogenese während der Tumorprogression zu klären, wurden 3d-Fibrin-Matrixsysteme entwickelt. Bei diesem Kokulturmodell werden zwei Fibringle, die zwei unterschiedliche Zelltypen enthalten, innerhalb desselben Wells einer 6-

Well-Kunststoffplatte platziert und beide mit dem gleichen Medium bedeckt (Lafleur *et al.*, 2002). Die Fibringle haben hierbei keinen direkten physikalischen Kontakt. Mit diesem Matrixkokultursystem konnte unter Verwendung von U87-Gliomzellen und HUVECs gezeigt werden, dass Gliomzellen offenbar die Proliferation und Migration von Endothelzellen beeinflussen (Khodarev *et al.*, 2003). Damit wurde klar, dass angiogenesestimulierende Faktoren von den Tumorzellen freigesetzt werden können, die für das Tumorstadium- und überleben essentiell sind.

Interessanterweise zeigte sich auch ein Einfluss von Gliomzellen auf Zellen des peripheren Nervensystems. Hierbei wurde eine Änderung der Morphologie von Schwannzellen, die mit Astrozytomzellen kokultiviert wurden, nachgewiesen (Lal, Ghirnikar, and Eng, 1996b).

Maligne Gliome haben vor allem aufgrund ihrer hochgradigen Invasivität eine äußerst schlechte Prognose. Die meist bestehende ausgedehnte Infiltration des normalen Hirngewebes führt zu einer "Unerreichbarkeit" der Tumorzellen für konventionelle Therapieformen. Humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark besitzen überraschenderweise eine ausgeprägte Affinität für maligne Gliome, was z.B. *in vitro* mit Hilfe von Matrigel-Invasionsassays bestätigt werden konnte. Hierbei wurde konditioniertes Medium aus Gliomzellen gewonnen und anschließend in ein Transwell pipettiert, darüber wurde ein mit Matrigel beschichtetes Well eingesetzt, welches humane mesenchymalen Stammzellen enthielt. Auf diese Weise konnte das Migrationsverhalten der Stammzellen in Richtung eines chemotaktischen Gradienten beobachtet werden. Es besteht die Hoffnung, dass die Stammzellen in Zukunft als "Transportvehikel" genutzt werden können, wobei die Stammzellen aufgrund ihrer ausgeprägten Migrationsneigung zu den Tumorzellen hinwandern und dort unmittelbar vor Ort therapeutische Wirkstoffe oder Genprodukte bereit stellen (Nakamizo *et al.*, 2005).

Bei der Invasion der Gliomzellen scheinen außer Astrozyten auch Mikrogliazellen eine bedeutende Funktion auszuüben (Bettinger, Thanos, and Paulus, 2002). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sie die Motilität von Gliomzellen durch Aktivitätssteigerung der Metalloprotease 2 stimulieren können (Markovic *et al.*, 2005).

1.9 Fragestellung

Mikrogliazellen können sowohl tumorfördernde als auch –antagonisierende Wirkungen ausüben. Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen glialen Tumorzellen und Mikroglia kann essentiell für das Verständnis der Tumorstadiumprogression und Invasion sein. Zu

diesem Zweck sollte in dieser Arbeit die Veränderung des Genexpressionsmusters in Rattengliomzellen nach Kokultivierung mit Mikrogliazellen untersucht werden.

Hierfür wurde ein Kokulturassay etabliert und anschließend die Veränderung der Genexpression in glialen Tumorzellen durch Kontakt mit Mikroglia bestimmt, dabei sollte die Bedeutung der Kandidatengene für die Invasion und Progression der Tumorzellen hinterfragt werden. Die Expressionsdaten der Kandidatengene wurden mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR überprüft, die Proteinexpression mit dem ELISA-Verfahren.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Alle nachfolgend beschriebenen Tätigkeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einem Zellkulturlabor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Eingriffe an offenen Zellkulturgefäßen wurden unter der Sterilwerkbank vorgenommen (z.B. Mediumwechsel, Trypsinierung). Verbrauchsmaterialien (Zellkulturflaschen, Pipetten etc.) wurden steril verpackt geliefert und stammten von der Firma Falcon[®] (Heidelberg, Deutschland). Die Zellkulturmedien wurden von der Firma Gibco[®] (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.1.1 Anlegen von F98-Rattengliomzellkulturen

Zum Anlegen von F98-Zellkulturen wurde eine entsprechende Anzahl kryokonservierter Stocks aufgetaut und eingesät. Hierzu wurden die Stocks zunächst im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend tröpfchenweise in 3 ml vorgewärmtes Medium A (DMEM, 4500 g/l Glucose, Glutamaxx, 10% FCS , 0,5 µg Gentamycin) gegeben. Danach wurden die Zellen für 8 min bei 103 g und 4°C pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde dann mit Medium A resuspendiert und auf eine entsprechende Anzahl Zellkulturflaschen verteilt. Hierbei wurden pro Flasche jeweils 15 ml serumhaltiges Medium A vorgelegt. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Mediumwechsel fand, je nach Wachstum, alle 3 Tage statt.

2.1.2 Passage der Zellen und Vermehrung

Sobald die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie umgesetzt: Das Medium wurde abpipettiert, die Zellen anschließend mit PBS gewaschen und mit 5x Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Der Trypsinverdau wurde dann mit Medium A abgestoppt und mit den abgelösten Zellen in ein 15 ml Falcon[®] pipettiert. Danach wurden die Zellen bei 103 g und Raumtemperatur für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Medium A resuspendiert. Zur Vermehrung der Zellen wurden alle Zellen in größere Zellkulturgefäße umgesetzt. Zum normalen Passagieren wurde ein Teil zumeist ¼ der Zellen umgesetzt, der Rest wurde verworfen oder kryokonserviert.

2.1.3 Kryokonservierung

Um möglichst viele F98-Rattengliomzellen, die für die folgenden Versuche aus einer gemeinsamen Passage stammen sollten, vorrätig zu haben, wurde eine bestimmte Zellzahl kryokonserviert. Dafür wurde zuerst das Einfriermedium, bestehend aus 10% FCS, 10% DMSO als Schutzsubstanz und 80% DMEM-4500 hergestellt. Die nach der Trypsinierung gewaschenen Zellen zu je 1×10^6 Zellen/ml wurden in 1 ml Einfriermedium gelöst und in Portionen von jeweils 1 ml eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in eine spezielle, für schonendes Einfrieren konzipierte Einfrierbox (NALGENE® Cryo 1°C Freezing Container, Nalge Nunc International, Hereford, U.K.) gestellt und für einen Tag bei -80°C deponiert. Hierdurch konnte ein konstantes Abkühlen von -1°C pro Minute gewährleistet werden. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen bei -296°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.1.4 Zellzählung

Sowohl für die Transwell-Kokultur als auch für immunzytochemischen Färbungen wurden Zellzählungen vorgenommen. Für die Transwell-Kokultur wurde zunächst die Mikrogliazellzahl bestimmt: Nach 2-stündigem Abschütteln der Primärkulturen wurde das Medium mit den darin enthaltenen Mikrogliazellen abgenommen, in ein 50 ml-Falcon®-Röhrchen pipettiert und anschließend für 6 min bei 161 g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 1 ml Medium B (DMEM, 1000 g/l Glucose, Glutamaxx, 10% FCS) resuspendiert, um die absolute Mikrogliaanzahl bestimmen zu können. Hierfür wurde zunächst eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (0,2 mm Tiefe, $0,0625 \text{ mm}^2$ Fläche) mit Ethanol gereinigt und das Deckgläschen leicht angefeuchtet aufgesetzt, woraufhin sich Newton'sche Ringe bildeten. Jetzt wurden 15 μl der Mikroglia-Zellsuspension unter das Deckgläschen gegeben und die Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt. Hierbei wurden vier Großquadrate zusammengesetzt aus 16 Kleinquadraten ausgezählt. Der Mittelwert ZZ wurde berechnet, indem die ermittelte Zellzahl durch vier geteilt wurde. Die absolute Zellzahl ließ sich nach folgender Formel ermitteln:

$$ZZ_{\text{Absolut}} = ZZ_{\text{Mittelwert}} \times 5000 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Resuspensionsvolumen}$$

Die Bestimmung der Anzahl der F98-Rattengliomzellen für die Transwell-Kokultur erfolgte analog der oben erwähnten Mikrogliaauszählung. Für die Vorbereitung der Zellzählung wurden in mehreren Zellkulturflaschen (Fläche 175 cm²) das Medium vollständig abgesaugt. Hiernach wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, um rückständiges Medium vollständig zu entfernen und Enzym-Serum-Interaktionen, welche die Enzymaktivität des im nächsten Arbeitsschritt verwendeten Trypsins herabsetzen würden, zu vermeiden. Im nächsten Schritt wurden 4 ml einer 5x Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und bei 37°C für 5-10 min inkubiert. Der Trypsinverdau wurde nach Vereinzeln der Zellen, welche mikroskopisch kontrolliert wurde, gestoppt. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden nun die doppelte Menge an Medium B in die Zellkulturflaschen gegeben und zusammen mit den Gliomzellen in ein 50 ml-Falcon[®]-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden für 6 min bei 161 g und Raumtemperatur abzentrifugiert; anschließend wurde der Trypsin/Medium-Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium B resuspendiert, 15 µl davon wurden 1:200 mit Medium B verdünnt und der Verdünnungsfaktor bei der Auszählung berücksichtigt. Hiernach fand die Zellzählung analog der Mikrogliazählung statt.

2.1.5 Präparation primärer Mikrogliazellkulturen

Für die Herstellung der primären Mikrogliazellkulturen wurden die Gehirne neugeborener Schneider-Ratten verwendet. Die Präparationen, welche in Kooperation mit dem Max-Delbrück-Zentrum Berlin (Abteilung Zelluläre Neurowissenschaften, Arbeitsgemeinschaft Kettenmann) durchgeführt wurden, erfolgten jeweils am Tag 1 und 2 nach der Methode von Giulian & Baker (Giulian and Baker, 1986): Zunächst wurde das Gewebe der Großhirnrinde vorsichtig von Blutgefäßen und Meningen befreit und anschließend 2 min mit 0,25% Trypsin in PBS trypsiniert. Danach wurde es mit einer abgeflamten Pipette dissoziiert und 2 x gewaschen. Die so erhaltenen Gliazellen konnten dann in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), welches mit 10% fetalem Kälber-Serum (FKS) und Antibiotika supplementiert wurde, überführt werden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (37°C, 10% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit). Nach 5 bis 7 Tagen hatte sich auf den Böden der Zellkulturflaschen ein konfluenter Astrozytenmonolayer gebildet, auf welchem die locker adhärenen Mikrogliazellen und die weniger locker adhärenen Oligodendrozyten wuchsen. Um für die folgenden Experimente eine möglichst große Mikroglia-Ausbeute zu erzielen, wurden die Primärzellen am 14. Tag mit L 929/1329-

Mikroglia-konditioniertem Medium aktiviert: Das verbrauchte Medium wurde abgenommen und durch 10 ml serumhaltiges Medium und 5 ml L 929/1329 ersetzt.

2.1.6 Isolierung der Mikroglia aus den Primärkulturen

Nach 20 Tagen hatten sich die Mikrogliazellen stark vermehrt und konnten durch die sogenannte Schüttelmethode (Giulian and Baker, 1986) vom Astrozyten/Oligodendrozytenmonolayer abgelöst werden. Hierfür wurden die Zellkulturflaschen für 2 h in einem Schüttelinkubator (260 r.p.m, 37°C) abgeschüttelt, so dass die locker adhärenen Mikrogliazellen für die darauffolgenden Versuche mit dem Medium abgenommen werden konnten. Die Primärkulturen wurden jeweils am 20. (1. Abschlag), 24. (2. Abschlag) und am 28. Tag (3. Abschlag) abgeschüttelt, um genügend Mikrogliazellen für die Versuche zu gewinnen.

2.1.7 Anlegen eines Transwell-Kokultur-Systems

Nach 2-stündigem Abschütteln der Mikroglia-Primärkulturen und der sich anschließenden Auszählung wurden $4,4 \times 10^5$ Mikrogliazellen/Well in 2 ml angewärmten Medium B ausgesät. Alle durch den Schüttelvorgang gewonnenen Mikrogliazellen wurden für das Anlegen einer möglichst großen Anzahl an Wells genutzt, wobei die Menge der Wells, die mit den Mikrogliazellen belegt wurde, abhängig war von der Ausbeute an den jeweiligen Versuchstagen.

Nachdem die Zellzahl der Tumorzellen ermittelt worden war, wurden 5×10^6 F98-Zellen auf Membraneinsätzen (Becton Dickinson Labware® Europe) bestehend aus einer Polyethylenterephthalat-Membran mit $0,4 \mu\text{m}$ Porendichte ausgesät. Zuvor wurde 1 ml Medium B in die jeweiligen Membraneinsätze vorgelegt. Die Membraneinsätze wurden dann in die Vertiefungen der mit den Mikrogliazellen bestückten 6-Well-Platte eingesetzt und gemeinsam mit den Mikroglia für 24 h bei 37°C kokultiviert (*siehe Abbildung 2*). Das Zellzahlverhältnis zwischen Mikroglia und Tumorzellen betrug 1:11.

Um einen Vergleich zwischen F98-Zellen, die für 24 h mit den Mikrogliazellen kokultiviert wurden und reinen F98-Zellen, die nicht mit Mikroglia kokultiviert wurden herstellen zu können, wurden diese allein zu je 5×10^6 Zellen pro Membraneinsatz ausgesät und unter gleichen Bedingungen (24 h, 37°C) inkubiert. Die Membraneinsätze ragten somit in Wells, die nur mit Medium B gefüllt waren. Die abgeschüttelten Mikrogliazellen (wie oben

beschrieben $4,4 \times 10^5$ Zellen/Well) wurden mit Membraneinsätzen, die nur 1 ml Medium B enthielten, inkubiert.

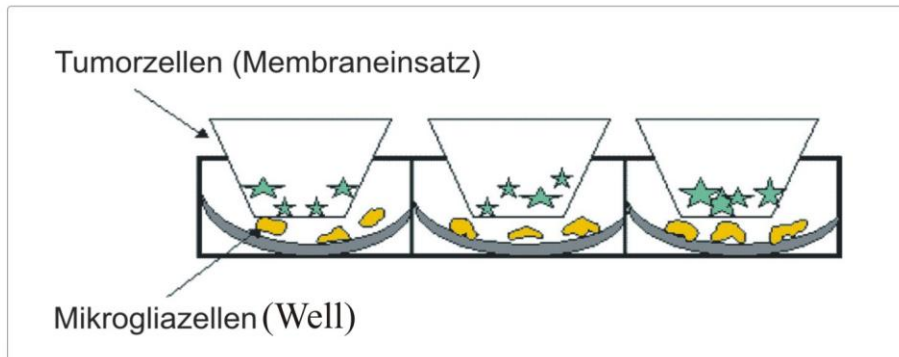


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Transwell-Kokultur-Assays.

2.1.8 Gewinnung von konditioniertem Medium aus dem Transwell-Kokultur-System

Nach 24-stündiger Kokultur wurde das konditionierte Medium vorsichtig aus den Wells bzw. Membraneinsätzen abgenommen und für die nachfolgende IL-6-Zytokinbestimmung in einem 15 ml-Falcon[®]-Röhrchen bei -296°C flüssigen Stickstoffs eingefroren.

2.2 Histologie und immunzytochemische Färbungen

2.2.1 Tumore und Herstellung von Paraffinschnitten

Das Tumormaterial stammte von Patienten mit WHO-Grad IV-Glioblastomen, die in der Neurochirurgischen Klinik der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum operiert wurden. Die Diagnose wurde von erfahrenen Neuropathologen des Instituts für Neuropathologie entsprechend der Kriterien der zweiten überarbeiteten WHO-Klassifikation histologisch klassifiziert und graduiert.

Vor der Einbettung von menschlichem Gehirnmateriale wurde dieses für 12 h in Formalin fixiert und weiterhin in einer steigenden Alkoholreihe (von 50% bis 100%) entwässert, da sich wässriges Gewebe nicht mit Paraffin mischt. Um das Schneiden mit dem Mikrotom zu erleichtern, wurde das Gewebe mit flüssigem Paraffin durchtränkt. Nach Aushärtung des Paraffins wurde der Gewebekblock in ein Mikrotom eingespannt und Schnitte definierter Dicke angefertigt. Im nächsten Schritt wurden die Paraffinscheiben auf Glasobjektträger aufgebracht und mit Permaunt[®] (Dako[®]) eingedeckt.

2.2.2 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE-Übersichtsfärbung)

Bei der H.E.-Färbung handelt es sich um eine Standardfärbung der Histologie. Sie kann generell bei jedem Präparat angewendet werden. Dabei erscheinen die Zellkerne aufgrund der Anlagerung des basischen Hämatoxilins an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren des Zellkerns blau, während sich das Zytoplasma durch die Eosinbehandlung rötlich darstellt. Nach der Rehydrierung wurden die Gehirnschnitte 3-4 min in Hämatoxilinlösung getaucht und danach 2 x in dH₂O gespült. Anschließend wurde der Schnitt 4 min in fließendem Leitungswasser „gebläut“. Im Anschluß wurde eine 14 min-Färbung in Eosin durchgeführt, welcher ein weiteres kurzes Spülen in dH₂O folgte. Nach Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Xylol unter einem Deckgläschen eingeschlossen.

2.2.3 Tomatolektinfärbung

Zur Ermittlung der Reinheit der abgeschüttelten Mikrogliazellen wurden 2×10^4 Zellen/Kammer auf einem 8-Kammer-Objekträger (Falcon®) in Medium B ausgesät. Nachdem die Zellen an der Oberfläche des Glasobjekträgers adhärirt hatten, wurde am nächsten Tag das in den Kammern befindliche Medium vorsichtig abgenommen. Danach wurden die Zellen 2 x mit unsterilem PBS gewaschen und anschließend mit vorgekühltem Methanol für 10 min bei 4°C fixiert. Nach Trocknung der Kammern bei Raumtemperatur für 10 min und wiederholtem Abspülen mit PBS wurde das mit Texas Red® markierte Lektin der Tomate *Lycopersicon esculentum* (Tomatolektin) auf die Zellen gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Tomatolektin hat die Eigenschaft, spezifisch an Poly-N-azetyl-laktosaminreste, die im Gehirn nicht nur auf Zelloberflächen von Mikroglia- sondern auch auf Endothelzellen vorkommen, zu binden. Letztere können jedoch aufgrund ihrer Morphologie von den Mikrogliazellen unterschieden werden.

Vor der Sichtbarmachung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica®) wurden die Zellen erneut mit PBS abgespült und schließlich mit Fluoromount-G (InterBio Tech®) eingedeckt. Für die Anregung des Tomatolektins wurde Licht mit einer Wellenlänge von 583 nm verwendet. Um die Auszählung der Zellen zu erleichtern, wurden mehrere Gesichtsfelder jeweils im Phasenkontrast/Fluoreszenzbild fotografiert und parallel auf dem Bildschirm betrachtet.

2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung

Ziel war es, Tumor- bzw. Mikroglia in 10 Gehirnschnitten von Glioblastompatienten zu färben, um das Verhältnis der Tumorzellzahl zur Anzahl der Mikrogliazellen im soliden Tumorgewebe zu bestimmen. Da es sich kompliziert gestaltet, von jedem Gewebestück jeweils zwei unabhängige Immunfluoreszenzfärbungen mit unterschiedlich spezifischen Antikörpern zu validieren, wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbemethode gewählt. Diese hat den Vorteil, dass beide Zelltypen später zur Erleichterung der Zellauszählung in einer Ebene liegen und von einem Gewebeschnitt stammen.

Zunächst wurden die Gehirnschnitte für die Entparaffinierung 10 min in Xylol gestellt und anschließend durch die absteigende Alkoholreihe geführt. Danach wurden sie einmal mit Wasser und mit PBS gespült. Jetzt wurden die Schnitte in ein mit Citrat-Puffer (pH 6) gefülltes Kästchen, welches vorher 2 min bei 600 Watt in einer Mikrowelle vorgewärmt worden war, gestellt und 2 x 5 min bei 600 Watt erhitzt. Nach Abkühlung für 5 min erfolgte zweimaliges Waschen mit PBS und vorsichtiges Abklopfen der Flüssigkeit. Zum Blockieren wurde Normalserum der Ziege Nr. X0907 (Dako[®], Deutschland) 1: 10 mit PBS verdünnt und jeweils 100 µl des Ziegenserums auf die Schnitte verteilt. Hiernach wurden sie 30 min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 min wurde das Serum abgeklopft und die Schnitte 2 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des spezifischen Antikörper *mouse anti-human-CD68* (Dako[®], 1:5000 verdünnt in PBS) und *rabbit anti human-GFAP* (Dako[®], 1: 200 verdünnt in PBS) auf die Schnitte gegeben und 2 h bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Ein erneuter Waschschrift mit PBS erfolgte bevor die Gehirnschnitte 1 h mit den zweiten Antikörpern bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Ein Cy[®] 2-konjugierter *goat-anti-mouse*-Antikörper (Sekundärantikörper für CD68, Emission 510 nm) und Cy[®] 3-konjugierter *goat-anti-rabbit*-Antikörper (sekundärer Antikörper zu GFAP, Emission 570 nm) wurden jeweils 1:100 verdünnt und auf die Präparate verteilt. Vor der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden diese 3 x mit PBS abgespült und anschließend in Fluoromount[®]-G eingedeckelt. Zur Bestimmung des Zellzahlverhältnisses wurde die Mikroglia- und die Tumorzellanzahl in 10 Feldern bei 400-facher Vergrößerung ermittelt. Anschließend wurde das Verhältnis Tumorzellen zu Mikroglia gebildet.

2.3 Molekularbiologische Analysen

Um die kokultivierten und nicht-kokultivierten Zellen auf Genexpressionsunterschiede untersuchen zu können, wurden die unterschiedlichen Zellgruppen (Mikroglia-kokultiviert mit F98-Gliomzellen, Mikroglia-nicht kokultiviert mit F98-Gliomzellen; F98-kokultiviert mit Mikroglia und F98-nicht kokultiviert mit Mikroglia) lysiert und deren Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Danach wurde die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Vor der Umschreibung wurde ein DNase-Verdau vorgenommen, um Verunreinigungen der RNA für die spätere Hybridisierung zu vermeiden. Für die Generierung ausreichender RNA-Mengen für die Hybridisierung, wurde die Gesamtheit der erzeugten cDNA mittels einer *in vitro*-Transkription und anschließender PCR-Reaktion amplifiziert. Sowohl die Umschreibung der Gesamt-RNA in cDNA und nachfolgende *in vitro*-Amplifikation als auch das Labeln der RNA-Proben wurden nach den Anweisungen des Herstellers (Affymetrix[®], Santa Clara, CA) in Kooperation mit dem Labor für funktionelle Genomforschung (LFGC, Charité Universitätsklinikum Berlin) durchgeführt.

2.3.1 Vorbereitung der Mikroglia und F98-Rattengliomzellen für die RNA-Isolierung

Die folgenden Arbeiten erfolgten mit vorgekühlten, vorher bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrten Zellkulturmaterialien (Zellschaber, Falcon[®]-Röhrchen, PBS, etc.). Nach 24-stündiger Kokultivierung mit den Rattengliomzellen wurden die Mikrogliazellen mit einem Zellschaber von den Well-Böden gelöst und mit Medium A in ein Falcon[®]-Röhrchen pipettiert. Hiernach wurden die Zellen für 8 min bei 4°C und 103 g abzentrifugiert. Das Medium wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen anschließend in PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde sofort stickstoffgefroren, um Genexpressionsveränderungen bis zur RNA-Isolation, die am folgenden Tag durchgeführt wurde, zu vermeiden. Die F98-Rattengliomzellen wurden ebenfalls mit einem Zellschaber vorsichtig von den Böden der Membraneinsätze abgelöst. Das Lösen beider Zellpopulationen erfolgte unter mikroskopischer Beobachtung, um möglichst viele Zellen (vor allem Mikrogliazellen) für die RNA-Isolation zu gewinnen. Die Gewinnung der Rattengliomzellen aus den Membraneinsätzen erfolgte abweichend von der Mikrogliazellengewinnung. Zunächst wurde das Medium aus den Inserts entfernt, anschließend die Zellen mit PBS abgespült und in 1 ml PBS abgeschabt. Die Zellsuspension

wurde dann in ein 15 ml-Falcon[®]-Röhrchen überführt und 8 min bei 4°C und 103 g abzentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet im flüssigen Stickstoff schockgefroren.

2.3.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Mikroglia und F98-Rattengliomzellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Mikroglia- und F98-Rattengliomzellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen[®] (Hilden, Deutschland). Hierbei wurde nach dem Protokoll zur Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen vorgegangen. Zunächst wurden die Zellpellets bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 600 µl RLT-Lysepuffer (enthielt 1% β-Mercaptoethanol) vermengt. Danach wurde die Zellsuspension durch kräftiges Passagieren mit der Pipette durchmischt um die restlichen Zellen zu lysieren. Das trübe Lysat wurde homogenisiert, indem es auf eine Qiashtredder-Säule (Qiagen[®], Hilden, Deutschland) mittels Zentrifugation gegeben wurde und für 2 min bei 7000 g zentrifugiert wurde. Zum Fällen der RNA wurde ein identisches Volumen 70%igen Ethanols auf das Homogenat gegeben und sorgfältig durchmischt. Hiernach wurden 700 µl der Suspension auf eine RNeasy-Säule geladen und für 15 s bei 3000 g zentrifugiert. Die sich unterhalb der Säule angesammelte Flüssigkeit wurde verworfen. Verunreinigungen der Säule wurden durch zwei Waschschrte mit 700 µl RW1-Puffer mit anschließender Zentrifugation für 15 s bei 3000 g entfernt. Ein dritter Waschschrte enthielt 500 µl RPE-Puffer; die Proben wurden für 2 min bei 3000 g zentrifugiert um die Säule ausreichend zu trocknen. Zur Gewinnung der RNA wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-fassendes Reaktionsgefäß gesetzt und 30 µl RNase-freies Wasser vorsichtig auf die Silica-Gel-Membran geträufelt. Abschließend erfolgte die Elution der RNA durch Zentrifugation bei 3000 g für 1min.

2.3.3 Photometrische Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration

2 µl der isolierten RNA wurden mit 98 µl DEPC-Wasser 1:50 verdünnt und in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Da eine optische Dichte bei 260 nm von 1,0 einer RNA-Menge von 40 ng/µl entspricht, kann die RNA-Konzentration nach folgender Formel ermittelt werden:

$$OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor (hier beträgt er 50)} = \text{RNA-Konzentration (ng/µl)}$$

Zur Bestimmung der gesamten isolierten RNA-Menge wurde zusätzlich mit dem Gesamtvolumen (hier: 28 µl) der eluierten RNA multipliziert. Um qualitative Aussagen über die eluierte RNA zu treffen, wurde zum einen das Verhältnis OD 260 nm/280 nm gebildet. Dieser Quotient gilt als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Zur qualitative Aussage bezüglich der Integrität der RNA wurde sie auf einem Agarosegel bzw. im Bioanalyzer elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert.

2.3.4 RNA-Gelelektrophorese und Bioanalyzer

Die Qualität und Quantität der benötigten RNA ist ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Markierungsreaktion der RNA-Sonde. Verunreinigungen der RNA mit zellulären Lipiden, Polysacchariden, Ethanolresten oder Proteinen aufgrund unzureichender RNA-Isolierung -und Reinigung können das Umschreiben der RNA in eine cRNA-Sonde erheblich behindern und in der darauffolgenden Hybridisierung optimale Ergebnisse verhindern.

Aus diesem Grund wurde die RNA-Präparation mittels Gelelektrophorese in einem 1%-Agarose-Gel bei 180 V aufgetrennt. Die RNA-Laufzeit betrug ca. 20 min. Durch Zugabe von 0,05% Ethidiumbromid, welches mit der RNA interkaliert, wurden die RNA-Fragmente am Gel-Dokumentationssystem (Intas, Göttingen, Deutschland) mit ultraviolettem Licht bei 302 nm sichtbar gemacht. Es wurde überprüft, ob die isolierte Gesamt-RNA im denaturierenden Gel distinkte ribosomale Banden der 18S- und 28S-rRNA aufweist und ob das Intensitätsverhältnis der 28S- und 18S-rRNA nahe bei 2:1 liegt. Zudem wurde nach möglichen Verunreinigungen der Geltaschen mit genomischer DNA geschaut.

Als zusätzliche Kontrolle wurde die Gesamt-RNA mithilfe der UV-Spektroskopie quantifiziert und deren Qualität durch Analyse auf einem Labchip (BioAnalyzer®, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) überprüft. Letztere Qualitätskontrolle erfolgte im LGFC, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte.

2.3.5 Reverse Transkription von RNA für die Affymetrix®-Genchip-Hybridisierung

Die folgenden Arbeiten zur Hybridisierung von RNA-Sonden auf Affymetrix®-Mikroarraychips wurden vom Labor für funktionelle Genomforschung (LGFC) durchgeführt. Alle RNA-Proben wurden unter Verwendung der SuperScript™ II Transcriptase (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) und Oligo(dT)₂₄-Primer, welche einen T7-RNA-Polymerase-Promotor enthalten, in doppelsträngige cDNA umgeschrieben.

Zunächst wurden 5 µg der Total-RNA und 1 µl (5 mM) T7-Oligo(dT)₂₄-Primer für 10 min bei 70°C erhitzt. Das Erhitzen dient der Aufschmelzung der Sekundärstrukturen der RNA zur verbesserten Primerbindung. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden 200 U der SuperScriptTM II Reverse Transcriptase, 4 µl Puffer für die Erststrangsynthese (50 mM TRIS-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 2 µl (10 mM) DTT und je 1 µl dNTP's (0,5 mM dGTP, dTTP, dATP, dCTP) hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 1,5 h bei 43°C inkubiert.

Nach der cDNA-Synthese, die unter Standardbedingungen erfolgte, lag nun ein DNA/RNA-Hybrid vor. Um hieraus doppelsträngige RNA herzustellen, bediente man sich der konventionellen Zweitstrangsynthese mithilfe der RNase H und der DNA-Polymerase I. Hierfür wurde ein 150 µl-Reaktionsansatz verwendet: 30 µl Puffer für die Zweitstrangsynthese (20 mM TRIS-HCl, pH 6,9, 90 mM KCl, 4,6 mM MgCl₂, 0,15 mM β-NAD⁺, 10 mM Mg(NH₄)₂SO₄, 3 µl dNTP's (0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, und dTTP), 1 µl (1,2 mM) DTT, 10 U DNA-Ligase, 40 U DNA-Polymerase I und 2 U RNase H wurden gemischt und für 2 h bei 16°C inkubiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation mit 10 U T4-DNA-Polymerase für 15 min.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl EDTA (0,5 M) beendet. Zum Schluß erfolgte eine Reinigung der doppelsträngigen cDNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Präzipitation mit 5 M Ammoniumacetat und Ethanol für 20 min bei -20°C. Das getrocknete Pellet wurde schließlich in 12 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.3.6 *In vitro*-Transkription (cRNA-Synthese) und Herstellung der RNA-Sonden

Bei DNA-Mikroarrays besteht die Möglichkeit, diese entweder mit DNA-Sonden oder mit RNA-Sonden zu hybridisieren. Obwohl die Verwendung von DNA-Sonden sehr viel gebräuchlicher ist, bietet die Verwendung von RNA-Sonden den Vorteil einer spezifischeren Hybridisierung: eine RNA/DNA-Hybridisierung ist energetisch sehr viel günstiger als eine DNA/DNA-Hybridisierung und kann demzufolge bei höheren Temperaturen, also bei höherer Spezifität erfolgen. RNA-Sonden können auf zwei unterschiedliche Arten hergestellt werden. Entweder markiert man die mRNA direkt, indem ein Hapten chemisch an die RNA gekoppelt wird oder die Markierung der RNA erfolgt während einer RNA-Amplifikationsreaktion (*in vitro*-Transkription).

Für die Herstellung der RNA-Sonden und die gleichzeitige *in vitro*-Transkription wurde das *BioArray High Yield RNA Transcription Kit* (Enzo Diagnostics[®], Farmingdale, N.Y.) verwendet.

Die aus 2.3.5 hergestellten doppelsträngigen cDNAs, welche über einen integrierten T7-RNA-Polymerase-Promotor verfügen, wurden zusammen mit T7-Transkriptions-Puffer (7 mM ATP, 7 mM GTP, 5,3 mM UTP, 5,3 mM CTP, 1,7 mM biotinyliertes UTP und 1,7 mM biotinyliertes CTP) für 6 h bei 37°C inkubiert. Während der Synthetisierung des komplementären Stranges der cRNA durch die DNA-abhängige T7-RNA-Polymerase wurden die markierten Nucleotide in den wachsenden cRNA-Strang eingebaut. Die umgeschriebene und amplifizierte cRNA wurde nun über eine Resin-Säule (Rneasy[®], Qiagen[®], Hilden, Deutschland) aufgereinigt, um die verbliebenen Primer, die eine Template-unabhängige cRNA-Synthese induzieren könnten, sowie freie dNTP's zu eliminieren. Nach Aufreinigung der cRNA wurde eine alkalische Hydrolyse durchgeführt, bei der die cRNA in Gegenwart von 40 mM Tris-Acetat, pH 8,1, 100 mM Potassiumacetat und 30 mM Magnesiumacetat für 35 min bei 94°C fragmentiert wurde. Die Fragmentierung dient dazu, RNA-Sonden im gewünschten Größenbereich (50-300 bp) zu erzeugen und damit die definierten Sondenlängen an das Experiment anzupassen.

Im Anschluß wurde die cRNA durch UV-Spektroskopie und die Verteilung der Fragmentgrößen der cRNA und entstandenen Nebenprodukten mittels Bioanalyzer[®] (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) ermittelt.

2.3.7 Hybridisierung der RNA-Sonden

Die erzeugten cRNA-Sonden wurden nun mit neurobiologischen, rattenspezifischen U34-Affymetrixchips (Affymetrix[®], Rat NeuroBiology Array U34, Artikel-Nr 900283, Santa Clara, CA) hybridisiert. Die Chips enthalten über 1200 für die in der Neurobiologie relevanten Gensequenzen (z.B. Gene für Kinasen, Zelloberflächen-Rezeptoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Onkogene).

Zunächst mußte eine Hybridisierungslösung hergestellt werden. Sie enthielt 0,05 µg/µl fragmentierte cRNA (Sonde), 50 pM B2-Kontroll-Oligonukleotide, eukaryotische Hybridisierungskontrollen (1,5 pM bio B, 5 pM bio C und 25 pM bio D von *E.coli*, Affymetrix[®], Santa Clara, CA), 0,1 mg/ml DNA aus Heringssperma und 0,5 mg/ml in Puffer (100 mM 2-N-Morpholinoethansulfonsäure (MES), 1 M NaCl, 20 mM EDTA, 0,01% Tween 20) gelöstes azetyliertes Serum-Albumin (Sigma, St. Louis, MO). Vor dem Auftragen der

Hybridisierungslösung auf den Chip, wurde sie zuerst auf 95°C, dann auf 45°C erhitzt und zentrifugiert. In einem Hybridisierungsofen wurde sie für 16 h bei 45°C mit den Chips aufbewahrt. Nach der Inkubation folgte das Waschen und Färben. Dabei wurde nach dem EukGE-WS2-Protokoll vorgegangen. Hierbei wurden die Genchip-Sonden 10 x bei 25°C mit nicht-stringentem Puffer (0,9 M NaCl, 0,06 M Na₂HPO₄, 6 mM EDTA, 0,01% Tween 20) gewaschen. Der zweite Waschschrift erfolgte bei einer Temperatur von 50°C und bestand aus vier Zyklen, in denen jeweils 15 x mit stringentem Puffer (100 mM MES, 0,1 M NaCl und 0,01% Tween 20) gewaschen wurde. Die Genchips wurden nun für 10 min bei 25°C von einer Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE)-Lösung (10 µg/ml SAPE, Molecular Probes, Eugene, OR), welche noch 2 µg/µl acetyliertes BSA (Sigma, St.Louis, MO) in 100 mM MES, 1 M NaCl und 0,05% Tween 20 enthielt, umspült. Der letzte Färbeschritt mit nichtstringenter Lösung wurde bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt und bestand diesmal aus 10 Zyklen. Zur Signalverstärkung wurden die Chipsonden für 10 min mit einer Antikörperlösung bestehend aus 2 µg/µl acetyliertem BSA, 0,1 µg/µl normalen Ziegen-IgGs (Sigma, St.Louis, MO), 3 µg/ml goat-anti-Streptavidin und biotinylierten Antikörper (Vector Laboratories, Burlingame, CA) in 100 mM MES, 1 M NaCl und zuletzt 0,05% Tween 20 bei 25°C behandelt. Nach dem Verstärkerschritt wurden die Chips in 15 Zyklen 4 x mit SAPE bei 30°C gewaschen. Eingelesen wurde 2 x mit dem GeneChip System Confocal Scanner (Agilent®, Santa Clara, CA). Die Datenanalyse wurde mit der Microarray Suite Version 5.0 Software und Data Mining Tool Version 2.0 Software von Affymetrix® ausgeführt.

2.3.8 Reverse Transkription von RNA für Real-Time PCR

Für die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde das *Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Zur Gewinnung von cDNA wurden ca. 3 µg intakte Gesamt-RNA verwendet. Für einen 20 µl-Reaktionsansatz wurden zelluläre RNA mit 1 µl Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primer(0,5 µg/µl) und 1 µl dNTP's (10 mM) zusammengegeben, kurz zentrifugiert und um ein *Annealing* zu ermöglichen 5 min bei 65°C inkubiert. Hiernach erfolgte eine kurze Abkühlung auf Eis und Zugabe von 2 µl 10x RT-Puffer, 2 µl (0,1 M) DTT und 4 µl MgCl₂ (25 mM) zugegeben. Der Ansatz wurde kurz gemischt und dann für 2 min bei 42°C inkubiert. Hiernach erfolgte die Zugabe von 1 µl SuperScript™ Reverse Transkriptase II und erneut eine 50-minütige Inkubation bei 42°C, in der die Synthese der cDNA stattfand. Zum Beenden der Reaktion wurde der Reaktionsansatz

für 15 min bei 70°C erhitzt, hiernach auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 1 µl RNase H und Inkubation für 20 min bei 37°C, um verbliebene RNA zu inaktivieren. Zum Schluß wurde mit der cDNA eine PCR durchgeführt. Die entstandenen Produkte wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen um zu analysieren, ob die cDNA-Synthese erfolgreich war.

2.3.9 Temperaturgradienten-PCR zur Primer-Optimierung

Um ein spezifisches Produkt in der folgenden Real-Time PCR zu erhalten, mussten Primeroptimierungen durchgeführt werden. Die Oligonukleotid-Sequenzen der verwendeten Primer wurden anhand der Sequenzen der mRNAs aus der Gen-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, NIH, Bethesda, USA) ausgewählt. Entscheidend waren der GC-Gehalt (40-60%), die Primer-Länge (18-30-mer) und die Schmelztemperatur, die zwischen 55 und 65°C liegen sollte. Zudem sollte das amplifizierte Fragment einen Größenbereich von etwa 100-300 bp aufweisen, die für die Anwendung in der Real-Time PCR empfohlen werden. Die Primersynthese wurde von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

Um optimale Bedingungen für die Bindung der Primer an die cDNA zu gewährleisten, wurde mit den ausgewählten Primern eine Temperaturgradienten-PCR durchgeführt. Hierbei unterschieden sich die Temperaturen um ca. 0,5°C. Gleichzeitig wurden mehrere MgCl₂-Konzentrationen (1 mM, 1,5 mM, 2 mM und 2,5 mM) pro cDNA-Probe getestet. Für die Temperaturgradienten-PCR wurde zunächst ein Mastermix hergestellt, der für einen 50 µl-Ansatz in den verwendeten Konzentrationen für MgCl₂ variierte (*siehe Tabelle 2*).

Tabelle 2: Mastermix und Temperaturprogramm für die PCR

Mastermix	PCR-Programm
1x RT-Puffer	1. 94°C 5 min
0,2 mM dNTP's	2. 94°C 30 s
0,5 µM sequenzspezifischer 3'-und 5'-Primer	3. 55-63°C 30 s (primerabhängig)
1-2,5 mM MgCl ₂	4. 72°C 30 s
1 U AmpliTaq-Polymerase	5. 72°C 10 min
ad dH ₂ O	6. 20°C ∞
	Bemerkung: Schritt 2-4 30 Zyklen

5 µl vorverdünnter cDNA (1:40 in dH₂O) wurden in 200 µl-Tubes (Biozym, Deutschland) vorgelegt und anschließend mit 45 µl des Mastermixes komplettiert. Tabelle 4 (Seite 38) zeigt eine Auflistung der verwendeten Primerpaare mit ihren jeweiligen Nukleotidsequenzen.

2.3.10 Auftrennung der cDNA-PCR-Produkte im Agarosegel

Für die Analyse der PCR-Produkte wurde zunächst ein 1% iges Agarosegel hergestellt: Dazu wurde in der Mikrowelle 1 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer gelöst. Nach dem Erhitzen wurden der Agarose 3 µl Ethidiumbromid zugefügt und anschließend ebenfalls unter dem Abzug ein Gel in einer Gelkammer gegossen. Nach dem Erhärten der Agarose wurde der Kamm entfernt, die PCR-Proben mit 5 µl 6x Ladepuffer (0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylencyanol, 60% Glycerol und 60 mM EDTA) versetzt und in je eine Geltasche aufgetragen. Die amplifizierten cDNA-Produkte wurden bei 180 V für 20 min im elektrischen Feld aufgetrennt und durch Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Farbstoffes Ethidiumbromid in einer UV-Kammer (Intas, Göttingen, Deutschland) sichtbar gemacht. Als Größenstandard diente ein 500 bp-Marker (pUC19 DNA/Msp I) von MBI Fermentas[®] (St. Leon-Rot, Deutschland).

2.3.11 Real-Time quantitative PCR (Theoretischer Hintergrund)

Die Real-Time quantitative PCR wurde mit dem Thermocycler iCycler iQ[®] der Firma Biorad[®] (München, Deutschland) durchgeführt. In dieser PCR-Maschine ist eine 96-Well-Platte und eine zusätzliche optische Einheit (CCD-Kamera) integriert, welche simultan die Emissionen der zuvor durch eine Halogenlampe beleuchteten Proben mißt. Die Kamera ist in der Lage, vier unterschiedliche Farbstoffe darunter FAM oder SYBR[®] Green I zu detektieren. Die Real-Time-quantitative PCR ist eine moderne Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren und zur Ermittlung von Unterschieden differentiell exprimierter Gene. Durch sie ist es möglich, über den gesamten Reaktionsverlauf die Amplifizierung der eingesetzten cDNA zu verfolgen. Die Amplifizierung der DNA kann mit verschiedenen Detektionssystemen dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde das Detektionsverfahren mit SYBR[®] Green I (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) verwendet. SYBR[®] Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Dieser wird mit einer Wellenlänge von 497 nm angeregt und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 520 nm. Durch die Bindungseigenschaften von SYBR[®] Green I wird die Fluoreszenzintensität

während der Amplifikationszyklen jeweils am Ende der Elongationsphase, wenn die amplifizierte DNA doppelsträngig vorliegt, gemessen. Das Fluoreszenzsignal ist im linearen Bereich der Amplifikation der Template-DNA proportional der Menge an gebildetem PCR-Produkt. Zur Quantifizierung wird der CT-Wert verwendet, welcher am Wendepunkt der exponentiellen Kurve liegt und einen signifikanten Anstieg des Fluoreszenzsignals anzeigt (siehe *Abbildung 3*). Desweiteren sollten vergleichbare CT-Werte über dem „Treshold“ liegen (siehe *Abbildung 3*). Ein CT-Wert von 40 und mehr bedeutet, dass keine Amplifizierung stattgefunden hat und nicht in die Rechnungen einbezogen werden kann.

Aufgrund seiner interkalierenden Eigenschaften ist es möglich, dass SYBR[®] Green I ebenfalls mögliche Primerdimere bindet, daher wurde neben der Quantifizierung der cDNA zusätzlich eine Schmelzpunktanalyse der entstandenen PCR-Produkte durchgeführt. Hierbei wird der Reaktionsansatz langsam von 40°C bis 95°C erhitzt. Der Schmelzpunkt kann zu dem Zeitpunkt ermittelt werden, an dem 50% der doppelsträngigen DNA-Fragmente bei einer spezifischen Temperatur in Einzelstränge denaturieren. Als Folge der Denaturierung kommt es zur Dissoziation von SYBR[®] Green I und damit zum Abfall der Fluoreszenzintensität, welche von der CCD-Kamera des iCyclers detektiert und als Änderung des Verlaufs der Schmelzkurve (siehe *Abbildung 4*) aufgezeichnet wird. Verschiedene Produktlängen und Produkte mit unterschiedlicher Sequenz schmelzen bei unterschiedlichen Temperaturen. Weist das amplifizierte PCR-Produkt einen distinkten Schmelzpunkt (in der Abbildung mit einem schwarzen Pfeil angedeutet) auf, kann mit Sicherheit von einem Amplifikat ausgegangen werden. Beim Vorliegen von zwei oder mehreren Schmelzpunkten muß auf eine Verunreinigung des PCR-Ansatzes der Amplifikation von mehreren Produkten oder von Primer-Dimeren geschlossen werden.

Um eine quantitative Expressionsanalyse durchführen zu können, wird von jeder Probe neben dem zu untersuchenden Primer auch eine PCR mit einem sog. „house keeping gene“ durchgeführt, welches als Quantifizierungsstandard dient. Diese Haushaltsgene sind Gene, die für fundamentale zelluläre Prozesse in den meisten Zelltypen bzw. Geweben benötigt werden und deren Expression in der Regel nicht vom Entwicklungsstatus oder physiologischen Status des Gewebes abhängt. Sie sind in der Regel stark exprimiert. Da das häufig verwendete „house keeping gene“ *GAPDH* in Gliomzellen reguliert wird (de Kok *et al.*, 2005), wurden Sequenzen des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Gens (*HPRT*) verwendet.

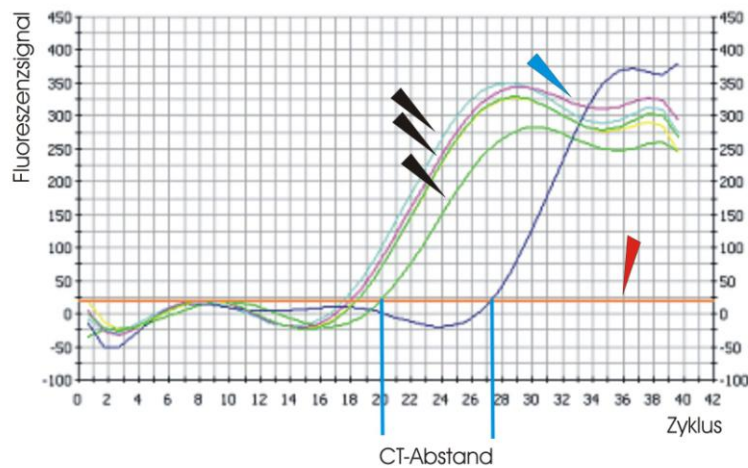


Abb. 3: Das Amplifikationsdiagramm enthält wichtige Informationen für die quantitative Messung der cDNA oder RNA. Die „*Threshold*“-Linie (roter Pfeil) gibt den Grad der Detektion oder den Zeitpunkt an, an dem die Reaktion eine Fluoreszenzintensität über der Hintergrundstrahlung erreicht. Die „*Threshold*“-Linie wird in den Punkt der linearen Phase der Amplifikation gelegt, dort wo der Wendepunkt der Kurve liegt. Der Zyklus, bei welchem die Probe diesen Level erreicht, wird der Zyklus „*Threshold*“ oder CT-Wert genannt. Die CT-Werte werden auf der x-Achse abgelesen. Schwarze Pfeile deuten auf die Amplifikationskurven der cDNA-Proben im 3x-Ansatz hin. Der CT-Abstand zwischen der 2. grünen und der blauen Kurve spiegelt den Expressionsunterschied zwischen zwei Genamplifikaten wider. Aus der y-Achse lassen sich Informationen zu den detektierten Fluoreszenzintensitäten gewinnen. Der blaue Pfeil deutet auf den Sättigungsbereich der Amplifikationskurven hin.

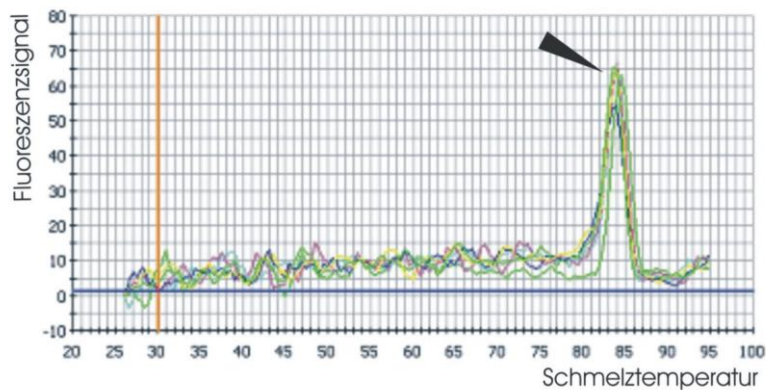


Abb. 4: Darstellung einer Schmelzkurve am Beispiel von HPRT. Der Pfeil deutet auf ein Amplifikationsprodukt und somit auf eine spezifische Bindung der Primer während der PCR-Reaktion hin.

2.3.12 Durchführung der Real-Time quantitativen PCR

Die cDNA-Proben wurden mit sieben verschiedenen Primerpaaren (*siehe Tabelle 4*) untersucht. Zuvor wurden 1 µl der 1:4 verdünnten cDNA vorgelegt. Anschließend wurde in einem 1,5 ml-Eppendorf-Tube ein Mastermix erstellt (*siehe Tabelle 2*) und jeweils 40 µl mit der cDNA vermengt. Für jedes Primerpaar wurde eine Verdünnungsreihe (cDNA: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) angesetzt, um die Effizienz der Amplifikation zu berechnen. 100% Effizienz bedeutet, dass es sich bei einer CT-Änderung von 3,2 um eine 10-fache Expressionsänderung des Amplifikates handelt. Idealerweise sollte die Effizienz der zu messenden Probe gleich der Effizienz des „house keeping gene“ sein. Zusätzlich wurde ein „no-template-control“ (NTC) angesetzt, das als Kontrollmechanismus für Primer- und Pufferverunreinigungen diente. Normalerweise sollten sich in diesem Ansatz keine Amplifikate gebildet werden wenn sauber pipettiert wurde.

Die Tubes wurden nun mit speziell für die Real-Time PCR hergestellten optischen Caps (PERKIN ELMER, USA) verschlossen. Anschließend wurde diese in den 96-Well-Heizblock des iCyclers gestellt und durch die Kamera abgedeckt. Daraufhin wurde die iCycler™ iQ® OpticalSystem Software (Version 3.0a) gestartet und das zuvor eingestellte PCR-Programm konnte ablaufen (*siehe Tabelle 3*).

Tabelle 3: Mastermix und Temperaturprogramm für die Real-Time PCR

Mastermix	PCR-Programm
10 x RT-Puffer	Zyklus 1: (1x)
0,5 mM dNTP's	Stufe 1: 95°C 3 min
0,5 µM sequenzspezifischer 3'-und 5'-Primer	Zyklus 2: (40x)
1-2,5 50 mM MgCl ₂	Stufe 1: 95°C 30 s
250 U PlatinumTaq-DNA-Polymerase	Stufe 2: Annealingtemperatur 30 s
10 nM Fluorescein(6-FAM)	Stufe 3: 72°C 20 s
Sybr Green I	Zyklus 3: (1x)
ad H ₂ O	Stufe 1 : 95°C 1 min
	Zyklus 4: (140x)
	Stufe 1: 95°C 10 s

Tabelle 4: Primersequenzen; die Synthese der Primer wurde von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

Genname	Primersequenz
<i>HPRT</i> (Hypoxanthin-Guanin-phosphoribosyl-Transferase)	5'-GAG GAC CAG GTT GTC TCC TG-3' 5'-ATG TAG GCC ATG AGG TCC AC-3'
<i>PRKCA</i> (Proteinkinase c alpha)	5'-GAA GGG GAG TTT TGG AAA GG-3' 5'-CTG TGA CGT ATT CCA TGA CG-3'
<i>SOD3</i> (Superoxiddismutase 3)	5'-CTG TCT TGG GAG AGC TTG TC -3' 5'-CCA GAT CTC CAG GTC TTG GG-3'
<i>CREM</i> (cAMP responsive element modulator)	5'-CCC AGG ATC TGA TGG TGT TC-3' 5'-GCT CGG ATC TGG TAA GTT GG-3'
<i>RIP1</i> (Ubiquinol-c-Reduktase, Rieske-iron-sulphur-Protein)	5'-TTC CAG CAT GAG TGC TTC TG-3' 5'-GCA GCT TCC TGG TCA ATC TC-3'
<i>ADRA1D</i> (Adrenalinrezeptor 1d)	5'-CAG AAG GCA GTC TTC CAA GC-3' 5'-ACA GGC AGA TTG GTC CTT TG- 3'
<i>HTR1A</i> (5-HT-Rezeptor 1a)	5'-GCA CCA GCT TAG GAA CTT CG-3' 5'-CAG AGG AAG GTG CTC TTT GG-3'
<i>NRXN2</i> (Neurexin 2)	5'-TCA AGG GCA ATG AGT CCT TC- 3' 5'- TTG ATG ATC AGC CAG ACA GC-3'

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Nachweis von Ratten-IL-6 im konditionierten Medium aus dem Kokultur-Assay

Für die quantitative Bestimmung von IL-6 wurde ein rattenspezifischer IL-6-„*Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay*“ (ELISA) durchgeführt. Zur Messung der IL-6-Konzentration wurde das Quantikine[®]-ELISA-Kit von R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) verwendet. Prinzip dieses Assays ist ein sog. *Sandwich-ELISA*, bei dem ein für IL-6 rattenspezifischer monoklonaler Antikörper an der festen Phase einer Mikrotiterplatte

gebunden ist. Gibt man eine Probe hinzu und ist IL-6 vorhanden, wird dieses an den immobilisierten Antikörper gebunden. Anschließend werden durch mehrmaliges Waschen ungebundene Substanzen eliminiert und ein Enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper, der wiederum spezifisch für Ratten-IL-6 ist, hinzugegeben. Durch erneutes Waschen werden ungebundene Antikörper-Enzym-Komplexe entfernt und danach eine Substrat-Lösung hinzugefügt. Das Substrat wird vom Enzym umgesetzt, und es entsteht ein blaues Produkt, welches sich nach Zugabe einer Stop-Lösung gelb verfärbt. Zum Schluß wird mit Hilfe eines ELISA-Readers die optische Dichte der Probe bei 450 nm bestimmt. Da die Farbintensität proportional zur IL-6-Konzentration ist, können die IL-6-Konzentrationen der jeweiligen Proben anhand einer Standardkurve bestimmt werden.

Für die Durchführung wurden zunächst alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und anschließend entsprechend den Anweisungen des ELISA-Protokolls vorbereitet. Bevor die konditionierten Medien bzw. Proben (FKO=MKO; Fminus und Mminus) zum Einsatz kamen, wurden diese für 10 min bei 103 g abzentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Die Proben und Kontrollen wurden als 3x-Ansätze, die Standards als Doppelbestimmungen durchgeführt. Jeweils 50 µl Proben, Kontrollen und Standards wurden in die einzelnen Öffnungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C hatte das Antigen IL-6 fest an den stationären IL-6-Antikörper gebunden. In Anschluß an einen 5-maligen Waschvorgang, welcher nicht-Antikörper-gebundenes IL-6 auswusch, wurden 100 µl einer Konjugat-Lösung (Enzym-gekoppelter Antikörper) gegen IL-6 hinzugegeben. Nach einer zweiten Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur erfolgte erneut ein 5-maliger Waschvorgang, dieser diente dazu, ungebundene Antikörper-Enzym-Komplexe zu entfernen. 100 µl einer Substrat-Lösung wurden nun in jede Vertiefung pipettiert und die Mikrotiterplatte anschließend für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden 100 µl Stop-Lösung hinzugefügt und die Extinktion der gelben Farblösung in den Proben, Kontrollen und Standards bei 450 nm mit einem ELISA-Reader (BioRad, München) ermittelt. Die Analyse der Daten erfolgte mit Excel (Microsoft).

3.0 Ergebnisse

3.1 Bestimmung des Verhältnisses von Mikroglia zu Tumorzellen

Für den später durchgeführten Transwell-Kokultur-Assay wurde zuerst eine Zellzählung an Hirnschnitten von drei Patienten vorgenommen. Ziel war es, in den Schnitten das Zellzahlverhältnis von Tumor- und Mikrogliazellen zu ermitteln, um den *in vivo*-Verhältnissen möglichst nahe zu kommen. Bei 100-facher Vergrößerung wurden mit Hilfe eines Okularaufsatzes mit integriertem Zählraster, welches insgesamt 10x10 Reihen aufwies, jeweils 10 Quadrate pro Hirnschnitt ausgezählt. In den Schnitten wurden die Mikrogliazellen mit einem Antikörper gegen CD68-Oberflächenantigene von Makrophagen/Mikrogliazellen angefärbt und konnten so deutlich von den Tumorzellen differenziert werden.

Abbildung 5A zeigt das Verhältnis der Tumorzellen zu den Mikrogliazellen des Durchschnitts von drei ausgewerteten Glioblastomschnitten (Tumorzellen $736,2 \pm 314,1$ SD; Mikrogliazellen $26,2 \pm 10,3$ SD). Schlüsselt man dieses Ergebnis in die drei Einzelschnitte auf, kann man erkennen, dass die Anzahl der Tumorzellen in den Tumoren unterschiedlicher Patienten stark schwankt (Abb. 5B). Zwischen Schnitt 1 und 2 besteht ein großer Unterschied der Tumorzellanzahl ($387,2 \pm 43,0$ SD und $996 \pm 216,5$ SD), während dieser bei Schnitt 2 und 3 geringer ausfällt ($996 \pm 216,5$ SD und $825,5 \pm 101,4$ SD). Auch die absolute Mikrogliaanzahl schwankt in den unterschiedlichen Patienten ($15,1 \pm 4,9$ SD; $35,5 \pm 9,9$ SD; $27,9 \pm 6,0$ SD). Betrachtet man jedoch das Verhältnis der Tumorzellen und Mikrogliazellen zu den Gesamtzellen in allen drei Experimenten, so fällt auf, dass dieses relativ konstant ist (Tumorzellen 96,2% der Gesamtzellen $\pm 0,4\%$ SD, Mikrogliazellen 3,5% $\pm 0,2\%$ SD). Daraus wurde der Schluß gezogen, dass ein vergleichbar konstantes Verhältnis zwischen Mikrogliazellen und Tumorzellen vorliegt. Dividiert man die Anzahl der Tumorzellen durch die Mikrogliazahl, so erhält man den Faktor 30. Dieses Verhältnis wurde als Grundlage für die Entwicklung des Kokulturassays verwendet.

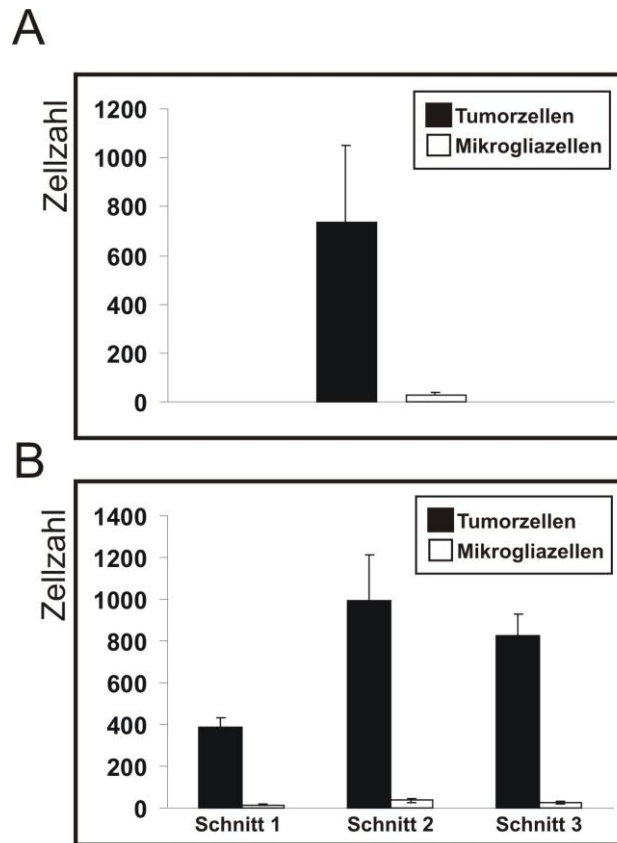


Abb. 5: Auswertung der Tumorschnitte von drei Patienten mit GBM. (A) Mittelwerte von drei Patienten, (B) Einzelanalyse. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.2 Tomatolektinfärbung der Mikroglia und konfokale Aufnahme

Zur Bestimmung der Reinheit der Mikrogliazellen wurde eine Tomatolektinfärbung durchgeführt. Man sieht, dass fast alle Zellen mit dem Lektinfarbstoff angefärbt wurden (Abb.6). Zu erkennen ist ein knapp 8 μm großer Zelleib mit feinen, dünnen Fortsätzen (Abb. 6 unten Mitte weißer Pfeil). Die Mikrogliazellen weisen einen amöboiden, makrophagenähnlichen Phänotyp auf. Zudem sind granuläre Strukturen (Abb.6 unten links weiße Pfeile) erkennbar, die sich ebenfalls anfärben lassen. Wie bereits in Abschnitt 2.2.3 erwähnt, weist Tomatolektin eine hohe Affinität zu Poly-N-Azetyl-Laktosaminresten auf (Acarin et al., 1994). Diese Reste findet man z.B. als Bestandteil verschiedener Rezeptoren und in den Lysosomen und dem Golgi-Apparat der Mikrogliazellen (Wang *et al.*, 1991). Daher läßt sich sowohl an der Plasmamembran als auch in diesen Zellorganellen ein Fluoreszenzsignal detektieren.

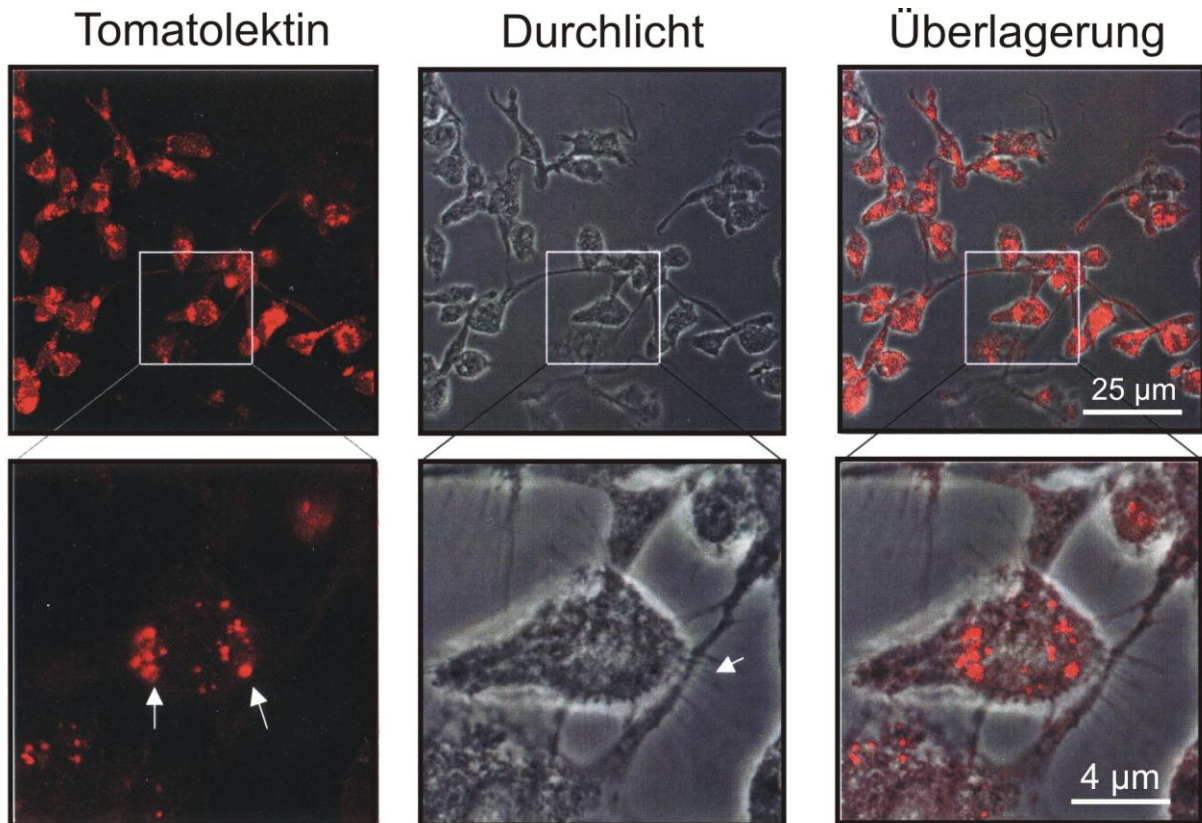


Abb. 6: Ergebnisse der Reinheitsbestimmung nach dem Abschütteln der Mikroglia-Primärkulturen. In der oberen Bildreihe sieht man verschiedene Bildaufnahmen der gefärbten Zellen. Das weiße Quadrat umrahmt eine Mikrogliazelle. In der unteren Bildreihe ist die Mikrogliazelle in 630-facher Vergrößerung dargestellt.

3.3 Morphologie nach Kokultur

Das ermittelte Zellzahlverhältnis von 1:30 konnte, wie sich herausstellte, im Kokulturasay nicht eingehalten werden, da die dafür erforderliche Oberfläche der Wells zu klein war und die Gliomzellen aufgrund zu hoher Dichte entweder starben oder Zeichen von Streß (Ablösung, Abrundung) zeigten. Um der Mindestzahl von Mikrogliazellen, die für die RNA-Isolation benötigt wurden, möglichst nahe zu kommen, wurden aus diesem Grunde weniger Rattengliomzellen als vorgesehen ausgesät. Die Oberfläche der Wells erlaubte ein maximales Verhältnis von 1:11. Die Tumorzellen wurden nun in den Transwellfiltern, die Mikrogliazellen in den Wells ausgesät.

Als Tumorzelllinie wurden die aus Fischerratten stammenden F98-Rattengliomzellen ausgewählt. Diese etablierte Rattengliomzelllinie (Ko, Koestner, and Wechsler, 1980) wird häufig in neuroonkologischen Experimenten eingesetzt und besitzt wesentliche biologische und morphologischen Eigenschaften der humanen Glioblastomzellen: Die Tumorzellen weisen eine hohe Proliferationsrate auf und lassen sich hervorragend in der Zellkultur

kultivieren. Wie die Glioblastomzellen im humanem Gehirngewebe zeigen sie ein infiltratives Wachstum und zeichnen sich durch eine geringe Expression von Oberflächenantigenen auf ihrer Zellmembran aus. Wie bereits in Abschnitt 2.1.5 erwähnt, wurden primäre Mikrogliazellen aus Hirnen neugeborener Schneiderratten gewonnen. Die Morphologie entspricht weitgehend den *in vivo*-Verhältnissen, die für Mikroglia beschrieben wurden. Das Aussehen der Mikrogliazellen unterscheidet sich je nach Aktivitätszustand der Zelle. Im Ruhezustand weisen die Mikrogliazellen eine spindelförmige Morphologie mit hellem Randsaum auf, in der Literatur häufig als „ramifizierter“ Zustand der Mikrogliazellen bezeichnet (Abb. 7A). Nach Aktivierung durch das konditionierte Medium differenzieren diese in einen makrophagenähnlichen Zustand (Abb. 7A Pfeile). Zwischen den Mikroglia, die nicht in Kontakt mit den Rattengliomzellen (Abb. 7A) und den Mikrogliazellen, die in Kontakt mit den Tumorzellen stehen (Abb. 7C), war kein morphologischer Unterschied zu erkennen.

Die Rattengliomzellen weisen eine typische multipolare Morphologie auf (Abb. 7B). Häufig sind superkonfluente Zellcluster zu erkennen (Abb. 7A Pfeile). Es wurde kein morphologischer Unterschied zwischen Einzelcluster und Kokultur (Abb. 7B und 7D) beobachtet.

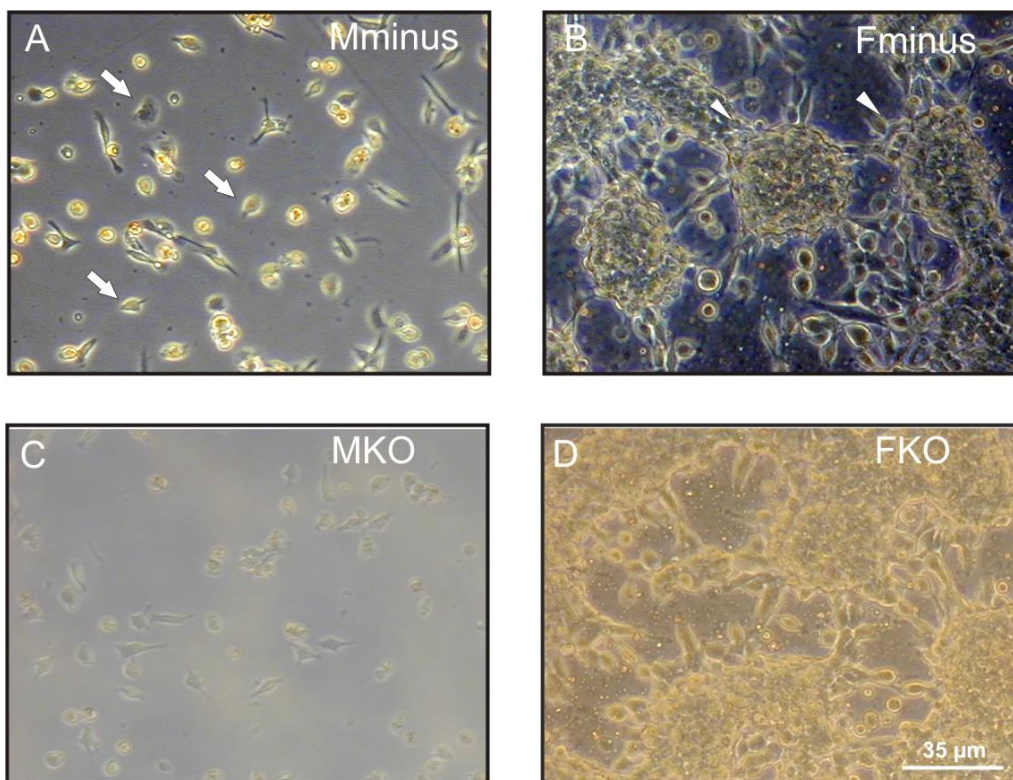


Abb. 7: Morphologie der verwendeten Zellen (Durchlicht). A. Mikroglia ohne Kontakt zu Gliomzellen, B. Gliomzellen ohne Kontakt zu Mikrogliazellen, C. Mikroglia in Kontakt mit

Gliomzellen, D. Gliomzellen in Kontakt mit Mikrogliazellen. Aus neugeborenen Ratten isolierte Mikrogliazellen (Primärzellen) wurden für 24 h mit der Rattengliomzelllinie F98 kultiviert bzw. nicht kultiviert. Pfeile deuten auf aktivierte Mikrogliazellen, Pfeilspitzen zeigen auf typische superkonfluente Gliomaggregate. Die Bilder wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen und zusätzlich 3-fach vergrößert, Balken = 35 µm.

Tabelle 5: Benennung der Zellen des Transwell-Kokultur-Assays

Bezeichnung der Zellen des Transwell-Kokultur-Assays (Abkürzung)	Erklärung
Fminus	F98-Rattengliomzellen, die nicht mit Mikrogliazellen kokultiviert wurden
FKO	F98-Rattengliomzellen, die kokultiviert wurden mit Mikrogliazellen
Mminus	Mikrogliazellen, die nicht mit F98-Rattengliomzellen kokultiviert wurden
MKO	Mikrogliazellen, die mit F98-Rattengliomzellen kokultiviert wurden

3.4 RNA-Aufreinigung der kokultivierten Zellen

Nach 24-stündiger Kokultivierung wurde RNA aus den einzelnen Zellpopulationen isoliert und deren Reinheit und Integrität mit Hilfe einer Gelelektrophorese überprüft. In Abbildung 8 erkennt man distinkte ribosomale 28S- und 18S-Banden der einzelnen Zellfraktionen, die ein nahezu identisches Verhältnis der 18- und 28S-rRNA aufweisen. Normalerweise würde man ein Verhältnis von 1:2 erwarten. Durch Auswertung der RNA mit Hilfe eines Test-Chips im Labor für funktionelle Genomforschung (LGFC) konnte jedoch die für die Hybridisierung benötigte ausreichend gute Qualität der gewonnenen RNA gesichert werden. Die Ergebnisse deuten auf einen leichten Abbau der RNA hin. Desweiteren sind in Probe IV stärkere und in Probe III Kontaminationen mit DNA zu erkennen, welche oberhalb der 28S-RNA-Banden sichtbar sind. Zur Beseitigung der DNA wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt und die Qualität der RNA mit Hilfe des Bioanalyzers im Labor für funktionelle Genomforschung (LGFC) ausgewertet (Abb. 9A/B). Insgesamt war die Qualität der RNA in den Rattengliomzellen besser als in den Mikrogliazellen.

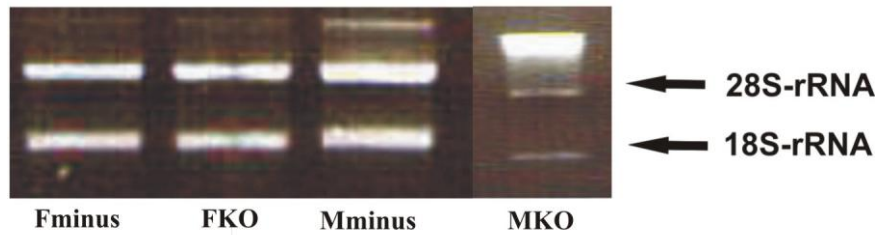


Abb. 8: Ergebnisse der RNA-Präparation. Fminus, FKO, Mminus und MKO geben die jeweiligen Zelltypen an, aus denen die RNA isoliert wurde. Fminus etc. Erklärung *siehe Tabelle 5*.

3.5 Herstellung von RNA-Sonden

Die Schritte bis zur Hybridisierung von RNA-Sonden auf den Affymetrix[®]-Genchip wurden per Bioanalyzer[®] im LGFC kontrolliert (Abb. 9-11). In Abbildung 9A sind zwei distinkte RNA-Peaks, die unter Zuhilfenahme des Größenmarkers (Abb. 9B) als 18S- und 28S-rRNA identifiziert werden können, dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die kontaminierende DNA durch DNase-Behandlung beseitigt werden konnte. Der Abfall der ribosomalen Peak-Höhe der 28S-rRNA ist auch hier erkennbar: Bei integrier RNA wäre normalerweise der 28S-Peak grösser als der 18S-Peak. Aus diesem Verhältnis läßt sich schließen, dass eine geringe RNA-Degradation vorliegt. Tabelle 6 zeigt die ermittelten Werte der 28S/18S-rRNA-Ratio aller 8 Proben. Anhand der Auftrennung eines Größenmarkers auf einem anderen Bioanalyzerchip konnten den 18S- und 28S-rRNA's die richtigen Größen zugeordnet werden (Abb. 9B).

Neben der qualitativen Beurteilung ist auch eine quantitative Bestimmung der Gesamt-RNA möglich: Hierzu berechnet man von einem RNA-Marker einer bestimmten Konzentration (weißer Pfeil in Abb. 9A), der zur Probe von Fminus gegeben wird, zunächst die Fläche seines Peaks im Elektropherogramm. Hiernach bestimmt man die Flächen der beiden Peaks der ribosomalen RNA. Anschließend setzt man deren Flächen ins Verhältnis zur Menge und Fläche des Markers und erhält so die Menge oder die Konzentration der eingesetzten RNA. In Abbildung 9A sind die Flächen der 18S- und 28S-rRNA-Peaks oberhalb der rosa- und grünfarbenen Striche zu erkennen.

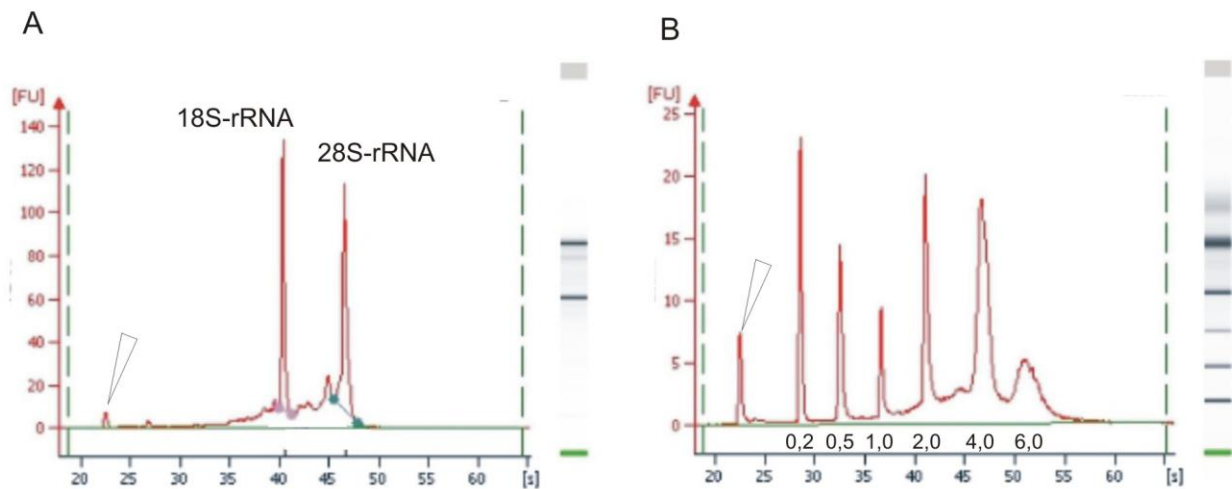


Abb.9: Elektropherogramm der RNA-Analyse mit dem Agilent Bioanalyzertm. (A) Elektropherogramm einer RNA-Probe von Fminus. Der weiÙe Pfeil deutet auf den kleinsten Markerpeak hin. (B) Dargestellt sind sieben Peaks eines RNA-Markers mit Fragmenten der GrÙÙe von 0,2-6,0 kb, deren GrÙÙen als Banden auf einer Skala rechts daneben dargestellt sind. Mit Hilfe dieses GrÙÙenmarkers ist es mÙglich, die einzelnen GrÙÙen der unterschiedlichen RNA's einer Probe zu bestimmen.

Tabelle 6: Ergebnisse der rRNA-Ratiobestimmung mit Hilfe des Bioanalyzers

RNA-Probenbezeichnung	28S:18S-rRNA-Verhàltnis (rRNA-Ratio)
I.FKO	0,9
II.Fminus	0,8
III.Mminus	0,7
IV.MKO	1,1
V.FKO	1,2
VI.Fminus	0,7
VII.Mminus	0,0
VIII.MKO	0,3

Als zweite Qualitãtssicherung erfolgte nun mit Hilfe des Bioanalyzers die Erstellung eines Elektropherogramms der cRNA-Amplifikationsprodukte, die nach der *in vitro*-Transkription entstanden sind (Erklãrung der cRNA-Amplifikation siehe Methodenteil Punkt 2.3.6). Erst nach einer erfolgreichen cRNA-Amplifikation ist es mÙglich, eine RNA-Fragmentierung (Verdau) zur Sondenherstellung vorzunehmen. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der cRNA-Amplifikation. Man kann einen kleinen initialen HÙgel (weiÙer Pfeil), der den Markerpeak darstellt, erkennen, gefolgt von einer breitbasigen, runden Kurve. Neben der Kurve sieht man ein Pseudogel, auf dem als diffuse Bande cRNA-Produkte unterschiedlicher GrÙÙe dargestellt sind. Die cRNA weist eine gute Qualitãt auf.

Ergebnisse

Nach erfolgreicher Amplifizierung wurden die cRNA-Produkte, deren Größe zwischen 0,5 und 3,0 kb lag, fragmentiert und mit Cy3 und Cy5 markiert. Zur Validierung der erfolgreichen Fragmentierung der cRNA schloß sich eine letzte Dokumentation mit dem Bioanalyzer® an. Abbildung 11 zeigt die Größenverteilung der markierten und fragmentierten cRNA-Transkripte, deren Fragmentgrößen etwa 35-200 bp betragen. Die cRNA-Sonden wurden zur Hybridisierung auf den Affymetrix®-Mikroarraychip RN U34 eingesetzt.

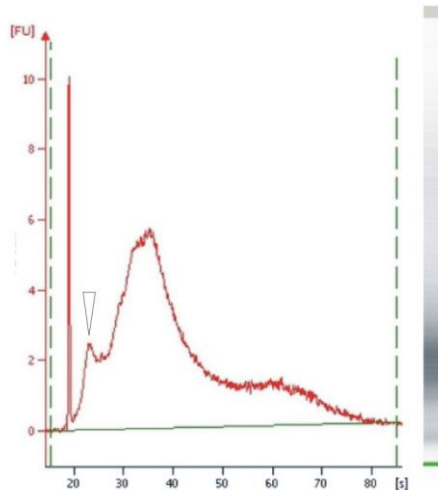


Abb. 10: Elektropherogramm der cRNA-Amplifikationsprodukte, hier am Beispiel von Fminus dargestellt

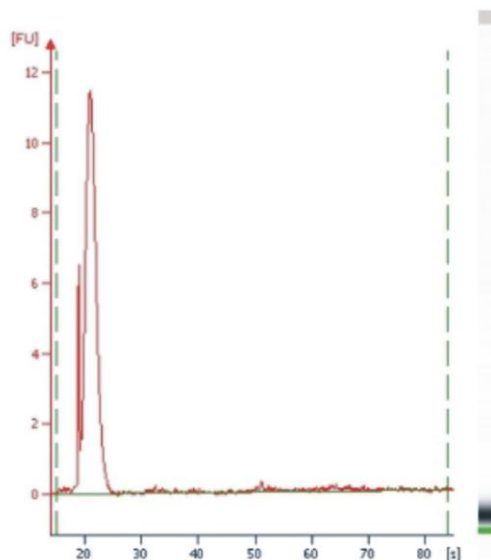


Abb. 11: Elektropherogramm der fragmentierten cRNA-Transkripte von Fminus.

3.6 Mikroarray-Clusteranalyse und Gewinnung von Genkandidaten

Abbildung 12 zeigt den Vergleich der unterschiedlichen Hybridisierungsexperimente in Bezug auf ihre Expressionsstärken, welche in einer sogenannten „*Heat Map*“ farbkodiert dargestellt sind. Anhand der „*Heat Map*“ können Expressionsunterschiede zwischen den Proben auf einen Blick dargestellt werden. Sie erlaubt die Untersuchung des Expressionsverhaltens von Genen verschiedener Proben, zu denen sowohl gleichsinnige als auch gegensinnige Expressionsverläufe gehören. In der mittleren Abbildung sind die Ergebnisse der jeweils doppelten Ansätze der vier Experimente (FKO, Fminus, MKO und Mminus) abgebildet. Die Doppelexperimente wurden unabhängig voneinander unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt und verglichen.

Jedes Gen ist als farbiger Strich in der „*Heat Map*“ dargestellt, wobei die Farbe die Stärke der Expression kodiert. Die Farbskala rechts in der Abb. 12 ist auf einen Wert von 1,0 normalisiert worden. Folglich repräsentieren Gene mit Werten größer als 1 eine hochregulierte Expression (rot), während Werte unterhalb von 1 herunterregulierten Genen (blau) entsprechen. Gene mit unveränderter Expression entsprechen dem Wert 1,0 und sind gelb dargestellt.

Betrachtet man die Replikate eines Experiments (z.B. in Abb. 12 FKO 1. Experiment und FKO 2. Experiment) untereinander, so läßt sich eine relativ gute Übereinstimmung der Expressionsstärken erkennen. Hierbei ist die Übereinstimmung bei den jeweils doppelt ausgeführten Experimenten der F98-Rattengliomzellen größer als die der Mikrogliazellen. Vergleicht man die Replikate von FKO und Fminus miteinander, so fällt auf, dass nur eine relativ kleine Anzahl von Genen signifikant differentiell exprimiert ist, was durch die relativ ähnlichen Genexpressionsfarbgebung erkennbar ist. Die Abbildung macht des weiteren deutlich, dass Mikrogliazellen und die Gliomzelllinie F98 starke Unterschiede in der Genexpression aufweisen.

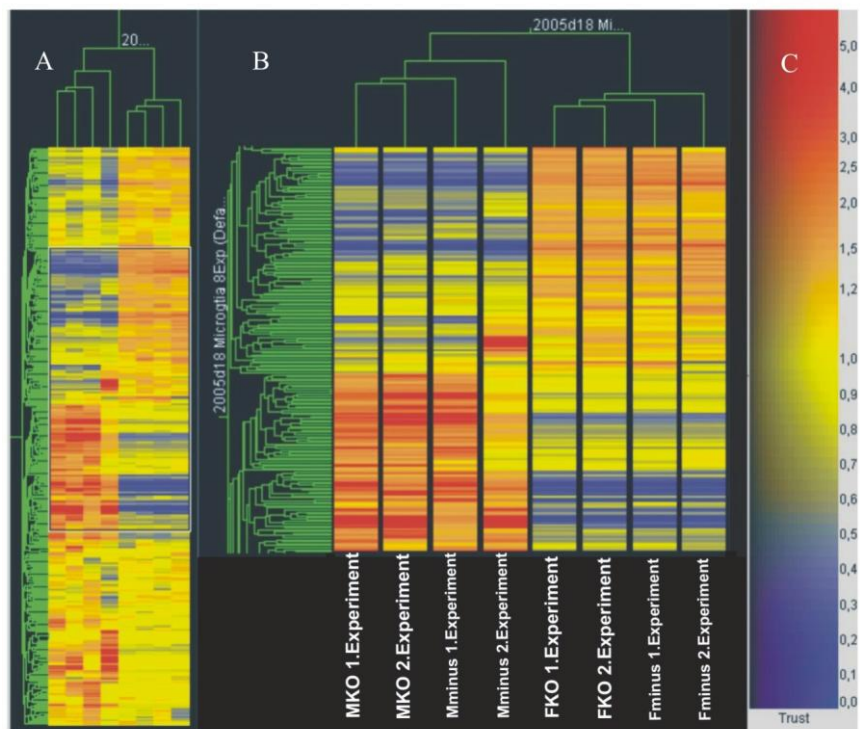


Abb. 12: „Heat Map“-Darstellung aller Gene (A) aus 2x4 Experimenten, (B) einer Auswahl an Genen, (C) der Farbskala. Die grünen Striche demonstrieren das zugehörige Baumdiagramm der Gene, aus denen sich Ähnlichkeiten der Expressionswerte ableiten lassen. MKO, Mminus, FKO und Fminus-Erklärung *siehe Tabelle 5*.

Um die Gene, die durch Kontakt der Zellen differentiell reguliert sind, zu ermitteln, wurde als nächstes eine sogenannte Clusteranalyse vorgenommen. In der Clusteranalyse werden die Meßdaten der Hybridisierungsexperimente aufgrund ihrer Ähnlichkeit untereinander in Haufen („Cluster“) gruppiert und diese Cluster dann als Repräsentanten der in ihnen enthaltenen Meßwerte verwendet. Der Vorteil dieser Methode liegt in der erheblichen Reduktion der Datenmenge, wodurch eine Interpretation erst möglich wird. Durch die Clusteranalyse ist es möglich, ähnlich exprimierte Gene in Gruppen einzuteilen, um diejenigen Gene zu bestimmen, die signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen aufweisen. Ähnliche Muster der Expression können beispielsweise gemeinsam regulierte Gene eines „Pathways“ erkennen lassen.

Für das Clustern wurden zunächst von den insgesamt 1323 Genen, die sich auf dem Chip befanden, diejenigen Gene herausgefiltert, die in mindestens einem der Proben reguliert vorliegen (als „present call“ bezeichnet). Daraus ergaben sich 413 Gene. Aufgrund der nicht homogenen Übereinstimmung in den Replikaten wurden anschließend von den 413 Genen

diejenigen Gene, die sich in den Replikaten um nicht mehr als 3-fach unterscheiden, ausgesiebt. Somit ergab sich eine Reduktion von 413 Genen auf nunmehr 60 Gene, die diese Bedingung erfüllten. Abbildung 13 zeigt einen „*Graph view*“ dieser Gene, der ebenfalls mit Hilfe der GeneSpring-Software erstellt wurde. Bei der Interpretation der Graphik ist zu beachten, dass ausgehend von Fminus (in der Graphik als F bezeichnet) eine Kolorierung der Graphen vorgenommen wurde, um alle Experimente miteinander vergleichen zu können. Jede Linie stellt ein Gen dar, dessen Expressionstärke für die jeweilige Probe auf der y-Achse abzulesen ist. Man erkennt, dass von diesen 60 Genen die meisten in FKO (FCo) und Fminus (F) gleichartig exprimiert sind, bei MKO (MCo) dagegen sind es deutlich mehr Gene, die nach Kontakt mit den Rattengliomzellen eine höhere Expression zeigten als Mikroglia, die nicht kontaktiert hatten (M). Wie in der vorigen Abbildung ist eine große Expressionsdifferenz zwischen den beiden Zellarten zu sehen. Die Daten lassen darauf schließen, dass wesentlich mehr Gene in Mikroglia nach Kokultur mit den Gliomzellen als in den Gliomzellen nach Kontakt mit den Mikroglia angeschaltet bzw. ausgeschaltet werden.

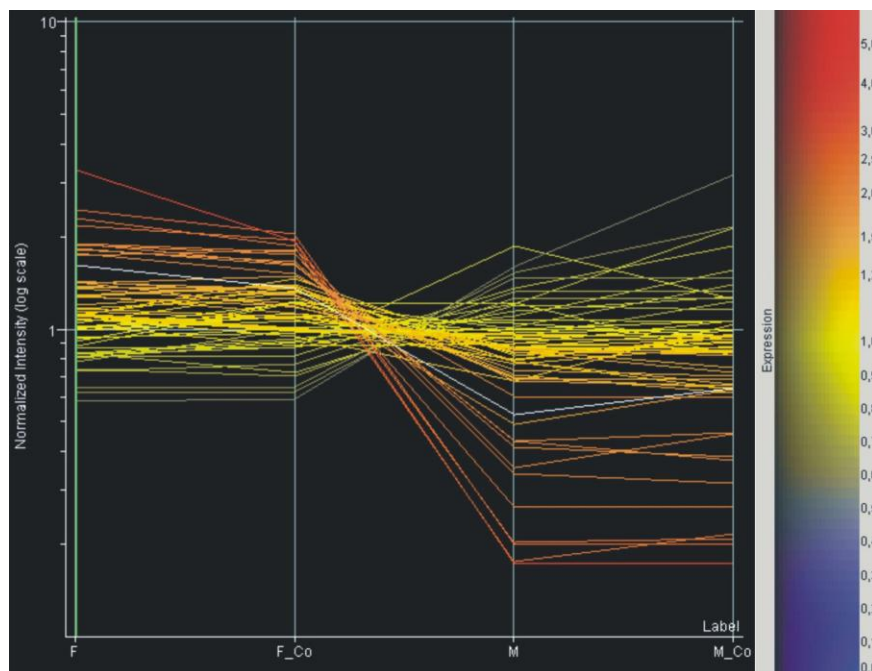


Abb. 13: Expressionsprofil der 60 Gene, die sich in den Replikaten der Experimente um nicht mehr als das 3-fache unterscheiden. Gezeigt sind die Expressionsverläufe der Gene in allen Experimenten. F=F98-Rattengliomzellen, die nicht mit Mikrogliazellen kokultiviert wurden, FCo=kokultivierte Rattengliomzellen, M=Mikrogliazellen, die nicht mit F98-Zellen kokultiviert wurden; MCo=kokultivierte Mikrogliazellen.

Als nächste Bedingung galt es, diejenigen Gene auszuschließen, deren Expression sich zwischen den Gruppen nicht mehr als 1,2-fach unterschieden, also eine vergleichsweise geringe oder gar keine Expressionsveränderung zeigen. Nach Ausschluss dieser Gene erhielt man 26 Gene. Innerhalb dieses Clusters von 26 Genen wurden nun die Gene verwendet, die Expressionsabweichungen von 1,5-fach zwischen den Experimenten aufweisen. Dem Themenschwerpunkt dieser experimentellen Arbeit entsprechend wurde das Augenmerk nur auf die Expressionsunterschiede zwischen kokultivierten und nicht-kokultivierten F98-Gliomzellen gelegt. Hierbei wurden sieben Genkandidaten (*CREM*, *HTR1A*, *ADRA1D*, *RIP1*, *SOD3*, *PRKCA* und *NRXN2*) herausgefiltert, deren Expression per quantitativer Real-Time-PCR im folgenden Abschnitt verifiziert werden sollten. Tabelle 7 zeigt eine Auflistung der 7 Kandidatengene, die nach Kontakt der F98-Rattengliomzellen mit Mikrogliazellen eine um mehr als 1,5-fach differentielle Regulierung zeigen. Die Interpretation der differentiellen Genexpressionsanalyse in den Mikrogliazellen war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Tabelle 7: Aufgelistet sind die 7 Kandidatengene, die nach Kontakt der F98-Rattengliomzellen mit den Mikrogliazellen (=FKO) eine um mehr als 1,5-fach differentielle Regulierung zeigen. Jedem der aus den Arrayexperimenten erhaltenen Gene ist eine Affymetrix-Identifizierungsnummer (Probenset-ID) zugeordnet. Diese kann zur funktionellen Analyse in der Affymetrix®-Datenbank „Netaffx“ verwendet werden. Die orangefarbenen Kästen kennzeichnen die Gene, bei denen die Mikroarray- und Real-Time-Daten nicht übereinstimmen.

Probenset ID	Gentitel	Gensymbol	Funktion
AF071014mRNA_s_at	Adrenerger Rezeptor α 1D	<i>ADRA1D</i>	Zellproliferation, Signaltransduktion, DNA-Metabolismus
Z24721_at	Superoxiddismutase 3	<i>SOD3</i>	Induziert bei oxidativem Streß
S66024_g_at	cAMP responsive element modulator	<i>CREM</i>	Regulation der Transkription, DNA-abhängige Signaltransduktion, Spermatogenese
X07286cds_s_at	Proteinkinase C α	<i>PRKCA</i>	Zellzykluskontrolle, Inaktivierung der MAPP-Kinasen, Phosphorylierung, neg. Regulation der Proteinkinase-Aktivität, Induktion von Apoptose, Chemotaxis

J05276cds_at	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 1A	<i>HTR1A</i>	Zellzykluskontrolle, Inaktivierung der MAPP-Kinasen, Phosphorylierung, neg. Regulation der Proteinkinase-Aktivität, Induktion von Apoptose, Chemotaxis
AFFXYEL024w/RIP1_at	Ubiquinol-cytochrom-c-Reduktase/rieske iron sulphur protein	<i>RIP1</i>	Mitochondrialer Elektronentransport
96376_at	Neurexin 2	<i>NRXN2</i>	Zelladhäsion, Chemotaxis, Signaltransduktion, Entwicklung des ZNS, Zelldifferenzierung

3.7 Verifikation der Mikroarray-Daten mittels quantitativer RT-PCR

3.7.1 Primeroptimierung

Die Expression der mit Hilfe des Mikroarrays ermittelten 7 Transkripte wurde mit einer weiteren Methode quantifiziert: der Real-Time-Reversen-Transkriptions PCR (Real-Time RT-PCR). Hierfür war es zunächst notwendig, eine Primeroptimierung vorzunehmen. Diese diente dazu, optimale Annealingtemperaturen und Magnesiumchloridkonzentrationen für die Real-Time-Quantifizierungsreaktion zu bestimmen. Nach dem ersten Durchlauf der mit der AmpliTaq-Polymerase durchgeführten Gradienten-PCR ergaben sich z.B. für die Proteinkinase C α -Primer (*PRKCA*-Primer) optimale Bedingungen bei einer Temperatur von 57°C und einer Magnesiumchloridkonzentration von 1mM, da hier im Gegensatz zu den anderen Produkten keine Primer-Dimere wie z.B. bei 2 mM- und 2,5 mM Magnesiumchloridkonzentration auftraten (Abb. 14).

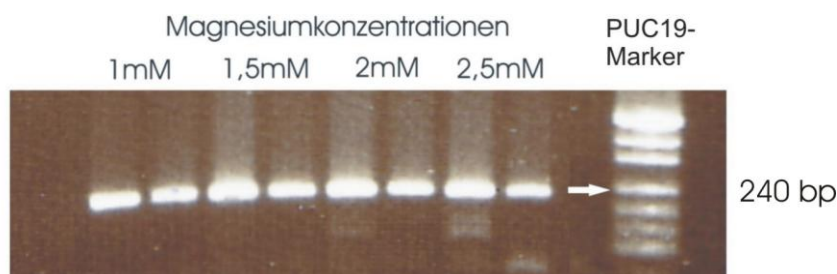


Abb. 14: Primeroptimierung am Beispiel der Proteinkinase C α -Primer. Die amplifizierten Fragmente sind ca. 240 bp groß (weißer Pfeil).

Nun erfolgte im zweiten Durchlauf - analog der später durchgeführten Real-Time PCR - die PCR-Reaktion unter Einsatz der PlatinumTaq-Polymerase und des Sybr[®]Greens, um eventuell weitere Verbesserungen der PCR-Bedingungen vornehmen zu können. Da erfahrungsgemäß das Sybr[®]Green die Eigenschaft hat, die Annealingtemperatur der Primer um durchschnittlich 2°C zu erhöhen, wurde die aus der vorigen PCR ermittelte Annealingtemperatur der *PRKCA*-PCR um 2°C erhöht. Dementsprechend wurde die PCR mit einer Temperatur von 59°C getestet. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der zweiten Primer-Optimierung dargestellt. Man erkennt eine helle, distinkte Bande, die ca. 240 bp groß ist. Für alle sechs weiteren Gene wurden die Primer auf gleiche Weise optimiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

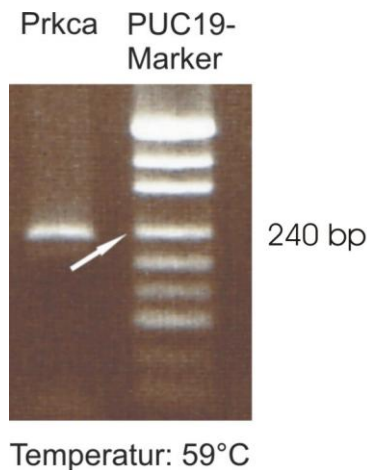


Abb. 15: Ergebnisse der Primeroptimierung nach dem zweiten Durchlauf mit SybrGreen[®] und unter Einsatz der PlatinumTaq-Polymerase. Der weiße Pfeil deutet auf die Fragmentlänge hin, der für das Amplikon bei ~240 bp liegt.

Tabelle 8 : Ergebnisse der Primeroptimierung für die Real-Time PCR

Genname	Annealingtemperatur	Magnesiumchlorid-konzentration
<i>PRKCA</i> (Proteinkinase α)	59°C	1 mM
<i>SOD3</i> (Superoxiddismutase 3)	63°C	2 mM
<i>CREM</i> (cAMP responsive element modulator)	59°C	1 mM
<i>RIP1</i> (Ubiquinol-c-Reduktase, Rieske-iron-sulphur-Protein)	57°C	1 mM
<i>ADRA1D</i> (Adrenalinrezeptor 1d)	64,5°C	2 mM
<i>HTR1A</i> (5-HT-Rezeptor 1a)	61°C	1 mM
<i>NRXN2</i> (Neurexin 2)	58°C	1,5 mM

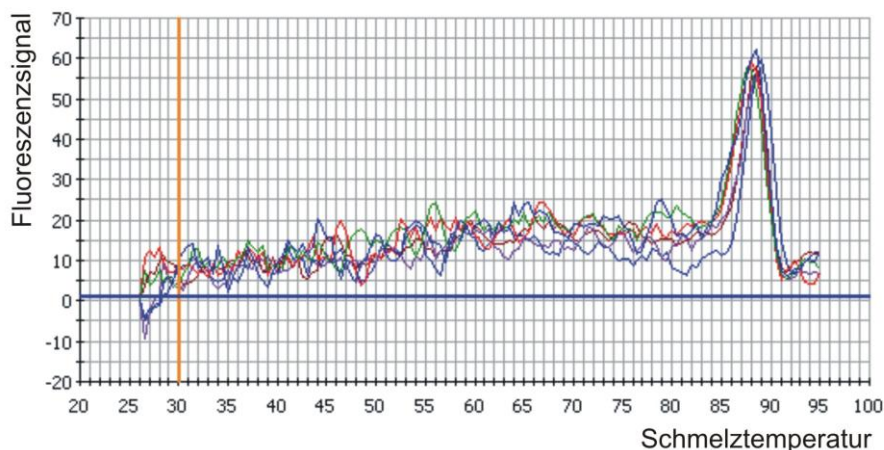
3.7.2 qRT-PCR-Ergebnisse

Ziel der Real-Time PCR war es, die Expression der mRNA der F98-Rattengliomzellen nach Kontakt mit Mikrogliazellen zu untersuchen. Wie unter Abschnitt 2.3.12 beschrieben, wurden die jeweiligen cDNA-Proben mit dem *house-keeping*-Gen *HPRT* (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) normiert. Für die insgesamt 7 aus den Mikroarraydaten ausgewählten Gene wurden zwei Wiederholungen der Real-Time-Quantifizierungen vorgenommen, um biologische Schwankungen zu erfassen und die Aussagekraft der Experimente zu verbessern.

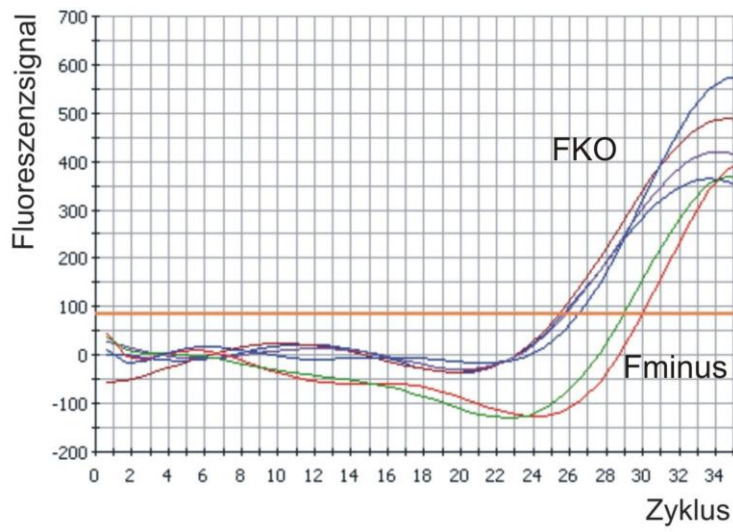
Abbildung 16 zeigt Schmelzkurve und Quantifizierungskurven des *CREM*-Gens, die während des PCR-Laufs vom iCycler-Programm aufgezeichnet wurden. Die Schmelzkurve wurde zur Ermittlung von Primer-Dimeren aufgenommen. Wie in Abbildung 16A am Beispiel von *CREM* zu sehen, ist nur ein doppelsträngiges DNA-Produkt entstanden, was dafür spricht, dass die Primer spezifisch gebunden haben und das Vorhandensein von Primer-Dimeren oder anderen unspezifischen Fragmenten ausschließt.

In Abb. 16B sind jeweils die Triplikate der Quantifizierungskurven von *CREM* in FKO (vordere vier Kurven) und Fminus (hintere zwei Kurven) zu sehen. Zu erkennen ist ein ca. 4-facher CT-Unterschied zwischen diesen beiden Experimenten. Nach Normalisierung mit *HPRT* (Abbildung 16C) konnte ein Expressionsunterschied von ca. 2,8 errechnet werden. Die Expressionsunterschiede der jeweiligen Gene sind in Tabelle 9 dargestellt. Ein positiver Expressionsunterschied bedeutet, dass das jeweilige Transkript nach Kontakt mit Mikroglia hochreguliert war, ein negativer Expressionsunterschied, dass durch Kontakt das Transkript herabreguliert war.

A



B



C

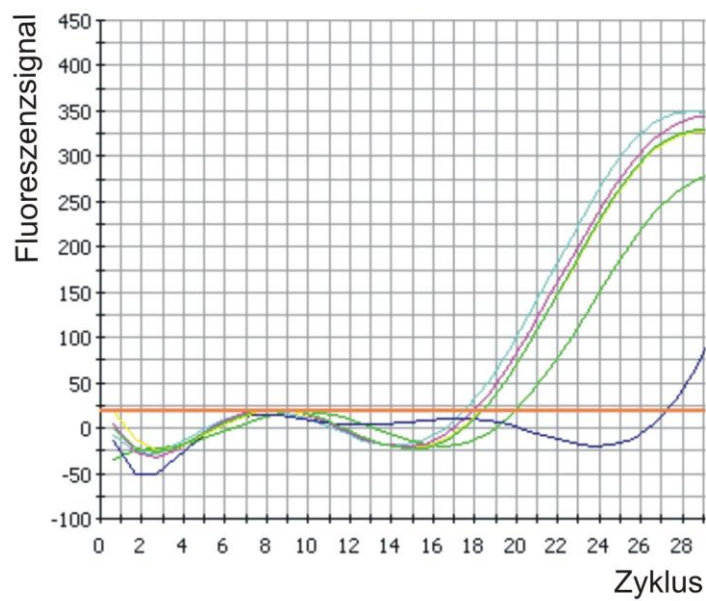


Abb. 16: (A) Schmelzkurve der *CREM*-Primer. (B) Quantifizierungskurven des *CREM*-Gens von FKO und Fminus. (C) Quantifizierungskurven von *HPRT*.

Ergebnisse

Tabelle 9: Expressionsunterschiede der Genkandidaten in FKO (jeweils in Duplikaten), die mit Hilfe der Mikroarrayanalyse und Real-Time PCR ermittelt wurden. Orange markierte Kästchen kennzeichnen Gene, bei denen die Mikroarray- und Real-Time-Expressionsdaten nicht übereinstimmen.

Gensymbol	FKO x-fach überexprimiert in Mikroarray			FKO x-fach überexprimiert in Real- Time PCR		
	1.Experiment	2.Experiment	Mittelwert + Standard-abweichung	1.Experiment	2.Experiment	Mittelwert + Standard-abweichung
<i>ADRA1D</i>	1,5	1,3	1,4 ± 0,14	2,0	2,3	2,15 ± 0,21
<i>SOD3</i>	-2,2	-1,7	-1,95 ± 0,35	-3,0	-3,9	-3,45 ± 0,64
<i>CREM</i>	2,9	3,4	3,15 ± 0,35	2,3	2,6	2,45 ± 0,21
<i>PRKCA</i>	1,9	1,6	1,75 ± 0,21	-4,6	-1,1	-2,85 ± 2,47
<i>HTR1A</i>	1,4	2,4	1,9 ± 0,71	2,9	2,3	2,6 ± 0,42
<i>RIP1</i>	-1,0	-2,6	-1,80 ± 1,13	-2,0	keine Veränderung	-1,0 ± 1,41
<i>NRXN2</i>	1,9	2,9	2,4 ± 0,71	-1,9	-1,6	-1,75 ± 0,21

Betrachtet man die Expressionsdaten vom *ADRA1D*-Gen (Tabelle 9), so sieht man, dass diese sowohl in der Mikroarrayanalyse als auch in der Real-Time PCR die gleiche Tendenz zeigen. Auffallend sind die bedeutend höheren Expressionsergebnisse, die mittels Real-Time PCR gewonnen wurden. Die Abweichung der Mittelwerte der Ergebnisse der beiden Methoden beträgt hier ca. 23% (Abb. 17), was deutlich macht, dass die beiden Methoden sehr sensitiv und störanfällig sind. Bildet man den Mittelwert aller Ergebnisse zusammen, so erhält man einen Wert von 1,8. *ADRA1D* wurde folglich in FKO 1,8-fach höher exprimiert als in den Tumorzellen allein (Fminus). Bei *SOD3* weichen die Ergebnisse etwas stärker voneinander ab als beim vorigen Gen (Tabelle 9). Wie aus Abb. 17 ersichtlich, kommt es hier zu einer prozentualen Abweichung von ca. 28%. Zudem läßt sich feststellen, dass *SOD3* in FKO um 2,7-fach niedriger exprimiert ist als in Fminus. Im Gegensatz zu *ADRA1D* und *SOD3* liegt bei *CREM* die prozentuale Differenz der beiden Expressionsbestimmungen bei gerade mal 12,5%. Der Betrag des Expressionsunterschiedes ist ähnlich wie bei dem *SOD3*-Gens (2,8), jedoch liegt hier statt einer Repression eine Überexpression in FKO vor. Betrachtet man das *PRKCA*-Gen (in Abb. 17 nicht dargestellt), so fällt auf, dass die Expressionsergebnisse keine Übereinstimmung (in der Tabelle 9 orange markiert) zeigen, da die mittels Real-Time PCR bestimmten Daten gegenläufige Werte (negative statt positive) vorweisen. Das gleiche trifft

auch für das *NRXN2*-Gen zu. *HTR1A* ordnet sich in Bezug auf die Ergebnisse der Mikroarrayanalyse und der Real-Time PCR an zweiter Stelle hinter *CREM* ein. Hier ergibt sich eine Abweichung von 16%. *HTR1A* liegt in FKO um 2,3-fach höher exprimiert vor als in Fminus. *RIP1* wird wie *SOD3* in FKO um einen Faktor von 1,4 reprimiert. Die Ergebnisse zeigen von allen anderen gemessenen Werten die geringste Abweichung (11%).

Abbildung 17 zeigt anhand eines Balkendiagramms den Unterschied der Expressionsergebnisse, die mittels Real-Time PCR und Mikroarrayanalyse gewonnen wurden.

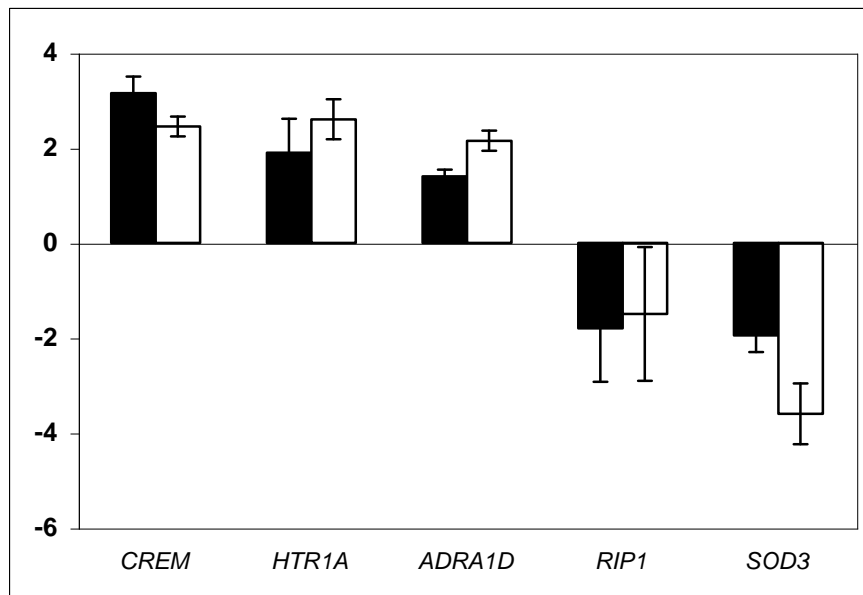


Abb. 17: Vergleich der Mittelwerte der Expressionsdaten für jedes Gen, die mittels Mikroarrayanalyse (schwarze Balken) und Real-Time PCR (weiße Balken) gewonnen wurden. Erläuterung im Text.

3.8 Kontrolle der qRT-PCR Amplifikate mittels Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der entstandenen Produktlängen wurden die Real-Time PCR-Amplifikate auf ein DNA-Agarosegel aufgetragen und mit dem PUC19-Größenmarker verglichen. Hierbei sollte untersucht werden, ob das gewünschte Produkt die richtige Länge hat und die Primer somit spezifisch gebunden hatten. Ferner sollte auf eventuell entstandene unspezifische Nebenprodukte geachtet werden, die die Real-Time PCR-generierten Daten beeinflussen könnten. In Abbildung 18 sind die im Agarosegel aufgetrennten Produkte der Real-Time PCR am Beispiel des *SOD3*-Gens abgebildet. Wie man sieht, wurde ein spezifisches Produkt erzeugt, das auf Höhe der 242 bp-Bande des Größenmarkers liegt. Interessant ist, dass ein

starker *SOD3*-Expressionsunterschied zwischen FKO und Fminus vorzuliegen scheint, erkennbar daran, dass die ersten drei Produkte wesentlich schwächer ausgeprägt sind als die Fminus-Banden. Dieser Expressionsunterschied korrelierte mit den Real-Time-Quantifizierungsdaten. Betrachtet man die Expression von HPRT als Referenzgen, so sieht man, dass es in den FKO-Ansätzen zwar geringer amplifiziert war, jedoch gegenüber Fminus nicht denselben starken Expressionsunterschied aufweist.

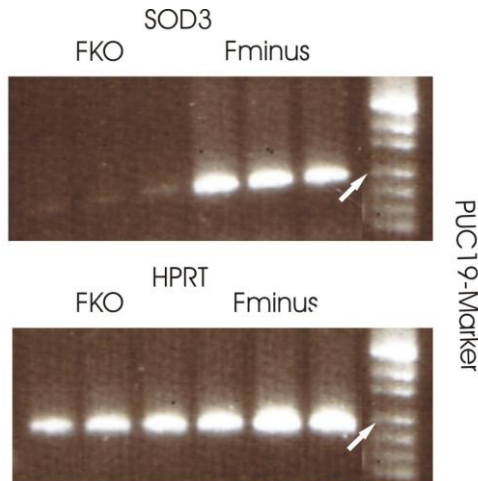


Abb. 18: Expression der amplifizierten *SOD3*-cDNA in FKO und Fminus. Die ersten drei Banden zeigen die Expression der mRNA der Tumorzellen, die mit Mikrogliazellen kokultiviert wurden (FKO), die letzten drei Banden die der Rattengliomzellen, die nicht kokultiviert wurden (Fminus). Der Pfeil weist auf die 242 bp-Bande des PUC19-Markers.

Abbildung 19 zeigt einen weiteren interessanten Expressionsunterschied am Beispiel des Neurexin-Gens. Im Gegensatz zum *SOD3*-Gen ist der Expressionsunterschied des Neurexin-Gens von FKO und Fminus geringer, jedoch zwischen den beiden Zellpopulationen deutlich erkennbar. Wie bei *SOD3* ist auch hier die Expression in FKO geringer ausgeprägt als in Fminus. Bei HPRT ist zu erkennen, dass die eingesetzte cDNA-Menge bei Fminus geringer war als in FKO, erkennbar an den schmalen Banden.

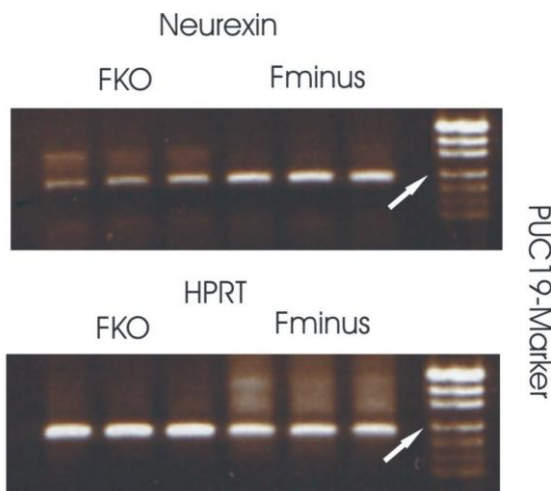


Abb. 19: Expression des Neurexin-Gens in FKO und Fminus. Weiße Pfeile kennzeichnen die 242 kb- Bande des PUC19-Markers.

Ginge man von gleicher eingesetzter Menge der cDNA aus, würde ein noch deutlicherer Expressionsunterschied zu sehen sein. Allein aus den beiden Ergebnissen folgend kann man sagen, dass durch Kontakt sowohl die *SOD3*- als auch die Neurexinexpression erniedrigt wird.

3.9. Ergebnisse der IL-6-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

Die Messung der IL-6-Konzentration in den Überständen ergab eine Induktion der IL-6-Expression nach Kokultur, erkennbar an der höheren Farbintensität (dunkelgelb). Die Farbintensität bei den einzeln kultivierten F98-Rattengliomzellen (F-) war niedriger als die der Kokultur oder Kontrollen (Abbildung 20 Kokultur als MF, Kontrollen mit IL-6-c bezeichnet). Überstände von Mikroglia, die nicht mit Rattengliomzellen kokultiviert wurden (M-), zeigten dagegen eine Gelbfärbung, die vergleichbar war mit der der Kontrollen. Die jeweils in Duplikaten eingesetzten Standards, welche aufsteigende IL-6-Konzentrationen von 0-4000 pg/ml enthielten, zeigten eine Zunahme der Farbintensität etwa um den Faktor 2.

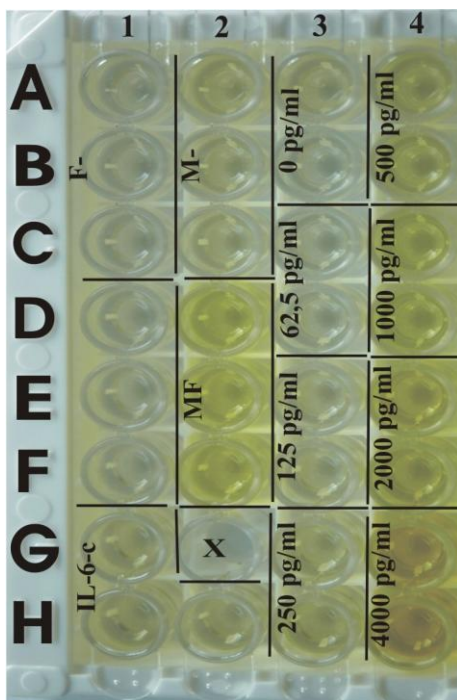


Abb. 20: IL-6-Konzentration der Überstände, erkennbar am gelben Farbprodukt. G1, H1-2 zeigen die Kontrollen. A-C1 sind Überstände von F98-Rattengliomzellen, die nicht mit Mikroglia kultiviert wurden (F-). A-C2 repräsentieren die IL-6-Konzentrationen der Überstände von Mikroglia, die nicht mit Rattengliomzellen kultiviert wurden (M-). D-F2 sind Überstände aus der Kokultur von Mikroglia und Rattengliomzellen (MF). A-H3 und A-H4 stellen die Standards dar.

Für die Bestimmung der IL-6-Konzentrationen in den jeweiligen Zellkulturüberständen wurden zunächst die Mittelwerte der Extinktionen ermittelt. Von den Standard-, Kontroll- und Probenwerten wurde anschließend der durchschnittliche 0-Standardwert subtrahiert. Auf diese Weise konnte allen IL-6-Messungen korrigierte Extinktionswerte (optische Dichte) zugewiesen und mit Hilfe der Excel-Software eine Standardkurve in linearer Darstellung

(Abbildung 21) erstellt werden. Anhand der Geradengleichung war es möglich, für die jeweiligen Proben (Überstände aus M-, F-, MF) die dazugehörigen IL-6-Konzentrationen zu berechnen.

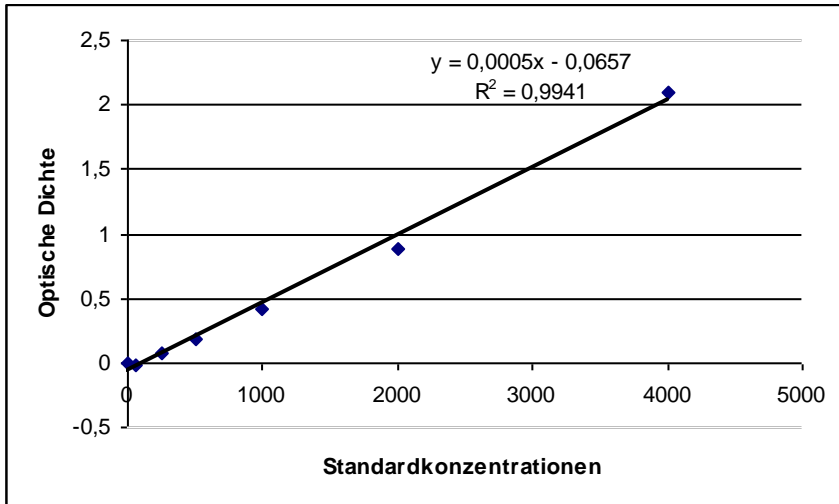


Abb. 21: Standardkurve, die mittels Excel - Software erstellt wurde. Auf der x-Achse sind die jeweiligen IL-6-Standardkonzentrationen (0, 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000 und 4000 pg/ml) aufgetragen, auf der y-Achse ist die optische Dichte dargestellt.

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der IL-6-Konzentrationen der Zellkulturüberstände. Die Überstände aus Fminus (F-) zeigen eine im Vergleich zu den Mikrogliazellen (M-) deutlich niedrigere IL-6-Konzentration ($66,4 \text{ pg/ml} \pm 8,16 \text{ SD}$ gegenüber $231,07 \text{ pg/ml} \pm 19,26 \text{ SD}$, $p \leq 0,02$). Überstände aus Mikrogliazellen, die nicht mit Rattengliomzellen kokultiviert wurden (M-), weisen eine vergleichbare IL-6-Konzentration wie die Kontrolle auf (M- $231,07 \text{ pg/ml} \pm 19,26 \text{ SD}$, Kontrolle $230,4 \text{ pg/ml} \pm 8,12 \text{ SD}$).

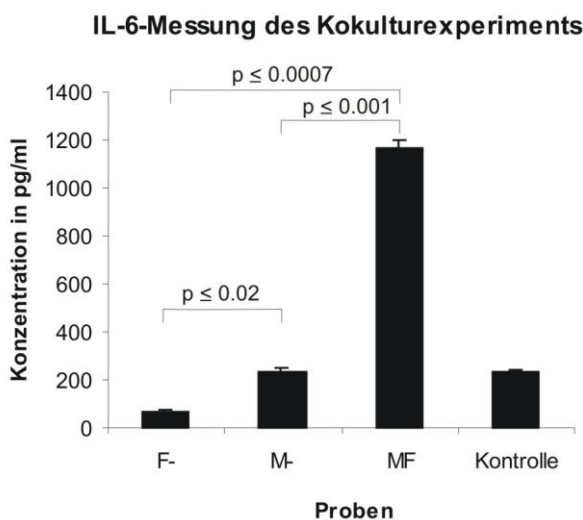


Abb. 22: Ergebnisse der IL-6-Konzentrationsbestimmungen. Unterhalb der Balken sieht man die jeweiligen Probenbezeichnungen, auf der y-Achse ist die IL-6-Konzentration aufgetragen.

Vergleicht man die IL-6-Konzentration der Überstände von Fminus (F-) mit dem Überstand aus den kokultivierten Mikroglia- und Rattengliomzellen (MF), so fällt auf, dass der Zellkulturüberstand aus der gemeinsamen Kultur von Mikroglia- und Rattengliomzellen eine signifikant höhere IL-6-Konzentration aufweist ($1164,4 \text{ pg/ml} \pm 33,34 \text{ SD}$, $p \leq 0,0007$). Auch gegenüber den Mikrogliazellen weist der Zellkulturüberstand aus MF eine signifikant höhere IL-6-Konzentration auf ($1164,4 \text{ pg/ml} \pm 33,34 \text{ SD}$, $p \leq 0,001$). Da sich Mikroglia- und Tumorzellen während 24-stündiger gemeinsamer Kultur das Medium geteilt haben, kann man keine Aussage darüber treffen, von welchem Zelltyp (Mikroglia- oder Tumorzellen) IL-6 ins Zellkulturmedium sezerniert wurde. Aus den Daten geht jedoch deutlich hervor, dass im Gegensatz zu den Einzelkulturen ein signifikanter Unterschied in der IL-6-Sekretion der Kokulturen vorliegt.

4.0 Diskussion

Mit Hilfe der cDNA-Mikroarray-Analyse wurde in dieser Arbeit erstmals der Einfluß von Mikrogliazellen auf die Expression von insgesamt 1323 Genen in Rattengliomzellen untersucht. Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob ein verändertes Genexpressionsprofil der Gliomzellen nach Kontakt mit Mikrogliazellen vorliegt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob den Mikrogliazellen tumorfördernde oder tumorantagonisierende Eigenschaften auf Gliomzellen zugewiesen werden können.

4.1 Bestätigung von 5/7 Kandidatengenen der Mikroarrayanalyse durch qRT-PCR

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass es eine Wechselwirkung zwischen Rattengliomzellen und Mikroglia gibt, denn es konnte mit Hilfe der Mikroarrayanalyse gezeigt werden, dass es nach dem Transwell-Kokultur-Assay zur Veränderung des Genexpressionsmusters bei Gliomzellen kommt, wenn diese gemeinsam mit Mikrogliazellen kultiviert werden. Auch bei den Mikrogliazellen kam es nach Kokultur zur Expressionsveränderung von Genen, interessanterweise lagen hier mehr Genexpressionsveränderungen vor als in den Rattengliomzellen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Mikrogliazellen verstärkt aktiviert wurden, da es sich hier um Immunzellen handelt, welche besonders empfindlich auf äußere Stimuli wie den Gliomzellen reagieren (Kreutzberg, 1996). Durch die Mikroarray-Analyse wurden nach den beschriebenen Auswahlkriterien 7 Gene identifiziert, die in Gliomzellen nach Kokultur mit Mikrogliazellen eine deutliche Veränderung ihrer Expression aufwiesen. Nach der ersten Analyse der Mikroarraydaten konnte von den insgesamt 7 Genen eine Überexpression bei *ADRA1D*, *CREM* und *HTR1A* gefunden werden, bei *SOD3* und *RIP1* zeigte sich hingegen eine Repression. Zur Verifizierung dieser Mikroarrayergebnisse wurde eine Real-Time-Quantifizierung durchgeführt. Diese ergab übereinstimmende Expressionsdaten bei *ADRA1D*, *CREM*, *HTR1A*, *SOD3* und *RIP1*, für das *PRKCA*- und das *NRXN2*-Gen konnte jedoch keine Übereinstimmung mit den Mikroarraydaten gefunden werden. Ein Grund für die unterschiedlichen Daten könnten z.B. die etwas eingeschränkte Qualität der verwendeten Tumor-RNA sein. Der leichte Abbau der RNA kann beispielsweise während der Hybridisierung der Genchips die Signalintensitätsmessung, die für die relative Expressionsstärke der Gene steht, beeinflussen. Desweiteren muß man bedenken, das ebenfalls aufgrund von geringen RNA-Mengen die Hybridisierungsreaktionen erschwert

werden kann (Schneider *et al.*, 2004). Bei uns war die geringe RNA-Menge überwiegend auf die geringe Anzahl von Mikrogliazellen, die durch die Schüttelmethode gewonnen wurden, zurückzuführen. Auch durch die während der RNA-Isolation durchgeführten Aufreinigungsschritte können RNA-Verluste auftreten. Ebenfalls sollte man nicht vergessen, dass die Expressionsanalyse der Tumor-RNA mit unterschiedlichen Meßmethoden durchgeführt wurde und diese aufgrund der unterschiedlichen Durchführung durchaus verschiedene Expressionsdaten liefern können. Jede Methode hat ihre Vor- und Nachteile: Im Gegensatz zur Real-Time-PCR besteht die Mikroarray-Analyse aus mehreren komplexen Arbeitsschritten, angefangen von der Array-Herstellung bis zur Probenvorbereitung, dem Proben-Labeling und der Hybridisierungsreaktion. Schon die in der Analyse integrierte RT-Reaktion allein kann durch unterschiedliche Faktoren (z.B. Enzyme, Primer und Nukleotide) beeinflusst werden. Der wesentliche Vorteil der Mikroarray-Technologie besteht jedoch darin, bis zu 10 000 Gene gleichzeitig in Bezug auf ihre Expressionstärken untersuchen zu können. Im Gegensatz dazu besitzt die Real-Time-PCR eine höhere Sensitivität und benötigt eine bis zu 1000-fach geringere RNA-Ausgangsmenge. Aufgrund des leichten Abbaus unserer RNA, die in Abbildung 8 (Abschnitt 3.4) zu sehen ist, wurde ein GeneChip Test 3 Array durchgeführt. Dieser stellt eine Methode zur Qualitätsbestimmung einer cRNA-Sonde, bevor diese auf den Genchip gebracht wird, dar. Nach der Test 3 Chip-Hybridisierung stellte sich heraus, dass die RNA eine befriedigende Qualität aufweist und für die Hybridisierung auf dem Genchip eingesetzt werden konnte. Ein weiterer Einflußfaktor ist der Experimentator, der z.B. durch Pipettierfehler oder unzureichendes RNase-freies Arbeiten die Datenproduktion beeinflusst.

Im nachfolgenden sollen mögliche Rollen der in der Real-Time PCR verifizierten Faktoren erläutert werden. Da *NRXN2* und *PRKCA* sowohl in der Mikroarrayanalyse als auch bei der Real-Time PCR stark unterschiedliche Expressionsdaten aufweisen, wird auf eine Erläuterung im nachfolgenden Abschnitt verzichtet.

4.1.2 *SOD3*-Repression wirkt tumorfördernd

Betrachtet man die Expressionsergebnisse von *SOD3* in den Rattengliomzellen, die mit Mikrogliazellen kokultiviert waren (FKO), so sieht man, dass die Daten erfolgreich mit der Real-Time PCR verifiziert werden konnten, da diese wie beim Mikroarrayexperiment eine Repression des *SOD3*-Gens zeigten. Nun stellt sich die Frage, warum die Tumorzellen nach Kokultivierung mit Mikrogliazellen eine Expressionsverminderung des *SOD3*-Gens zeigten.

Es ist beschrieben worden, dass dieses Gen normalerweise bei oxidativem Streß induziert wird (Franco, Odom, and Rando, 1999). Ferner sind an der Induktion des *SOD3*-Gens auch inflammatorische Zytokine wie z.B. Interferon γ und Interleukin 1α und der Transkriptionsfaktor NF κ B beteiligt (Marklund, 1992; Brady *et al.*, 1997). Das *SOD3*-Gen wird vor allem in sekretorischen Alveolarepithelzellen vom Typ II der Lunge exprimiert (Su *et al.*, 1997), aber auch in glatten Muskelzellen von Gefäßen, Fibroblasten und Gliazellen (Willems *et al.*, 1993). Dort kodiert es für das extrazellulär lokalisierte Enzym Superoxiddismutase, die in ihrem katalytischen Zentrum Kupfer und Zink enthält. Bei der Superoxiddismutase lassen sich insgesamt drei Isoformen differenzieren, die sich in unter anderem in ihrer Lokalisation und Gensequenz unterscheiden (Willems *et al.*, 1993). Bei der Ratte liegt das Enzym als Homodimer, beim Menschen als Tetramer vor (Marklund, 1984). Das Enzym hat die Funktion, reaktive Sauerstoffradikale wie z.B. das Superoxid, dass bei inflammatorischen Prozessen freigesetzt wird zu eliminieren und so die Zelle vor Destruktion zu schützen. Es verhindert somit den programmierten Zelltod (Apoptose) der Zellen (Patel *et al.*, 2002). *SOD3* war in unseren Zellen reprimiert und kann möglicherweise nicht antiapoptotisch wirken.

Aus *in vitro*-Experimenten ist bereits bekannt, dass eine Überexpression des *SOD3*-Gens in humanen Gliomzelllinien sowohl das Tumorzellwachstum als auch den malignen Phänotyp supprimiert und so eine mögliche Funktion als Tumorsuppressorgen ausübt (Zhang *et al.*, 2002). Aus unseren Daten läßt sich somit die Hypothese erstellen, dass eine nach Kokultivierung mit Mikrogliazellen resultierende Repression des *SOD3*-Gens in Rattengliomzellen das Tumorzellwachstum fördert. Dieser Befund unterstützt die These, dass Mikroglia offenbar nicht mehr ihre Funktion als Abwehrzelle gegen Tumoren wahrnehmen können und aus diesem Grunde das Tumorzellwachstum unterstützen (Badie and Schartner, 2001).

Von bedeutendem Interesse ist weiterhin, dass *SOD3* offenbar bei der Tumorzellinvasion beteiligt ist. So zeigten Muramatsu *et al.*, dass humane Zungenepithelkarzinomzellen, die mit Antisense *SOD3*-cDNA transfiziert wurden, eine höhere Invasivität aufweisen (Muramatsu *et al.*, 1995). Ebenfalls ist in einer darauf folgenden Studie bestätigt worden, dass eine gesteigerte Motilität bei Sarkomzellen vorhanden ist, wenn eine Suppression des *SOD3*-Gens vorlag (Tanaka *et al.*, 1997). Da bei uns ebenfalls eine Suppression von *SOD3* in Gliomzellen, die mit Mikroglia kokultiviert wurden, vorliegt, ist es möglich, dass Mikrogliazellen auch die Invasion von Gliomzellen unterstützen. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die

Gliomzellen nach Kokultivierung mit Mikroglia *SOD3* reprimieren, was möglicherweise Tumorwachstum und -Invasion fördert.

4.1.3 *HTR1A*-Hochregulation wirkt tumorfördernd

Anders als bei *SOD3* lag in den kokultivierten Rattengliomzellen eine Überexpression des *HTR1A*-Rezeptor-Gens vor. Die mRNA-Expression kann in unterschiedlichen Geweben detektiert werden. So findet man beispielsweise eine besonders hohe Expression des Rezeptorgens in verschiedenen Gehirnarealen wie z.B. dem Hippocampus, Thalamus und Mesencephalon, aber auch in Neuronen und in Astrogliazellen kann eine Expression des Gens nachgewiesen werden (Abdoun *et al.*, 2001). Weiterhin findet man eine Expression in humanen Lymphknoten, Milz, Thymus (Albert *et al.*, 1990), in mononukleären Zellen und aktivierten T-Lymphozyten (Aune *et al.*, 1993). Das *HTR1A*-Rezeptorgen kodiert normalerweise für ein Protein mit sieben Transmembrandomänen, welches zur G-Protein gekoppelten Rezeptor-Superfamilie gehört (Albert and Lemonde, 2004). Es existieren insgesamt sieben Klassen, deren Einteilung auf strukturelle, funktionelle und pharmakologische Kriterien beruht (Hoyer *et al.*, 1994). Der natürliche Ligand von *HTR1A* ist das Amin Serotonin (auch als 5-Hydroxy-Tryptamin bezeichnet), welches als Transmitter eine Vielzahl von physiologischen Funktionen erfüllt. Kürzlich wurde beschrieben, dass es das Zellwachstum unterstützt (Dizeyi *et al.*, 2004).

In hochmalignen Prostatatumorzellen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte mRNA-Expression des *HTR1A*-Gens mit dem Tumorwachstum korreliert (Dizeyi *et al.*, 2004). Auch wenn bis jetzt noch keine Veröffentlichungen existieren, die gezeigt haben, dass eine erhöhte Expression des *HTR1A*-Gens eine erhöhte Proliferation in Gliomzellen bedingt, so kann man dennoch feststellen, dass durch den Kontakt mit Mikrogliazellen eine Induktion des Gens stattfand, was womöglich eine erhöhte Proliferation der Tumorzellen hervorruft. Durch *in vitro*-Experimente ließ sich ferner nachweisen, dass Serotonin offenbar in der Lage ist, Proliferation, Migration und die Invasion von Gliomzellen positiv zu beeinflussen (Merzak *et al.*, 1996).

Dass Serotonin ein wichtiger Neuroimmunmodulator ist, konnte dadurch bekräftigt werden, dass es über eine Phosphorylierung diverser Faktoren die Induktion des Zytokins IL-6 stimuliert (Lieb *et al.*, 2005). So kann die Induktion des *HTR1A*-Gens in unseren Tumorzellen den Zweck gehabt haben, durch erhöhte mRNA-Expression verstärkt das Rezeptorprotein *HTR1A* zu bilden, um vermehrt Serotonin binden zu können und damit eine Immunantwort

zu induzieren. Mikrogliazellen könnten möglicherweise an der Induktion des Serotoninrezeptor-Gens beteiligt sein und auf diese Weise das Gliomwachstum, die Proliferation und die Invasion stimulieren.

In Bezug auf die transkriptionelle Regulation des *HTRIA*-Gens ist bekannt, dass dessen Expression durch mehrere Steuerelemente reguliert wird, wie z.B. einer gewebe-spezifischen Enhancer-Region, einem nichtselektivem Promotor und einer Repressorregion, die zu 80% homolog ist mit RANTES-(eng.: regulated on activation, normal T expressed and secreted; RANTES ist ein Zytokin, das zur Interleukin 8-Superfamilie gehört und chemotaktisch auf T-Gedächtniszellen, eosinophile und basophile Granulozyten wirkt), Tumor Nekrose Faktor- β - und anderen Immunsystemgenen (Storring *et al.*, 1999). Aus Experimenten mit Milzzellen ist ferner bekannt, dass die *HTRIA*-mRNA-Expression durch bestimmte Mitogene angeregt werden kann (Abdoh *et al.*, 2001). Man weiß, dass Mikrogliazellen in der Lage sind, Mitogene freizusetzen (Giulian *et al.*, 1991), daher wäre dies eine mögliche Erklärung für die Induktion des *HTRIA*-Gens und damit der Stimulierung der Proliferation in unseren Rattengliomzellen.

Innerhalb des *HTRIA*-Gens gibt es eine Region mit starker Enhancer-Aktivität, welche zwei NF κ B-Konsensussequenzen enthält. An diese Sequenzen kann NF κ B binden und so die Transkription des *HTRIA*-Gens steigern (Ou *et al.*, 2000). Im Widerspruch dazu soll I κ B, ein funktioneller Inhibitor von NF κ B, der im Zytoplasma einen Komplex mit NF κ B bildet, dessen Translokation in den Zellkern verhindern und als positiver Regulator des Promotors von *HTRIA* fungieren (Wissink *et al.*, 2000). Es ist zu vermuten, dass durch Kokultivierung der Tumor- und Mikrogliazellen eine Immunreaktion hervorgerufen wurde und im Zuge der Inflammation, bzw. Immunantwort die Mikrogliazellen eine Verstärkung der Proliferation der Gliomzellen herbeiführen, möglicherweise durch eine NF κ B-unterstützte Induktion des *HTRIA*-Gens.

4.1.4 Antitumorwirkung durch hochreguliertes *CREM*

Unsere Daten zeigten eine erhöhte mRNA-Expression von *CREM* in Gliomzellen, die mit Mikrogliazellen kokultiviert wurden. *CREM* gehört zu der Familie der cAMP-regulierten Transkriptionsfaktoren. Von seinem Gen werden unterschiedlich viele Isoformen durch Gebrauch von vier Promotoren und alternativem *Splicing* der mRNA gebildet (Liu, Huang, and Kream, 2005). So wird beispielsweise das Protein ICER (inducible cAMP early

repressor) von einem internen P2-Promotor, welcher innerhalb eines Introns des *CREM*-Gens liegt, erzeugt (Molina *et al.*, 1993). Interessanterweise weist das *CREM*-Gen mit der *ICER*-Splicevariante eine duale Funktion auf, *ICER* ist ein endogener Inhibitor von *CREM* und verwandten Transkriptionsfaktoren wie *CREB* (*cAMP responsive element binding protein*) und *ATF-1* (*activating transcription factor-1*) (Mioduszevska, Jaworski, and Kaczmarek, 2003). *CREM* wird durch Aktivierung des cAMP-Signalweges mit der Kinetik eines „*early response gene*“ induziert (Lamas *et al.*, 1996).

Interessant ist, dass das Genprodukt von *CREM-ICER* den Transkriptionsfaktor *CREB* und somit die cAMP-induzierte Transkription antagonisiert und beim programmierten Zelltod involviert ist (Jaworski *et al.*, 2003). *CREM* scheint folglich in der Apoptose von Zellen involviert zu sein. Ferner soll *CREM* in der Lage sein, über eine Hemmung von NFκB die Tumormalignität zu revertieren (Andela *et al.*, 2003). Weitere Daten sprechen für eine Verminderung der Tumorigenität durch *CREM-ICER*: Es ist beschrieben worden, dass Prostatatumorzellen mit ektop erhöhter *ICER*-Expression eine erniedrigte Proliferation aufweisen (Yehia *et al.*, 2001). Ebenfalls konnte bestätigt werden, dass eine erhöhte *ICER*-Expression in Rattenprostatatumorzellen deren Kolonieformation bzw. Tumorformation im Softagar verhindert (Memin *et al.*, 2002).

Die Induktion des *CREM*-Gens in Gliomzellen durch Mikroglia scheint eine neue Beobachtung zu sein, denn bisher wurde eine Induktion der *CREM*-mRNA in Gliomzellen nur gefunden, wenn diese mit Isoproterenol behandelt wurden (Fitzgerald *et al.*, 1996). Isoproterenol hat dabei die Eigenschaft, an den β1-Adrenozeptor der Tumorzellen zu binden, den intrazellulären cAMP-Spiegel anzuheben und so eine erhöhte Expression des *CREM*-Gens hervorzurufen. Es wäre denkbar, dass die Mikrogliazellen in den Tumorzellen die cAMP-Bildung induzieren und somit die Expression von *CREM* steigern.

Da das *CREM*-Produkt *ICER* antiproliferative Effekte von cAMP vermittelt, weisen die erhöhten mRNA-Expressionsdaten von *CREM* in unseren kokultivierten Gliomzellen auf eine Antitumorwirkung der Mikrogliazellen durch erhöhte Apoptose und Verminderung der Tumormalignität hin.

4.1.5 Antitumorwirkung durch Repression von *RIP1*

Nach Kontakt mit Mikrogliazellen trat bei den Gliomzellen eine Repression von *RIP1* auf. *RIP1* kodiert für das Enzym, welche zum Cytochrom bc1-Komplex (auch als Komplex III bezeichnet) der mitochondrialen Elektronentransportkette gehört (Sun, Kinter, and Anderson,

2003). Das Enzym hat vor allem die Funktion, Elektronen von Ubiquinol zu Cytochrom c1 zu transferieren. Ferner ist es an der Aufrechterhaltung des Protonengradienten über der Mitochondrienmembran, an der Protein-Prozessierung und der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt (Guzy *et al.*, 2005).

Bisher existieren keine Veröffentlichungen, in denen die Rolle des *RIP1*-Gens in Gliomen untersucht wurde. Das *RIP1*-Gen scheint eine bedeutende Rolle in verschiedenen malignen Zellen zu spielen, da es dort in amplifizierter Form vorliegt. So wurden sowohl in Zervix-, Ovarial- und Mammakarzinomen (Ohashi *et al.*, 2004; Kaneko *et al.*, 2003) als auch beim Myelodysplastischen Syndrom (Sait *et al.*, 2002) *RIP1*-Genamplifikationen gefunden.

Wir konnten zum ersten Mal nachweisen, dass *RIP-1* auch eine Rolle in Gliomen spielen könnte. Unsere Daten zeigten, dass nach Kontakt mit Mikrogliazellen bei den Tumorzellen eine Repression des Gens auftritt. Dies könnte für die Tumorzellen bedeuten, dass weniger Ubiquinol c-Reduktase gebildet werden kann und damit das vom Protonengradienten abhängige mitochondriale Membranpotential, was für die ATP-Produktion essentiell ist, zusammenbricht. Die unmittelbare Folge wäre ein nichtselektiver Ioneneinstrom, der zum Anschwellen der Mitochondrien und damit zum programmierten Zelltod (Apoptose) der Tumorzellen führt (Armstrong *et al.*, 2004).

Es wäre zu klären, ob in Gliomzellen ebenfalls *RIP1*-Genamplifikationen vorliegen. Falls dies der Fall ist, könnte trotz Repression durch die Mikrogliazellen das *RIP1*-Expressionslevel immer noch über einem physiologischen Expressionswert liegen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum unsere Gliomzellen nicht abstarben. Nur durch einen Vergleich mit Primärzellen könnte herausgefunden werden, ob das Expressionslevel niedriger ist als in den Kokulturzellen.

Es ist bekannt, dass die Genexpression von *RIP1* durch Hypoxie gesteigert werden kann (Brunelle *et al.*, 2005), wobei das Produkt in der Lage ist, den *hypoxia inducible factor 1* (HIF1) zu stabilisieren und die Synthese reaktiver Sauerstoffradikale wie z.B. dem Superoxidanion zu fördern (Guzy, 2005). Von HIF1 weiß man, dass es ein potentere Aktivator der Angiogenese ist und durch Induktion von Matrix-Metalloproteinasen und Serinproteasen an der Invasion von Gliomzellen beteiligt ist (Kaur *et al.*, 2005).

Wie die Stabilisierung von HIF1 im einzelnen erfolgt, ist bis jetzt noch unbekannt. Man vermutet, dass sowohl bei normaler als auch bei gesteigerter Expression von *RIP1* Sauerstoffradikale (z.B. das Superoxidanion) gebildet werden, die für die Stabilisierung von HIF1 verantwortlich sein sollen. Nach Bildung am mitochondrialen Komplex III (*RIP1*) gelangen diese durch einen Anionenkanal ins Zytosol und werden dort zu Wasserstoffperoxid

umgewandelt. Anschließend aktivieren die Wasserstoffperoxidmoleküle PI3-Kinasen und Phosphatasen, welche die Stabilisierung von HIF1 fördern (Chandel *et al.*, 2000). Andere Arbeiten gehen davon aus, dass die Stabilisierung von HIF1 über die p38 α -MAPK-Signalkaskade erfolgt: Womöglich aktivieren die Sauerstoffradikale ein unbekanntes Protein im Zytosol, welches zunächst MKK3/6 und anschließend die p38 α -MAPK aktiviert. Die MAPK unterdrücken die Hydroxylierung von Prolin- und Asparaginresten am HIF1-Protein und stabilisieren es (Emerling *et al.*, 2005). Da Mikrogliazellen eine Repression des *RIP1*-Gens in Gliomzellen hervorrufen, könnte HIF1 möglicherweise durch Verminderung der Sauerstoffradikalbildung destabilisiert werden/sein, was die Angiogenese und die Invasion der Gliomzellen beeinträchtigt.

4.1.6 Hochregulation von *ADRAID* wirkt tumorfördernd

ADRAID, welches in den kokultivierten Rattengliomzellen hochreguliert wurde, kodiert für einen G-Protein-gekoppelten α 1-Rezeptor, welcher Wirkungen von Katecholaminen vermittelt. Pharmakologisch können drei α 1-Subtypen (α 1a, α 1b und α 1d) charakterisiert werden (Cotecchia *et al.*, 1988) (Lomasney *et al.*, 1991). Alle Rezeptoren führen über eine intrazelluläre IP3-Produktion zur Erhöhung von Calcium. Ihre Verteilung in murinen Geweben ist je nach Rezeptortyp unterschiedlich. Der vom *ADRAID*-Gen kodierte α 1d-Adrenozeptor wird im murinen Gehirn besonders hoch exprimiert (Shen *et al.*, 2000). Von α 1d-Rezeptoren ist bekannt, dass sie diverse Gene regulieren können. Zu diesen Genen gehören beispielsweise endogene Peptidliganden wie Zytokine und Wachstumsfaktoren, DNA-bindende Proteine (Transkriptionsfaktoren) und extrazelluläre Matrixproteine (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2003).

Die Stimulation der α 1d-Rezeptoren führt offenbar zum Zellwachstum und Proliferation von Zellen (Keffel *et al.*, 2000). Auch konnte eine migrationsfördernde Wirkung nachgewiesen werden. In Rattenfibroblasten konnte beobachtet werden, dass α 1d-Rezeptoren an der Aktivierung von Mitogen-aktivierenden Proteinkinase (MAPK)-Pfadwegen beteiligt sind (Waldrop *et al.*, 2002). MAPK sind bedeutende Mediatoren von Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Überleben und Invasion (MacCorkle and Tan, 2005).

In Astrozyten konnte gezeigt werden, dass eine α 1d-Adrenozeptorstimulation zur Bildung des proinflammatorischen und streßinduzierbaren Zytokins Interleukin-6 (IL-6) führt (Norris and Benveniste, 1993). Die Bedeutung von IL-6 liegt darin, dass es Zellwachstum und das

Überleben von Zellen fördert (Thier *et al.*, 1999). In Rattengliomzellkulturen kann gewöhnlicherweise ein basaler IL-6-Level gemessen werden (Slegers and Joniau, 1996). Unsere Daten, die eine Überexpression des *ADRAID*-Gens in mit Mikroglia kokultivierten Rattengliomzellen zeigen, weisen auf proliferations- und invasionsfördernde Funktionen von Mikroglia hin. Interessant ist, dass sowohl die Genprodukte des *HTRIA*- als auch des *ADRAID*-Gens, die in Gliomzellen durch Kokultivierung induziert wurden, in der Lage sind, die IL-6 Bildung zu stimulieren. Beide Genexpressionsdaten in den kokultivierten Rattengliomzellen weisen darauf hin, dass die Tumorzellen als Reaktion auf die Mikrogliazellen eine Immunantwort induzieren. Weiterhin läßt sich festhalten, dass Mikrogliazellen über eine gleichzeitige *ADRAID*- und *HTRIA*-Rezeptorgeninduktion die Proliferation der Tumorzellen unterstützen. Hier zeigt sich erneut, dass die Mikrogliazellen nicht in der Lage sind, Apoptose in Gliomzellen herbeizuführen und eine Anti-Tumorantwort nicht aufrechterhalten können. Die Tumorzellen machen sich die Eigenschaften der Mikroglia zunutze und profitieren stattdessen von deren Proliferationsstimuli.

4.2 Einfluß von *ADRAID*, *HTRIA* und *CREM* auf die IL-6-Bildung in Gliomzellen

Die Genexpression von mit Mikrogliazellen kontaktierten F98-Zellen weist drei Kandidaten auf, die durch Kontakt hochreguliert sind und die Bildung von IL-6 beeinflussen können (Abb. 23). IL-6 wird in Neuronen und Gliazellen gebildet und übt eine Vielzahl von Funktionen im zentralen Nervensystem aus (Van Wagoner and Benveniste, 1999). Es erfüllt beispielsweise trophische Funktionen, indem es das Überleben der neuronalen Zellen und die Proliferation der Astrozyten sichert. Desweiteren ist IL-6 ein bedeutender Vermittler von Inflammation und Astrogliose (Gadient and Otten, 1997). Von Astrozyten ist bekannt, dass diese als Antwort auf verschiedene Liganden IL-6 freisetzen können. Ein wichtiger Ligand, welcher die IL-6 Bildung induzieren kann, ist z.B. das proinflammatorische Zytokin TNF- α , dass im Rahmen einer Inflammationsreaktion von aktivierten Mikrogliazellen freigesetzt werden kann (Van Wagoner *et al.*, 1999). In unserer Mikroarray-Expressionsanalyse hat sich gezeigt, dass nach Kokultivierung von Mikrogliazellen mit Rattengliomzellen die TNF- α -Expression in Mikrogliazellen erhöht ist (wurde nicht in den Ergebnissen erwähnt). So liegt es nahe, dass die erhöhte TNF- α -Expression ebenfalls zu einer Induktion von IL-6 in den Gliomzellen führen kann.

Fiebich et al haben gezeigt, dass Prostaglandine die Synthese von IL-6 in Gliomzellen stimulieren können (Fiebich *et al.*, 1998). Möglicherweise besteht eine direkte Verbindung zwischen der Freisetzung von Prostaglandinen aus aktivierten Mikrogliazellen und der Synthese von IL-6 in Gliomzellen. Aus unserem Kokulturrexperiment geht hervor, dass Gliomzellen nach Kokultur mit Mikrogliazellen veränderte Expressionswerte von *ADRAID*, *HTR1A* und *CREM* aufweisen und diese einen bedeutenden Einfluß auf die IL-6-Sekretion haben. Sowohl die Genprodukte des *HTR1A*- als auch des *ADRAID*-Gens sind offenbar in der Lage, die IL-6-Bildung zu stimulieren und damit eine Immunantwort in Gang zu setzen. IL-6 ist über einen Zytokin-vermittelten Signalweg in der Lage, die GFAP-Expression zu steigern (Yanagisawa, Nakashima, and Taga, 1999) und die Differenzierung der Astrozyten zu fördern. Vor kurzem wurde herausgefunden, dass die Differenzierung durch erhöhte cAMP-Spiegel induziert und durch autokrine IL-6-Produktion vermittelt wird (Takanaga *et al.*, 2004). Da *HTR1A* und *ADRAID* direkt die IL-6-Produktion stimulieren können, scheinen sie sowohl an der Differenzierung als auch an der Tumorprogression von Gliomzellen beteiligt zu sein. In Bezug auf die *CREM*-Expression wurde bereits angedeutet, dass Mikrogliazellen auf unbekanntem Wege in der Lage sind, die cAMP-Bildung in den Tumorzellen zu erhöhen, woraus eine verstärkte Expression von *CREM* resultiert. Das *CREM*-Genprodukt ist in der Lage, als negativer Regulator vom Transkriptionsfaktor CREB (Loriaux, Brennan, and Goodman, 1994) dessen Bindung an die IL-6-Promotorsequenz zu verhindern und die IL-6-Bildung zu hemmen (Takanaga *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit, die IL-6-Synthese zu verhindern, besteht in der *CREM*-vermittelten Hemmung des Transkriptionsfaktors NFκB, welcher in der Lage ist, direkt die Transkription von IL-6 zu aktivieren (Baeuerle and Henkel, 1994). *CREM* scheint somit im Gegensatz zu *ADRAID* und *HTR1A* einen negativen Einfluß auf die IL-6-Bildung/Sekretion und Differenzierung der Tumorzellen auszuüben. Abbildung 23 stellt ein mögliches Modell über den Einfluß der Mikrogliazellen auf die IL-6-Sekretion via TNF-α-Freisetzung und Expressionsveränderung des *ADRAID*, *HTR1A*- und *CREM*-Gens in Gliomzellen dar.

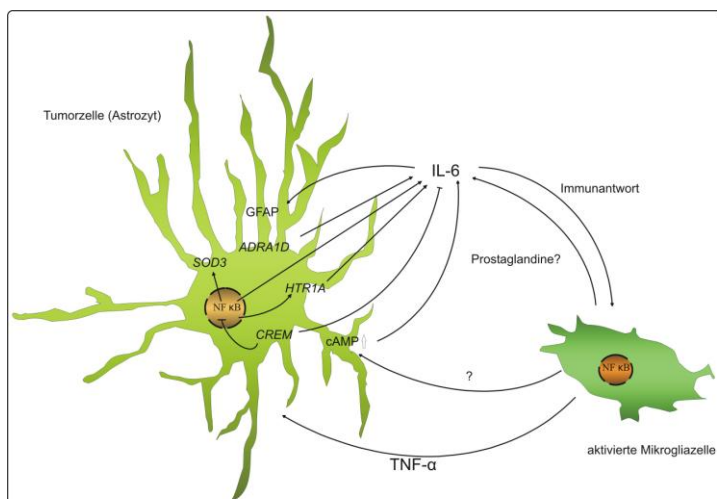


Abb. 23: Einfluß von *ADRAID*, *HTR1A* und *CREM* auf die IL-6-Bildung in Gliomzellen.

SOD3, welches nach Kontakt mit Mikroglia in den Rattengliomzellen reprimiert wurde, ist nicht an der IL-6-Bildung beteiligt. Zusammenfassend ist zu sagen, dass maligne Tumoren durch Entzündungen induziert werden oder weiter voranschreiten können.

4.3 Erhöhte IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand aus gemeinsam kultivierten Mikroglia- und F98-Rattengliomzellen

Aus den Messungen der IL-6-Konzentrationen in den einzelnen Zellkulturüberständen geht deutlich hervor, dass nach Kokultur von Mikroglia- und Rattengliomzellen im Überstand tatsächlich eine deutlich höhere IL-6-Konzentration vorliegt als in Überständen von einzeln kultivierten Mikroglia- und Rattengliomzellen. Da sich beide Zelltypen im Kokulturassay das Zellkulturmedium teilten, läßt sich nicht erschließen, ob die Mikrogliazellen oder die Tumorzellen vermehrt IL-6 ins Medium sezernierten. Einen ersten Hinweis darauf, dass beide Zelltypen IL-6 sezernieren, läßt sich von den Mikroarraydaten ableiten. Die Expressionsveränderungen waren hier jedoch nicht 100% konstant, so dass sie nicht in der ersten Analyse in Erscheinung traten. Es ist daher erforderlich, die IL-6-Expression per Real-Time PCR zu verifizieren. Für die Tumorzellen ist aus unserer Genexpressionsanalyse hervorgegangen, dass die IL-6-Expression durch *ADRA1D*, *HTR1A* und *CREM* reguliert wird, was die Hypothese unterstützt, dass die Tumorzellen eine erhöhte IL-6-Sekretion aufweisen. Denkbar ist auch, dass die Mikrogliazellen aufgrund ihrer immunologischen Funktion nach Kontakt mit den Tumorzellen aktiviert wurden und vermehrt IL-6 ins Medium sezernierten (Kreutzberg, 1995). Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass die Kokultur der beiden Zelltypen entscheidend für die Erhöhung der IL-6-Sekretion ist.

4.4 Ausblick

Nachdem die Expression der 5 differentiell exprimierten Transkripte quantifiziert worden ist, könnte in einem nächsten Schritt anhand von humanen Glioblastomschnitten auf Proteinebene untersucht werden, ob eine differentielle Proteinexpression von *ADRA1D*, *CREM*, *SOD3*, *RIP1* und *HTR1A* vorliegt. Denkbar wäre auch, einen Kokulturassay mit einer humanen Gliomzelllinie und Mikrogliazellen durchzuführen und deren Proteinlysate mittels Westernblot zu untersuchen. Problematisch hierbei ist, dass bis jetzt keine etablierte humane Mikrogliazelllinie existiert.

Die Genexpressionsdaten von *SOD3*, *HTR1A* und *ADRA1D* deuten auf einen Einfluß der Mikrogliazellen bei der Tumorprogression hin. In Bezug auf die *SOD3*-Repression in kokultivierten Gliomzellen wäre es mit Hilfe eines Matrigel-Invasionsassays interessant zu überprüfen, ob tatsächlich die Tumorzellen, die Kontakt zu Mikrogliazellen haben, invasiver sind als unkontaktierte Tumorzellen. Man könnte ferner in Glioblastomen bzw. in Astrozytomen unterschiedlicher Malignität, die eine unterschiedliche Anzahl an Mikrogliazellen aufweisen, mit einer immunhistochemischen Färbung analysieren, ob die *SOD3*-Repression reziprok mit dem Grad der Invasivität des Tumors und direkt proportional zu der Anzahl an Mikrogliazellen ist. In Proliferationsversuchen könnte gezeigt werden, ob *HTR1A* einen wesentlichen Einfluß auf die Proliferation der Tumorzellen hat und ob seine Expression in Gliomen durch NF κ B induziert wird. Durch Einsatz von *HTR1A*-Inhibitoren könnte auf diese Weise die Tumorprogression vermindert werden. Desweiteren wäre zu untersuchen, auf welchem Wege Mikrogliazellen den cAMP-Spiegel in Gliomzellen erhöhen. Näher beleuchtet werden müßte der Einfluß von *CREM* und *RIP1* auf die Apoptose von Tumorzellen, da sich hier interessante therapeutische Ansätze bei der Bekämpfung des Glioblastoms erkennen lassen.

Abschließend ist festzuhalten, dass Mikroglia wesentlich daran beteiligt sind, über eine Expressionsveränderung von *ADRA1D*, *HTR1A* und *CREM* die IL-6-Synthese in Gliomzellen zu stimulieren. Da die IL-6-Sezernierung der Gliomzellen einen wichtigen Proliferationsstimulus darstellt und eine zentrale Rolle in der Genese des malignen Glioms spielt, sollte versucht werden, diese autokrine Schleife zu durchbrechen. Da Gliome sehr invasiv und hochresistent bei der chemotherapeutischen Behandlung sind, könnten die durch diese Studie ermittelten Kandidatengene neue therapeutische Angriffspunkte repräsentieren und für eine antiproliferative Therapie des Glioblastoms eingesetzt werden. Es müßten tumorspezifische neutralisierende Antikörper entwickelt und untersucht werden, ob sich diese als Ergänzung für eine IL-6-Immuntherapie eignen. Es ist anzumerken, dass außer den Mikrogliazellen noch andere den Tumor umgebende Zellen (Oligodendrozyten, Endothelzellen, etc.) existieren. Welche Bedeutung diesen Zellen in der Gliombiologie zukommt, wird daher in Zukunft näher beleuchtet werden müssen. Erst durch das Verständnis der Zellfunktionen wird es möglich sein, eine optimale Therapie zu entwickeln.

5. Literaturverzeichnis

Abbott,N.J., Revest,P.A., and Romero,I.A. (1992) Astrocyte-endothelial interaction: physiology and pathology *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* **18**: 424-433.

Abdouh,M., Storrington,J.M., Riad,M., Paquette,Y., Albert,P.R., Drobetsky,E., and Kouassi,E. (2001) Transcriptional mechanisms for induction of 5-HT_{1A} receptor mRNA and protein in activated B and T lymphocytes *J.Biol.Chem.* **276**: 4382-4388.

Acarin,L., Vela,J.M., Gonzalez,B., and Castellano,B. (1994) Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding *J.Histochem.Cytochem.* **42**: 1033-1041.

Al Ali,S.Y., al Hussain,S.M. (1996) An ultrastructural study of the phagocytic activity of astrocytes in adult rat brain *J.Anat.* **188 (Pt 2)**: 257-262.

Albert,P.R., Lemonde,S. (2004) 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association *Neuroscientist.* **10**: 575-593.

Albert,P.R., Zhou,Q.Y., Van Tol,H.H., Bunzow,J.R., and Civelli,O. (1990) Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene *J Biol.Chem.* **265**: 5825-5832.

Andela,V.B., Gingold,B.I., Souza,M.D., O'Keefe,R.J., Puzas,E.J., Schwarz,E.M., and Rosier,R.N. (2003) Clinical relevance of increased retinoid and cAMP transcriptional programs in tumor cells rendered non-malignant by dominant negative inhibition of NFκB *Cancer Lett.* **194**: 37-43.

Armstrong,J.S., Yang,H., Duan,W., and Whiteman,M. (2004) Cytochrome bc₁ regulates the mitochondrial permeability transition by two distinct pathways *J.Biol.Chem.* **279**: 50420-50428.

Aune,T.M., McGrath,K.M., Sarr,T., Bombara,M.P., and Kelley,K.A. (1993) Expression of 5HT_{1a} receptors on activated human T cells. Regulation of cyclic AMP levels and T cell proliferation by 5-hydroxytryptamine *J.Immunol.* **151**: 1175-1183.

- Badie,B., Schartner,J. (2001) Role of microglia in glioma biology *Microsc.Res.Tech.* **54**: 106-113.
- Baeuerle,P.A., Henkel,T. (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system *Annu.Rev.Immunol.* **12**: 141-179.
- Benouaich-Amiel,A., Simon,J.M., and Delattre,J.Y. (2005) [Concomitant radiotherapy with chemotherapy in patients with glioblastoma] *Bull.Cancer* **92**: 1065-1072.
- Bettinger,I., Thanos,S., and Paulus,W. (2002) Microglia promote glioma migration *Acta Neuropathol.(Berl)* **103**: 351-355.
- Biernat,W., Kleihues,P., Yonekawa,Y., and Ohgaki,H. (1997a) Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* **56**: 180-185.
- Biernat,W., Tohma,Y., Yonekawa,Y., Kleihues,P., and Ohgaki,H. (1997b) Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas *Acta Neuropathol.(Berl)* **94**: 303-309.
- Bleehen,N.M., Stenning,S.P. (1991) A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party *Br.J Cancer* **64**: 769-774.
- Brady,T.C., Chang,L.Y., Day,B.J., and Crapo,J.D. (1997) Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation *Am.J Physiol* **273**: L1002-L1006.
- Brunelle,J.K., Bell,E.L., Quesada,N.M., Vercauteren,K., Tiranti,V., Zeviani,M., Scarpulla,R.C., and Chandel,N.S. (2005) Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation *Cell Metab* **1**: 409-414.
- Burton,E.C., Lamborn,K.R., Forsyth,P., Scott,J., O'Campo,J., Uyehara-Lock,J., Prados,M., Berger,M., Passe,S., Uhm,J., O'Neill,B.P., Jenkins,R.B., and Aldape,K.D. (2002) Aberrant p53, mdm2, and proliferation differ in glioblastomas from long-term compared with typical survivors *Clin.Cancer Res.* **8**: 180-187.

- Chandel,N.S., McClintock,D.S., Feliciano,C.E., Wood,T.M., Melendez,J.A., Rodriguez,A.M., and Schumacker,P.T. (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing *J Biol.Chem.* **275**: 25130-25138.
- Chinot,O. (2005) [New place of the chemotherapy in gliomas] *Bull.Cancer* **92**: 343-354.
- Chow,L.M., Baker,S.J. (2006) PTEN function in normal and neoplastic growth *Cancer Lett.*
- Cotecchia,S., Schwinn,D.A., Randall,R.R., Lefkowitz,R.J., Caron,M.G., and Kobilka,B.K. (1988) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1-adrenergic receptor *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**: 7159-7163.
- Cuadros,M.A., Navascues,J. (1998) The origin and differentiation of microglial cells during development *Prog.Neurobiol.* **56**: 173-189.
- D'Atri,S., Tentori,L., Lacial,P.M., Graziani,G., Pagani,E., Benincasa,E., Zambruno,G., Bonmassar,E., and Jiricny,J. (1998) Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis *Mol.Pharmacol.* **54**: 334-341.
- de Kok,J.B., Roelofs,R.W., Giesendorf,B.A., Pennings,J.L., Waas,E.T., Feuth,T., Swinkels,D.W., and Span,P.N. (2005) Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes *Lab Invest* **85**: 154-159.
- Dizeyi,N., Bjartell,A., Nilsson,E., Hansson,J., Gadaleanu,V., Cross,N., and Abrahamsson,P.A. (2004) Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines *Prostate* **59**: 328-336.
- Dropcho,E.J.S.S.J. (1996) The prognostic impact of prior lowgrade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-controlstudy. *Neurology* **47**: 684-690.
- Dvorak,H.F., Brown,L.F., Detmar,M., and Dvorak,A.M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis *Am.J Pathol.* **146**: 1029-1039.
- Ekstrand,A.J., Sugawa,N., James,C.D., and Collins,V.P. (1992) Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 4309-4313.

Emerling,B.M., Plataniias,L.C., Black,E., Nebreda,A.R., Davis,R.J., and Chandel,N.S. (2005) Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling *Mol.Cell Biol.* **25**: 4853-4862.

Fakhrai,N., Czech,T., Diekmann,K., Fazeny-Dorner,B., Birner,P., Hainfellner,J.A., Prayer,D., and Marosi,C. (2004) Glioblastoma with spinal seeding *Strahlenther.Onkol.* **180**: 455-457.

Feldkamp,M.M., Lau,N., Rak,J., Kerbel,R.S., and Guha,A. (1999) Normoxic and hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by astrocytoma cells is mediated by Ras *Int J.Cancer* **81**: 118-124.

Fiano,V., Ghimenti,C., Imarisio,S., Silengo,L., and Schiffer,D. (2004) PAkt, cyclin D1 and p27/Kip.1 in glioblastomas with and without EGFR amplification and PTEN mutation *Anticancer Res.* **24**: 2643-2647.

Fiebich,B.L., Hull,M., Lieb,K., Schumann,G., Berger,M., and Bauer,J. (1998) Potential link between interleukin-6 and arachidonic acid metabolism in Alzheimer's disease *J.Neural Transm.Suppl* **54**: 268-278.

Fitzgerald,L.R., Li,Z., Machida,C.A., Fishman,P.H., and Duman,R.S. (1996) Adrenergic regulation of ICER (inducible cyclic AMP early repressor) and beta1-adrenergic receptor gene expression in C6 glioma cells *J.Neurochem.* **67**: 490-497.

Flugel,A., Labeur,M.S., Grasbon-Frodl,E.M., Kreutzberg,G.W., and Graeber,M.B. (1999) Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells *Int J Dev.Neurosci.* **17**: 547-556.

Franco,A.A., Odom,R.S., and Rando,T.A. (1999) Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle *Free Radic.Biol.Med* **27**: 1122-1132.

Frei,K., Malipiero,U., Piani,D., and Fontana,A. (1994) Microglia and tumor rejection *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* **20**: 206-208.

Fults,D., Pedone,C.A., Thompson,G.E., Uchiyama,C.M., Gumpfer,K.L., Iliiev,D., Vinson,V.L., Tavtigian,S.V., and Perry,W.L., III (1998) Microsatellite deletion mapping on

chromosome 10q and mutation analysis of MMAC1, FAS, and MXI1 in human glioblastoma multiforme *Int J. Oncol.* **12**: 905-910.

Gadient,R.A., Otten,U.H. (1997) Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials *Prog.Neurobiol.* **52**: 379-390.

Galasso,J.M., Miller,M.J., Cowell,R.M., Harrison,J.K., Warren,J.S., and Silverstein,F.S. (2000) Acute excitotoxic injury induces expression of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR2, in neonatal rat brain *Exp.Neurol.* **165**: 295-305.

Gerson,S.L. (2002) Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer *J Clin.Oncol.* **20**: 2388-2399.

Giulian,D., Baker,T.J. (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain *J Neurosci.* **6**: 2163-2178.

Giulian,D., Johnson,B., Krebs,J.F., George,J.K., and Tapscott,M. (1991) Microglial mitogens are produced in the developing and injured mammalian brain *J.Cell Biol.* **112**: 323-333.

Gonzalez-Cabrera,P.J., Gaivin,R.J., Yun,J., Ross,S.A., Papay,R.S., McCune,D.F., Rorabaugh,B.R., and Perez,D.M. (2003) Genetic profiling of alpha 1-adrenergic receptor subtypes by oligonucleotide microarrays: coupling to interleukin-6 secretion but differences in STAT3 phosphorylation and gp-130 *Mol.Pharmacol.* **63**: 1104-1116.

Graeber,M.B., Scheithauer,B.W., and Kreutzberg,G.W. (2002) Microglia in brain tumors *Glia* **40**: 252-259.

Gray,C.W., Patel,A.J. (1992) Characterization of a neurotrophic factor produced by cultured astrocytes involved in the regulation of subcortical cholinergic neurons *Brain Res.* **574**: 257-265.

Grove,J.I., Searle,P.F., Weedon,S.J., Green,N.K., McNeish,I.A., and Kerr,D.J. (1999) Virus-directed enzyme prodrug therapy using CB1954 *Anticancer Drug Des* **14**: 461-472.

Gundersen,S., Lote,K., and Hannisdal,E. (1996) Prognostic factors for glioblastoma multiforme--development of a prognostic index *Acta Oncol.* **35 Suppl 8**: 123-127.

Guzy,R.D., Hoyos,B., Robin,E., Chen,H., Liu,L., Mansfield,K.D., Simon,M.C., Hammerling,U., and Schumacker,P.T. (2005) Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing *Cell Metab* **1**: 401-408.

Halatsch,M.E., Schmidt,U., Behnke-Mursch,J., Unterberg,A., and Wirtz,C.R. (2006) Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours *Cancer Treat.Rev.* **32**: 74-89.

Hegi,M.E., zur,H.A., Ruedi,D., Malin,G., and Kleihues,P. (1997) Hemizygous or homozygous deletion of the chromosomal region containing the p16INK4a gene is associated with amplification of the EGF receptor gene in glioblastomas *Int J.Cancer* **73**: 57-63.

Heimberger,A.B., Suki,D., Yang,D., Shi,W., and Aldape,K. (2005) The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients *J.Transl.Med.* **3**: 38.

Hinds,P.W., Weinberg,R.A. (1994) Tumor suppressor genes *Curr.Opin.Genet.Dev.* **4**: 135-141.

Hoyer,D., Clarke,D.E., Fozard,J.R., Hartig,P.R., Martin,G.R., Mylecharane,E.J., Saxena,P.R., and Humphrey,P.P. (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin) *Pharmacol.Rev.* **46**: 157-203.

Hsieh,J.C., Lesniak,M.S. (2005) Surgical management of high-grade gliomas *Expert.Rev.Neurother.* **5**: S33-S39.

Hurst,R.D., Fritz,I.B. (1996) Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier *J.Cell Physiol* **167**: 81-88.

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.

Jaworski,J., Mioduszevska,B., Sanchez-Capelo,A., Figiel,I., Habas,A., Gozdz,A., Proszynski,T., Hetman,M., Mallet,J., and Kaczmarek,L. (2003) Inducible cAMP early repressor, an endogenous antagonist of cAMP responsive element-binding protein, evokes neuronal apoptosis in vitro *J.Neurosci.* **23**: 4519-4526.

- Jellinger,K. (1978) Glioblastoma multiforme: morphology and biology *Acta Neurochir.(Wien.)* **42**: 5-32.
- Joensuu,H., Pupa, M., Sihto,H., Tynninen,O., and Nupponen,N.N. (2005) Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme *J.Pathol.* **207**: 224-231.
- Kaneko,S.J., Gerasimova,T., Smith,S.T., Lloyd,K.O., Suzumori,K., and Young,S.R. (2003) CA125 and UQCERS1 FISH studies of ovarian carcinoma *Gynecol.Oncol.* **90**: 29-36.
- Karcher,S., Steiner,H.H., Ahmadi,R., Zoubaa,S., Vasvari,G., Bauer,H., Unterberg,A., and Herold-Mende,C. (2006) Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas *Int J.Cancer* **118**: 2182-2189.
- Katsura,K., Kristian,T., Nair,R., and Siesjo,B.K. (1994) Regulation of intra- and extracellular pH in the rat brain in acute hypercapnia: a re-appraisal *Brain Res.* **651**: 47-56.
- Kaur,B., Khwaja,F.W., Severson,E.A., Matheny,S.L., Brat,D.J., and Van Meir,E.G. (2005) Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis *Neuro.-oncol.* **7**: 134-153.
- Keffel,S., Alexandrov,A., Goepel,M., and Michel,M.C. (2000) alpha(1)-adrenoceptor subtypes differentially couple to growth promotion and inhibition in Chinese hamster ovary cells *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **272**: 906-911.
- Khodarev,N.N., Yu,J., Labay,E., Darga,T., Brown,C.K., Mauceri,H.J., Yassari,R., Gupta,N., and Weichselbaum,R.R. (2003) Tumour-endothelium interactions in co-culture: coordinated changes of gene expression profiles and phenotypic properties of endothelial cells *J.Cell Sci.* **116**: 1013-1022.
- Kielian,T., Esen,N. (2004) Effects of neuroinflammation on glia-glia gap junctional intercellular communication: a perspective *Neurochem.Int* **45**: 429-436.
- 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.

- Kleihues,P., Lubbe,J., Watanabe,K., von Ammon,K., and Ohgaki,H. (1994) Genetic alterations associated with glioma progression *Verh.Dtsch.Ges.Pathol.* **78**: 43-47.
- Kleihues,P., Ohgaki,H. (2000) Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors *Toxicol.Pathol.* **28**: 164-170.
- Ko,L., Koestner,A., and Wechsler,W. (1980) Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones *Acta Neuropathol.(Berl)* **51**: 23-31.
- Konduri,S., Lakka,S.S., Tasiou,A., Yanamandra,N., Gondi,C.S., Dinh,D.H., Olivero,W.C., Gujrati,M., and Rao,J.S. (2001) Elevated levels of cathepsin B in human glioblastoma cell lines *Int J.Oncol.* **19**: 519-524.
- Kowanetz,M., Ferrara,N. (2006) Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective *Clin.Cancer Res.* **12**: 5018-5022.
- Kreutzberg,G.W. (1995) Microglia, the first line of defence in brain pathologies *Arzneimittelforschung.* **45**: 357-360.
- Kreutzberg,G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS *Trends Neurosci.* **19**: 312-318.
- Lafleur,M.A., Handsley,M.M., Knauper,V., Murphy,G., and Edwards,D.R. (2002) Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs) *J.Cell Sci.* **115**: 3427-3438.
- Lal,P.G., Ghirnikar,R.S., and Eng,L.F. (1996a) Astrocyte-astrocytoma cell line interactions in culture *J.Neurosci.Res.* **44**: 216-222.
- Lal,P.G., Ghirnikar,R.S., and Eng,L.F. (1996b) Astrocytoma and Schwann cells in coculture *Mol.Chem.Neuropathol.* **29**: 93-104.
- Lam,P.Y., Di Tomaso,E., Ng,H.K., Pang,J.C., Roussel,M.F., and Hjelm,N.M. (2000) Expression of p19INK4d, CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme *Br.J.Neurosurg.* **14**: 28-32.

Lamas,M., Monaco,L., Zazopoulos,E., Lalli,E., Tamai,K., Penna,L., Mazzucchelli,C., Nantel,F., Foulkes,N.S., and Sassone-Corsi,P. (1996) CREM: a master-switch in the transcriptional response to cAMP *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **351**: 561-567.

Le Roux,P.D., Reh,T.A. (1995) Independent regulation of primary dendritic and axonal growth by maturing astrocytes in vitro *Neurosci.Lett.* **198**: 5-8.

Le,D.M., Besson,A., Fogg,D.K., Choi,K.S., Waisman,D.M., Goodyer,C.G., Rewcastle,B., and Yong,V.W. (2003) Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade *J.Neurosci.* **23**: 4034-4043.

Levine,A.J., Perry,M.E., Chang,A., Silver,A., Dittmer,D., Wu,M., and Welsh,D. (1994) The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis *Br.J.Cancer* **69**: 409-416.

Li,J., Yen,C., Liaw,D., Podsypanina,K., Bose,S., Wang,S.I., Puc,J., Miliareis,C., Rodgers,L., McCombie,R., Bigner,S.H., Giovanella,B.C., Ittmann,M., Tycko,B., Hibshoosh,H., Wigler,M.H., and Parsons,R. (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer *Science* **275**: 1943-1947.

Lieb,K., Biersack,L., Waschbisch,A., Orlikowski,S., Akundi,R.S., Candelario-Jalil,E., Hull,M., and Fiebich,B.L. (2005) Serotonin via 5-HT7 receptors activates p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C epsilon resulting in interleukin-6 synthesis in human U373 MG astrocytoma cells *J.Neurochem.* **93**: 549-559.

Liu,F., Huang,Y.F., and Kream,B.E. (2005) Identification of novel cAMP responsive element modulator (CREM) isoforms expressed by osteoblasts *Calcif.Tissue Int* **77**: 91-95.

Lomasney,J.W., Cotecchia,S., Lefkowitz,R.J., and Caron,M.G. (1991) Molecular biology of alpha-adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure-function relationships *Biochim.Biophys.Acta* **1095**: 127-139.

Loriaux,M.M., Brennan,R.G., and Goodman,R.H. (1994) Modulatory function of CREB.CREM alpha heterodimers depends upon CREM alpha phosphorylation *J.Biol.Chem.* **269**: 28839-28843.

- Lund-Johansen,M., Engebraaten,O., Bjerkvig,R., and Laerum,O.D. (1990) Invasive glioma cells in tissue culture *Anticancer Res.* **10**: 1135-1151.
- Lundberg,A.S., Weinberg,R.A. (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes *Mol.Cell Biol.* **18**: 753-761.
- MacCorkle,R.A., Tan,T.H. (2005) Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control *Cell Biochem.Biophys.* **43**: 451-461.
- Malek-Hedayat,S., Rome,L.H. (1994) Expression of a beta 1-related integrin by oligodendroglia in primary culture: evidence for a functional role in myelination *J.Cell Biol.* **124**: 1039-1046.
- Marklund,S.L. (1984) Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines *J Clin.Invest* **74**: 1398-1403.
- Marklund,S.L. (1992) Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts *J Biol.Chem.* **267**: 6696-6701.
- Markovic,D.S., Glass,R., Synowitz,M., Rooijen,N., and Kettenmann,H. (2005) Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2 *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* **64**: 754-762.
- Memin,E., Yehia,G., Razavi,R., and Molina,C.A. (2002) ICER reverses tumorigenesis of rat prostate tumor cells without affecting cell growth *Prostate* **53**: 225-231.
- Merzak,A., Koochekpour,S., Fillion,M.P., Fillion,G., and Pilkington,G.J. (1996) Expression of serotonin receptors in human fetal astrocytes and glioma cell lines: a possible role in glioma cell proliferation and migration *Brain Res.Mol.Brain Res.* **41**: 1-7.
- Mioduszewska,B., Jaworski,J., and Kaczmarek,L. (2003) Inducible cAMP early repressor (ICER) in the nervous system--a transcriptional regulator of neuronal plasticity and programmed cell death *J.Neurochem.* **87**: 1313-1320.
- Molina,C.A., Foulkes,N.S., Lalli,E., and Sassone-Corsi,P. (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor *Cell* **75**: 875-886.

- Muller,S., Lamszus,K., Nikolich,K., and Westphal,M. (2004) Receptor protein tyrosine phosphatase zeta as a therapeutic target for glioblastoma therapy *Expert.Opin.Ther.Targets*. **8**: 211-220.
- Muramatsu,H., Kogawa,K., Tanaka,M., Okumura,K., Nishihori,Y., Koike,K., Kuga,T., and Niitsu,Y. (1995) Superoxide dismutase in SAS human tongue carcinoma cell line is a factor defining invasiveness and cell motility *Cancer Res*. **55**: 6210-6214.
- Nakamizo,A., Marini,F., Amano,T., Khan,A., Studeny,M., Gumin,J., Chen,J., Hentschel,S., Vecil,G., Dembinski,J., Andreeff,M., and Lang,F.F. (2005) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas *Cancer Res*. **65**: 3307-3318.
- Norris,J.G., Benveniste,E.N. (1993) Interleukin-6 production by astrocytes: induction by the neurotransmitter norepinephrine *J Neuroimmunol*. **45**: 137-145.
- Nowacki,P., Tabaka,J., Jezewski,D., and Honczarenko,K. (2004) [Diagnosis of brain gliomas in stereotactic biopsy assisted by optical neuro-navigation system] *Neurol.Neurochir.Pol*. **38**: 3-8.
- Ohashi,Y., Kaneko,S.J., Cupples,T.E., and Young,S.R. (2004) Ubiquinol cytochrome c reductase (UQCRFS1) gene amplification in primary breast cancer core biopsy samples *Gynecol.Oncol*. **93**: 54-58.
- Ohgaki,H., Kleihues,P. (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas *J.Neuropathol.Exp.Neurol*. **64**: 479-489.
- Oliveira,R., Christov,C., Guillamo,J.S., de Bouard,S., Palfi,S., Venance,L., Tardy,M., and Peschanski,M. (2005) Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas *BMC.Cell Biol*. **6**: 7.
- Ou,X.M., Jafar-Nejad,H., Storrington,J.M., Meng,J.H., Lemonde,S., and Albert,P.R. (2000) Novel dual repressor elements for neuronal cell-specific transcription of the rat 5-HT1A receptor gene *J.Biol.Chem*. **275**: 8161-8168.

Pace,A., Bove,L., Innocenti,P., Pietrangeli,A., Carapella,C.M., Oppido,P., Raus,L., Occhipinti,E., and Jandolo,B. (1998) Epilepsy and gliomas: incidence and treatment in 119 patients *J Exp.Clin.Cancer Res.* **17**: 479-482.

Papadopoulos,M.C., Saadoun,S., Davies,D.C., and Bell,B.A. (2001) Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema *Br.J.Neurosurg.* **15**: 101-108.

Patel,Y., Collaco,M.Y., Latchman,D., Coffin,R., and de Bellerocche,J. (2002) Neuroprotective effects of copper/zinc-dependent superoxide dismutase against a wide variety of death-inducing stimuli and proapoptotic effect of familial amyotrophic lateral sclerosis mutations *Brain Res.Mol.Brain Res.* **109**: 189-197.

Pekny,M., Eliasson,C., Chien,C.L., Kindblom,L.G., Liem,R., Hamberger,A., and Betsholtz,C. (1998) GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density *Exp.Cell Res.* **239**: 332-343.

Penne,K., Bohlin,C., Schneider,S., and Allen,D. (2005) Gefitinib (Iressa, ZD1839) and tyrosine kinase inhibitors: the wave of the future in cancer therapy *Cancer Nurs.* **28**: 481-486.

Perry,V.H. (1998) A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation *J Neuroimmunol.* **90**: 113-121.

Prat,E., Baron,P., Meda,L., Scarpini,E., Galimberti,D., Ardolino,G., Catania,A., and Scarlato,G. (2000) The human astrocytoma cell line U373MG produces monocyte chemotactic protein (MCP)-1 upon stimulation with beta-amyloid protein *Neurosci.Lett.* **283**: 177-180.

Puzzilli,F., Ruggeri,A., Mastronardi,L., Di Stefano,D., and Lunardi,P. (1998) Long-term survival in cerebral glioblastoma. Case report and critical review of the literature *Tumori* **84**: 69-74.

Raizer,J.J. (2005) HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme *J Neurooncol.* **74**: 77-86.

Ramnarain,D.B., Park,S., Lee,D.Y., Hatanpaa,K.J., Scoggin,S.O., Otu,H., Libermann,T.A., Raisanen,J.M., Ashfaq,R., Wong,E.T., Wu,J., Elliott,R., and Habib,A.A. (2006) Differential

gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells *Cancer Res.* **66**: 867-874.

Sait,S.N., Qadir,M.U., Conroy,J.M., Matsui,S., Nowak,N.J., and Baer,M.R. (2002) Double minute chromosomes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: identification of new amplification regions by fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping *Genes Chromosomes.Cancer* **34**: 42-47.

Sansal,I., Sellers,W.R. (2004) The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway *J.Clin.Oncol.* **22**: 2954-2963.

Scherer J.H. (1940) *American Journal of Cancer.* **40**: 159-198.

Schiebe,M., Ohneseit,P., Hoffmann,W., Meyermann,R., Rodemann,H.P., and Bamberg,M. (2000) Analysis of mdm2 and p53 gene alterations in glioblastomas and its correlation with clinical factors *J.Neurooncol.* **49**: 197-203.

Schneider,J., Bunes,A., Huber,W., Volz,J., Kioschis,P., Hafner,M., Poustka,A., and Sultmann,H. (2004) Systematic analysis of T7 RNA polymerase based in vitro linear RNA amplification for use in microarray experiments *BMC.Genomics* **5**: 29.

Senger,D., Cairncross,J.G., and Forsyth,P.A. (2003) Long-term survivors of glioblastoma: statistical aberration or important unrecognized molecular subtype? *Cancer J* **9**: 214-221.

Shen,H., Peri,K.G., Deng,X.F., Chemtob,S., and Varma,D.R. (2000) Distribution of alpha1-adrenoceptor subtype proteins in different tissues of neonatal and adult rats *Can.J Physiol Pharmacol.* **78**: 237-243.

Slegers,H., Joniau,M. (1996) Lipopolysaccharide-enhanced expression of interleukin-6 in dibutyryl cyclic AMP-differentiated rat C6 glioma *J Neurochem.* **66**: 466-473.

Storring,J.M., Charest,A., Cheng,P., and Albert,P.R. (1999) TATA-driven transcriptional initiation and regulation of the rat serotonin 5-HT1A receptor gene *J.Neurochem.* **72**: 2238-2247.

Stupp

R.,M.W.P.v.d.B.M.J.W.M.F.B.T.M.J.B.K.B.A.A.M.C.B.U.C.J.J.R.C.L.S.K.G.T.A.A.L.D.C.J.

G.E.E.M.R.O. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352(10)**: 987-996.

Su,W.Y., Folz,R., Chen,J.S., Crapo,J.D., and Chang,L.Y. (1997) Extracellular superoxide dismutase mRNA expressions in the human lung by in situ hybridization *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* **16**: 162-170.

Sun,G., Kinter,M.T., and Anderson,V.E. (2003) Mass spectrometric characterization of mitochondrial electron transport complexes: subunits of the rat heart ubiquinol-cytochrome c reductase *J.Mass Spectrom.* **38**: 531-539.

Takanaga,H., Yoshitake,T., Hara,S., Yamasaki,C., and Kunimoto,M. (2004) cAMP-induced astrocytic differentiation of C6 glioma cells is mediated by autocrine interleukin-6 *J.Biol.Chem.* **279**: 15441-15447.

Takano,S., Tsuboi,K., Matsumura,A., and Nose,T. (2003) Anti-vascular endothelial growth factor antibody and nimustine as combined therapy: effects on tumour growth and angiogenesis in human glioblastoma xenografts *Neuro.-oncol.* **5**: 1-7.

Tanaka,M., Kogawa,K., Nishihori,Y., Kuribayashi,K., Nakamura,K., Muramatsu,H., Koike,K., Sakamaki,S., and Niitsu,Y. (1997) Suppression of intracellular Cu-Zn SOD results in enhanced motility and metastasis of Meth A sarcoma cells *Int J.Cancer* **73**: 187-192.

Thier,M., Marz,P., Otten,U., Weis,J., and Rose-John,S. (1999) Interleukin-6 (IL-6) and its soluble receptor support survival of sensory neurons *J Neurosci.Res.* **55**: 411-422.

Tsacopoulos,M. (2002) Metabolic signaling between neurons and glial cells: a short review *J.Physiol Paris* **96**: 283-288.

Ulbricht,U., Brockmann,M.A., Aigner,A., Eckerich,C., Muller,S., Fillbrandt,R., Westphal,M., and Lamszus,K. (2003) Expression and function of the receptor protein tyrosine phosphatase zeta and its ligand pleiotrophin in human astrocytomas *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* **62**: 1265-1275.

Van Wagoner,N.J., Benveniste,E.N. (1999) Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes *J.Neuroimmunol.* **100**: 124-139.

Van Wagoner,N.J., Oh,J.W., Repovic,P., and Benveniste,E.N. (1999) Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor *J.Neurosci.* **19**: 5236-5244.

Vince,G.H., Herbold,C., Klein,R., Kuhl,J., Pietsch,T., Franz,S., Roosen,K., and Tonn,J.C. (2001) Medulloblastoma displays distinct regional matrix metalloprotease expression *J Neurooncol.* **53**: 99-106.

von Deimling,A., Eibl,R.H., Ohgaki,H., Louis,D.N., von Ammon,K., Petersen,I., Kleihues,P., Chung,R.Y., Wiestler,O.D., and Seizinger,B.R. (1992a) p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma *Cancer Res.* **52**: 2987-2990.

von Deimling,A., Louis,D.N., von Ammon,K., Petersen,I., Hoell,T., Chung,R.Y., Martuza,R.L., Schoenfeld,D.A., Yasargil,M.G., Wiestler,O.D., and . (1992b) Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme *J.Neurosurg.* **77**: 295-301.

Wagner,S., Czub,S., Greif,M., Vince,G.H., Suss,N., Kerkau,S., Rieckmann,P., Roggendorf,W., Roosen,K., and Tonn,J.C. (1999) Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas *Int J Cancer* **82**: 12-16.

Waldrop,B.A., Mastalerz,D., Piascik,M.T., and Post,G.R. (2002) alpha(1B)- and alpha(1D)-Adrenergic receptors exhibit different requirements for agonist and mitogen-activated protein kinase activation to regulate growth responses in rat 1 fibroblasts *J Pharmacol.Exp.Ther.* **300**: 83-90.

Wang,C.Y., Li,F., Yang,Y., Guo,H.Y., Wu,C.X., and Wang,S. (2006) Recombinant baculovirus containing the diphtheria toxin A gene for malignant glioma therapy *Cancer Res.* **66**: 5798-5806.

Wang,W.C., Lee,N., Aoki,D., Fukuda,M.N., and Fukuda,M. (1991) The poly-N-acetyllactosamines attached to lysosomal membrane glycoproteins are increased by the prolonged association with the Golgi complex *J.Biol.Chem.* **266**: 23185-23190.

Willems,J., Zwijsen,A., Slegers,H., Nicolai,S., Bettadapura,J., Raymackers,J., and Scarcez,T. (1993) Purification and sequence of rat extracellular superoxide dismutase B secreted by C6 glioma *J Biol.Chem.* **268**: 24614-24621.

Wissink,S., Meijer,O., Pearce,D., van Der,B.B., and Der Saag,P.T. (2000) Regulation of the rat serotonin-1A receptor gene by corticosteroids *J.Biol.Chem.* **275**: 1321-1326.

Yanagisawa,M., Nakashima,K., and Taga,T. (1999) STAT3-mediated astrocyte differentiation from mouse fetal neuroepithelial cells by mouse oncostatin M *Neurosci.Lett.* **269**: 169-172.

Yehia,G., Razavi,R., Memin,E., Schlotter,F., and Molina,C.A. (2001) The expression of inducible cAMP early repressor (ICER) is altered in prostate cancer cells and reverses the transformed phenotype of the LNCaP prostate tumor cell line *Cancer Res.* **61**: 6055-6059.

Yin,D., Zhou,H., Kumagai,T., Liu,G., Ong,J.M., Black,K.L., and Koeffler,H.P. (2005) Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM) *Oncogene* **24**: 344-354.

Zhang,M., Chakravarti,A. (2006) Novel radiation-enhancing agents in malignant gliomas *Semin.Radiat.Oncol.* **16**: 29-37.

Zhang,W., Nwagwu,C., Le,D.M., Yong,V.W., Song,H., and Couldwell,W.T. (2003) Increased invasive capacity of connexin43-overexpressing malignant glioma cells *J.Neurosurg.* **99**: 1039-1046.

Zhang,Y., Zhao,W., Zhang,H.J., Domann,F.E., and Oberley,L.W. (2002) Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth *Cancer Res.* **62**: 1205-1212.

6. Curriculum vitae

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

7. Erklärung

„Ich, Tanja Matschulat, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Differentielle Genexpressionsanalyse in Gliomzellen nach Interaktion mit Mikroglia selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum :.....

Unterschrift:.....