

AUS DER ABTEILUNG
FÜR NEUROPATHOLOGIE
LEITER: PROF. DR. MED. MARKUS J. RIEMENSCHNEIDER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

FUNKTIONELLE ANALYSE DES DIRAS3-GENS IN GLIOMZELLINIEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Matthias Florian Hessenauer

2019

AUS DER ABTEILUNG
FÜR NEUROPATHOLOGIE
LEITER: PROF. DR. MED. MARKUS J. RIEMENSCHNEIDER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

FUNKTIONELLE ANALYSE DES DIRAS3-GENS IN GLIOMZELLINIEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Matthias Florian Hessenauer

2019

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

Prof. Dr. Markus J. Riemenschneider

Prof. Dr. Martin Proescholdt

18.03.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
<i>1.1 Tumore des Zentralen Nervensystems und epidemiologische Bedeutung der Gliome</i>	2
<i>1.2 WHO Klassifikation der Gliome</i>	3
1.2.1 Definition der WHO-Grade nach histopathologischen Kriterien	4
1.2.2 Bedeutende molekulare Marker der einzelnen Tumorentitäten nach der revidierten vierten Edition der WHO Klassifikation der Hirntumore (2016)	5
1.2.2.1 IDH Mutation	5
1.2.2.2 1p19q-Kodeletion	5
1.2.2.3 hTERT und ATRX Mutationen	5
1.2.2.4 MGMT Promotor Methylierung	6
1.2.3 Astrozytäre und oligodendrogliale Tumore beim Erwachsenen	6
1.2.3.1 Astrozytome	6
1.2.3.2 Oligodendrogliome	9
<i>1.3 Erstlinien-Therapieverfahren bei Astrozytomen und Oligodendrogliomen</i>	11
1.3.1 Temozolomid	12
1.3.2 PCV	12
<i>1.4 DIRAS3</i>	14
1.4.1 DIRAS3 in Gliomen	15
<i>1.5 Fragestellung dieser Arbeit</i>	17
2 Material und Methoden	18
2.1 <i>Materialien</i>	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur	19
2.1.3 Versuchsmaterialien	20
2.1.4 Software	24

2.2	<i>Methoden</i>	24
2.2.1	Arbeiten mit HS683 und U251 Gliomzelllinien	25
2.2.2	Molekularbiologische Techniken	25
2.2.2.1	DNA und RNA Extraktion	25
2.2.2.2	Synthese von cDNA mittels Reverse Transkriptase	26
2.2.2.3	Quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	26
2.2.3	Funktionelle Assays	27
2.2.3.1	Proliferationsassay mit CellTiter 96® AqueousOne Solution (Promega)	27
2.2.3.2	Proliferationsassay mit Bromdesoxyuridin	28
2.2.3.3	Chemoresistenztestung durch Bestimmung der mittleren Inhibitorischen Konzentration IC50	29
2.2.3.4	Migrationsveruche: Wound healing Assay	30
2.2.3.5	Matrigel Invasionsassay (Transwell-System)	31
2.2.4	Apoptosemessung	32
2.2.4.1	FACS-gestützte Quantifizierung apoptotischer Zellen	32
2.2.4.2	FACS-gestützte Quantifizierung apoptotischer Zellen mit Lomustin Behandlung	34
2.2.4.3	FACS-gestützte Zellzyklusanalyse durch statische Ploidiebestimmung	34
2.2.5	Proteome Profiling	37
3	Ergebnisse	38
3.1	<i>Datenbankanalyse zu DIRAS3-Expression</i>	38
3.1.1	Natürliche DIRAS3 Expression im Gehirn und anderen Organen	38
3.1.2	DIRAS3 Expression in Gliomen im Vergleich mit anderen soliden Tumoren	39
3.1.3	Effekt der DIRAS3-Expression im Bezug auf das Gesamtüberleben	40
3.2	<i>Selektion der DIRAS3-shRNA Klone durch Expressionsanalyse</i>	42
3.3	<i>Proliferationsassays</i>	44
3.4	<i>Chemoresistenztestung durch Bestimmung der mittleren Inhibitorischen Konzentration IC50 mit Hilfe des CellTiter Blue® Cell Viability Assay</i>	48
3.4.1	Temozolomid	49

3.4.2 Procarbazin	50
3.4.3 Lomustin (CCNU)	51
3.4.4 Vincristin	52
3.5 <i>Apoptosemessung</i>	53
3.5.1 Apoptosemessung mittels FITC-Annexin V	53
3.5.2 Apoptosemessung mittels FITC Annexin V unter Lomustinbehandlung	54
3.6 <i>Migrations- und Invasionsversuche</i>	55
3.7 <i>Proteome Profiler Array</i>	57
3.8 <i>Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse</i>	60
4 Diskussion	61
4.1 <i>Einordnung der Ergebnisse</i>	61
4.2 <i>Kritische Methodendiskussion</i>	65
4.3 <i>Ausblick</i>	66
5 Zusammenfassung	68
Literaturverzeichnis	69
Abbildungsverzeichnis	77
Tabellenverzeichnis	79
Erklärung zur eigenständigen Anfertigung	80
Danksagung	81

Abkürzungsverzeichnis

A	<i>Astrozytom</i>	GBM	<i>Glioblastom WHO IV</i>
AKT	<i>Protein Kinase B</i>	GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
AMP	<i>Adenosinmonophosphat</i>	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
AMPK	<i>AMP activated protein kinase</i>	GLUT4	<i>Glucose transporter 4</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>	GSK3	<i>Glykogensynthase Kinase 3</i>
ARHI	<i>Ras homolog gene family, member 1</i>	Gy	<i>Gray</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated kinase</i>	HSP60	<i>heat shock protein 60</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>	hTERT	<i>humane Telomerase reverse Transkriptase</i>
ATRX	<i>α-thalassemia/mental retardation syndrome</i> <i>X-linked</i>	IC50	<i>inhibitory concentration 50</i>
BECN1	<i>Beclin 1</i>	IDH	<i>Isocytatdehydrogenase</i>
BP	<i>Basenpaar</i>	JAK	<i>Janus-kinase, Janus-kinase</i>
BrdU	<i>Bromdesoxyuridin, Bromdesoyuridin</i>	KM-MRT	<i>Kontrastmittel-Magnresonanztomografie</i>
Caspase	<i>cystein.aspartic acid-specific protease</i>	LC3	<i>light chain 3</i>
CCNU	<i>Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea</i>	LOH	<i>Loss of Heterozygoty</i>
CDKN2A	<i>für cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A</i>	max.	<i>maximal</i>
Chk-2	<i>checkpoint kinase 2</i>	MDM	<i>mouse double minute homolog</i>
CIMP	<i>CpG-Island Methylator Phenotyp</i>	mDT	<i>gemittelte Verdopplungszeit in Tagen</i>
CpG	<i>Desoxycytidin – Phosphorsäure –</i> <i>Desoxyguanosin</i>	MET	<i>tyrosine-protein kinase Met</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>	MGMT	<i>O6-Methylguanin-DNA-Methyl-Transferase</i>
CTCF	<i>CCCTC-Binding Factor</i>	MSK-1	<i>Mitogen and stress activated kinase 1</i>
Dicer	<i>Endoribonukleaseenzym</i>	mTOR	<i>mammalian traget of rapamycin</i>
DIRAS3	<i>Distinct subgroup of the Ras Family,</i> <i>member 3</i>	MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-</i> <i>carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-</i> <i>tetrazolium, inner salt</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>	MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-</i> <i>diphenyltetrazoliumbromid</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>	N.	<i>Nucleus, Nucleus</i>
Drosha	<i>Endoribonukleaseenzym</i>	NAD ⁺	<i>Nicotinamidadenindinukleotid</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>	n _b	<i>Anzahl biologischer Replikate</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	NF1	<i>neurofibromatosis 1- gene</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of</i> <i>activated B-cells</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal regulated Kinase</i>	ns	<i>nicht signifikant</i>
expO	<i>expression project for oncology</i>	n _t	<i>Anzahl technischer Replikate</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>	O	<i>Oligodenrogliom</i>
FBS	<i>fötales Rinderserum</i>	OA	<i>Oligoastrozytom</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>	p53	<i>Protein 53kDa</i>
FSC	<i>Vorwärtsstreulicht</i>	PA	<i>Pilozytisches Astrozytom</i>
G0	<i>Gap 0 Ruhephase</i>	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
G1	<i>Gap 1-Phase</i>	PC	<i>Personal Computer</i>
G2/M	<i>Gap2-Phase/Mitosephase, G2-</i> <i>Phase/Mitosephase</i>	PCV	<i>Procarbazin CCNU Vincristin</i>
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-</i> <i>Dehydrogenase</i>	PDGFRA	<i>platelet-derived growth factor receptor A</i>
		Pen/Strep	<i>Penicillin Streptomycin</i>

PI <i>Propidiumiodid</i>	SQSTM1 <i>sequestosome1</i>
PI3K <i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>	SSC <i>Seitwärtsstreulicht</i>
PRAS40 <i>Proline rich AKT substrate: 40kD = AKT1S1, proline rich AKT substrate 40kDa</i>	STAT <i>Signal transducer and activator of translation</i>
PTEN <i>Phosphatase and tensin homolog</i>	Streptavidin-HRP <i>Streptavidin-horseradish- peroxidase</i>
RHOA <i>Ras homolog gene family, member A</i>	T <i>Threonin</i>
RNA induced silencing complex <i>RNA induced silencing complex</i>	TCGA <i>the cancer genome atlas, the cancer genome atlas</i>
RPM <i>rounds per minute</i>	TP53 <i>Tumorsuppressorprotein 53 kD</i>
RTKs <i>Rezeptortyrosinkinasen</i>	t-RNA <i>transfer-RNA</i>
RTOG <i>Radiation Therapy Oncology Group</i>	ULK1 <i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>
S <i>Serin, Synthese Phase (DNA Replikation)</i>	Wnt <i>wingless Int-1</i>
shCTRL <i>Kontrollklon transfiziert mit Kontroll shRNA</i>	wt <i>Wildtyp</i>
shD3.xKx <i>DIRAS3-shRNA transfizierter Klon und Nummerierung</i>	Y <i>Tyrosin</i>
shRNA <i>short-hairpin RNA</i>	ZNS <i>Zentrales Nervensystem</i>
	α -KG <i>α-Ketoglutarat</i>

Einleitung

1 Einleitung

Erkrankungen zu verstehen und aus diesem Verständnis heraus Heilungsansätze zu entwickeln ist die Triebfeder medizinischen Fortschritts und der Verbesserung angewandter Therapien. Besonders im Feld der Onkologie ist seit langem klar, Tumore können zwar durch radiologische und histologische Parameter kategorisiert und klassifiziert werden, trotzdem ist das Ansprechen auf Therapien von Patient zu Patient verschieden. Gerade bei der Therapie maligner Neoplasien des Zentralen Nervensystems ist eine exakte initiale pathologische Diagnostik entscheidend für die Wahl der richtigen Therapie. Die Wirksamkeitsspanne der gängigen Therapieschemata, insbesondere bei Glioblastomen, ist nur sehr kurz. Deshalb sind regelmäßige bildgebende Verlaufskontrollen, aber auch Monitoring auf molekularer Ebene wichtig für die weitere Behandlung: Der Entwicklung therapieresistenter Tumore liegen Veränderungen des Genoms und Epigenoms zugrunde. Die Relevanz der molekularpathologischen Aufarbeitung der Tumorbiopsien zeigt sich auch in den Modifikationen, die an der WHO-Klassifikation der Gliome zwischen 2007 und 2016 vorgenommen wurden: Zwar spielen histologisch-morphologische Charakteristika nach wie vor eine große Rolle um Tumorentitäten zu definieren, aber molekulargenetische Marker wie *IDH*-Mutation oder 1p19q Kodeletion sind mittlerweile oftmals maßgeblich für die Klassifizierung bestimmter Tumorentitäten und deren Therapie.

Eine große Herausforderung der Medizin des 21. Jahrhunderts ist es, durch hochspezifische Diagnostik für den jeweiligen Patienten ein individuelles Therapiekonzept zu erstellen, um die Erkrankung des Einzelnen möglichst effizient zu behandeln. Entscheidende technische Fortschritte der letzten 20 Jahre haben es möglich gemacht molekulare Diagnostik breiter einzusetzen und so dem Ziel der individuellen Therapie immer näher zu kommen. Verbesserte Diagnostik-Werkzeuge wie 3rd Generation Sequencing bieten aber auch die Möglichkeit, neue Marker zu finden und schaffen die Notwendigkeit diese zu evaluieren und somit bereits individualisierte Therapieansätze weiterzuentwickeln. Dazu soll die folgende Arbeit durch die Funktionsanalyse des *DIRAS3*-Gens in Gliomzelllinien einen Beitrag leisten.

1.1 Tumore des Zentralen Nervensystems und epidemiologische Bedeutung der Gliome

Bösartige Neubildungen des Nervensystems betreffen zu 95% das Gehirn inklusive des Hirnstamms, weitere fünf Prozent der Neoplasien entstehen in Meningen, Hirnnerven, Rückenmarkshäuten, dem Rückenmark sowie den Spinalnerven. Das Gros der Tumorerkrankungen ist gliomatösen Ursprungs, wovon etwa 2/3 der Neoplasien Glioblastome und weitere 15% Astrozytome darstellen. In Deutschland wurde im Jahr 2010 bei knapp 7000 Personen eine Tumorerkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) diagnostiziert, wobei etwa 4000 Männer und 3000 Frauen betroffen waren. Auch wenn ZNS-Tumore in jedem Lebensalter auftreten steigt das Risiko mit zunehmendem Alter. Auffällig ist hierbei die ungleiche Geschlechterverteilung der Erkrankungs- und Sterberaten, Männer erkranken im Schnitt im Alter von 61 Jahren, Frauen dagegen im Mittel mit 67 Jahren(1).

Daten des Central Brain Tumor Registry der USA geben Aufschluss über die Altersgruppenverteilung der ZNS-Tumore sowie über die genauen Anteile der einzelnen Tumorentitäten an der Gesamtzahl der Hirntumorerkrankungen: In der Altersgruppe von 0-19 Jahren stellen die ZNS-Tumoren mit einer Inzidenz von 5,42 pro 100 000, noch vor den Leukämien mit einer Inzidenz von 4,49 pro 100 000, die häufigste Tumormanifestation dar. In der Altersgruppe über 20 Jahren liegt die Inzidenz der ZNS-Tumore bei 27,86 pro 100 000, die häufigsten Tumorlokalisationen in dieser Altersgruppe sind Brust und Prostata mit Inzidenzraten von 201,4 bzw. 171,2 pro 100 000.

Von den erfassten ZNS-Tumoren werden 33,7% als maligne und 66,3% als nicht maligne Tumore eingestuft. Bei 80 % der malignen ZNS-Tumore handelt es sich um Gliome, wobei davon das Glioblastom mit 45,6% den höchsten Anteil ausmacht, weitere 17,4% fallen auf die Astrozytome, 4,9 % auf die Oligodendrogliome und weitere 2,7% auf die Oligoastrozytome(2).

Einleitung

1.2 WHO Klassifikation der Gliome

Die aktuelle vierte revidierte Edition der WHO Klassifikation der Gliome aus dem Jahr 2016 teilt die verschiedenen Tumorentitäten nach histologischen Kriterien ein, die in ihren Grundzügen noch auf die erste von Cushing und Bailey veröffentlichte Klassifikation zurückgehen. Andererseits spiegelt sie auch die Entwicklung der letzten Jahre wieder, die der Charakterisierung des Genotyps der Tumore eine immer wichtigere Rolle hinsichtlich Prognose und Therapiekonzepten zuspricht(3,4). Die gegenwärtige Forschung versucht die neu entdeckten tumorspezifischen Veränderungen mit der bestehenden histologischen Einteilung zu korrelieren. Dabei kristallisiert sich zunehmend heraus, dass die genetische Charakterisierung der Hirntumore der histo-morphologischen Einteilung gleichwertig, wenn nicht gar überlegen ist(5,6). Dies liegt einerseits daran, dass der Nachweis genetischer Veränderungen objektiver gelingt als die untersucherabhängige mikroskopische Identifikation morphologischer Charakteristika(6). Wichtiger ist jedoch noch die Tatsache, dass anhand genetischer Charakteristika eher eine Aussage bezüglich der Wirksamkeit bestimmter Therapien bzw. der Gesamtüberlebenschance des jeweiligen Patienten getroffen werden kann, da sie teilweise in einem direkten kausalen Zusammenhang zu diesen Punkten stehen. So setzt sich die exakte Diagnose eines Glioms aus 3 Bestandteilen zusammen:

- 1) dem histologischen Subtyp,
- 2) der histologischen WHO Gradierung,
- 3) den molekulargenetischen Informationen(7).

Ist eine molekulare Charakterisierung nicht möglich werden die Tumore als "not otherwise specified" eingeordnet(5). Im folgenden Abschnitt wird das Prinzip der histologischen Einteilung nach WHO Graden dargestellt, weiter werden wichtige molekulare Marker in Funktion und Bedeutung erklärt und schließlich werden die beim Erwachsenen vorkommenden diffusen Astrozytome und Oligodendrogliome hinsichtlich molekularer Charakteristika, makroskopischem Aspekt und histologischer Einteilung zusammenfassend vorgestellt.

1.2.1 Definition der WHO-Grade nach histopathologischen Kriterien

Die WHO Gradierung der ZNS-Tumore hat die Aufgabe einer Malignitätsskala, die die histomorphologische Erscheinung des jeweiligen Tumors mit einer prognostischen Aussage in Verbindung zu setzen sucht. Jede Tumorentität ist dabei mit ihrem WHO Grad fest verknüpft. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Tumorentitäten, die WHO Grade und ihre histomorphologischen Diagnosekriterien(8).

Tab.: 1 WHO Grad und Histopathologie astrozytärer und oligodendroglialer Gliome (3) (8)

WHO Grad	Definition	Histopathologie				Tumortyp
		Atypie- zeichen	Mitose	Mikrovaskuläre Proliferation	Nekrose	
I	Umschriebener gering proliferativer Tumor, rein chirurgische kurative Therapie möglich	+	-	-	-	Pilozytisches Astrozytom Subependymales Riesenzell-Astrozytom Pleomorphes Xanthoastrozytom
II	Infiltratives aber langsames Wachstum, Tendenz zu Rezidivierung und Progression	+	-	-	-	Diffuses Astrozytom, Oligodendrogliom
III	Rasches infiltratives Wachstum, Malignisierung	+	+	-	-	Anaplastisches Astrozytom, anaplastisches Oligodendrogliom
IV	Schnelle infiltrative Tumorausdehnung, malignes Verhalten, häufig letale Verläufe in kurzer Zeit	+	+	±	±	Primäres Glioblastom, sekundäres Glioblastom

Einleitung

Dieses Gradierungssystem wird erfolgreich für die Tumore astrozytären und oligodendroglialen Ursprungs eingesetzt und ist in weiten Teilen auf andere ZNS-Tumore übertragbar(9).

1.2.2 Bedeutende molekulare Marker der einzelnen Tumorentitäten nach der revidierten vierten Edition der WHO Klassifikation der Hirntumore (2016)

1.2.2.1 *IDH Mutation*

IDH (Isocitratdehydrogenase) 1- und *IDH2*-Mutationen kommen in astrozytären und oligodendroglialen Tumoren vor. Im Citratzyklus katalysiert die Isocitratdehydrogenase die Oxidation von Isocitrat zu α -Ketoglutarat (α -KG) unter Gewinnung von NADH^+ . Bei heterozygoter *IDH*-Mutation kommt es stattdessen zur Bildung von D-2-Hydroxyglutarat, einem Onkometabolit, der in den Tumorzellen akkumuliert und zu epigenetischen Veränderungen wie DNA Methylierung und Histonmodifikationen führt. Die Folge sind Hypermethylierungen insbesondere an CpG-reichen Regionen. Es kommt zur Ausprägung des CIMP (CpG-Island Methylator Phenotyp)(10).

Die *IDH*-Mutation ist typisch bei jüngeren Patienten mit frontaler Lokalisation des Glioms, und geht mit einer besseren Prognose verglichen mit *IDH*-wt Gliomen einher(11).

1.2.2.2 *1p19q-Kodeletion*

Die 1p19q-Kodeletion bedeutet den Verlust der Heterozygotie (LOH) der Chromosomarme 1p und 19q. In Kombination mit einer *IDH1* oder *IDH2* Mutation ist dieser LOH mittlerweile ein diagnostischer Biomarker für oligodendrogliale Tumore(5), und bedeutet eine verbesserte Prognose bei vollständiger Kodeletion im Vergleich zu den nicht 1p19q co-deletierten oder nur teildeletierten Tumoren WHO (II-III)(6,12). Zudem ist die 1p19q Co-deletion ein prädiktiver Marker für ein besseres Ansprechen der Tumore auf kombinierte Radio-Chemotherapie mit PCV (Kombinationschemotherapie aus Procarbazin, CCNU, Vincristin) verglichen mit alleiniger Strahlentherapie(13–15).

1.2.2.3 *hTERT und ATRX Mutationen*

Durch Verlängerung der Chromosomenenden umgehen Tumorzellen die natürliche Zellalterung. In Gliomen gibt es zwei charakteristische Mutationen, die diesen Mechanismus auslösen: 1) Aktivierende Mutationen im *hTERT* (humane Telomerase

reverse Transkriptase) Promotor steigern die Telomeraseaktivität und somit die Verlängerung der Telomere. 2) Inaktivierende Mutationen im *ATRX*-Gen (α -thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) führen zu einer Störung des Histons H3.3 und damit des "chromatin remodelling complexes". Interessanterweise sind *hTERT* Mutationen häufig bei IDH mutierten und 1p19q co-deletierten Oligodendrogliomen und bei *IDH*-wt - Astrozytomen und Glioblastomen nachweisbar. *ATRX* Mutationen sind dagegen eher bei *IDH* mutierten Astrozytomen und Glioblastomen zu finden(6,7).

1.2.2.4 MGMT Promotor Methylierung

Die O6-Methylguanin-DNA-Methyl-Transferase (MGMT) ist ein DNA-Reparatur Enzym, welches in der Lage ist die Alkylierung der DNA durch bestimmte Chemotherapeutika wie z.B. Temozolomid rückgängig zu machen. Alkylanzien stören die DNA Replikation und induzieren somit Apoptose in der Zelle. Durch Aktivierung von MGMT entsteht also ein Resistenzmechanismus gegenüber Alkylanzien. Ist jedoch der Promotor des *MGMT*-Gens durch Methylierung inaktiviert, wird kein oder weniger *MGMT* exprimiert und der Resistenzmechanismus außer Kraft gesetzt. *MGMT*-Promotormethylierung geht meist mit *IDH*-Mutation einher, da diese eine DNA Hypermethylierung bewirkt(7).

1.2.3 Astrozytäre und oligodendrogliale Tumore beim Erwachsenen

1.2.3.1 Astrozytome

Neoplasien astrozytären Ursprungs kann man bezüglich ihres Wachstums in zwei Untergruppen einteilen: Die seltenen lokal und vom umliegenden Gewebe abgegrenzt wachsenden Tumore, z. B. pilozytische Astrozytom, das pleomorphe Xanthoastrozytom oder das subependymale Riesenzellastrozytom auf der einen Seite, und die häufigeren diffus in das umliegende Hirngewebe infiltrierend wachsenden Astrozytome (WHO Grad II und höher) auf der anderen(16). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den diffusen Astrozytomen (WHO II und höher) weshalb auf die zirkumskripten Astrozytome hier nicht näher eingegangen werden soll.

Auffällig sind bei den diffus wachsenden Astrozytomen altersabhängige Lokalisationsmuster: So kommen im Kindesalter vor allem Tumore im Hirnstamm vor, während Astrozytome im Erwachsenenalter eher das Großhirn betreffen. Mit etwa 50% aller primär neuroepithelialer intrakranieller Tumore ist das Glioblastom gleichzeitig der häufigste wie auch der am weitesten entdifferenzierte Tumor (9).

Einleitung

1.2.3.1.1 diffuse Astrozytome WHO Grad II-III

Häufig manifestiert sich ein diffuses Astrozytom erstmalig in der dritten oder vierten Lebensdekade. Eines der bedeutendsten Charakteristika der diffusen Astrozytome ist ihr Hang zur weiteren anaplastischen Transformation. 50-75% der Tumore durchlaufen einen Progress vom diffusen Astrozytom über das anaplastische Astrozytom und bis hin zum sekundären Glioblastom(9). Dieser Wandel vollzieht sich zunächst auf genetischer dann auf histologischer Ebene und wird schließlich makroskopisch bilddiagnostisch sichtbar. Eine typische, aber nicht obligate Mutation, die häufig sehr früh in der Tumorgenese auftritt, ist die *IDH*-Mutation(5–7), sie führt zum hypermethylierten Phänotyp G-CIMP und ist mit einer verbesserten Prognose assoziiert. Hinzu kommen *p53*-Mutationen und *ATRX*-Mutationen. Auf chromosomaler Ebene treten eine Trisomie des Chromosoms 7 oder ein zusätzlicher Arm 7q sowie der LOH für 17p häufig auf(6).

Makroskopische Charakteristika

Makroskopisch erweitern Astrozytome diffus die weiße Substanz, Low-Grade Astrozytome sind aber radiologisch nicht Kontrastmittel-anreichernd. Ein entstehendes Ödem sowie kortikale und subkortikale Einwanderung können eine Weitung der Gyri und eine Mittellinienverschiebung verursachen, eine Diagnosesicherung durch Bildgebung ist bisher nicht möglich, zystische Veränderungen und Blässe der weißen Substanz können jedoch Hinweise für ein Astrozytom sein(9).

Histologische Charakteristika

Mikroskopisch infiltrieren die neoplastischen Zellen die weiße Substanz, seltener findet sich eine Beteiligung der grauen Substanz. Die Infiltration ruft eine Entzündungsreaktion hervor, so dass sich in der Umgebung etliche Mikrogliazellen befinden und astrozytärer Umbau stattfindet. Weiter können Mikrozysten, die mit einer klaren gelblichen Flüssigkeit gefüllt sind, gefunden werden. Die Astrozytomzellen selbst weisen milde Kernpleomorphien sowie hyperchromatische Nuclei auf. Mitoseaktivität findet sich nicht in diffusen Astrozytomen, und würde bereits für einen anaplastischen Progress sprechen. Es lassen sich zwei Subtypen unterscheiden, der fibrilläre und der gemistocytische Typ.

Dabei ist der fibrillär wachsende Typ der häufigste. Charakteristisch sind fibrilläre Zellfortsätze bei diffus angeordneten, leicht pleomorphen hyperchromatischen Nuclei.

Der gemistocytische Typ besteht größtenteils aus plumpen Zellen mit glasartig durchscheinendem Zytoplasma(9).

Eine Transformation zu einem anaplastischen Astrozytom WHO III macht sich klinisch erst durch eine Verschlechterung der neurologischen Symptomatik bemerkbar. Im MRT lässt sich dann unter Umständen im Verlauf eine neue Kontrastmittelaufnahme der vorbekannten Raumforderung feststellen. Histologisch fallen eine Aggravation der bereits bei den diffusen Astrozytomen beschriebenen Neoplasiezeichen auf: Verstärkter Pleomorphismus des Nukleus wie auch des Zytoplasmas, auch die Kern-Plasma Relation ist vergrößert. Weiter fallen häufige Mitosen sowie eine verstärkte Neubildung von Gefäßen im Präparat auf. Nekrotische Areale hingegen finden sich nicht(9).

1.2.3.1.2 Glioblastome WHO Grad IV

Bei den Glioblastomen handelt es sich um die am weitesten entdifferenzierte Tumorentität unter den hirneigenen Tumoren, diese ist gleichzeitig mit der schlechtesten Prognose verbunden. Dennoch gibt es innerhalb dieser Entität entscheidende genetische Unterschiede, die sich auf Therapie und Prognose auswirken. So werden nach der aktuellen WHO Klassifikation folgende Entitäten unterschieden:

"Glioblastom *IDH*-mutiert", diese Entität entspricht am ehesten dem Begriff des sekundären Glioblastoms, also eines Tumors der sich aus einem Astrozytom WHO II-III entwickelt hat. Allerdings treten *IDH*-mutierte Glioblastome auch auf, ohne dass vorher ein Astrozytom diagnostiziert wurde(5,7). Typischerweise finden sich in diesen Tumoren *IDH1*- oder *IDH2*-Mutationen kombiniert mit *TP53*-Mutationen, *ATRX*-Mutation und einer homozygoten Deletion für cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*)(6). Weiter finden sich, ebenso wie in den Astrozytomen, Trisomien des Chromosoms 7 oder ein zusätzlicher Arm 7q sowie der LOH für 17p und zusätzlich eine Deletion des q-Arms von Chromosom 10. Durch die *IDH*-Mutation weisen diese Tumore ebenfalls den prognostisch günstigeren Hypermethylator-Phänotyp G-CIMP auf(5–7). Mit weniger als 10% der Glioblastome ist diese Entität jedoch die Seltenerere, die meist bei jüngeren Patienten zu finden ist(7).

"Glioblastom *IDH*-Wildtyp" stellt die zweite große Entität der Glioblastome dar und tritt typischerweise "de novo" auf, ohne dass eine Vordiagnose eines niedrig malignen Glioms bereits vorlag. Häufig sind die Patienten bei Erstdiagnose älter als 50 Jahre. Charakteristische chromosomale Veränderungen sind Trisomie von 8

Einleitung

Chromosom 7, Monosomie von Chromosom 10 sowie das Vorliegen von double minute Chromosomen. Auf Gen-Ebene finden sich *PTEN*-Mutation (Phosphatase and tensin homolog) oder Deletion, Deletion von *CDKN2A* und *2B*, und *hTERT* Promoter Mutationen. Weitere Mutationen sind die *TP53*-(Tumorsuppressorprotein 53kD), *PI3K*- (Phosphoinositid-3-Kinasen) und *NF1*-(neurofibromatosis 1- gene) - Gen, Mutationen, sowie Amplifikationen im *EGFR*(epidermal growth factor receptor)-, *PDGFRA*(platelet-derived growth factor receptor A)- *MET*(tyrosin-protein kinase Met)-Gen, *CDK4* und *6* und *MDM* (mouse double minute homolog)2 und 4(17). Diese Mutationen stören gleichzeitig Zellzykluskontrollmechanismen und aktivieren proliferativ wirkende Rezeptortyrosinkinase-Signalwege(5,6,12) (RTK). Ein wichtiger prädiktiver Marker für die TMZ-Therapie ist das Vorliegen einer *MGMT*-Promotormethylierung.

Makroskopische Charakteristika

Makroskopisch imponieren Glioblastome als kugelförmige zentral nekrotische Raumforderungen. Entsprechend wird in der Kontrastmittel-Magnetresonanztomografie (KM-MRT) eine ringförmige KM-aufnehmende hyperdense Struktur mit einem nicht KM-aufnehmenden hypodensen Areal in der Mitte sichtbar. Häufig kommt es zu einer Mittellinienverlagerung. Immer wieder finden sich zystische, nekrotische und einblutende Areale. Entlang der weißen Substanz infiltrieren die Tumorzellen in verschiedene Bereiche des Gehirns, so dass ein multilokuläres Bild entsteht. In einigen Fällen kann es zur Infiltration des Tumors über das Corpus Callosum in die gegenüberliegende Hirnhälfte kommen, diese Sonderform wird als sog. Schmetterlingsgliom bezeichnet(9).

Histologische Charakteristika

Als bedeutendstes Charakteristikum kann die hohe histologische Variabilität der Glioblastome genannt werden. So treten gemistozytische und fibrilläre Astrozytomzellen auf, aber auch vielzellige Riesenzellen und sehr kleine Zellen. Differentialdiagnostisch unterscheiden sich Glioblastome von diffus infiltrierenden bzw. anaplastischen Astrozytomen durch das Vorkommen von Nekrose und Arealen mit starker mikrovaskulärer Proliferation(9).

1.2.3.2 Oligodendrogliome

Oligodendrogliome machen etwa 7-10% der primären intrakraniellen Neoplasien aus, im Gegensatz zu den Astrozytomen findet sich bei Oligodendrogliomen eine weitgehend gleiche Geschlechterverteilung. Der Häufigkeitsgipfel der Altersverteilung

liegt zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr, eine Erkrankung im Kindesalter ist hingegen sehr selten. Ein auffälliges Charakteristikum ist auch die häufige Lokalisation im Frontallappen. Als klinische Erstmanifestation tritt oft eine symptomatische Epilepsie auf. Im Vergleich zu diffusen Astrozytomen handelt es sich bei Oligodendrogliomen meist um weniger aggressiv wachsende Tumoren, die relativ gut auf Radio- und Chemotherapie ansprechen. Nach der aktuellen WHO-Klassifikation der Gliome sind die *IDH*-Mutation und 1p19q Kodeletion zwingend mit der Diagnose Oligodendrogliom assoziiert, die *ATRX* Funktion bleibt meist erhalten(5,6).

Makroskopische Charakteristika

Oligodendrogliome weisen eine teils gut umschriebene teils diffus infiltrativ wachsende graue Tumormasse auf, die das umliegende Hirngewebe verdrängt, die Cortexoberfläche durchbricht und in den Subarachnoidalraum invadiert.

Histologische Charakteristika

In Oligodendrogliompräparaten finden sich typischerweise gleichförmige Zellen mit runden hyperchromatischen Zellkernen. Durch zytoplasmatische Schrumpffartefakte entsteht der Aspekt eines im Verhältnis zum Zytoplasma großen Zellkerns, dies wird auch als sog. "fried-egg" Phänomen bezeichnet. Durch netzartig verzweigte Tumorkapillaren kann ein lobulär organisiertes Bild entstehen. Am Übergang zum gesunden neuronalen Gewebe finden sich gelegentlich dystrophe Kalzifikationsherde. Auffällig ist in diesem Bereich weiterhin, dass sich das Wachstumsverhalten der Tumorzellen verändert je nachdem ob sie an graue oder weiße Substanz angrenzen: An graue Substanz grenzende Zellen wachsen deutlich invasiv in das gesunde Gewebe ein, während an weiße Substanz anliegende Zellen einen scharf begrenzten Rand zu bilden scheinen(9).

Malignisierung und Abgrenzung zu oligoastrozytären Mischformen

In manchen Tumoren lassen sich sog. Mini-Gemistozysten erkennen, die mit ihrem in die Länge gezogenen Zytoplasma an astrozytäre Tumore erinnern. Im Gegensatz zu den klassischen oligodendroglialen Zellen sind diese Zellen stark GFAP-positiv (glial fibrillary acidic protein). Gelegentlich treten auch siegelringförmige Zellen auf, dies geht jedoch meist mit weiteren Anaplasiemerkmalen wie zunehmenden Mitosen, ausgeprägter Mikrovaskularisation und auch Nekrosebildung einher. Solche Befunde sind charakteristisch für eine weitere Malignisierung der Erkrankung hin zum anaplastischen Oligodendrogliom(5).

Einleitung

1.3 Erstlinien-Therapieverfahren bei Astrozytomen und Oligodendrogliomen

Die Erstlinien-Therapien bei Gliomen bestehen meist aus einer maximal möglichen Tumorsektion mit anschließender Radio-Chemotherapie. In jedem Fall ist eine stereotaktische Biopsie zur Klassifizierung notwendig. Erfolgt eine Klassifizierung des Tumors als ein Low-Risk Gliom (\leq WHO II), kann unter Berücksichtigung des Patientenwunsches zunächst nach der "wait-and-scan"-Strategie verfahren werden(6,12). Prognostische Faktoren sind neben den bereits erwähnten Tumormarkern vor allem die operative Reduktion der Tumormasse(6) sowie das Erkrankungsalter und der Karnofsky-Performance Score zu Beginn der Erkrankung(7).

Als Erst-Linien-Chemotherapeutika stehen aktuell das alkylierend wirkende Temozolomid (TMZ) sowie die Kombinationschemotherapie PCV (bestehend aus den Alkylanzien Procarbazin und Lomustin (CCNU), und dem Spindelgift Vincristin) zur Verfügung. Vincristin wird in vielen deutschsprachigen neuroonkologischen Zentren jedoch aufgrund der hohen Nebenwirkungen durch Neurotoxizität nicht eingesetzt. Zudem ist die Wirksamkeit von Vincristin bei schlechter Liquorgängigkeit umstritten(7). Unter Anwendung der molekularen Marker und des Risikoprofils der Patienten werden die Therapien in unterschiedlicher Intensität durchgeführt.

Während die Radiochemotherapie mit PCV aufgrund der RTOG 9402 Phase III-Studie (Radiation Therapy Oncology Group) vorrangig gegen Oligodendrogliome mit 1p19q

Kodeletion eingesetzt wird(13,15), kommt Temozolomid in *IDH* mutierten G-CIMP und *IDHwt-MGMT*-promotormethylierten Tumoren zum Einsatz(6). Ob PCV in 1p19q kodeletierten Tumoren einen Vorteil gegenüber der TMZ-Therapie hat wird erst beim Vergleich der RTOG 9402 mit der aktuell laufenden CODEL Studie, die sich mit TMZ

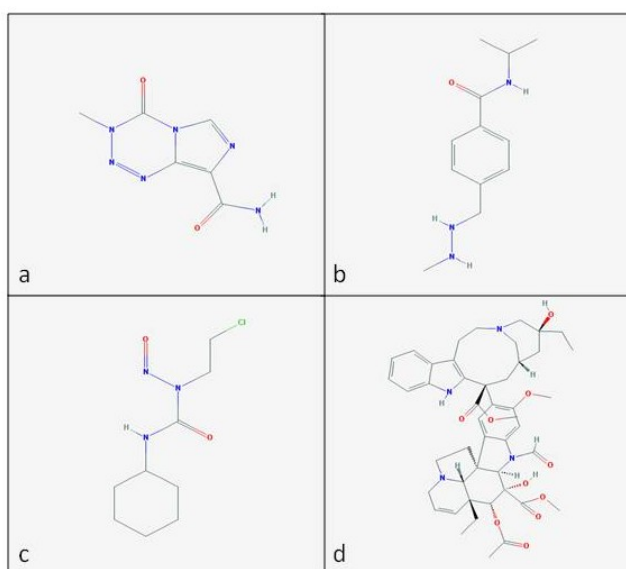


Abb.: 1 a) Temozolomid, b) Procarbazin, c) Lomustin d) Vincristin; Quelle: URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Therapie bei 1p19q kodelitierten Tumoren befasst, klar werden(6,7). Auch Patienten mit Tumoren ohne MGMT-Promotormethylierung profitieren von Radiotherapie in Kombination mit TMZ(18). Bei Patienten mit Tumoren ohne MGMT-Promotormethylierung und gleichzeitig ungünstigen Therapievoraussetzungen wie einem Erkrankungsalter über 70 Jahre und niedrigem Karnofsky-Index kann auch eine alleinige Radiotherapie durchgeführt werden(6).

Im Folgenden werden die einzelnen Chemotherapeutika vorgestellt.

1.3.1 Temozolomid

Temozolomid ($C_6H_6N_6O_2$) ist ein Imidazotetrazin-Derivat, es ist als Prodrug konzipiert und wird bei neutralen bis basischen pH-Werten schnell zu aktivem 5-(3-methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboxamid hydrolysiert. Der Wirkmechanismus besteht in der Alkylierung bzw. Methylierung des Sauerstoffatoms O_6 und des Stickstoffatoms N_7 von Guanin. Der große Vorteil gegenüber anderen Chemotherapeutika besteht darin, dass es nicht nur intravenös sondern auch oral als Kapsel aufgenommen werden kann. Zudem ist es im Vergleich zur PCV Therapie besser verträglich(19).

Trotzdem treten typische Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerz und Müdigkeit regelmäßig auf. Gefährlich für den Patienten können Myelosuppression, Immunschwäche mit gesteigertem Infektionsrisiko, Hepatotoxizität, Epilepsien und anaphylaktische Reaktionen werden, die durch Temozolomid verursacht werden können(19). Temozolomid wird z.B. in der Standardtherapie nach Stupp et. al bei Glioblastomen nach folgendem Therapieschema eingesetzt: Tumorresektion mit postoperativer Bestrahlung 60 Gy Gesamtdosis, verteilt auf 30 Einzeldosen à 2 Gy, über einen Zeitraum von 6 Wochen, konkomittant wird dem Patienten TMZ 75mg/m²/d verabreicht. Darauf folgt eine Pause über 4 Wochen und anschließend folgt die adjuvante TMZ-Therapie mit 150-200mg TMZ für 5 Tage innerhalb von 28 Tagen (=1 Zyklus). Die Therapie wird über bis zu 6 Zyklen durchgeführt(20).

1.3.2 PCV

PCV besteht aus den drei Substanzen Procarbazin, Lomustin und Vincristin. Das Therapieschema ist etwas komplexer als bei der TMZ-Therapie: Einer möglichst kompletten Tumorresektion folgt die Bestrahlung mit der Gesamtdosis von 59,4 Gy verteilt auf 33 Einzeldosen à 1,8Gy. Dem wird die PCV Therapie adjuvant in 6 Zyklen

Einleitung

angeschlossen(14,15). Ein Therapiezyklus dauert in der Regel 29 Tage wobei die drei Substanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten verabreicht werden. Zwischen den Zyklen liegt jeweils eine Pause von 6-8 Wochen. An Tag 1 jedes Zyklus wird Lomustin als Einmalgabe in der Dosierung $110\text{mg}/\text{m}^2$ oral eingenommen, die Verabreichung von Procarbazin erfolgt ebenfalls in oraler Form an den Tagen 8-21 in der Dosierung $60\text{mg}/\text{m}^2$, Vincristin wird intravenös an den Tagen 8 und 29 in der Dosierung $1,4\text{mg}/\text{m}^2$ injiziert(21). Das Nebenwirkungsprofil von Lomustin und Procarbazin ist dem von TMZ sehr ähnlich, bei Vincristin ist zusätzlich noch die Cardio- und Neurotoxizität zu beachten.

Procarbazin

Procarbazin ($\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$) wirkt ebenfalls alkylierend in der Zelle. Der genaue Wirkmechanismus ist bis dato nicht geklärt, jedoch wirkt es inhibierend auf die Synthese von transfer-RNA (t-RNA) und behindert somit die Proteinbiosynthese(22).

Lomustin

Lomustin CCNU ($\text{C}_9\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_2$) gehört zu den Nitroseharnstoffen und wirkt ebenfalls durch seine alkylierenden Eigenschaften, es verursacht unter anderem DNA-Cross Links und unterbricht Translation, Transkription und damit die Proteinbiosynthese(23).

Vincristin

Vincristin ($\text{C}_{46}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{10}$) ist ein Vincaalkaloid, das aus der Pflanze Vinca Rosea gewonnen wird. Der Wirkmechanismus besteht in der irreversiblen Bindung von Microtubuli und Spindelfasern während der S-Phase des Zellzyklus, was zu einem Arrest der Mitose in der Metaphase führt(24).

Insbesondere Vincristin weist eine hohe Neurotoxizität auf. Aufgrund seiner molekularen Größe ist die Liquorgängigkeit umstritten(7).

1.4 DIRAS3

Das Gen *DIRAS3* (Distinct subgroup of the Ras Family, member 3), auch bekannt als ARHI (Ras homolog gene family, member 1), liegt in der chromosomalen Region 1p31,3 und besteht aus 2 Exons und einem Intron(25), wobei die ganze 229 Basenpaare (BP) lange, Protein-codierende Region in Exon2 liegt(26). Durch Sequenzanalyse der cDNA von DIRAS3 konnte eine 54% Homologie der Aminosäurenkette zu HRas und eine 56-62-prozentige Homologie zu Ras-ähnlichen Proteinen nachgewiesen werden. Es enthält eine GTP-Bindungsdomäne und ein C-terminal gelegenes Zellmembranlokalisierungsmotiv. Exprimiert wird DIRAS3 in Leber-, Herzmuskel-, Pankreas-, Ovarial- und neuronalem Gewebe, wobei die höchste Expression in ovariellen Zellen nachweisbar ist. Dies zeigen Northern Blot Daten von Yu et.al.(27). Bestätigt wird dies durch RT-PCR Analysen von Niemcyk et al. in verschiedenen Geweben(25), wobei hier die höchste Expression (relativ zu GAPDH-Expression) absteigend in ovariellen, pankreatischem, cervicalem, testikulärem, prostatischem und Mamma-Gewebe festgestellt wurde. In Hirngewebe wurde gegenüber dem Durchschnitt eine etwa eineinhalbfach höhere Expression festgestellt(25). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Expression von DIRAS3 einem maternalen Imprinting Mechanismus unterliegt, also nur das paternale Allel transkribiert wird. Das maternale Allel ist "stumm" und weist zwei Methylierungsstellen (Differentially methylated Regions, DMRs) auf: Bei DMR 1 handelt es sich um eine upstream gelegene CpG-Insel mit einer CTCF-Bindungsstelle (CCCTC-Binding Factor). DMR2 liegt in der Promotorregion des Gens. Eine dritte CpG-Insel liegt in der Protein-kodierenden Region von Exon2(26), diese CpG-Insel scheint jedoch dauerhaft methyliert zu sein(25).

Im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen wird DIRAS3 vor allem in Ovarial- und Mammakarzinomen erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass DIRAS3 inhibitorisch auf die PI3K/AKT und RAS/MAP Signalwege einwirkt und DIRAS3 Reexpression unter anderem über p21 den Zellzyklusprogress inhibiert, und Apoptose bzw. Autophagie einleitet(28–30). Daher gilt DIRAS3 in diesen Tumorentitäten als Tumorsuppressor, dessen Verlust zu verstärkter Proliferation und zu Tumorprogress führt.

Einleitung

1.4.1 DIRAS3 in Gliomen

Zur genauen Rolle von DIRAS3 in Gliomen ist bisher nur wenig bekannt: Riemenschneider et al. veröffentlichten 2008 die erste klinisch retrospektive Studie zur DIRAS3-Expression in 59 Gliomproben. Davon wurden nach der WHO Klassifikation von 2007 38 Proben als Tumore oligodendroglialer Differenzierung (18 anaplastische Oligodendrogliome, 6 anaplastische Oligoastrozytome, 9 Oligodendrogliome, 5 Oligoastrozytome) und 21 Proben als Tumore astrozytärer Differenzierung (15 Glioblastome, 2 anaplastische Astrozytome, 4 diffuse Astrozytome) klassifiziert.

In 20 der 38 oligodendroglialen Tumore fand sich ein LOH für den p-Arm von Chromosom 1, auf dem auch das DIRAS3 Gen liegt. Die Methylierungsanalyse auf dem verbleibenden DIRAS3 Allel zeigte bei der Mehrzahl der oligodendroglialen Tumore mit LOH für 1p, eine Methylierung der CpG Inseln, die für die Expression von DIRAS3 verantwortlich sind. Kohärent damit fand sich auch eine erniedrigte DIRAS3 Expression in diesen Tumorproben. DIRAS3 war in diesen Tumoren biallelisch inaktiviert. In den oligodendroglialen bzw. astrozytären Tumoren mit Retention von 1p fand sich in den meisten Fällen keine CpG-Insel-Methylierung. Die DIRAS3 Expression war insbesondere in den GBM-Proben erhöht (max. 20-30x)(31). Weiter konnte gezeigt werden, dass DIRAS3 Inaktivierung ähnlich wie 1p Verlust mit einem längeren Gesamtüberleben der Patienten mit oligodendroglialen Tumoren WHOII-III assoziiert ist(31). In einer weiteren Studie wurden 21 Tumorpräparate glialer Tumoren untersucht, wobei 1/3 der Tumore eine erniedrigte und 2/3 eine erhöhte DIRAS3 Expression aufwiesen(32).

In der Studie von Chen et.al 2014 wurden ebenfalls 59 Gliomproben auf DIRAS3-Expression hin überprüft. Weiter wurde die DIRAS3 Expression in 4 Gliomzelllinien (U251, U87, BT325 und SHG44) bestimmt und mit 10 Normalhirnproben verglichen. Dabei zeigte sich, dass die DIRAS3 RNA Expression und die Menge an DIRAS3 Protein mit zunehmendem WHO Grad der Tumorproben abnahm und in den getesteten Zelllinien im Vergleich mit den Normalhirnproben verringert war. Es wurden 9 pilozytische Astrozytome, 16 diffuse Astrozytome, 19 anaplastische Astrozytome und 15 primäre Glioblastome untersucht. Oligodendrogliome wurden nicht untersucht. Außerdem wurden die Präparate ausschließlich histologisch klassifiziert, molekulare Subtypen wurden nicht berücksichtigt. Mithilfe des Plasmidvectors pcDNA3.1 wurde DIRAS3 cDNA stabil in U251 Gliomzellen

transfiziert und eine DIRAS3 Überexpression auf RNA und Proteinebene nachgewiesen. In den anschließend durchgeführten Tests wurde eine Suppression der Zellproliferation, Zellzyklusarrest am G2/M Checkpoint, und eine reduzierte Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen festgestellt(33).

Einleitung

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Wie Riemenschneider et al. beschreiben, geht eine verminderte DIRAS3 Expression in oligodendroglialen Tumoren mit verlängertem Gesamtüberleben einher. Weiter zeigte sich in Astrozytomen und insbesondere Glioblastomen eine bis zu 30-fach höhere Expression von DIRAS3(31). Gegensätzlich dazu stellen Chen et. al, in ihrer Studie fest, dass die DIRAS3 Expression mit steigendem WHO-Grad der Tumore abnimmt. In daraufhin durchgeführten funktionellen Untersuchungen mit den Gliomzelllinien bewirkte eine DIRAS3 Überexpression eine verminderte Proliferation und Zellzyklusarrest, verminderte Zellmigration und verstärkte Apoptose(33). Diese beiden konträren Befunde in Kombination mit der bestehenden Literatur zu DIRAS3 in anderen Tumorentitäten werfen nun folgende Fragen auf:

DIRAS3 wird in der Literatur weitgehend als Tumorsuppressorgen beschrieben, dessen Verlust zu einer Dysregulation des Zellwachstums, einer verstärkten Migration und verminderten Apoptose führt(28,30,33,34). Wie ist es also möglich, dass der Verlust von DIRAS3 in Oligodendrogliomen mit verlängertem Gesamtüberleben der Patienten einhergeht? Wirkt DIRAS3 abhängig von der Tumorentität, der Lokalisation und dem Mikroenvironment unterschiedlich auf die Entwicklung eines Tumors ein? Spielen dabei eventuell die angewandten Therapieverfahren eine entscheidende Rolle? Wie wirkt sich die DIRAS3 Expression auf das Therapieansprechen der Tumorzellen unter Chemotherapie mit Temozolomid und PCV aus? In dieser Arbeit soll der von Riemenschneider et al. klinisch-pathologisch beschriebene Verlust von DIRAS3 Expression *in vitro* modelliert werden um weitere Informationen zur DIRAS3 Funktion in Gliomen zu gewinnen. Dazu dient ein DIRAS3 knockdown Modell (DIRAS3-shRNA) in stabil transfizierten U251 und HS683 Gliomzelllinien. In funktionellen Versuchen werden Proliferationsverhalten, Chemoresistenz, Migrations- Invasions- und Apoptoseverhalten sowie Proteinphosphorylierungsmuster der DIRAS3 Knockdown-Klone untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Hersteller	Artikel
Brutschrank	
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	HERAcell240 i
Durchflusszytometer	
BD Biosciences, San Jose, USA	FACSCanto II
Geldokumentationssystem	
GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg	Image Quant LAS 4000 mini
Heiz- und Kühlblock	
Eppendorf, Hamburg	Thermomixer compact
Mikroskope	
Fluoreszenzmikroskop:	IX 61
Olympus Deutschland GmbH, Hamburg	
Umkehrmikroskop	Leitz DM IL Type 090-135.001
Life Imaging Mikroskop:	AF6000 LX
Leica Microsystems CMS GmbH, Bensheim	
Mikroliterpipetten	
Gilson, Inc. Middleton USA	Pipetman classic, P2, P10, P20, P100, P200, P1000
Eppendorf, Hamburg	
Sartorius AG, Göttingen	Multipette plus mLine Mehrkanalpipette
Photometer	
BMG Labtech, GmbH, Ortenberg	FLOUstar OMEGA, Mikroplattenreader
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	NanoDrop2000, Spectrophotometer
Sicherheitswerkbank	
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	EN12469: 2000 Class II Safety Cabinet
Thermocycler	
Life Technologies, GmbH, Darmstadt	Applied Biosystems Step One Plus Real Time PCR System
Biometra, GmbH, Göttingen	T3000 Thermocycler
Zentrifugen	
Andreas Hettich, GmbH & Co.KG, Tuttlingen	Hettich Mikro 200R

Material und Methoden

Hettich Rotina 420R
VWR International, GmbH, Darmstadt Mini Star silverline

Sonstige Geräte

Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, LAUDA AQUAline AL25 Wasserbad
Lauda-Königshofen
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Tiefkühlschrank -80°C
VWR International, GmbH, Darmstadt Reagenzglasschüttler
Rotationsgerät

2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Hersteller	Artikel-Nr.	Artikel
A. Hartenstein GmbH, Würzburg	PP06	Pasteurpipetten, 150mm
Life Technologies, GmbH, Darmstadt	15140-122	Penicillin/Streptomycin, 100 ml
Merck, KGaA, Darmstadt	203351-10ML	Blasticidin S, Hydrochlorid
PAN Biotech, GmbH, Aidenbach	3302	Fötales Rinderserum (FBS)
Carl Roth, GmbH & Co. KG, Karlsruhe	A994.1	Dimethylsulfoxid (DMSO)
Sigma-Aldrich Co, LLC.	D5796-6x500ML	Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM- high glucose 500ml
	D8537-500ML	Phosphate buffered saline (PBS)
	T3924-100ML	Trypsin-EDTA solution
Sarstedt AG & Co, Nümbrecht	83.1810.502	Suspensionszellkulturflaschen T25
	83.1813.502	Suspensionszellkulturflaschen T75, mit Filter
Zusammensetzung Kulturmedium (untransfizierte Zellen)		500ml DMEM + 50ml FBS + 5ml Pen/Strep
Zusammensetzung Selektionsmedium (transfizierte Zellen)		500ml DMEM + 50ml FBS + 5ml Pen/Strep

Zusammensetzung

Kulturmedium

(CO₂ unabhängig)

+ 2µg/ml Bastacidin S,
verdünnt in Aqua dest.
46,5ml CO₂ independent
medium
+ 2,5ml FBS
+ 500µl L-Glutamat
+ 500µl Pen/Strep

2.1.3 Versuchsmaterialien

Hersteller	Artikel-Nr.	Artikel
Apoptoseversuche mit Caspase Glo3/7 Assay		
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	136101	Nunc F96 MicroWell Plates, white
Promega, Heidelberg	G8091	Caspase Glo 3/7 Assay
Apoptoseversuche mit FITC Annexin V		
BD Biosciences, San Jose, USA	556419	Annexin V - FITC, 200 Tests
	556454	Annexin V Binding Buffer, 10X concentrate RUO
Sigma Aldrich Co, LLC	P4864-10ML	Propidiumiodid Lösung
	S4400-1MG)	Staurosporin
cDNA Synthese		
Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	R0181	dNTP-Set (4 x 0,25 ml) 100 mM solutions
Promega, Heidelberg	N2615	RNasin Plus RNase Inhibitor (40 U/µl)

Material und Methoden

Life Technologies, GmbH, Darmstadt
18064-071 SuperScript II Reverse Transcriptase

GeneLink 26-4000-10 pd(N)6 (1,5µg/µl), 5x First Strand Buffer, DTT (100mM)
DEPC H2O

DNA+RNA Extraktion

Qiagen, Hilden 880004 AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit
80204 AllPrep DNA/RNA Mini Kit
79656 QIAshredder
74134 RNeasy Plus Mini Kit

Sigma-&Aldrich Co, LLC. M6250-10ML β-Mercaptoethanol

IC50 Bestimmung mit Resazurin

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA 137101 Nunc F96 Microwell, black

Promega, Heidelberg G8080 Promega™ CellTiter Blue™ Cell Viability Assay

Sigma-&Aldrich Co, LLC. L5918-100MG Lomustine, >98 %
SML0036-50MG Procarbazinehydrochloride , >98% (HPLC)
T2577-100MG Temozolomide, >98% (HPLC)
V8879-1MG Vincristine sulfate salt

Invasionsversuche

Corning B.V. Life Sciences, NE Schipphool Rijk Niederlande 356231 Matrigel, Phenol-Red free

354578 Corning BioCoat Control 8.0µm Membrane (Inserts) 24-Well Plate

	353504	24-Well plates
Sigma-&Aldrich Co, LLC	D1145	DMEM, phenolrotfrei
	D9542- 1MG	DAPI, powder, >98%
Life Technologies, GmbH, Darmstadt	15140-122	Pen/Strep, 100 ml
	25030-024	L-Glutamine, 200mM
Carl Roth, GmbH & Co. KG, Karlsruhe	4627.5	Methanol Rotipuran 99,9%

Migrationsversuche

Life Technologies, GmbH, Darmstadt	18045-054	CO ₂ independent medium
	15140-122	Pen/Strep, 100 ml
	25030-024	L-Glutamine, 200mM
ibidi GmbH, Martinsried	80209	25 culture inserts for self-insertion
	80826 15	μ-slide, 8-Well, ibi-treat,tissue culture sterile
Proteome Profiler Array		
R&D Systems	ARY003B	Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit

Polymerasekettenreaktion

Bioline GmbH, Luckenwalde	BIO-92005	SensiFAST SYBR Hi-Rox Kit
Eurofins Genomics, Ebersberg	NCBI Ref- Seq. #	Primer-Nukleotidsequenz
DIRAS3 Primer forward	NM_004675. 3	GTTCGTGCCTCCGAGAAAG
DIRAS3 Primer reverse	NM_004675. 3	AACCGCTTCAGCAGCTTCTG

Material und Methoden

ARF-1 Primer forward	NM_001658.	GACCACGATCCTCTACAAGC
ARF-1 Primer reverse	NM_001658.	TCCCACACAGTGAAGCTGATG

Transfektion für DIRAS3 Überexpression

Life Technologies, GmbH, Darmstadt

11668-027	Lipofectamine 2000 Transfection Reagent
31985-070	Opti-MEM Reduced Serum Medium
L3000001	Lipofectamine 3000 Transfection Reagent
	LacZ Plasmid
K4936-00	DIRAS3 Plasmid
	pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR

Invitrogen/
Thermo Fisher Scientific,
Waltham, USA

shRNA-Nukleotidsequenz

DIRAS3 shRNA1	<u>TGCTGTTCAATGGTCGGCAGGTA</u> <u>CTCGTTTTGGCCACTGACTG</u> <u>ACGAGTACCTCGACCATTGAA</u> CAAGTTACCAGCCGTCATGAGCAAACCGGTGACTGACTGC TCATGGA GCTGGTAACTTGTCC
DIRAS3 shRNA2	<u>TGCTGAACAGCTCCTGCACATTCACAGTTTTGGCCACTGACTG</u> <u>ACTGTGAATGCAGGAGCTGTT</u> CTTGTCGAGGACGTGTAAGTGTCAAACCGGTGACTGACTGA CACTTACGTCTCGACAAGTCC
DIRAS3 shRNA3	<u>TGCTGTTATGCACTTGTCAAGCAGCTGTTTTGGCCACTGACTG</u> <u>ACAGCTGCTTCAAGTGCATAA</u> CAATACGTGAACAGTTCGTGACAAAACCGGTGACTGACTGTC GACGAAGTTCACGTATTGTCC

Zellproliferationsversuche

Promega, Heidelberg	G3580	CellTiter 96® AqueousOne Solution Cell Proliferation Assay
Roche Diagnostics, Mannheim	116699150 01	Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent),
VWR International,	736-0230	96-Well-Platten schwarz/μClear

GmbH,
Darmstadt

136101 Nunc F96 MicroWell Plates white

Zell-Zyklus- und Apoptoseanalysen mit Propidiumiodid

Carl Roth, 9065.3 Ethanol, 99,8 %, p.a.
GmbH & Co.

KG, Karlsruhe

Sigma-&Aldrich P4864- Propidiumiodid Lösung
Co, LLC. 10ML

47036- Saponin
50G-F

R6513- RNase A
10MG

2.1.4 Software

Hersteller

Produkt

GraphPad Software Inc. San Diego, USA
Wayne Rasband,
National Institute of Health, USA

GraphPad Prism V (Version 5.01, 2007)
ImageJ 1.47

Dr. Jan Koster, Department of
Oncogenomics Academic Medical Center
(AMC) Amsterdam, Niederlande

R2: Genomics Analysis and Visualization
Platform (<http://r2.amc.nl>)

Perttu Terho, Turko Centre for
Biotechnology, University of Turko, Finnland

Flowing Software version 2.5.1

Verity Software House, Topshem, USA
Wellcome Sanger Institute, London, UK

ModFit LT™
COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations in
Cancer

2.2 Methoden

Vorbemerkung

Soweit nicht anders angegeben wurden die Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt.

Molekularbiologische Arbeiten sowie die Arbeiten mit den verschiedenen Gliom-Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in sterilen Gefäßen mit sterilen Lösungen durchgeführt.

Material und Methoden

Die statistische Signifikanztestung aller Versuche erfolgte mithilfe der Funktion One-way ANOVA für nichtparametrische Daten und Kruskal Wallis Test, der GraphPad Prism Software Version V (2007). Zusätzliche Berechnungen werden in der Versuchsbeschreibung aufgeführt.

2.2.1 Arbeiten mit HS683 und U251 Gliomzelllinien

Alle Zellkulturexperimente wurden mit den Gliomzelllinien U251 oder HS683 durchgeführt. Diese wurden mit einem Plasmid transfiziert, welches eine zu DIRAS3 RNA komplementäre short-hairpin RNA (shRNA) enthält. Durch Behandlung der transfizierten Zellen mit Blasticidin wird ein Selektionsdruck aufgebaut und die shRNA wird, zusammen mit dem Resistenzgen gegen Blasticidin, stabil in das Genom der Gliomzellen eingebaut. Die shRNA wird mit Hilfe von Drosha, Dicer (Endoribonukleaseenzymen) und dem RISC-Komplex (RNA induced silencing complex) prozessiert(35) und bindet die DIRAS3 messenger RNA (mRNA). Nun kommt es entweder zur Degradation der mRNA (shRNA perfekt komplementär zur mRNA) oder zur Verhinderung der Translation, es findet ein Knockdown für DIRAS3 statt. Für die Kultur der transfizierten Zellklone wurde durchweg das oben beschriebene Blasticidin-haltige Selektionsmedium benutzt. Untransfizierte Zellen wurden mit Blasticidin-freiem Kulturmedium gleicher Zusammensetzung kultiviert. Im Folgenden werden aus Vereinfachungsgründen die Begriffe Zellkulturmedium, Kulturmedium oder DMEM verwendet. Sind abweichende Zusammensetzungen für bestimmte Versuche notwendig, so wird dies im Methodenteil dargelegt.

Die Kultur erfolgte in T75 Suspensionszellkulturflaschen mit 8ml Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂. Ein Medium-Wechsel erfolgte regelmäßig alle 2 Tage. Zur Passage wurden die Zellen mindestens einmal pro Woche passagiert, dazu jeweils mit PBS gewaschen, für 3 Minuten (min) mit Trypsin-EDTA Lösung bei 37° C inkubiert, mit Kulturmedium 1:5-1:10 verdünnt und in neue T75 Suspensionszellkulturflaschen ausgesät.

2.2.2 Molekularbiologische Techniken

2.2.2.1 DNA und RNA Extraktion

Die DNA- bzw. RNA-Extraktion erfolgte mithilfe des AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen).

In der Vorbereitung wurden die in T75 Kulturflaschen bei einer Konfluenz >70% gehaltenen Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie durch

Zugabe von 350µl RLT-Puffer mit 10 % β-Mercaptoethanol lysiert und mittels eines Zellschabers in ein Eppendorf-Cup überführt. Zur Abtrennung der Zellbestandteile wurde das gewonnene Zelllysate auf die Qiashreder Säulchen aufgetragen und bei 10000 RPM (Hettich Mikro 200R) für 1 min. zentrifugiert.

Die anschließende DNA bzw. RNA Isolierung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des AllPrep DNA/RNA Mini Kits.

Die Bestimmung des DNA bzw. RNA Gehalts erfolgte mit dem NanoDrop2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bei einer Wellenlänge von 260nm.

2.2.2.2 Synthese von cDNA mittels Reverse Transkriptase

Um die Expression spezifischer mRNAs zu quantifizieren wurden diese nach der Isolation zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und darauf mittels quantitativer PCR amplifiziert.

Reverse Transkription:

Reaktionsansatz (50µl)

- 1µg isolierte RNA gelöst in 32.1µl DEPC H₂O
- RNA Mix (16,9µl)
 - 10µl 5x First Strand Buffer
 - 3µl pd(N)6 (1,5µg/µl)
 - 2,5µl dNTP (25mM)
 - 1µl RNAsin (40U/µl)
 - 0,4µl DTT (100mM)
- 1µl Superscript® II Reverse Transkriptase (200U/µl) (Invitrogen)

Die Reverse Transkription wurde im T3000 Thermocycler (Biometra) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Denaturierung der RNA bei 70°C für 5 Min
- Abkühlung auf 4°C
- Zugabe des RNA-MIX mit Primern, Nukleotiden und des Ribonukleaseinhibitors RNasin.
- Inkubation bei 42°C für 3 Min. (Annealing)
- Zugabe der Superscript® II Reverse Transkriptase
- Inkubation für 50 Min. bei 42°C (Transkription)
- Inkubation für 10 Min. bei 80°C (Denaturierung der Reversen Transkriptase)

Die gewonnene cDNA wurde entweder zur Aufbewahrung bei -80°C eingefroren oder direkt mittels quantitativer RT-PCR quantifiziert.

2.2.2.3 Quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die quantitative RT-PCR wurde mit dem Applied Biosystems Step One Plus Real Time PCR System, von Life Technologies durchgeführt. Es handelte sich um in

Material und Methoden

Tripletts amplifizierte 25µl Ansätze auf 96-Well Platten. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 µl der isolierten cDNA
- 12,5µl SYBR Green
- 6,0µl DEPC H₂O
- 0,75µl Primer forward
- 0,75µl Primer reverse

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Denaturierung 94 °C für 2 min
- 40 Zyklen:
 - Denaturierung 94 °C 15 sec
 - Annealing, extension,
 - und Fluoreszenz read-out 60 °C 1 min
- Abkühlung und Aufbewahrung der RT-PCR Produkte 4 °

Als Standard zur Quantifizierung diente das Haushaltsgen ARF-1, die Analyse der Ergebnisse erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode(36) mit der Analysesoftware des Realtime PCR-Systems und nach Angaben des Herstellers.

2.2.3 Funktionelle Assays

2.2.3.1 Proliferationsassay mit CellTiter 96® AqueousOne Solution (Promega)

Zur Visualisierung der Auswirkungen des DIRAS3 knockdown auf die Zellvermehrung wurden mit den shDIRAS3 Klonen und den entsprechenden Wildtypzellen Proliferationsversuche mithilfe des CellTiter 96® AqueousOne Solution Cell Proliferation Assay (Promega) durchgeführt.

Versuchsprinzip

Die CellTiter 96® AqueousOne Solution enthält eine Tetrazoliumverbindung (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS). Diese Verbindung wird mit Hilfe des Elektronenakzeptors Phenazinethosulfat durch lebende Zellen zu einem farbigen, in Zellkulturmedium löslichen, Formazan-Produkt reduziert. Diese Reduktion wird durch NADPH bzw. NADH bewirkt, welches von Dehydrogenasen aus biologisch aktiven Zellen stammt. Die Menge an Formazan-Produkt kann als Absorbanz mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 490nm bestimmt werden und ist direkt proportional zu der Menge lebender Zellen(37).

Versuchsdurchführung

Die Proliferationsmessung erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen. Dazu wurden an Tag 0 Triplikate aller Zellklone einer Zellreihe mit einer Zellkonzentration von 1000 Zellen/100µl Kulturmedium für 7 Einzelmessungen auf 96-Well Platten ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die sieben Folgetage wurde jeweils zur gleichen Tageszeit eine Messung durchgeführt: Eine Stunde vor der geplanten Messung wurden jeweils 20µl der CellTiter 96® AqueousOne Solution pro Well zugegeben und für eine weitere Stunde bei 37,5°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 490nm mit Hilfe des FLOUstar OMEGA Mikroplattenreader (BMG Labtech) bestimmt.

Auswertung

Aus den gewonnenen Daten wurde mithilfe der Analysesoftware GraphPad Prism 5 und der Funktion "nonlinear regression curve fit-exponential growth" eine Wachstumskurve generiert.

2.2.3.2 Proliferationsassay mit Bromdesoxyuridin

Zur Validierung der Ergebnisse aus dem MTS-Proliferationsassay kam zusätzlich für die U251 Zelllinie der Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminiscence) (Roche) zum Einsatz.

Versuchsprinzip

Durch Zugabe einer bromdesoxyuridinhaltigen Lösung ins Kulturmedium der proliferierenden Zellen wird dieses an der Stelle von Thymidin in die DNA sich teilender Zellen eingebaut. Nach einer festgelegten Inkubationszeit wird ein Zelllysat hergestellt, mit einem Anti-BrdU Antikörper inkubiert und ein ELISA durchgeführt. Die Proliferation wird durch Quantifizierung des Chemoluminiszenzsignals gemessen, welches sich proportional zur in die DNA integrierten Menge an BrdU verhält.

Versuchsdurchführung

Der Versuch wurde analog zum oben beschriebenen MTT Assay angesetzt, allerdings wurden jeweils 1500 Zellen pro Well ausgebracht, nach 24h Inkubation wurde dann die BrdU-Labeling Lösung zugegeben und die Messung nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt..

Material und Methoden

2.2.3.3 Chemoresistenztestung durch Bestimmung der mittleren Inhibitorischen Konzentration IC50

Zur IC50 Bestimmung wurde der CellTiter Blue® Cell Viability Assay (Promega) verwendet.

Versuchsprinzip

Der Nachweis lebender Zellen erfolgt ähnlich dem MTS basierten Ansatz auf der Reduktion einer Markersubstanz, in diesem Fall Resazurin, welche durch die Zellmembran diffundiert und durch mitochondriale, zytosomale, und mikrosomale Enzyme zu Resorufin reduziert wird. Während Resazurin von tiefblauer Farbe ist und nur gering fluoresziert ist Resorufin pink gefärbt und stark fluoreszierend. So kann die Menge lebender Zellen in einem Well einer Mikrotiterplatte anhand der Intensität der Fluoreszenz wie auch anhand der unterschiedlichen Absorbanzpeaks der beiden Verbindungen mit Hilfe eines Mikroplattenreaders quantifiziert werden(38).

Versuchsdurchführung

Für die Chemoresistenztestung wurden U251 und HS683 Zellen verwendet. Die Zellen und DIRAS3 -shRNA und CTRL-shRNA Klone wurden in T75 Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 70-90% kultiviert, ausgezählt und in Triplets à 500 Zellen in 50µl Kulturmedium in 96-Well Platten ausgesät, und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Adhärenz der Zellen wurden 50µl Kulturmedium, welches die jeweilige Testsubstanz in aufsteigenden Konzentrationen enthielt, in die Wells gegeben. Die so behandelten Zellen wurden für weitere fünf Tage inkubiert, dann mit 10µl Resazurin zur Quantifizierung der lebenden Zellen versetzt. Nach 3 Stunden Inkubation wurde die Absorbanz im FLOUstar OMEGA, Mikroplattenreader bei 570nm und 605nm bestimmt.

In Vorversuchen wurden die jeweils verwendeten Konzentrationen der Testsubstanzen evaluiert und schließlich so gewählt, dass eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Messpunkte auf der Dose-Response Kurve erzielt wurde (Tab.: 2).

Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Analyse Software GraphPad Prism V: Hierzu wurden zunächst die Konzentrationsangaben auf der Abszisse von linearen in logarithmische Werte umgewandelt, daraufhin wurden die Extinktionswerte für die steigenden Konzentrationen zum jeweiligen Extinktionswert des Kontrollansatzes ohne Chemotherapeutikum ins Verhältnis gesetzt, so dass der Extinktionswert des

Kontrollansatzes 100% Zellviabilität, und der Extinktionswert der höchsten Konzentration an Chemotherapeutikum 0% Zellviabilität entsprach. Mit den so transformierten Daten wurde eine Dosis-Wirkungskurve (log inhibitor vs. normalized response variable slope) erstellt und somit die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) des Chemotherapeutikums für den jeweiligen shRNA Klon bestimmt. Anschließend wurden die IC50 Werte der Klone aus mehreren unabhängigen Versuchsansätzen mit ANOVA und dem Kruskal Wallis-Test für nichtparametrische Daten verglichen und auf statistisch signifikante Unterschiede hin überprüft.

Tab.: 2 verwendete Konzentrationen der Testsubstanzen mit entsprechendem Lösungsmittel

Verwendete Stammkonzentrationen mit Lösungsmittel			
Lomustin 10mg/ml DMSO	Procarbazin 100mg/ml DMSO	Temozolomid 40mg/ml DMSO	Vincristin 0,1 mg/ml Methanol
Verwendete Endkonzentrationsreihen mit Lösungsmittel			
Lomustin (DMSO/DMEM) µM	Procarbazin (DMSO/DMEM) µM	Temozolomid (DMSO/DMEM) µM	Vincristin (Methanol/DMEM) µM
0	0	0	0
2,5	500	1	0,0005
5	1000	2,5	0,001
7,5	1500	5	0,0025
10	2000	10	0,005
25	2500	50	0,0075
50	3000	100	0,01
75	4000	500	0,05
100	5000	1000	-
200	7500	2000	-

2.2.3.4 Migrationsveruche: Wound healing Assay

Versuchsprinzip

Beim wound healing assay werden pro Ansatz je zwei Populationen eines Zellklons, getrennt durch eine spezielle "Kulturschablone", auf einem Kulturobjekträger ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen wird die Schablone entfernt. Die nun einsetzende Migration der Zellen über die künstlich erzeugte "Wunde" hinweg wird über einen bestimmten Zeitraum mit Hilfe eines Life-Imaging Mikroskops beobachtet

Material und Methoden

und anschließend durch grafische Analyse quantifiziert. Auf diese Weise können Unterschiede im Migrationsverhalten der Zellklone festgestellt werden.

Versuchsdurchführung

Es wurden die ibitreat beschichteten 8-Well Objektträger für adhärierende Zellen sowie die normierten Kulturschablonen (culture insert) (ibidi) verwendet. Durch diese "culture inserts" wird eine Lücke von etwa 500µm zwischen den in beiden Kammern ausgebrachten Zellen erzeugt(39).

Für die Kultur der Zellen unter Life-imaging Bedingungen wurde ein von der CO₂-Konzentration in der Luft unabhängiges Nährmedium verwendet (s.o.).

In einem ersten Schritt wurde der Objektträger mit den culture inserts präpariert, dann wurden 70µl einer Zellsuspension aus Standardkulturmedium mit 430 Zellen/µl in jede Kammer der Kulturschablone pipettiert. Pro Versuch wurden von jedem Klon zwei Ansätze hergestellt, so dass auf einem Objektträger vier verschiedene Zellklone untersucht werden konnten. Zum Adhären der Zellen wurde der Objektträger über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

In einem zweiten Schritt wurden darauf die culture inserts und das Kulturmedium vorsichtig entfernt, so dass eine scharfe Trennlinie zwischen den beiden Populationen in jedem Well entstand. Nach vorsichtigem zweimaligen Spülen der Wells mit dem zuvor hergestellten CO₂-independent-Medium wurden die Wells mit 250µl CO₂-independent-Medium aufgefüllt. Daraufhin wurde die Migration über 24h mit dem Life-imaging Mikroskop AF6000 LX (Leica) beobachtet, wobei die Bilder der Klone jeweils nach 0h, 6h, 12h, und 24h verglichen wurden.

Die Quantifizierung der Migration erfolgte durch Vermessung der freien Fläche zwischen den beiden Populationsgrenzen in einem Well mithilfe der ImageJ-Software zu den 4 o.g. Zeitpunkten. Die zellbedeckte Fläche wurde als Wachstum über Zeit in einer Kurve aufgetragen. Mithilfe einer ANOVA und dem Kruskal Wallis-Test für nichtparametrische Daten wurden Unterschiede zu den einzelnen Messzeitpunkten auf statistische Signifikanz hin überprüft.

2.2.3.5 Matrigel Invasionsassay (Transwell-System)

Versuchsprinzip

Mit dem Invasionsassay soll ebenfalls das Migrationsverhalten von Zellen beobachtet werden, hierbei wird die Durchwanderung von Gewebegrenzen wie der Basalmembran in lebenden Organismen simuliert, wie es beispielsweise bei einer Metastasierung von Tumoren geschieht. Die natürliche Barriere zwischen

verschiedenen Gewebeschichten wird in diesem Versuch mithilfe von Matrigel® nachgebildet, das auf eine spezielle mikroperforierte PET-Membran (Durchmesser der Löcher 8µm) aufgebracht wird. Als Migrationsanreiz werden die Zellen in einem nährstoffarmen Medium diesseits der Membran ausgesät, während sich jenseits der Membran ein mit FCS angereichertes Medium befindet.

Versuchsdurchführung

Die Invasionsversuche wurden mit dem Invasionsystem BioCoat™ Control 8.0 µm PET Membrane Inserts (Corning B.V. Life Sciences) auf 24-Well Platten durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurde das Matrigel® bei 4°C in Phenolrot freiem DMEM 1:3 verdünnt und die Invasionsinserts mit je 60µl des verdünnten Matrigels® beschichtet. Nach einer Trocknungszeit von 1h bei 37°C wurden die Inserts in eine 24-Well Platte gesetzt deren Wells mit 750µl phenolrotfreiem DMEM mit 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamat gefüllt waren. Anschließend wurden pro Ansatz 500µl der jeweiligen Zellsuspension à 10⁵ Zellen/ml in phenolrotfreiem DMEM mit 0,5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamat in die Inserts überführt. Schließlich wurde der Ansatz bei 37°C 5% CO₂ für 48h inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit wurde die Innenseite der Inserts zunächst vom verbliebenen Matrigel® befreit, daraufhin wurden die invadierten Zellen auf der Außenseite der Membran 15min mit Methanol fixiert und weitere 15 min in 750µl DAPI/PBS Lösung der Konzentration 2mg/ml in dunkler Umgebung gefärbt. Anschließend wurde die PET Membran mit einem Skalpell aus dem Insert herausgetrennt und mithilfe eines wasserbasierten DAPI haltigen Mountingmediums auf einen Objektträger aufgebracht. Die Auswertung erfolgte durch fotografische Erfassung der invadierten Zellen in vier unabhängigen Bildausschnitten pro Membran am Fluoreszenzmikroskop IX 61 (Olympus). Zur anschließenden Quantifizierung wurde die Bildanalysesoftware ImageJ verwendet.

2.2.4 Apoptosemessung

2.2.4.1 FACS-gestützte Quantifizierung apoptotischer Zellen

Versuchsprinzip

Zum Färben apoptotischer Zellen wurden Fluorescein-isothiocyanat(FITC)-Annexin V und Propidiumiodid (PI) verwendet: Annexin V bindet an Phosphatidylserinreste der Zellmembran, die sich typischerweise bereits in der Frühphase der Apoptose zur

Material und Methoden

Außenseite der Zellmembran kehren, während Propidiumiodid nur den Zellkern der spätapoptotischen Zellen mit bereits permeabler Zellmembran färben kann(40). Mithilfe des Durchflusszytometriegerätes FACS(fluorescence-activated cell sorting) Cantoll (BD Biosciences) konnten so die apoptotischen Zellen quantifiziert werden.

Versuchsdurchführung

Tag 1: Aussaat der zu untersuchenden Zellen

Je 500000 Zellen wurden in 5ml Kulturmedium in T25 Kulturflaschen unter Bereitstellung je einer negativen Kontrolle und einer positiven Kontrolle ausgebracht. Nach Adhärenz der Zellen, also 4h nach Aussaat wurde in der Positivkontrolle Staurosporin (Zielkonzentration 30nM/l) zum Herbeiführen der Apoptose zugegeben. Es folgte die Inkubation für 16-18h unter Standardbedingungen.

Tag 2: Färben und Messen

Die Zellen wurden nach Standardprotokoll von den Kulturflaschen gelöst. Dabei wurden sowohl die Zellen, die Nährlösung, wie auch die zum Spülen genutzten Lösungen einer Kulturflasche komplett in ein 50ml Greiner Röhrchen überführt, um eine möglichst realistische Zusammensetzung der in der Flasche vorhandenen lebenden, apoptotischen, wie auch bereits nekrotischen Zellen zu erhalten.

Zusammen mit zusätzlich 20 ml PBS wurden die Greiner Röhrchen 3 min mit 1200 RPM (Hettich Rotina 420R) bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das verbliebene Zellpellet mit 45µl der in 1xBindungspuffer 1:10 verdünnten Annexin Färbelösung resuspendiert. Nach 20 minütiger Inkubation im Eisbad unter dunklen Bedingungen wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 200µl 1x Bindungspuffer gestoppt. Anschließend wurden die Proben durch einen Filter hindurch in ein FACS-Tube überführt. Vor der Messung der Probe am FACS wurde jeweils 3 µl Propidiumiodid (PI) der Konzentration 50µg/ml zugegeben so dass die ermittelte Apoptoserate mit Annexinfärbung gegen die Apoptoserate mit PI validiert werden konnte.

Gating

Um eine möglichst realitätsnahe Zählung der apoptotischen Zellen zu erhalten müssen aus dem Datensatz mögliche Confounder wie Zelltrümmer (Debris) oder aber Zelldubletten und größere Zellkonglomerate, die trotz der vorherigen Filterung in der Zellsuspension übriggeblieben sind, nachträglich am PC aus der Messung ausgeschlossen werden. Dies geschieht durch das sog. Gating: Hierbei werden alle im Vorwärtsstreulicht (FSC) wie im Seitwärtsstreulicht (SSC) registrierten Signale

gegeneinander als Dot-Plot aufgetragen. Die Stärke des FSC-Signals ist als Maß für die Größe der Zelle, die Stärke des SSC-Signal als Maß für die Granularität einer Zelle zu verstehen. Während Debris ein schwächeres SSC und FSC Signal als eine Einzelzelle aufweist zeichnen sich Zelldoubletten oder Konglomerate durch ein wesentlich stärkeres Signal aus(41).

Nach Abschluss des Gatings wurden die Daten mithilfe der open source Software Flowing Software 2 Version 2.5.1 hinsichtlich der Signalstärke der Annexin-V Fluoreszenz (GFP-A) und der PI-Fluoreszenz (PI-A) analysiert. Hierbei wurde die jeweilige Signalintensität der Negativprobe als Referenzwert für nicht apoptotische Zellen verwendet. Höhere Annexin-V oder PI Signalintensitäten wurden als Signal apoptotischer Zellen angenommen und durch die Setzung eines entsprechenden Gates quantifiziert. Somit konnte für jede Messung ein Prozentsatz von apoptotischen zu nicht apoptotischen Zellen angegeben werden.

2.2.4.2 FACS-gestützte Quantifizierung apoptotischer Zellen mit Lomustin Behandlung

Zur Messung eines Effekts der Behandlung mit Lomustin auf das Apoptoseverhalten der Zellen, wurde in einem weiteren Versuchsansatz vor der Apoptosemessung mittels Annexin V eine 4tägige Inkubation der Zellen in 10µM Lomustin-haltigem Nährmedium durchgeführt. Die Konzentration von 10µM wurde in Anlehnung an die ermittelten IC50 Konzentrationen der DIRAS3-shRNA für Lomustin gewählt. Die Messung erfolgte dann wie unter 2.2.4.1 beschrieben.

2.2.4.3 FACS-gestützte Zellzyklusanalyse durch statische Ploidiebestimmung Versuchsprinzip

Zur Analyse des Zellzyklus wird hierbei mithilfe eines fluoreszierenden DNA Interkalans die anteilige Verteilung der Zellen einer Population auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus G0/G1, S und G2/M bestimmt. Je nach DNA-Gehalt, während der G0 bzw. G1 Phase diploid, der S Phase zwischen diploid und tetraploid und der G2/M Phase tetraploid, lässt sich ein unterschiedlich starkes Fluoreszenzsignal messen. Zur Minimierung von Fehlerquellen ist es hierbei wichtig, doppelsträngige RNA durch die Verwendung einer RNase zu entfernen und auf eine angemessene Farbstoffsättigung zu achten, da der Farbstoff PI stöchiometrisch an die in der Zelle vorhandene doppelsträngige Nukleinsäure bindet(41).

Material und Methoden

Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung des Zellzyklus der Tumorzellen wurden diese zunächst durch Inkubation über Nacht in einem nährstoffarmen Medium (DMEM + Pen/Strep 1%) synchronisiert. Anschließend wurde durch Zugabe von normalem Kulturmedium ein Proliferationsreiz gesetzt und der DNA-Gehalt der Zellen mithilfe einer PI-Färbung in verschiedenen Ansätzen nach 4h, 14h und 24h gemessen.

Der zeitliche Ablauf des Versuchs erschließt sich aus Tab.: 3.

Die Färbung der Zellen erfolgte nach folgendem Färbeprotokoll:

Vorbereitung: Abtrypsinieren der Zellen und Einstellen der Zellzahl auf 1 Mio. Zellen, Waschen und anschließende Zentrifugation in 5 ml PBS bei 800 Rounds per minute (RPM) (Hettich Rotina 420R) für 5min

Fixierung: Absaugen des Überstandes und anschließendes Resuspendieren in 500µl PBS bei Raumtemperatur, vorsichtiges Zufügen von 4ml 4°C kaltem 70% Ethanol, Inkubation für eine Stunde bei 4°C zur Permeabilisierung der Zellmembran und Fixierung, zweimaliges Waschen mit 5ml kaltem PBS und anschließender Zentrifugation bei 1200 RPM (Hettich Rotina 420R)und 4°C für 5min, Resuspension des Zellpellets in 100µl PBS.

Färben: Die PI-Färbelösung setzte sich wie folgt zusammen:

- 340µl PBS
- 25µl 1% Saponin in PBS
- 25µl RNase A 1mg/ml
- 10µl PI 1mg/ml

Zugabe von je 400µl der Färbelösung, Resuspension und Überführung in das FACS-Tube, anschließende Inkubation für 30 Min. bei 37°C.

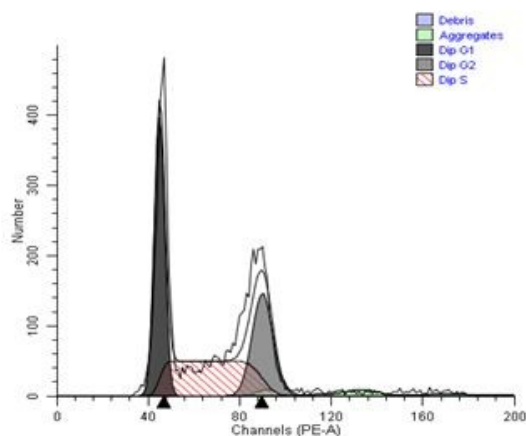


Abb.: 2 Beispiel statische Plodiebestimmung mit ModFit LT

Messung am FACS: Das Fluoreszenzsignal der angefärbten DNA wird einerseits als Signalthöhe entsprechend der Helligkeit, als Signalweite entsprechend der Partikelgröße und als Fläche entsprechend dem Fluoreszenzgehalt, erfasst. Durch kombinierte Darstellung dieser Parameter und entsprechendes Gating müssen zunächst Zelldoubletten ausgeschlossen

werden(41). Daraufhin kann mithilfe der Analysesoftware ModFit LT, die prozentuale Verteilung der Zellen auf G1, S, und G2/M Phase ermittelt werden.

Tab.: 3 Verlaufsprotokoll statische Ploidiebestimmung

Zellzyklus Analyse	4h Ansatz	14h Ansatz	24h Ansatz
Tag 1	Aussaat von je 350000 Zellen in 5ml Kulturmedium	Aussaat von je 350000 Zellen in 5ml Kulturmedium	Aussaat von je 350000 Zellen in 5ml Kulturmedium
Tag 2	Mediumwechsel Medium nährstoffarm	Mediumwechsel Medium nährstoffarm	Mediumwechsel Medium nährstoffarm
Tag 3	Mediumwechsel zu Standardkulturmedium Inkubationszeit 4h Wachstumsstop / Färben / Messung am FACS	Mediumwechsel zu Standardkulturmedium Inkubationszeit 14h	Mediumwechsel zu Standardkulturmedium Inkubationszeit 24 h
Tag 4		Wachstumsstop / Färben / Messung am FACS	Wachstumsstop / Färben / Messung am FACS

Material und Methoden

2.2.5 Proteome Profiling

Mittels des Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (RnD Systems) wurde das Phosphorylierungsmuster von 43 Phosphorylierungsstellen verschiedener Kinasen erstellt.

Versuchsprinzip

Auf Nitrozellulosemembranen sind Antikörper gegen bestimmte Phospho-Kinasen punktförmig aufgetragen. Die Antikörper richten sich spezifisch gegen bestimmte Phosphorylierungsstellen mit regulativer Funktion. Durch Inkubation der Membranen mit Zellysat über Nacht werden die entsprechend phosphorylierten Proteine an den Spots auf der Membran gebunden. Nachdem unspezifische Proteine in einem Waschschrift entfernt worden sind, wird der biotinylierte Detektionsantikörper hinzugegeben. Nach zweistündiger Inkubation werden überschüssige Antikörper durch einen weiteren Waschschrift entfernt, daraufhin wird die Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Streptavidin-HRP) zugefügt. Streptavidin bindet an den biotinylierten Detektionsantikörper, während die Meerrettichperoxidase, nach einem weiteren Waschschrift, zusammen mit dem nun zugegeben "chemi-reagent Mix", ein Chemilumineszenzsignal erzeugt(42).

Versuchsdurchführung

Der Versuch wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt, anschließend wurde das Lumineszenzsignal mit Hilfe des Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare Europe) erfasst und mittels der Bildanalysesoftware ImageJ quantifiziert.

Auswertung

Die Quantifizierung erfolgte für jeden Spot relativ zur auf der jeweiligen Membran aufgetragenen Positivkontrolle. Die so gewonnene relative Phosphorylierung wurde dann mit dem Phosphorylierungsmuster des shRNA- Kontrollklons verglichen. Die Recherche zur jeweiligen Funktion der differenziell phosphorylierten Proteine erfolgte unter Zuhilfenahme der Website <https://reactome.org>, die einen Überblick über intra- und extrazelluläre Signalwege unter direkter Verlinkung der Originalpublikationen bietet(43,44).

3 Ergebnisse

3.1 Datenbankanalyse zu DIRAS3-Expression

Zunächst wurde mithilfe des Analyseprogramm R2 eine Datenbankrecherche zur Expression von DIRAS3 durchgeführt. Diese kostenfrei online verfügbare Software ermöglicht retrospektiv den Zugriff auf verschiedene Expressionsdatensätze aus Normal- und Tumorgewebe sowie auch auf einige gängige Zelllinien (URL: <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi#>). Leider waren jedoch zu den in dieser Arbeit verwendeten Gliom-Linien U251 und HS683 keine Daten vorhanden. Die Auswahl der verwendeten Normalgewebe- und Tumordatensätze erfolgte nach Größe und Aktualität der Publikationen. Der Ursprung der Datensätze ist jeweils unter den Abbildungen angegeben.

3.1.1 Natürliche DIRAS3 Expression im Gehirn und anderen Organen

Als Ausgangspunkt wurde die natürliche DIRAS3 Expression in einzelnen Hirnregionen, sowie den Ursprungsgeweben der häufigsten Tumore, nämlich in Cervix-, Brustdrüsen-, Dickdarm-, Lungen-Ovarial- und Prostatagewebe betrachtet (Abb.: 3).

Es wird deutlich dass zwischen verschiedenen Organen, wie auch innerhalb verschiedener Hirnregionen deutliche Unterschiede der DIRAS3 Expression bestehen: Auffällig hohe DIRAS3 Expression findet sich in Proben aus dem Nucleus (N.) accumbens, dem Hypothalamus, der Medulla sowie im Bereich des N. vestibularis superior. Weiter weisen die Proben aus Ovar und Cervix eine hohe DIRAS3

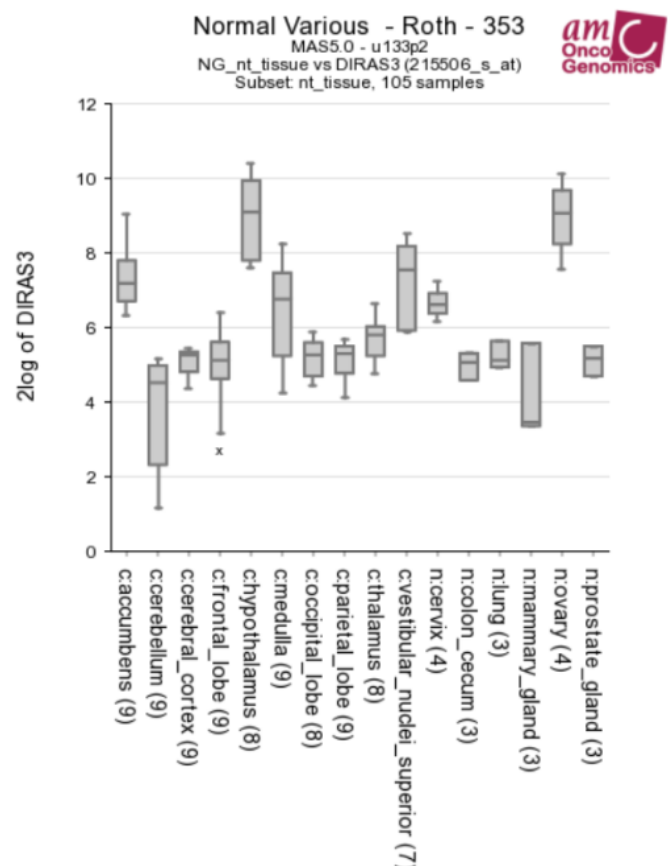


Abb.: 3 Expressionsanalyse DIRAS3 in nicht neoplastischem Hirngewebe verglichen mit weiteren Geweben, Datensatz Roth et. al.⁶³, 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>)'

Ergebnisse

Expression auf. Kortexareale, Darmgewebe, sowie Lungen und Prostatagewebe zeigen in dieser Analyse verglichen mit den o.g. Proben eine niedrigere Expression von DIRAS3.

3.1.2 DIRAS3 Expression in Gliomen im Vergleich mit anderen soliden Tumoren

In einem sogenannten MegaSampler wurde die DIRAS3 Expression aus mehreren Datensätzen verschiedener Gliomtypen, aber auch häufiger anderer Tumorentitäten in Abb.: 4 dargestellt. Als Referenz dient der Datensatz von Berchtold et al.(45) (post-mortem Gewebeproben verschiedener Hirnareale).

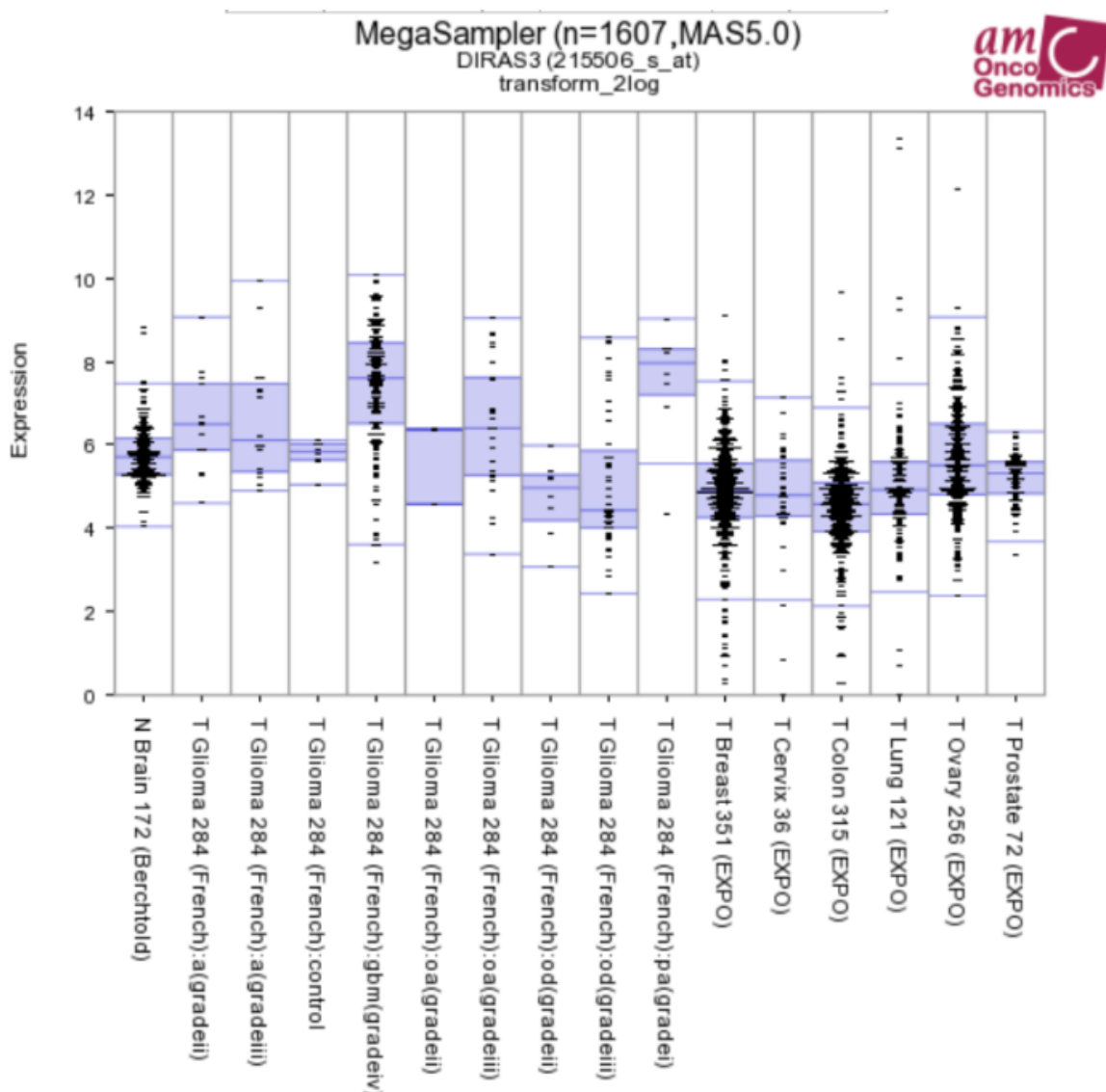


Abb.: 4 DIRAS3 Expression in Normalhirngewebe, Gliomsubtypen sowie weiteren häufigen Tumoren; MegaSampler Datensätze aus Berchtold et al.⁴⁴, French et al.⁴⁵ sowie expO, 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>)'.

Deutlich zeigt sich eine hohe DIRAS3 Expression in Glioblastomen IV (GBM), Astrozytomen (A) und Oligoastrozytomen III (OA), sowie dem Pilozytischen

Astrozytom (PA). Dagegen weisen Oligodendrogliome II und III (O) eine niedrigere DIRAS3 Expression auf. Auf einem ähnlichen Expressionslevel liegen Tumore der Brustdrüse, Cervix-, Colon-, Lungen- und Prostatakarzinom. In Ovarialtumoren findet sich wieder eine höhere DIRAS3 Expression. Verglichen mit dem Expressionslevel in Abb.: 3 kann jedoch in Ovarialtumoren von einer Herabregulation der DIRAS3 Expression in Vergleich zu gesundem Ovarialgewebe ausgegangen werden.

3.1.3 Effekt der DIRAS3-Expression im Bezug auf das Gesamtüberleben

Schließlich wurde das Expressionslevel von DIRAS3 in den verschiedenen Gliomentitäten in einer Kaplan-Meier Kurve mit dem Gesamtüberleben korreliert. Dabei wird der Datensatz anhand der Expression des untersuchten Gens mittels Log-Rank-Test in einen hohen und einen niedrigen Expressionstyp eingeteilt, und anschließend eine entsprechende Kaplan-Meier Kurve generiert (cutoff mode: scan)(46). Hierbei wird ersichtlich, dass sowohl in Glioblastomen (WHO IV) (Abb.: 5) Oligodendrogliomen (Abb.: 7)(47) als auch über histologische Subtypen hinweg (Abb.: 6)(47) der niedrige Expressionstyp von DIRAS3 mit einem längeren Gesamtüberleben einhergeht.

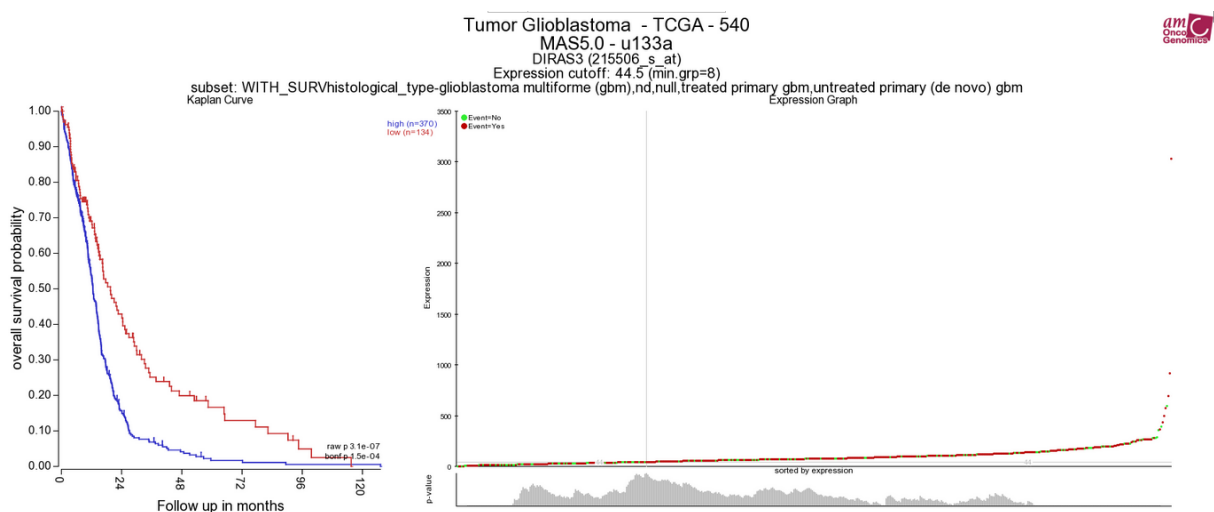


Abb.: 5 Kaplan-Meier Kurve DIRAS3 Expressionslevel Korrelation mit Gesamtüberleben bei Glioblastompatienten, Datenbank TCGA Glioblastoma, cutoff: 44,5 fold Expression, cutoff-mode: scan; 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>)'.

Ergebnisse

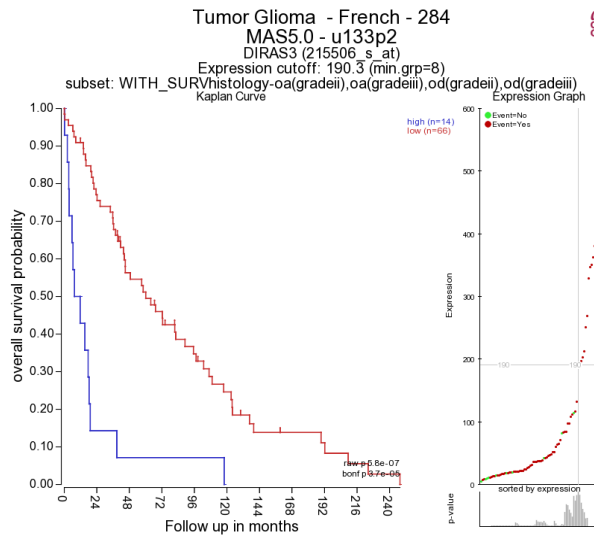


Abb.: 7 Kaplan-Meier Kurve DIRAS3-Expressionslevel Korrelation mit Gesamtüberleben bei Oligodendrogliompatienten, Datenbank: French et. al.⁴⁵, cutoff: 190,3 fold Expression, cutoff-mode: scan; 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>)

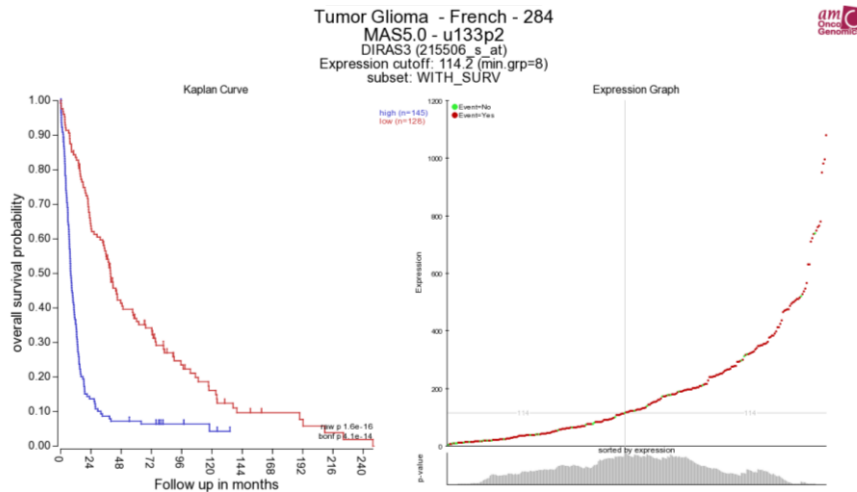


Abb.: 6 Kaplan-Meier Kurve DIRAS3-Expressionslevel Korrelation mit Gesamtüberleben bei Gliompatienten (allgemein), Datenbank: French et. al.⁴⁵, cutoff: 114,2 fold Expression, cutoff-mode: scan; 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>)

Dies lässt sich jedoch nicht generell auf andere Tumorentitäten übertragen. So scheint z.B. in Ovarialtumoren eine umgekehrte Korrelation zu bestehen (Abb.: 8)(48).

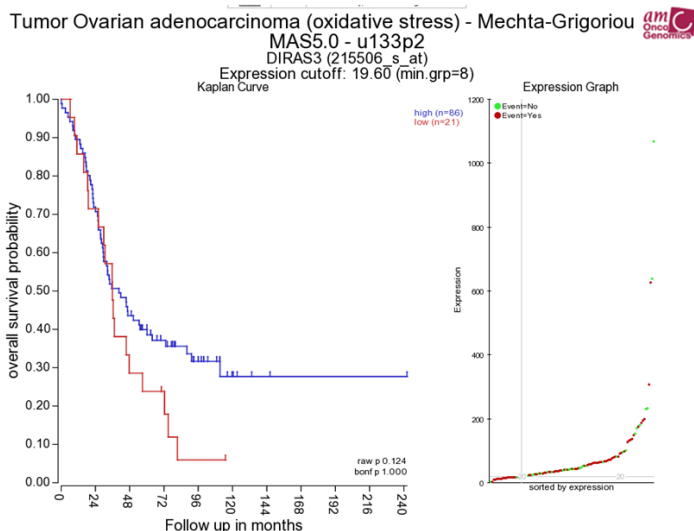


Abb.: 8 Kaplan-Meier Kurve DIRAS3-Expressionslevel Korrelation mit Gesamtüberleben bei Ovarialkarzinom-Patienten, Datenbank: Mechta-Grigoriou et al.⁴⁶; cutoff: 19,6 fold Expression, cutoff-mode: scan; 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform ([http:// r2.amc.nl](http://r2.amc.nl))

3.2 Selektion der DIRAS3-shRNA Klone durch Expressionsanalyse

Anhand eines *in vitro* DIRAS3 knockdown Modells (DIRAS3-shRNA) in U251 und HS683 Gliomzelllinien sollten nun weitere Informationen zur DIRAS3-Funktion gewonnen werden. Der DIRAS3 knockdown wurde durch stabile Transfektion der Zellen mit einer DIRAS3-shRNA erreicht. Die DIRAS3 Expression wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Anschließend wurden geeignete knockdown-Klone wie auch Kontrollklone für die funktionellen Analysen ausgewählt.

Tab.: 4 Nomenklatur in Abbildungen und Beschriftungen

Wildtyp	WT
Kontrollklon transfiziert mit Kontroll shRNA	shCTRL
DIRAS3-shRNA transfizierter Klon und Nummerierung	z.B.: shD3.(shRNA "x")Klon"x"
Anzahl biologischer Replikate	$n_b = x$
Gesamtzahl technischer Replikate	$n_t = x$
Statistische Signifikanz nach Kruskal Wallis test mit Dunn's multiple comparison test	ns = nicht signifikant * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$

Ergebnisse

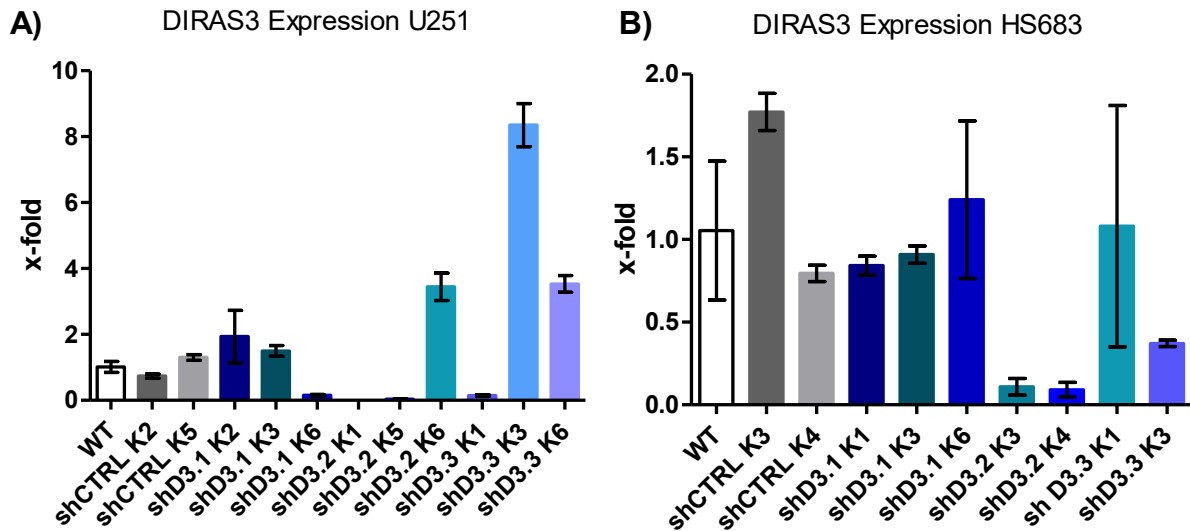


Abb.: 9 -PCR DIRAS3 Expression; $n_t=3$; $n_b=1$, $n_t=3$; A) U251 Zelllinie, B) HS683 Zelllinie

Abb.: 9 zeigt die DIRAS3 Expression, jeweils in Relation zum Wildtyp. In Tab.: 1 sind die Klone für die weiteren Versuche aufgeführt. Für die Zelllinie U251 konnten vier und für die HS683-linie drei shRNA-Klone mit ausreichender DIRAS3 Suppression gewonnen werden:

Als Kontrollen wurden shCTRL5 (U251) und shCTRL4 (HS683) bestimmt.

Tab.: 5 : ausgewählte DIRAS3 knockdown Klone

U251		HS683	
Klon	Mittlere DIRAS3 Expression relativ zum Wildtyp	Klon	Mittlere DIRAS3 Expression relativ zum Wildtyp
shCTRL 5	1,3	shCTRL 4	0,8
shD3.1 K6	0,2	shD3.2 K3	0,1
shD3.2 K1	< 0,1	shD3.2 K4	0,1
shD3.2 K5	< 0,1	shD3.3 K3	0,4
shD3.3 K1	0,1		

3.3 Proliferationsassays

DIRAS3 wird in verschiedenen Tumorentitäten unter anderem in Ovarialtumorzelllinien als Tumorsuppressorgen beschrieben, dessen Herabregulation zu einer verstärkten Zellproliferation führt¹³.

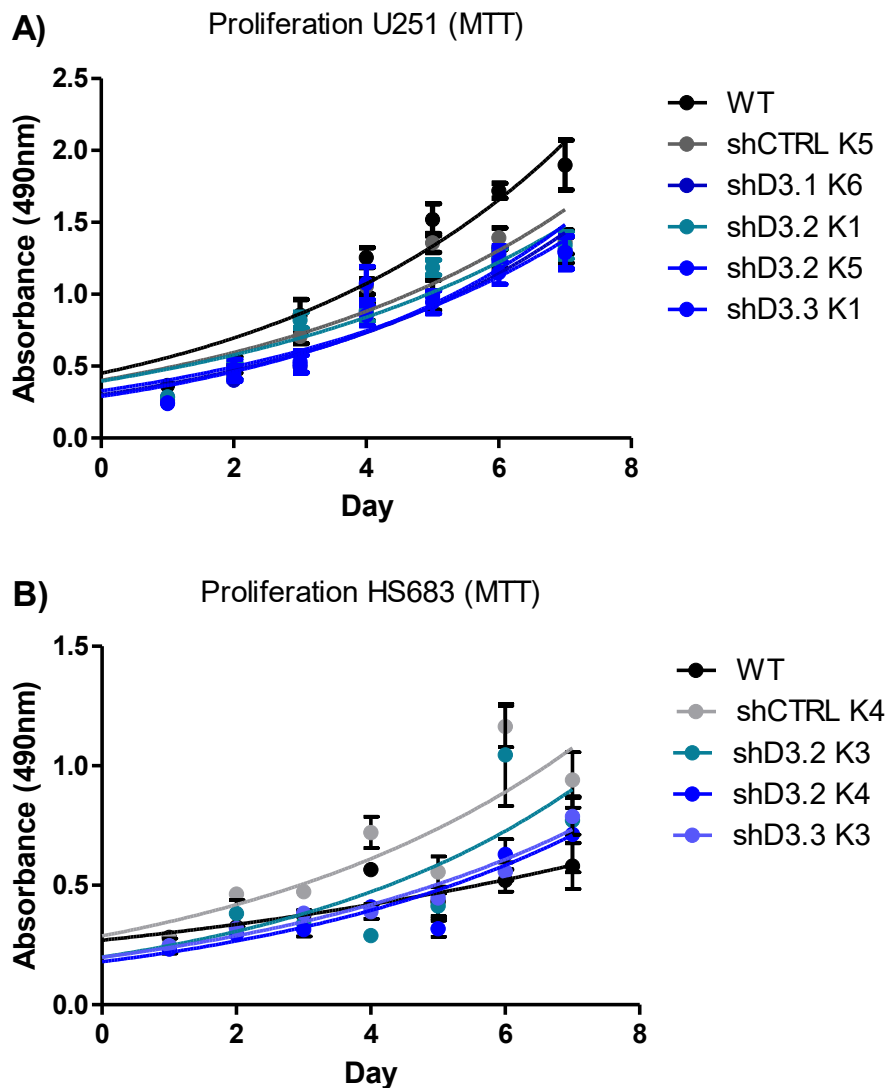


Abb.: 10 A) MTT-Proliferationsassay U251, 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test ns, $n_b = 3$, $n_t = 9$; B) MTT-Proliferationsassay HS683; 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test ns; $n_b = 2$, $n_t = 6$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst, in je drei unabhängigen Ansätzen, das Proliferationsverhalten der Zelllinien shDIRAS3-U251 und shDIRAS3-HS683 mittels des redoxbasierten colorimetrischen Proliferationsassay CellTiter 96® AqueousOne getestet. Zur Validierung der Ergebnisse in der U251 Zelllinie wurde zusätzlich ein BrdU basierter ELISA-Proliferationstest sowie eine Zellzyklusanalyse durch statische Ploidiemessung durchgeführt.

Ergebnisse

Mittels des MTT basierten Assays konnte kein signifikanter Effekt des DIRAS3 knockdown nachgewiesen werden (Abb.: 10) auch in den für U251-Linie durchgeführten BrdU Assays zeigte sich zwar ein Trend zu einer geringeren Proliferationsrate in den shDIRAS3 Klonen, dieser war aber im direkten Vergleich mit shCTRL5 nicht signifikant (Dunn`s multiple comparison Test) (Abb.: 11).

Tab.: 6 Gemittelte Verdopplungszeit (mDT) in Tagen U251 und HS683

U251	WT	sh CTRL K5	shD3.1 K6	shD3.2 K1	shD3.2 K5	shD3.3 K1
mDT	3,2	3,5	3,1	3,7	3,0	3,4
HS683	WT	sh CTRL K4	shD3.2 K3	shD3.2 K4	shD3.3 K3	
mDT	6,3	3,7	3,2	3,5	3,7	

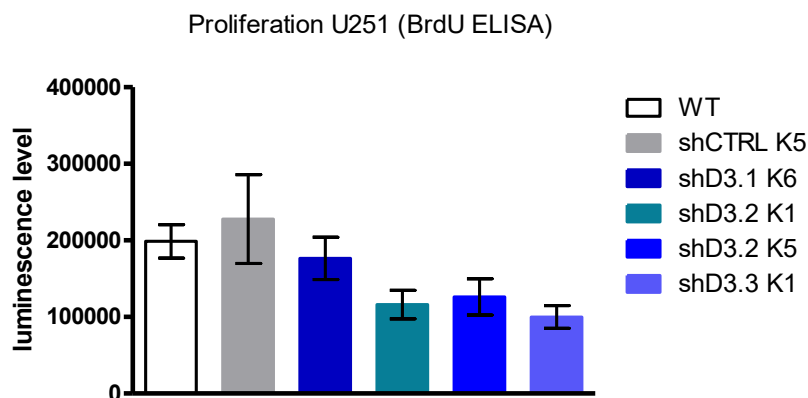


Abb.: 11 U251 BrdU-ELISA Proliferationsassay; 1-way ANOVA Kruskal Wallis test $p=0,0181$; Dunn's multiple comparison post-test: ns, $n_b = 4$, ; $n_t = 17$

Dagegen fallen bei der Untersuchung des Zellzyklus durch FACS-gestützte statische Ploidiebestimmung deutliche Unterschiede auf was die Verteilung der Zellen auf die drei Zellzyklusphasen G1/G0, S und G2/M angeht (Abb.: 12). Während in der Messung 4h nach Zugabe des regulären Nährmediums das Verteilungsmuster der Zellzyklusphasen in Wildtyp, Kontrollklon und DIRAS3-shRNA-Klonen noch weitgehend gleich ist, zeigt sich in der 14h Messung folgendes Bild: bei Wildtyp und Kontrolle befinden sich jeweils 46% der Zellen in der G1 Phase, dagegen liegt dieser Anteil bei den DIRAS3-shRNA Klonen zwischen 10% und 22%. Den niedrigsten G1/G0 Anteil weisen die Klone DIRAS3-shRNA 1 K6 mit 10% und DIRAS3-shRNA 2

K5 mit 15% auf. 47-70% der DIRAS3-shRNA Zellen befinden sich in der S-Phase: führend ist hier DIRAS3-shRNA 2 K5 mit 70%, während WT und Kontrolle mit 40% bzw. 50% in der S-Phase vertreten sind. In der G2/M Phase liegen die Werte für WT und Kontrolle bei 14% bzw. 4% während bei den knockdown Klonen Werte zwischen 15 und 33% (DIRAS3-shRNA 1 K6) zu finden sind. 24h nach Zugabe des Nährmediums zeigt sich ein weiter desynchronisiertes Bild der Zellzyklen, wobei die G1/G0 Phase im WT und DIRAS3-shRNA 1K6 bei etwa 30% liegt, während die Kontrolle 54% aufweisen und die drei weiteren DIRAS3-shRNA Klone über 60% G1/G0 aufweisen. Die S-Phase ist bei allen Zellreihen mit 19-26% vertreten, während die G2-Phase beim WT 48% bei der Kontrolle 23% beim DIRAS3-shRNA 1K6 42% und bei den restlichen DIRAS3-shRNA etwa 14-19% ausmacht.

Ergebnisse

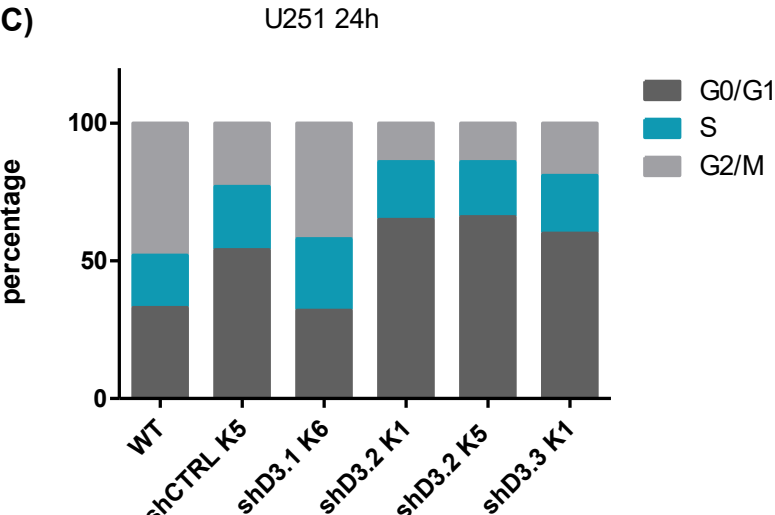
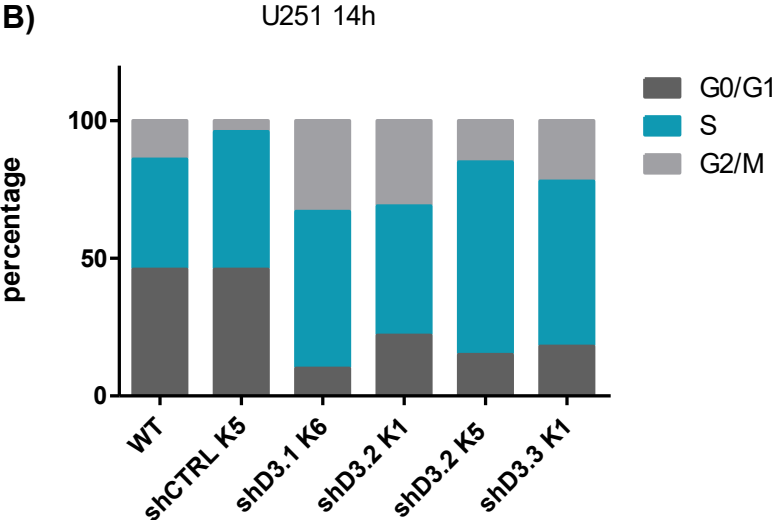
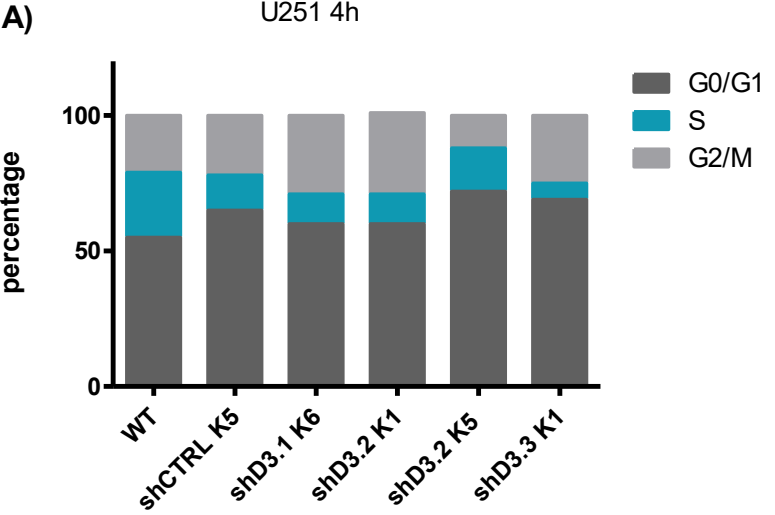


Abb.: 12 U251, statische Ploidiebestimmung A) 4h, B) 14h, C) 24h nach Synchronisation, $n_b = 1$, $n_t = 10000$

3.4 Chemoresistenztestung durch Bestimmung der mittleren Inhibitorischen Konzentration IC50 mit Hilfe des CellTiter Blue® Cell Viability Assay

Einen wesentlichen Bestandteil der aktuellen Erstlinientherapie nach Stupp et al. beim Glioblastom stellt die Chemotherapie mit dem Alkylanz Temozolomid dar(20). Als Zweitlinientherapie gilt noch immer die Kombinationschemotherapie aus Procarbacin, Lomustin (CCNU) und Vincristin kurz PCV-Therapie. Hingegen wird bei anaplastischen Oligodendrogliomen mit 1p19q Co-Deletion eine Strahlentherapie in Kombination mit PCV Therapie als Erstlinientherapie empfohlen(49). In dieser Arbeit sollte das Verhalten der DIRAS3 knockdown Klone gegenüber diesen vier Chemotherapeutika getestet werden, um einen möglichen Effekt der DIRAS3-Herabregulation auf das Ansprechverhalten der Tumore zu prüfen. In je mindestens 2 unabhängigen Versuchen wurde, unter aufsteigenden Konzentrationen des jeweiligen Chemotherapeutikums, für jede Zelllinie mittels CellTiter Blue® Cell Viability Assay die Konzentration errechnet, bei der eine 50-prozentige Wachstumsreduktion erreicht war (IC50 Wert). In der Signifikanztestung wurden die mittleren IC50 Werte für jeden Klon mit denen der Kontrolle verglichen.

Ergebnisse

3.4.1 Temozolomid

Die mittlere IC₅₀ des U251 WT liegt bei 10,50µM, die der Kontrolle bei 13,92µM, für die knockdown-Klone shD3.1 K6 bei 17,77µM, shD3.2 K1 bei 11,77µM, shD3.2 K5 bei 15,65µM und shD3. K1 bei 23,50µM. Im Vergleich zur Kontrolle konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

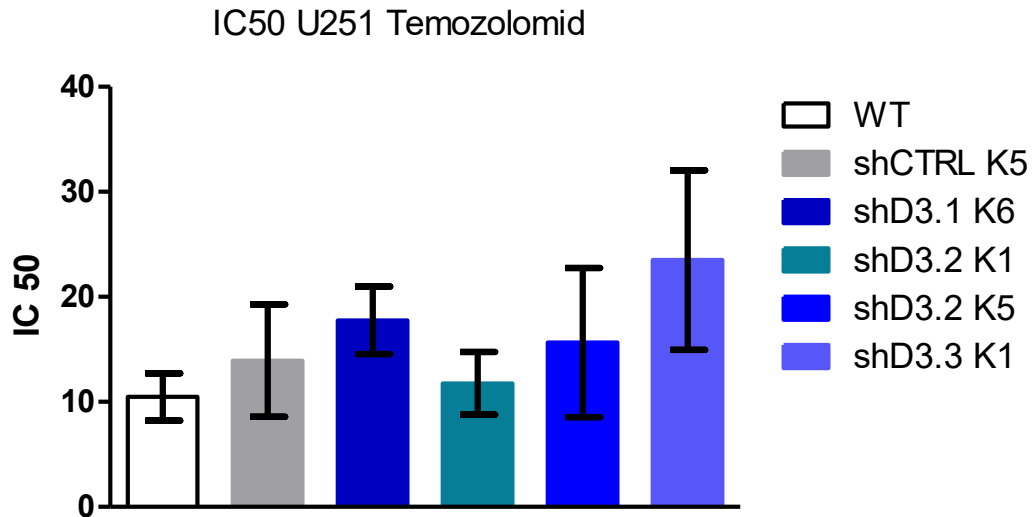


Abb.: 13 IC₅₀ U251 Temozolomid; 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test ns, n_b = 3, n_t = 9

Problematisch war hier eine hohe Variabilität in den Ergebnissen, was möglicherweise durch eine geringe Stabilität von TMZ bedingt wurde.

3.4.2 Procarbazin

Abb.: 14 zeigt die mittleren IC₅₀ Konzentrationen für das alkylierend wirkende Chemotherapeutikum Procarbazin. Die mittleren IC₅₀-Werte lagen bei, U251 WT 2125 μ M; Kontrolle 2378 μ M; shD3.1 K6 2349,5 μ M; shD3.2 K1 1997,5 μ M; shD3.2 K5 2416 μ M; shD3. 3 K1 2286,5 μ M.

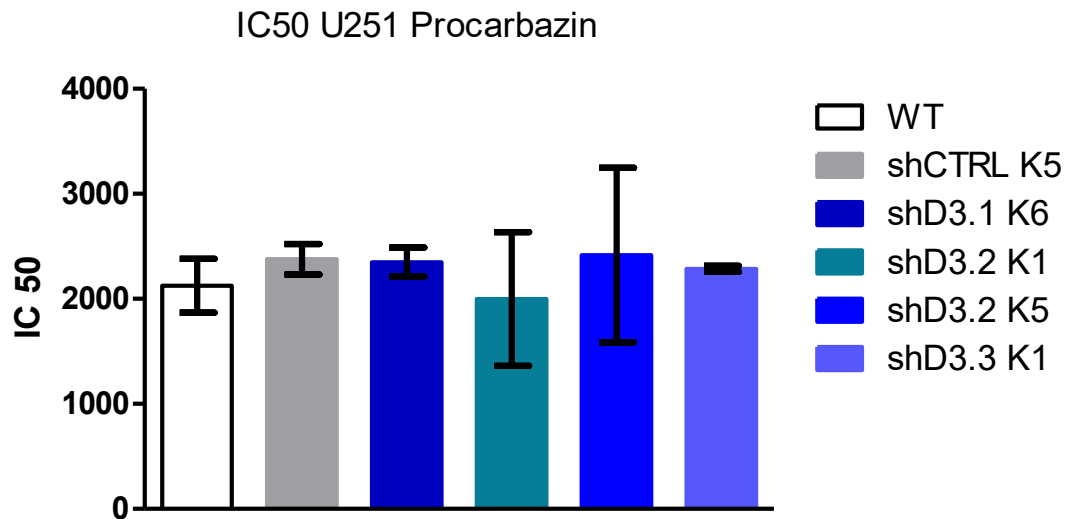


Abb.: 14 IC₅₀ U251 Procarbazin; 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test ns;
 $n_b = 2, n_t = 6$

In der statistischen Auswertung ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den DIRAS3-shRNA Klonen und der Kontrolle.

Ergebnisse

3.4.3 Lomustin (CCNU)

In Abb.: 15 sind die mittleren IC₅₀ Konzentrationen der 3 Versuchsansätze mit der U251 Zellreihe dargestellt:

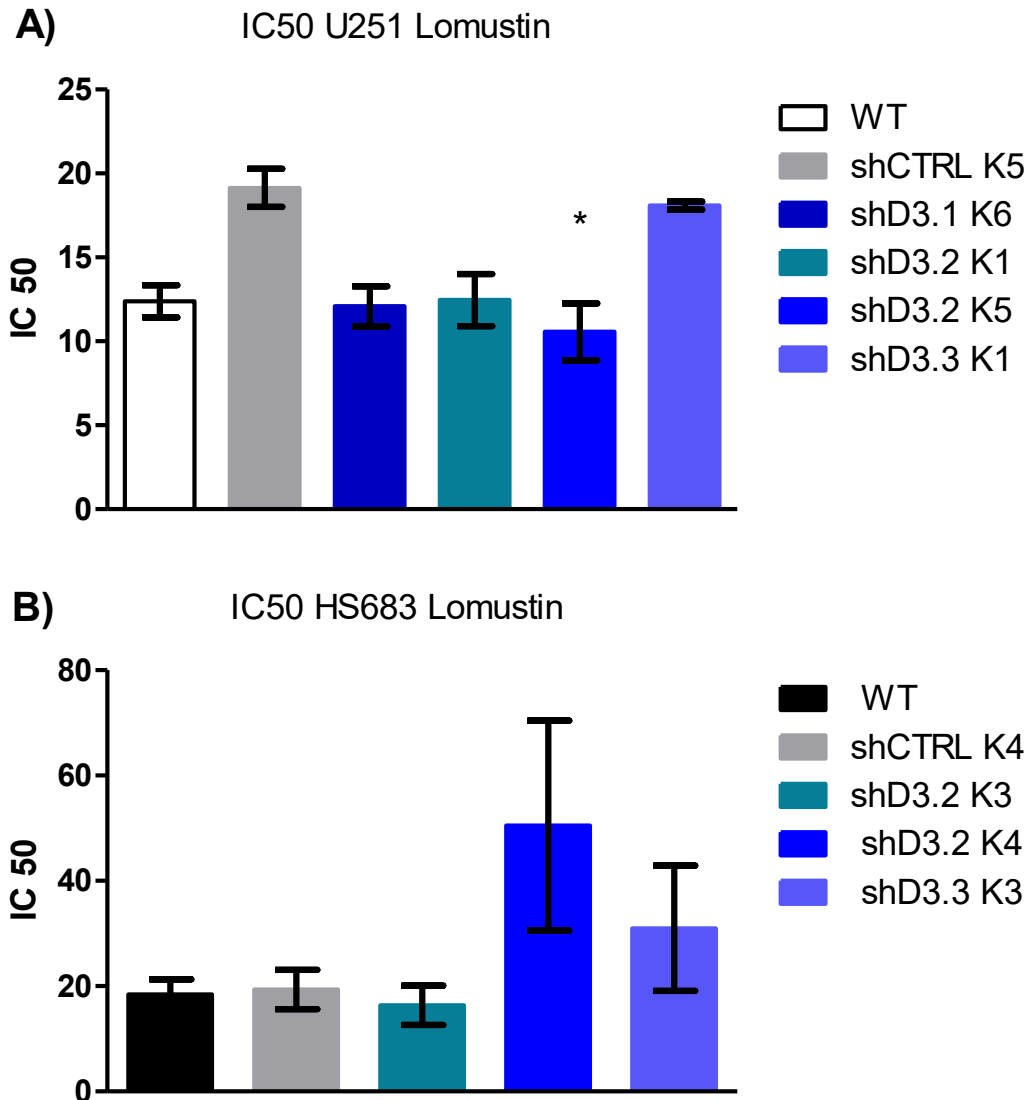


Abb.: 15 A) IC₅₀ U251 Lomustin; 1-way ANOVA Kruskal Wallis test $p=0,0171$; Asterisk entsprechend dem Dunn's multiple comparison post-test, $n_b = 3$, $n_t = 9$;
B) IC₅₀ HS683 Lomustin; 1-way ANOVA Kruskal Wallis test: ns; $n_b = 2$, $n_t = 6$

In allen drei Versuchen weisen drei von vier DIRAS3-shRNA Klone deutlich geringere IC₅₀-Werte als die Kontrolle CTRL5 auf. So liegt der durchschnittliche IC₅₀ für DIRAS3-shRNA 1K6 bei 12,09µM, DIRAS3-shRNA 2K1 bei 12,46µM, DIRAS3-shRNA 2 K5 bei 10,56µM, während die Kontrolle einen durchschnittlichen IC₅₀ von 19,14µM aufweist. Auch DIRAS3-shRNA 3 K1 liegt mit 18,08µM in diesem Bereich. Für den U251 WT wurde eine durchschnittlichen IC₅₀ von 12,38µM gemessen. Dieser deutliche Effekt in der U251 Linie konnte jedoch in den analog durchgeführten Versuchen mit der HS683 Zelllinie nicht reproduziert werden.

Hier liegen die gemittelten IC₅₀ Werte bei 18,40µM (WT), 19,37µM (shCTRL K4), 16,38µM (shD3.2K3), 50,50µM (shD3.2 K4), 31,00µM (shD3.3 K3). Dabei zeigen die beiden letztgenannten DIRAS3-shRNA Klone zwar deutlich erhöhte IC₅₀ Werte, diese unterliegen jedoch deutlichen Schwankungen.

3.4.4 Vincristin

Abb.: 16 zeigt die mittleren IC₅₀ Werte der Vincristin Testung: WT (1,44µM), und DIRAS3-shRNA Klone (1,14µM; 1,57µM; 1,88µM, 1,86µM) weisen zwar durchweg eine niedrigere inhibitorische Konzentration 50 auf als die Kontrolle (2,38µM).

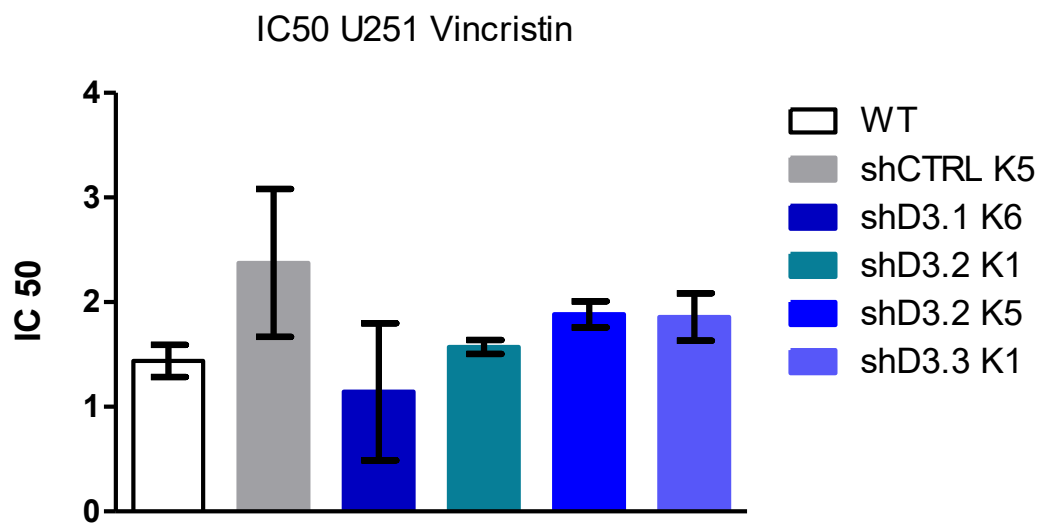


Abb.: 16 A) IC₅₀ U251 Vincristin; 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test: ns; n_t=6 n_b = 2

Jedoch zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Ergebnisse

3.5 Apoptosemessung

Zur Analyse des Apoptoseverhaltens der DIRAS3-shRNA Klone wurden FACS basierte Messungen mit FITC-markiertem Annexin V, mit und ohne Behandlung durch Lomustin durchgeführt.

3.5.1 Apoptosemessung mittels FITC-Annexin V

In den Apoptoseversuchen zeigte sich für die U251 Zelllinie ein sehr deutlicher Effekt für DIRAS3-shRNA 1 K6 und DIRAS3-shRNA 2 K5, während die anderen beiden DIRAS3-shRNA Klone sich nicht signifikant unterschiedlich zum Kontrollklon oder zum Wildtyp verhielten (Abb.: 17).

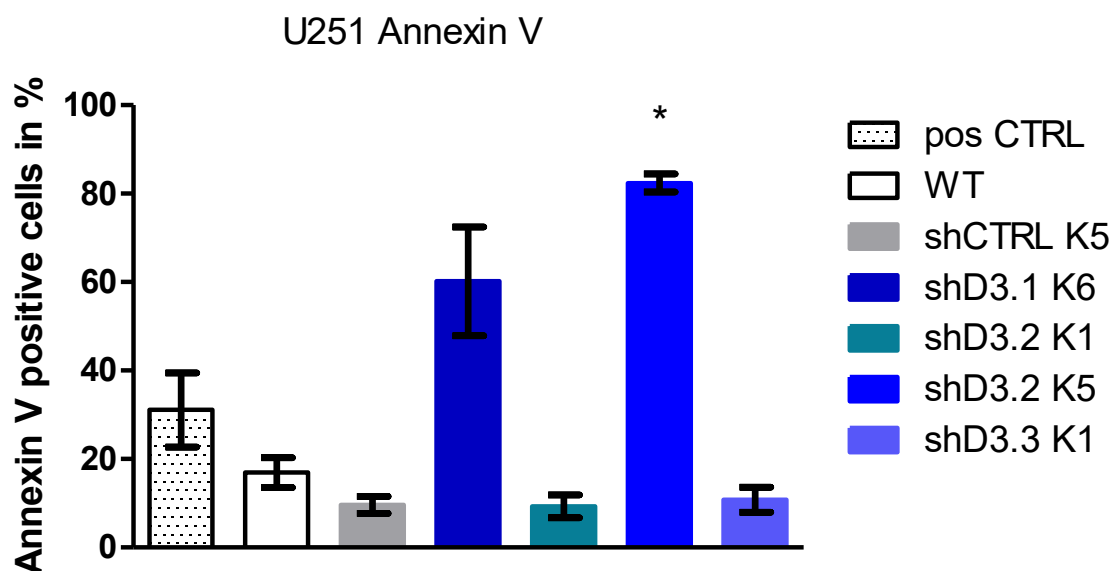


Abb.: 17 U251 Apoptosemessung mit Annexin V; pos CTRL = WT+ Staurosporin 30nM, 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test: $p = 0,0003$; Asterisk entsprechend dem Dunn's multiple comparison post-test; $n_b = 4$; $n_t = 40000$

Im daraufhin einmalig durchgeführten Test der HS683 Zelllinie zeigten ebenfalls zwei DIRAS3-shRNA Klone eine ausgesprochen hohe Apoptoserate mit über 70% auf, während der Kontrollklon und die Wildtyp Zellen bei 54% bzw. 45% liegen. Der DIRAS3-shRNA 3 K3 zeigt dagegen nur eine Apoptoserate von 29% (Abb.: 18).

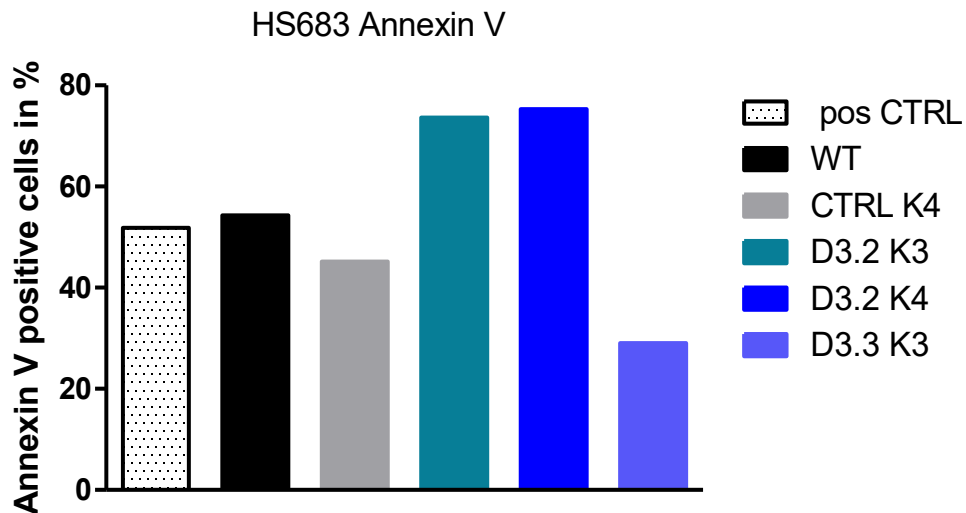


Abb.: 18 HS683 Apoptosemessung mit Annexin V, $n_b = 1$, $n_t = 10000$

3.5.2 Apoptosemessung mittels FITC Annexin V unter Lomustinbehandlung

Wie in Abb.: 15 zu sehen, ist von einem stärker wachstumshemmenden Effekt auf die DIRAS3-shRNA Klone im Vergleich mit dem Kontrollklon in der Zelllinie U251 auszugehen. Da Lomustin als DNA-interkalierendes Alkylanz wirkt, ist ein vermehrtes

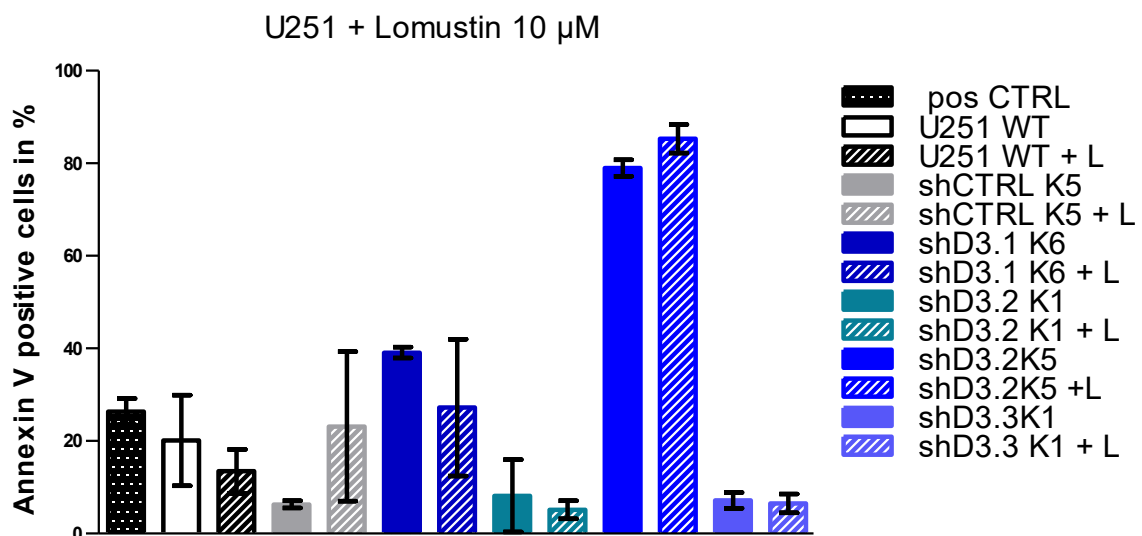


Abb.: 19 U251 Apoptosemessung mit Annexin V Vergleich unbehandelt vs. Lomustin
behandlung ($c=10\mu\text{M}$), 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test: ns; $n_b = 2$, $n_t = 2 \times 10000$; L=Lomustin
10 μM

Absterben der Zellen unter anderem auch durch Apoptose wahrscheinlich.

Wie oben wurde die Apoptoserate der U251 DIRAS3-shRNA Klone unter Lomustin Behandlung mittels FITC-Annexin V quantifiziert und mit entsprechenden unbehandelten Kontrollen verglichen. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Ergebnisse

3.6 Migrations- und Invasionsversuche

Die Fähigkeit der Tumorzellen zu migrieren, Nah- und Fernmetastasen zu bilden und andere Gewebe zu durchdringen ist eine wesentliche Eigenschaft aggressiver maligner Tumore. Mittels des Wound-Healing Assays über 24h unter Live-Imaging Bedingungen wurde das Migrationsverhalten der DIRAS3-shRNA Klone beurteilt.

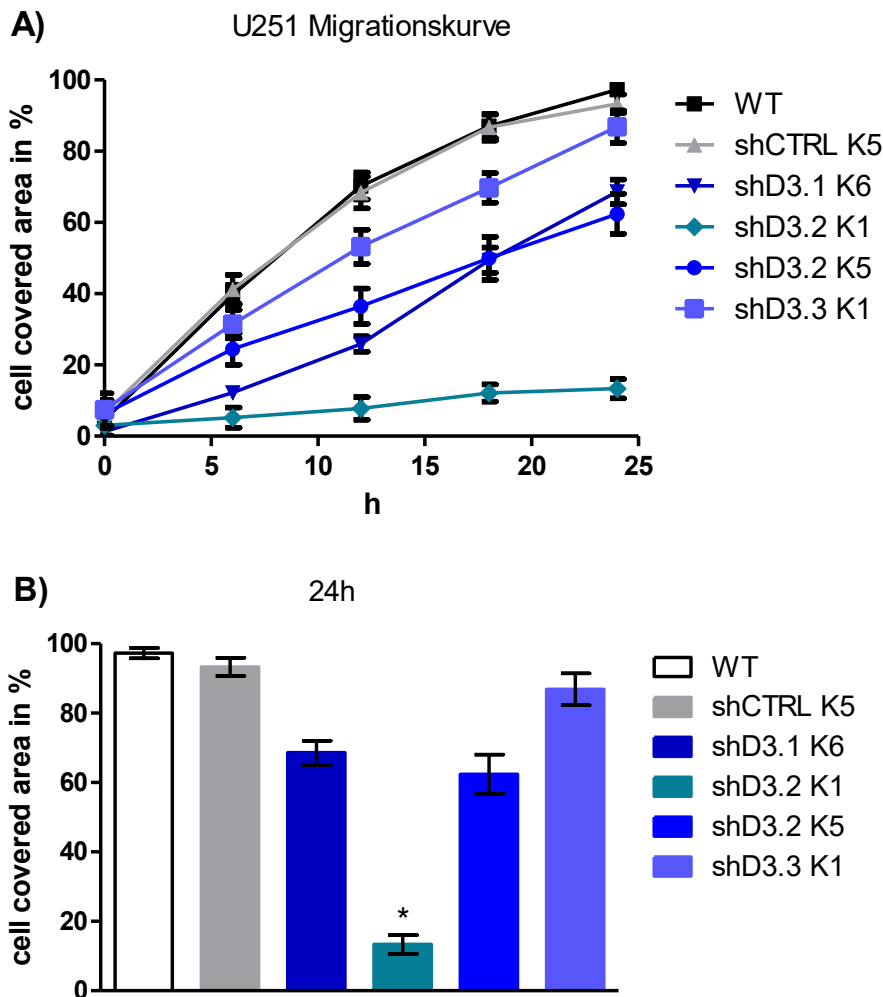


Abb.: 20 A) U251 Migrationskurve, n=2 U251 Wound Healing Assay, B) Zeitpunkt 24h, 1-way ANOVA Kruskal Wallis test: $p = 0,0001$; Asteriske entsprechend dem Dunn's multiple comparison post-test; $n_b = 2$, $n_t = 4$

Dabei wiesen drei von vier DIRAS3-shRNA Klonen eine deutlich geringere Fähigkeit zur Migration auf. Abb.: 20 A) zeigt den prozentual bedeckten Flächenanteil in Abhängigkeit von der Zeit. Es wird deutlich, dass die DIRAS3-shRNA Klone innerhalb von 24h keinen kompletten Verschluss der durch das ibidi-Insert entstandenen "Wunde/Lücke" erreichen. Abb.: 20 B) zeigt die Auswertung der zellbedeckten Lücke nach 24h Inkubationszeit: U251 WT und die Zellen des Kontrollklons haben nahezu 100% der Lücke geschlossen, während der DIRAS3-shRNA Klon 3 K1 etwa 85% und

die DIRAS3-shRNA Klone 1K6 und 2K5 jeweils etwa 65% der Lücke schließen konnten. Bei DIRAS3-shRNA 2K1 wurde auch nach 24h nur etwa 10% der freien Fläche besiedelt.

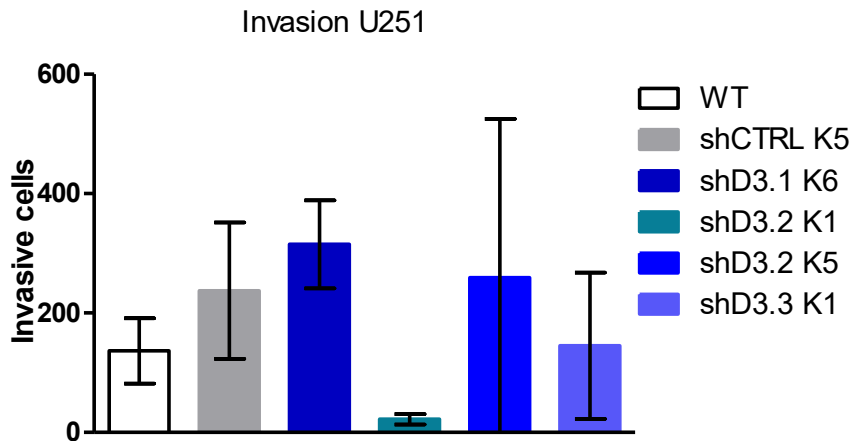


Abb.: 21 U251 Invasionsassay; 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test: ns; $n_b = 3$, $n_t = 9$

Zusätzlich wurde mit einem Transwell-Assay die Invasivität der DIRAS3-shRNA Klone getestet. Es zeigte sich jedoch eine sehr hohe Variabilität der Ergebnisse in den Einzelversuchen, die nicht auf die DIRAS3-shRNA, sondern auf methodisch bedingte Schwankungen zurückzuführen ist. Somit ist anhand dieser Daten keine eindeutige Aussage über die Invasivität der DIRAS3-shRNA Klone im Vergleich zu den Kontrollzellen zu treffen (Abb.: 21).

Ergebnisse

3.7 Proteome Profiler Array

Mithilfe des Proteome Profiler Array sollten Effekte des DIRAS3-Knockdown auf Phosphoproteinebene untersucht werden. Dafür wurden diejenigen DIRAS3-shRNA Klone ausgewählt, die mindestens in einem der funktionellen Assays deutlich unterschiedlich zum Kontrollklon 5 waren. In Tab.: 7 ist die relative Phosphorylierung zu den auf der Array Membran aufbrachten Referenzspots im Vergleich zum jeweiligen Wert von shCTRL5 dargestellt. Die jeweils phosphorylierten Aminosäuren werden mit S (Serin), T (Threonin) und Y (Tyrosin) abgekürzt. Bei der Auswertung der Rohdaten ergaben sich vier Signalweggruppen (s.u.), in denen ähnliche Phosphorylierungsmuster Hinweise auf mögliche DIRAS3 Effekte geben. Wie aus Tab.: 7 hervorgeht ergibt sich kein einheitliches Bild in den drei getesteten U251 shDIRAS3 Klonen, es lassen sich jedoch Gemeinsamkeiten nachweisen.

Proteome Profiler Array Datenanalyse

Betrachtet man die Ergebnisse aus dem Proteome Profiler Array im Hinblick auf zellzyklusregulatorische Proteine, so fällt eine Hypophosphorylierung von p53 (Protein 53kDA) an S15 und S392 in allen 3 shDIRAS3 Klonen gegenüber shCTRL5 auf. Weiter zeigt die Checkpoint Kinase 2 (Chk-2) bei den beiden Klonen shD3.2 K1 und shD3.2K5 eine vermehrte Phosphorylierung an T68.

In den Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) abhängigen Signalwegen kann man eine Hyperphosphorylierung von MSK 1/2 (Mitogen and stress activated kinase) an S376/S360 in allen 3 shDIRAS3 Klonen feststellen. Koherent ist eine vermehrte Phosphorylierung von CREB an S133 sichtbar.

ERK1/2 zeigt in diesem Assay eine verstärkte Phosphorylierung an T202/Y204 // T185/Y187 in shD3.1 K6 und shD3.2 K1. In shD3.2 K5 dagegen ist ERK1/2 vermindert phosphoryliert. Ein genau gleiches Phosphorylierungsmuster besteht für die "mitogen activated protein kinase" p38 α in den drei shDIRAS3 Klonen.

Weiter zeigt sich eine geringfügige Hyperphosphorylierung der src-family Kinasen Yes an Y426 und Lyn an Y397.

Tab.: 7 Proteome Profiler Array: Relative Phosphorylierungslevel prozentual zum Referenzspot; Bezug zu shCTRL5: Farbcodierung: rot - verminderte Phosphorylierung, grün - vermehrte Phosphorylierung; n b=1, nt=2.

	shCTRL K5	shD3.1 K6	shD3.2 K1	shD3.2 K5
Zellzyklusregulation				
p53 1 (S15)	127,2	85,6	102,5	111,1
p53 3 (S392)	174,8	147,4	166,7	168,7
Chk-2 (T68)	0,00	0,00	7,4	11,2
Rezeptortyrosinkinasen gesteuerte Signalwege				
ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187)	62,0	129,53	97,63	30,24
p38 α (T180/Y182)	74,93	105,83	75,86	43,15
MSK 1/2 (S376/S360)	0,00	16,77	19,35	10,10
Creb (S133)	79,93	91,24	110,52	82,14
Lyn (Y397)	2,35	3,76	6,71	4,00
Yes (Y426)	0,00	6,63	3,62	3,01
Stoffwechselsteuerung				
AMPK α 1 (T183)	6,62	14,71	2,13	21,88
AMPK α 2 (T172)	50,33	35,29	35,23	36,60
HSP 60	53,70	46,85	40,04	37,51
GSK3 α/β (S21/S9)	27,52	16,59	19,73	2,48
PRas40 (T246)	80,57	89,82	101,32	47,10
Transkriptionsfaktoren				
STAT2 (Y689)	44,42	34,43	33,55	25,33
STAT3 (S727)	0,00	60,43	1,15	0,00
STAT5 a/b (Y694/Y699)	0,00	7,35	1,73	4,92
STAT6 (Y641)	23,28	20,43	18,95	17,67

Hinsichtlich der am Zellstoffwechsel beteiligten Proteine fällt das Phosphorylierungsmuster der AMPK auf: Die beiden untersuchten Untereinheiten der AMPK zeigen gegensätzliche Phosphorylierungsmuster. AMPK α 1 (T183) ist in zwei der drei DIRAS3-knockdown Klone hyperphosphoryliert, dagegen ist AMPK α 2 (AMP activated protein kinase) an T172 in den drei Knockdown Klonen hypophosphoryliert.

Ergebnisse

GSK3 (Glykogensynthase-Kinase 3) α/β zeigt sich in allen drei shDIRAS3 Klonen vermindert phosphoryliert im Vergleich zum shCTRL K5.

Ein weiteres an der Stoffwechselregulation beteiligtes Phosphoprotein ist PRAS40 (proline rich AKT substrate 40kDa): shD3.1K6 und shD3.2K1 weisen eine Hyperphosphorylierung von PRAS40 an T246 auf, während in shD3.2K5 eine Hypophosphorylierung vorliegt.

Relativ zu shCTRL 5 ergab sich außerdem eine geringere Konzentration von HSP60 in allen drei shDIRAS3-Klonen. HSP60 wirkt neben seiner Funktion als Chaperon als Induktor von Autophagiemechanismen(51).

STATs (Signal transducer and activator of translation) fungieren als Signalüberträger vom Cytosol in den Zellkern im Rahmen des JAK-STAT (Janus-kinase) Signalweges. Auffällig ist in diesem Array die Hypophosphorylierung von STAT2 an Y689 und STAT6 an Y641 in allen shDIRAS3-Klonen. Dagegen zeigt sich eine Hyperphosphorylierung von STAT5a und STAT5b an Y694 bzw. Y699, Ebenso zeigt sich eine Hyperphosphorylierung von STAT3 an S727, besonders stark in shD3.1K6 und eher gering in shD3.2K1.

3.8 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Expressionsdatenanalyse zeigen, dass die DIRAS3 Expression

1. in Tumoren abhängig von Tumorentität und Tumorstadium ist;
2. in Oligodendrogliomen niedriger ist als in Glioblastomen;
3. in Gliomen unabhängig vom WHO Grad eine niedrige DIRAS3 Expression mit verbessertem Gesamtüberleben einhergeht.

In der funktionellen Analyse wird deutlich, dass:

1. die Empfindlichkeit der shDIRAS3-U251 Klone gegenüber Lomustin erhöht ist;
2. in der Hälfte der shDIRAS3 Klone der U251 Linie eine verstärkte Apoptose ausgelöst wird;
3. die Proliferationsaktivität in den shDIRAS3 Klonen zwar nicht signifikant, jedoch tendenziell vermindert ist;
4. die Mehrzahl der shDIRAS3-U251 Klone eine verschlechterte Migrationsfähigkeit aufweisen;

Zudem ergaben sich Hinweise dass:

1. der Zellzyklus in den shDIRAS3 Klonen verändert ist;
2. Phosphorylierungsmuster im Rezeptortyrosinkinaseweg, in der Zellzyklusregulation und in der Stoffwechselregulation durch den DIRAS3-knockdown beeinflusst werden.

4 Diskussion

4.1 Einordnung der Ergebnisse

Im Rahmen der Expressionsdatenanalyse mithilfe der R2 Software zeigten sich sehr unterschiedliche Expressionslevel für DIRAS3 innerhalb verschiedener Hirnregionen, aber auch zwischen verschiedenen Organen. Gewebe außerhalb des ZNS zeigen eine sehr variable Expression von DIRAS3, wobei in ovariellen Gewebe die Expression besonders hoch zu sein scheint. Vergleicht man nun die jeweilige DIRAS3 Expression in Normalgewebe mit Tumorgewebe so fällt auf: in Ovarialtumoren scheint eine Herabregulation von DIRAS3 stattzufinden, während in Gliomen sowohl eine Überexpression von DIRAS3, z.B. bei Glioblastomen, als auch eine Herabregulation der Expression von DIRAS3, z.B. bei Oligodendrogliomen, beobachtet werden kann. Betrachtet man die Korrelation von Gesamtüberleben der Gliompatienten, Glioblastompatienten wie auch Oligodendrogliompatienten mit der Expression von DIRAS3 im Vergleich mit der entsprechenden Korrelation bei Ovarialtumorpatienten, so stellt man fest, dass eine komplett gegensätzliche Beziehung in diesen beiden Tumortypen für die Expression von DIRAS3 besteht: Während bei Gliompatienten eine niedrigere DIRAS3 Expression mit längerem Gesamtüberleben korreliert (Abb.: 5, Abb.: 7, Abb.: 6), scheint bei Ovarialkarzinompatientinnen eine niedrige DIRAS3 Expression mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert zu sein (Abb.: 8). Es liegt nahe, dass auch der Effekt der DIRAS3 Expression in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich sein kann.

Entsprechend der Kaplan-Meier Kurven (Abb.: 5-7) müssen die funktionellen Eigenschaften von DIRAS3 in Gliomen eher onkogen wirken, während die Wirkung von DIRAS3 in anderen Tumorentitäten eher als tumorsuppressiv charakterisiert werden kann. Dies wird durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Tests im U251 DIRAS3 knockdown Modell größtenteils bestätigt. Die Ergebnisse aus der Testung des Chemotherapieansprechens legen eine erhöhte Empfindlichkeit der shDIRAS3-Klone gegenüber Lomustin nahe. Weitere Indizien für eine onkogene Wirkung von DIRAS3 im U251-Tumormodell sind die erhöhte Apoptoserate und reduzierte Migrationsfähigkeit unter DIRAS3 knockdown Bedingungen. Weiterhin konnte zwar in den Proliferationsassays für keinen der shDIRAS3 Klone ein signifikanter Effekt nachgewiesen werden, tendenziell zeigte

sich jedoch eine reduzierte Proliferation in den knockdown Klonen. Auch dieser Befund weist auf eine onkogene Funktion des intakten DIRAS3 hin. Dass sich der DIRAS3-knockdown auf die Zellteilung auswirkt, wird durch die Ergebnisse der Zellzyklusmessung untermauert: Zu den drei Messzeitpunkten (4h, 14h, 24h) nach Medienwechsel von Hungermedium auf das reguläre Kulturmedium zeigt sich besonders in der 14h Messung ein klarer Unterschied im Verteilungsmuster der shDIRAS3 Klone und der shCTRL5- bzw. WT-Population auf die Zellzyklusphasen. Anhand des prozentualen Verteilungsmusters der Zellpopulationen auf die drei Zellzyklusphasen allein lässt sich jedoch keine Aussage über die Teilungsgeschwindigkeit ablesen, sodass die Ergebnisse aus den Proliferationsmessungen damit nicht abschließend erklärt werden können. Anhand der statischen Messung lässt sich nur ableiten, dass der Zellzyklus verändert ist. Diese Veränderung tritt einige Stunden nach dem Wechsel aus einer Nährstoff- und Wachstumsfaktor-Mangelsituation heraus in eine Stoffwechsellage, in der ausreichend Energie und Wachstumsfaktoren vorhanden sind, zu Tage.

Im Ovarialkarzinommodell wurde festgestellt, dass die Wirkung der DIRAS3 - Expression in Ovarialkarzinomen durchaus nicht nur tumorsuppressiv sein muss: DIRAS3 wird in der Publikation von Lu et al. (2014) als molekularer Schalter beschrieben, der zwar in 60% der Ovarialkarzinome herunterreguliert ist, jedoch in ruhenden Ovarialkarzinomzellen über die Induktion von Autophagiemechanismen das Überleben der Tumorzellen unter nährstoffarmen Bedingungen sichert(52). Dies spiegelte sich auch in den an unterschiedlichen Lokalisationen entnommenen Biopsien wieder: so exprimierten nur etwa 20% der primären Ovarialkarzinome DIRAS3, während ca. 80% der Peritonealmetastasen von Ovarialkarzinomen eine DIRAS3 Expression aufwiesen.(52) Im Bereich der Metastase scheint die DIRAS3 Expression also auch den Tumorzellen des Ovarialkarzinoms einen Evolutionsvorteil zu verschaffen. Ein stoffwechselabhängiger Wirkmechanismus von DIRAS3 im Bezug auf die Zellproliferation wäre auch für die untersuchten Gliomzelllinien denkbar, und könnte eventuell erklären warum unter Standardbedingungen kein Proliferationseffekt in den shDIRAS3-Klonen nachweisbar war.

Eine wichtige Rolle scheinen auch die Stärke der DIRAS3 Expression und das Mikroenvironment zu spielen: Zhang et. al berichten, dass DIRAS3-Überexpression um den Faktor 50 in Ovarial- und Mammakarzinomzelllinien Wachstum verhinderte und Apoptose induzierte(53); Reexpression von DIRAS3 auf physiologischem Niveau

Diskussion

induzierte dagegen Autophagie(54). Lu et al. fanden ebenfalls in einem Ovarialkarzinommodell, dass DIRAS3 Expression über PI3K und mTOR Blockade unter *in vitro* Bedingungen zum Zelltod führen kann, der gleiche Mechanismus in einem *in vivo*-Modell aber einen Autophagiemechanismus induziert, welcher die Zellen in einen Ruhezustand versetzt. Nach Abfall der DIRAS3 Expressionslevel fingen diese Zellen dann erneut an zu proliferieren(34).

Eine ähnliche Situation könnte auch auf Gliome zutreffen: Während in Glioblastomen und höhergradigen Gliomen durch das rasche unkontrollierte Wachstum häufig Nekrosezonen entstehen, ist dies in den weniger aggressiv wachsenden (Oligodendro-) Gliomen seltener. In dieses Bild passen auch die Daten aus der Expressionsanalyse dieser Arbeit und die Ergebnisse von Riemenschneider et al.: Glioblastome weisen eine sehr hohe DIRAS3 Expression auf, während die Expression in oligodendroglialen Tumoren erniedrigt ist (Abb.: 4). Dabei ist die Herabregulation in Oligodendrogliomen nicht nur durch intrinsische Zellregulationsmechanismen wie Promotormethylierung bedingt, sondern auch durch Verlust eines oder beider DIRAS3 Allele bei der häufigen 1p19q Kodeletion(31).

Ein Vergleich des Proteoms von 1p19q codeletierten mit nicht deletierten Gliomproben zeigt, dass in den nicht deletierten Tumoren insbesondere Proteine hochreguliert sind, die mit dem Stoffwechsel, der Migration, und Überlebensmechanismen assoziiert sind(55).

Geht man davon aus, dass die Fähigkeit Autophagie zu betreiben und damit prekäre Energieversorgungssituationen zu überstehen durch den DIRAS3 Verlust eingeschränkt ist, wäre dies auch eine Erklärungsmöglichkeit für ein besseres Ansprechen der Tumoren mit 1p19q Kodeletion auf Chemotherapeutika und Bestrahlung.

Über die genaue Funktionsweise von DIRAS3 insbesondere in Gliomen und die Wirkung seiner Expression auf Zellebene bleiben weiterhin viele Fragen offen: Insbesondere die Ergebnisse des Proteome Profiler Arrays sind hinsichtlich einer rein onkogenen oder rein tumorsuppressiven Wirkung von DIRAS3 und hinsichtlich der Datenlage aus den funktionellen Assays schwer einzuordnen:

Im Sinne einer eher tumorsuppressiven Funktion von DIRAS3 sind die relative Hypophosphorylierung und damit geminderte Aktivität von p53 (S15) in den shDIRAS3 U251 Klonen wie auch die Aktivierung Rezeptortyrosinkinase gesteuerter Signalwege hervorzuheben. Besonders MSK1/2 und Creb und auch die src-family

Kinasen Lyn und Yes, zeigen hier eine Hyperphosphorylierung in allen der drei untersuchten shDIRAS3-U251 Klonen. Auch die weiteren getesteten Phosphoproteine ERK1/2 und p38 α sind in zwei von drei Klonen hyperphosphoryliert. Dies kann als Hinweis gelten, dass anabole, das Tumorwachstum fördernde Signalwege bei Verlust von DIRAS3 vermehrt aktiviert werden(56). Auch im Bezug auf die Phosphorylierungsmuster der an der Stoffwechselregulation beteiligten Phosphoproteine deuten einige Befunde in die Richtung einer Tumorsuppressorfunktion von DIRAS3. So weisen die obigen Befunde auf eine geringere Aktivität des wichtigen Stoffwechselschalters AMPK hin, dieser bremst in aktivem Zustand anabole Stoffwechselprozesse und induziert katabole Mechanismen wie auch Autophagie(57,58). Dabei ist bislang jedoch nur für die Phosphorylierung von T172 der α 2-Einheit eine aktivierende Wirkung auf die AMPK nachgewiesen(59). Zur Funktion der Phosphorylierungsstelle der α 1-Einheit bei T183 liegen noch keine eindeutigen Untersuchungsergebnisse vor.

Auch HSP60, welches als Chaperon(50) wirkt und gleichzeitig ebenfalls eine Rolle bei der Induktion von Autophagiemechanismen spielt(51), ist vermindert exprimiert. Folglich kann bei DIRAS3-Verlust von einer Dysregulation des Stoffwechsels ausgegangen werden, was einen weiteren Hinweis auf eine tumorsuppressive Wirkung von DIRAS3 darstellt. Zudem ist dies, wie auch die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse ein weiteres Indiz für die Relevanz von DIRAS3 im Bezug auf verschiedene Stoffwechsellagen.

Die Hyperphosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT5, deren tumorigene Wirkung vor allem bei hämatopoetischen Tumorerkrankungen(60–62) aber für STAT3 auch in Glioblastomen(63) nachgewiesen ist, kann als Indiz für eine tumorsuppressive Wirkung von DIRAS3 eingeordnet werden.

Gleichzeitig werden aber durch den Verlust von DIRAS3 Signalwege auch in einer Weise reguliert, die eine onkogene Funktion des aktiven DIRAS3 unterstützen: Hier ist vor allem die Hypophosphorylierung von GSK3 α/β , welches auf eine verminderte Glykogensynthese und damit eine Reduktion anaboler Prozesse hinweist. Ebenso zeigt sich die Checkpointkinase Chk2 in zwei von drei shDIRAS3 Klonen verstärkt phosphoryliert, was auf eine Aktivierung der Zellzykluskontrollmechanismen bei Inaktivierung von DIRAS3 hinweist. Des Weiteren wird die vermeintlich deutliche Minderung der p53 Aktivität bei den shDIRAS3 Klonen durch die Tatsache relativiert, dass sowohl in der U251 wie auch in der HS683 Zelllinie Punktmutationen im TP53-

Diskussion

Gen vorliegen, die bei der Proteinbiosynthese zum Einbau einer Missense-Aminosäure führen (URL: cancer.sanger.ac.uk)(64). Dabei ist zu beachten, dass diese Mutationen zusammen mit möglichen posttranslationalen Modifikationen teils zur Umkehr der ursprünglichen protektiven Funktion von p53 führen und Tumorprogress und Metastasierung(65) wie auch Chemoresistenz auslösen können(66).

Zusätzlich müssen die Ergebnisse aus dem Proteome Profiler Array vor dem Hintergrund gesehen werden, dass mit diesem einmalig durchgeführten Assay nur ein grobes Abbild vieler im Tumorstoffwechsel wichtiger Regulationsmechanismen erzeugt wird. Die genauen Regulationsmechanismen und ihre Einflussfaktoren müssten mit weiteren detaillierteren Phosphoproteinarrays unter verschiedenen Bedingungen untersucht, und in mehreren Versuchsansätzen validiert werden.

4.2 Kritische Methodendiskussion

Dass die Effekte eines DIRAS3 Verlustes in Gliomzellen von etlichen anderen noch unbekanntem Einflussfaktoren abhängen müssen, zeigt sich bei der kritischen Betrachtung der Ergebnisse aus den funktionellen Versuchen:

Bereits zwischen den shDIRAS3 Klonen der U251 Reihe gibt es, trotz stabiler Transfektion mit dem shDIRAS3 Plasmid, nahezu gleicher Suppression der Expression und gleichen Versuchsbedingungen, teils erhebliche Unterschiede in den funktionellen Eigenschaften: so zeigt sich die erhöhte Lomustinempfindlichkeit nur bei dreien der vier shDIRAS3- U251 Klone, während sich der vierte sehr ähnlich zur Kontrolle verhält; eine erhöhte Apoptoserate weisen nur zwei shDIRAS3 U251 Klone auf. Obwohl die Apoptoserate im AnnexinV Assay signifikant erhöht ist, schlägt sich dieser Effekt nicht in den Proliferationsassays nieder. Eine mögliche Erklärung hierzu wäre die Kompensation des Zellverlusts durch Apoptose, durch vermehrte proliferative Aktivität. In der Zellzyklusbestimmung ergaben sich jedoch keine Hinweise darauf, im Gegenteil hier verhielten sich die shDIRAS3 Klone sehr ähnlich. Einer der Gründe für die hohe Variabilität der Ergebnisse liegt sicherlich in der Methode des Gen-knockdown mittels stabiler Transfektion: hierbei erfolgt die Insertion der PlasmidDNA an zufälliger Lokalisation im Genom, somit wird bei jeder erfolgreichen Insertion eine zufällige Mutation erzeugt. Die Effekte dieser Mutationen sind für jeden knockdown Klon unterschiedlich und nicht vorhersehbar(35). Des Weiteren sind off-Target Effekte der verwendeten shRNA denkbar: neben dem

knockdown durch Bindung und Inaktivierung der DIRAS3-mRNA sind weitere Interaktionen der shRNA mit anderen mRNA Sequenzen denkbar(67).

Noch deutlichere Unterschiede treten beim Vergleich der shDIRAS3-U251 Reihe mit der shDIRAS3-HS683 Zelllinie zu Tage. Im Gegensatz zu den U251 shDIRAS3 Klonen ergab sich für die HS683 shDIRAS3 Reihe kein Anhalt für eine vermehrte Lomustin-Empfindlichkeit. Grundsätzlich erwiesen sich die HS683 shDIRAS3 Klone als sehr empfindlich. Bei gleicher Behandlung und gleichem Versuchsaufbau musste in vielen Fällen der jeweilige Versuch aufgrund von mangelndem Wachstum der Zellen abgebrochen werden, so z.B. der Migrationsversuch mit den shDIRAS3 HS683 Zellen. Die erhobenen Daten sind nur eingeschränkt wertbar und vergleichbar zu den Versuchsergebnissen der U251 Reihe. Dies macht eine Validierung der mit den shDIRAS3-U251 Klonen gewonnenen Daten schwierig. Eine Adaptation der Versuchsbedingungen hätte jedoch ebenfalls die Vergleichbarkeit der Daten eingeschränkt.

4.3 Ausblick

Unter Berücksichtigung der oben diskutierten Erkenntnisse zu DIRAS3 in den verschiedenen Tumorentitäten und den Ergebnissen dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass DIRAS3 onkogene aber auch tumorsuppressive Eigenschaften besitzt. Es ist denkbar, dass diese sich, abhängig von individueller Tumorgenetik, Mikroenvironment und Selektionsfaktoren (Chemotherapie, Sauerstoff- und Nährstoffversorgung), unterschiedlich auf das Gesamtüberleben der Patienten auswirken. In Gliomen scheint sich der DIRAS3 Verlust positiv auf die Tumorthherapie auszuwirken, im Umkehrschluss kommt dem Gen dann bei Expression eher eine onkogene Wirkung zu.

Denkbar wäre etwa eine Rolle bei der Bildung von therapieresistenten Gliomstammzellen, da DIRAS3 unter prekären Stoffwechselsituationen einerseits den Zellzyklus herunterfährt, aber andererseits durch Autophagieregulation das Überleben der Zellen ermöglicht. Gleichzeitig erhöht es die Resistenz gegenüber Lomustin und fördert die Migration der Zellen. Diese Befunde sollten zunächst durch Versuche mit einer zweiten Zellreihe z.B. mit Brain tumor initiating cells bestätigt werden. Zudem wäre es wichtig in einem DIRAS3-überexprimierenden Modell inverse Effekte nachzuweisen. In einem zweiten Schritt könnten dann die

Diskussion

Veränderungen im Zellstoffwechsel und unter Einfluss von Lomustin auf Proteinebene untersucht werden. Hierbei könnten auf Basis der Ergebnisse des Proteome Profiler Arrays insbesondere der p53 Signalweg wie auch die Aktivierung von RTKs und des AMPK Signalwegs wichtige Ansatzpunkte sein, um die genauen Aufgaben und Wechselwirkungen von DIRAS3 in der Krebszelle zu determinieren. Durch Adaptation der in dieser Arbeit verwendeten funktionellen Assays zur Simulation verschiedener Stoffwechsellagen könnte die Rolle von Überlebensmechanismen wie Autophagie noch weiter herausgearbeitet werden. Letztlich sollte der Effekt von DIRAS3-knockdown bzw. Überexpression zusätzlich im *in vivo*-Modell getestet werden, um eine möglichst realitätsnahe Simulation des Mikroenvironments der Zellen zu erreichen.

5 Zusammenfassung

Ausgangslage in Literatur und anhand von Expressionsdaten: Verglichen mit der gemittelten DIRAS3 Expression in gesundem neuronalem Gewebe findet sich in den höhergradigen Gliomen eine Überexpression von DIRAS3, in low-grade Oligodendrogliomen aber eine niedrigere Expression von DIRAS3. In letzteren lässt sich häufig eine biallellische Inaktivierung entweder durch Methylierung der relevanten CpG-Inseln und/oder durch LOH bei 1p19q-Codeletion feststellen. DIRAS3 wird bislang überwiegend als Tumorsuppressor gesehen, der insbesondere im Ovarialkarzinom eine relevante Rolle spielt. Verglichen mit gesundem Ovarialgewebe ist die DIRAS3 Expression in Ovarialkarzinomproben relevant heruntergeregelt.

Unabhängig vom WHO-Grad korreliert, in Gliomen, im Gegensatz zu den OvarialCa, eine niedrige DIRAS3-Expression mit einem besseren Gesamtüberleben. Dies spricht für eine entitätsspezifisch onkogene Wirkung von DIRAS3 in Gliomen.

Funktionelle Analyse: Die durchgeführten in vitro Experimente mit den Gliomzelllinien zeigen, dass sich der DIRAS3 Knockdown insgesamt negativ auf die Zellviabilität auswirkt. In der U251-Linie erhöhte sich die Empfindlichkeit der Klone gegenüber Lomustin. Die Mehrzahl der shDIRAS3 U251 Klone weist eine deutlich verschlechterte Migrationsfähigkeit auf. In der Hälfte der shDIRAS3 U251 Klone zeigt sich eine verstärkte Apoptose.

Somit wird im Umkehrschluss der onkogene Effekt der DIRAS3-Expression in Gliomen bestätigt.

Ausblick: Bei der orientierenden Exploration möglicher regulatorischer Effekte auf Phosphoproteinebene, ergaben sich Hinweise auf eine stoffwechselabhängige Funktion von DIRAS3 mit der Regulation des Stoffwechselschalter AMPK α 1/2 bzw. GSK3 α/β , wie auch auf eine zellzyklusregulatorische Funktion über p53 und zudem auf die Regulation RTK-gesteuerter Signalwege. Die Zellzyklusverteilung unter Nährstoffmangelbedingungen legt ebenfalls einen DIRAS3-Effekt nahe, der mit der Stoffwechsellage der Zellen zusammenhängt.

In weiteren Untersuchungen müssten die individuelle Tumorgenetik, das Mikroenvironment und ihr Wechselspiel mit Selektionsfaktoren beleuchtet werden, um genau erklären zu können unter welchen Umständen entitätsspezifisch tumorsuppressive Effekte oder onkogene Effekte zum Tragen kommen.

Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2009/2010 [Internet] [cited 2015 Mar 14]. Available from: RKI DATEN Hirntumore DTLD 2009-2010.pdf
2. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-Oncology*. 2014;16(suppl 4):iv1–iv63. doi:10.1093/neuonc/nou223
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97–109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
4. Riemenschneider MJ, Jeuken, Judith W. M., Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol*. 2010;120(5):567–84. doi:10.1007/s00401-010-0736-4
5. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A v., Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803–20. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
6. Reifenberger G, Wirsching H-G, Knobbe-Thomsen CB, Weller M. Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(7):434–52. doi:10.1038/nrclinonc.2016.204
7. Leibetseder A, Rainer S, Hutterer M. Klassifikation und Behandlungsmöglichkeiten von Gliomen - Was gibt es Neues? // Classification and Treatment Recommendations of Gliomas.
8. KOMORI T. Pathology and Genetics of Diffuse Gliomas in Adults. *Neurol. Med. Chir.(Tokyo)*. 2015;55(1):28–37. doi:10.2176/nmc.ra.2014-0229
9. Ellison D. *Neuropathology: A reference text of CNS pathology*. 3rd ed. 1 online resource (xiii, 879).
10. Uhm J. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Yearbook of Neurology and Neurosurgery*. 2009;2009119–20. doi:10.1016/S0513-5117(09)79085-4

11. Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, Forrest WF, Pujara K, Carrillo JA, Pandita A, Ellingson BM, Bowers CW, Soriano RH, Schmidt NO, Mohan S, Yong WH, Seshagiri S, Modrusan Z, Jiang Z, Aldape KD, Mischel PS, Liau LM, Escovedo CJ, Chen W, Nghiemphu PL, James CD, Prados MD, Westphal M, Lamszus K, Cloughesy T, Phillips HS. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol.* 2011;29(34):4482–90. doi:10.1200/JCO.2010.33.8715
12. Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, Nishikawa R, Rosenthal M, Wen PY, Stupp R, Reifenberger G. Glioma. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;115017. doi:10.1038/nrdp.2015.17
13. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, Kros JM, Kouwenhoven MCM, Delattre J-Y, Bernsen HJJA, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Enting RH, French PJ, Dinjens WNM, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T, Hoang-Xuan K. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: Long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol.* 2013;31(3):344–50. doi:10.1200/JCO.2012.43.2229
14. Buckner JC, Shaw EG, Pugh SL, Chakravarti A, Gilbert MR, Barger GR, Coons S, Ricci P, Bullard D, Brown PD, Stelzer K, Brachman D, Suh JH, Schultz CJ, Bahary J-P, Fisher BJ, Kim H, Murtha AD, Bell EH, Won M, Mehta MP, Curran WJ. Radiation plus Procarbazine, CCNU, and Vincristine in Low-Grade Glioma. *N Engl J Med.* 2016;374(14):1344–55. doi:10.1056/NEJMoa1500925
15. Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Curran W, Mehta M. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: Long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol.* 2013;31(3):337–43. doi:10.1200/JCO.2012.43.2674
16. Capper D, Reifenberger G. Klassifikation von Gliomen. *Nervenarzt.* 2015;86(6):672–83. doi:10.1007/s00115-014-4223-3
17. Riemenschneider MJ, Büschges R, Wolter M, Reifenberger J, Boström J, Kraus JA, Schlegel U, Reifenberger G. Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Research.* 1999;59(24):6091–6.

Literaturverzeichnis

18. MD JRP, O'Callaghan CJ, Ding K, Roa W, Mason WP, Cairncross JG, Brandes AA, Menten J, Phillips C, Fay MF, Nishikawa R, Winch C, Laperriere N. A PHASE III RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL OF SHORT-COURSE RADIOTHERAPY WITH OR WITHOUT CONCOMITANT AND ADJUVANT TEMOZOLOMIDE IN ELDERLY PATIENTS WITH GLIOBLASTOMA (NCIC CTG CE.6, EORTC 26062-22061, TROG 08.02, NCT00482677). *Neuro-Oncology*. 2014;16(suppl 3):iii46-iii46. doi:10.1093/neuonc/nou209.16
19. FDA. TEMODAR (temozolomide) Label.
20. Roger Stupp, Monika E Hegi, Warren P Mason, Martin J van den Bent, Martin JB Taphoorn, Robert C Janzer, Samuel K Ludwin, Anouk Allgeier, Barbara Fisher, Karl Belanger, Peter Hau, Alba A Brandes, Johanna Gijtenbeek, Christine Marosi, Charles J Vecht, Karima Mokhtari, Pieter Wesseling, Salvador Villa, Elizabeth Eisenhauer, Thierry Gorlia, Michael Weller, Denis Lacombe, J Gregory Cairncross, René-Olivier Mirimanoff, on behalf of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups, the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial.
21. Solimando DA, Waddell JA. Procarbazine, Lomustine, and Vincristine (PCV) Regimen for Central Nervous System Tumors. *Hosp Pharm*. 2017;52(2):98–104. doi:10.1310/hpj5202-98
22. PubChem Compound Database. Procarbazine [Internet]: NIH.
23. PubChem Compound Database. Lomustine [Internet]: NIH.
24. PubChem Compound Database. Vincristine [Internet]: NIH.
25. Niemczyk M, Ito Y, Huddleston J, Git A, Abu-Amero S, Caldas C, Moore GE, Stojic L, Murrell A. Imprinted chromatin around DIRAS3 regulates alternative splicing of GNG12-AS1, a long noncoding RNA. *Am J Hum Genet*. 2013;93(2):224–35. eng. doi:10.1016/j.ajhg.2013.06.010
26. Yuan J, Luo RZ, Fujii S, Wang L, Hu W, Andreeff M, Pan Y, Kadota M, Oshimura M, Sahin AA, Issa J-P, Bast RC, Yu Y. Aberrant methylation and silencing of ARHI, an imprinted tumor suppressor gene in which the function is lost in breast cancers. *Cancer Research*. 2003;63(14):4174–80. eng.

27. Yu Y, Xu F, Peng H, Fang X, Zhao S, Li Y, Cuevas B, Kuo WL, Gray JW, Siciliano M, Mills GB, Bast RC. NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(1):214–9. eng.
28. Lu Z, Yang H, Sutton MN, Yang M, Clarke CH, Liao WS-L, Bast RC. ARHI (DIRAS3) induces autophagy in ovarian cancer cells by downregulating the epidermal growth factor receptor, inhibiting PI3K and Ras/MAP signaling and activating the FOXo3a-mediated induction of Rab7. *Cell Death Differ*. 2014;21(8):1275–89. eng. doi:10.1038/cdd.2014.48
29. Zhang L, Liu P, Li H, Xue F. Effect of histone deacetylase inhibitors on cell apoptosis and expression of the tumor suppressor genes RUNX3 and ARHI in ovarian tumors. *Mol Med Rep*. 2013;7(5):1705–9. eng. doi:10.3892/mmr.2013.1371
30. Lapinska K, Housman G, Byler S, Heerboth S, Willbanks A, Oza A, Sarkar S. The Effects of Histone Deacetylase Inhibitor and Calpain Inhibitor Combination Therapies on Ovarian Cancer Cells. *Anticancer Res*. 2016;36(11):5731–42. eng. doi:10.21873/anticancer.11156
31. Riemenschneider MJ, Reifenberger J, Reifenberger G. Frequent biallelic inactivation and transcriptional silencing of the DIRAS3 gene at 1p31 in oligodendroglial tumors with 1p loss. *Int. J. Cancer*. 2008;122(11):2503–10. doi:10.1002/ijc.23409
32. Yakut S, Tuncer, Berker M, Goksu E, Gurer I, Ozes O, Luleci G, Karauzum S. Aplasia ras homologous member I gene and development of glial tumors. *Balkan J Med Genet*. 2011;14(1):37–44. eng. doi:10.2478/v10034-011-0016-1
33. Chen J, Shi S, Yang W, Chen C. Over-expression of ARHI decreases tumor growth, migration, and invasion in human glioma. *Med Oncol*. 2014;31(3). doi:10.1007/s12032-014-0846-2
34. Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu Y, Mills GB, Liao WS-L, Bast RC. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J. Clin. Invest*. 2008;118(12):3917–29. eng. doi:10.1172/JCI35512
35. Heinrich PC, Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie*. 9th ed. Heidelberg: Springer; 2014. XXIX, 1073 S. (Springer-Lehrbuch).

Literaturverzeichnis

36. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
37. Promega. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay System Technical Bulletin [Internet].
38. Promega. CellTiter-Blue Cell Viability Assay [Internet].
39. IBIDI. Culture Insert - Instructions [Internet] [cited 2015 Apr 20]. Available from: IN_8XXXX_CI.pdf
40. Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure.
41. Gero Brockhoff. DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*;2007.
42. Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit.
43. Croft D, Mundo AF, Haw R, Milacic M, Weiser J, Wu G, Caudy M, Garapati P, Gillespie M, Kamdar MR, Jassal B, Jupe S, Matthews L, May B, Palatnik S, Rothfels K, Shamovsky V, Song H, Williams M, Birney E, Hermjakob H, Stein L, D'Eustachio P. The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D472-7. doi:10.1093/nar/gkt1102
44. Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, Haw R, Jassal B, Korninger F, May B, Milacic M, Roca CD, Rothfels K, Sevilla C, Shamovsky V, Shorser S, Varusai T, Viteri G, Weiser J, Wu G, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D649-D655. doi:10.1093/nar/gkx1132
45. Berchtold NC, Cribbs DH, Coleman PD, Rogers J, Head E, Kim R, Beach T, Miller C, Troncoso J, Trojanowski JQ, Zielke HR, Cotman CW. Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(40):15605–10. doi:10.1073/pnas.0806883105
46. Jan Koster. R2 Tutorials.
47. Gravendeel LAM, Kouwenhoven MCM, Gevaert O, Rooi JJ de, Stubbs AP, Duijm JE, Daemen A, Bleeker FE, Bralten LBC, Kloosterhof NK, Moor B de, Eilers PHC, van der Spek PJ, Kros JM, Sillevius Smitt PAE, van den Bent MJ,

- French PJ. Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Research*. 2009;69(23):9065–72.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2307
48. Mateescu B, Batista L, Cardon M, Gruosso T, Feraudy Y de, Mariani O, Nicolas A, Meyniel J-P, Cottu P, Sastre-Garau X, Mechta-Grigoriou F. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nat Med*. 2011;17(12):1627–35. doi:10.1038/nm.2512
49. Weller M. Gliome: Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. AWMF Leitlinie Deutsche Gesellschaft für Neurologie. 2014;2014.
50. Gupta RS. Evolution of the chaperonin families (HSP60, HSP 10 and TCP-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Mol Microbiol*. 1995;15(1):1–11.
doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02216.x
51. Liu X, Cao H, Li J, Wang B, Zhang P, Dong Zhang X, Liu Z, Yuan H, Zhan Z. Autophagy induced by DAMPs facilitates the inflammation response in lungs undergoing ischemia-reperfusion injury through promoting TRAF6 ubiquitination. *Cell Death Differ*. 2017;24(4):683–93. doi:10.1038/cdd.2017.1
52. Lu Z, Baquero MT, Yang H, Yang M, Reger AS, Kim C, Levine DA, Clarke CH, Liao WS-L, Bast RC. DIRAS3 regulates the autophagosome initiation complex in dormant ovarian cancer cells. *Autophagy*. 2014;10(6):1071–92.
doi:10.4161/auto.28577
53. Zhang J, Li Y-H, Cui A-R, Wang J-L, Cheng J-X, Wang S-J. [Expression and clinical relevance of ARHI, STAT3 and E2F1 in ovarian serous carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2008;30(12):905–9. chi.
54. Bao J-J, Le X-F, Wang R-Y, Yuan J, Wang L, Atkinson EN, LaPushin R, Andreeff M, Fang B, Yu Y, Bast RC. Reexpression of the tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent calpain-dependent pathway. *Cancer Research*. 2002;62(24):7264–72. eng.
55. Rostomily RC, Born DE, Beyer RP, Jin J, Alvord EC, Mikheev AM, Matthews RT, Pan C, Khorasani L, Sonnen JA, Montine TJ, Shi M, Zhang J. Quantitative proteomic analysis of oligodendrogliomas with and without 1p/19q deletion. *J Proteome Res*. 2010;9(5):2610–8. doi:10.1021/pr100054v

Literaturverzeichnis

56. Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* 1998;17(15):4426–41. doi:10.1093/emboj/17.15.4426
57. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 23):5479–87. doi:10.1242/jcs.01540
58. Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan K-L. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy.* 2014;7(6):643–4. doi:10.4161/auto.7.6.15123
59. STEIN SC, WOODS A, JONES NA, DAVISON MD, CARLING D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem. J.* 2000;345(3):437–43. doi:10.1042/bj3450437
60. Berger A, Sexl V, Valent P, Moriggl R. Inhibition of STAT5: A therapeutic option in BCR-ABL1-driven leukemia. *Oncotarget.* 2014;5(20):9564–76. doi:10.18632/oncotarget.2465
61. Groner B, Manstein V v. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;4511–14. doi:10.1016/j.mce.2017.05.033
62. Plaza-Menacho I, van der Sluis T, Hollema H, Gimm O, Buys CHCM, Magee AI, Isacke CM, Hofstra RMW, Eggen BJL. Ras/ERK1/2-mediated STAT3 Ser727 phosphorylation by familial medullary thyroid carcinoma-associated RET mutants induces full activation of STAT3 and is required for c-fos promoter activation, cell mitogenicity, and transformation. *J Biol Chem.* 2007;282(9):6415–24. doi:10.1074/jbc.M608952200
63. Chang N, Ahn SH, Kong D-S, Lee HW, Nam D-H. The role of STAT3 in glioblastoma progression through dual influences on tumor cells and the immune microenvironment. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;45153–65. doi:10.1016/j.mce.2017.01.004
64. Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, Cole CG, Ward S, Dawson E, Ponting L, Stefancsik R, Harsha B, Kok CY, Jia M, Jubb H, Sondka Z, Thompson S, De T, Campbell PJ. COSMIC: Somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D777-D783. doi:10.1093/nar/gkw1121

65. Nguyen T-A, Menendez D, Resnick MA, Anderson CW. Mutant TP53 posttranslational modifications: Challenges and opportunities. *Hum Mutat.* 2014;35(6):738–55. doi:10.1002/humu.22506
66. Yap DBS, Hsieh J-K, Zhong S, Heath V, Gusterson B, Crook T, Lu X. Ser392 phosphorylation regulates the oncogenic function of mutant p53. *Cancer Research.* 2004;64(14):4749–54. doi:10.1158/0008-5472.CAN-1305-2
67. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 2003;21(6):635–7. doi:10.1038/nbt831

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb.: 1 a) Temozolomid, b) Procarbazin, c) Lomustin d) Vincristin; Quelle: URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov	11
Abb.: 2 Beispiel statische Ploidiebestimmung mit ModFit LT	35
Abb.: 3 Expressionsanalyse DIRAS3 in nicht neoplastischem Hirngewebe verglichen mit weiteren Geweben, Datensatz Roth et. al. ⁶³ , 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (http://r2.amc.nl)'	38
Abb.: 4 DIRAS3 Expression in Normalhirngewebe, Gliomensubtypen sowie weiteren häufigen Tumoren; MegaSampler Datensätze aus Berchtold et al. ⁴⁴ , French et al. ⁴⁵ sowie expO, 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (http://r2.amc.nl)'	39
Abb.: 5 Kaplan-Meier Kurve DIRAS3 Expressionslevel Korrelation mit Gesamtüberleben bei Glioblastompatienten, Datenbank TCGA Glioblastoma, cutoff: 44,5 fold Expression, cutoff-mode: scan; 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (http://r2.amc.nl)'	40
Abb.: 6 Kaplan-Meier Kurve DIRAS3-Expressionslevel Korrelation mit Gesamtüberleben bei Oligodendrogliompatienten, Datenbank: French et. al. ⁴⁵ , cutoff: 190,3 fold Expression, cutoff-mode: scan; 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (http://r2.amc.nl)'	41
Abb.: 7 Kaplan-Meier Kurve DIRAS3-Expressionslevel Korrelation mit Gesamtüberleben bei Gliompatienten (allgemein), Datenbank: French et. al. ⁴⁵ , cutoff: 114,2 fold Expression, cutoff-mode: scan; 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (http://r2.amc.nl)'	41
Abb.: 8 Kaplan-Meier Kurve DIRAS3-Expressionslevel Korrelation mit Gesamtüberleben bei Ovarialkarzinom-Patienten, Datenbank: Mehta-Grigoriou et al. ⁴⁶ ; cutoff: 19,6 fold Expression, cutoff-mode: scan; 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (http://r2.amc.nl)'	42
Abb.: 9 -PCR DIRAS3 Expression; $n_t=3$; $n_b=1$, $n_t=3$; A) U251 Zelllinie, B) HS683 Zelllinie	43
Abb.: 10 A) MTT-Proliferationsassay U251, 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test ns, $n_b=3$, $n_t=9$; B) MTT-Proliferationsassay HS683; 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test ns; $n_b=2$, $n_t=6$..	44
Abb.: 11 U251 BrdU-ELISA Proliferationsassay; 1-way ANOVA Kruskal Wallis test $p=0,0181$; Dunn's multiple comparison post-test: ns, $n_b=4$, ; $n_t=17$	45
Abb.: 12 U251, statische Ploidiebestimmung A) 4h, B) 14h, C) 24h nach Synchronisation, $n_b=1$, $n_t=10000$	47
Abb.: 13 IC50 U251 Temozolomid; 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test ns, $n_b=3$, $n_t=9$	49
Abb.: 14 IC50 U251 Procarbazin; 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test ns; $n_b=2$, $n_t=6$	50

Abb.: 15 A) IC50 U251 Lomustin; 1-way ANOVA Kruskal Wallis test $p=0,0171$; Asterisk
entsprechend dem Dunn's multiple comparison post-test, $n_b = 3$, $n_t = 9$; B) IC50 HS683
Lomustin; 1-way ANOVA Kruskal Wallis test: ns; $n_b = 2$, $n_t = 6$ 51

Abb.: 16 A) IC50 U251 Vincristin; 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test: ns; $n_t = 6$ $n_b = 2$ 52

Abb.: 17 U251 Apoptosemessung mit Annexin V; pos CTRL = WT+ Staurosporin 30nM, 1-way
ANOVA: Kruskal Wallis test: $p= 0,0003$; Asterisk entsprechend dem Dunn's multiple
comparison post-test; $n_b = 4$; $n_t = 40000$ 53

Abb.: 18 HS683 Apoptosemessung mit Annexin V, $n_b = 1$, $n_t = 10000$ 54

Abb.: 19 U251 Apoptosemessung mit Annexin V Vergleich unbehandelt vs. Lomustin
behandlung ($c=10\mu\text{M}$), 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test: ns; $n_b = 2$, $n_t = 2 \times 10000$;
L=Lomustin $10\mu\text{M}$ 54

Abb.: 20 A) U251 Migrationskurve, $n=2$ U251 Wound Healing Assay, B) Zeitpunkt 24h, 1-way
ANOVA Kruskal Wallis test: $p= 0,0001$; Asteriske entsprechend dem Dunn's multiple
comparison post-test; $n_b = 2$, $n_t = 4$ 55

Abb.: 21 U251 Invasionsassay; 1-way ANOVA: Kruskal Wallis test: ns; $n_b = 3$, $n_t = 9$ 56

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tab.: 1 WHO Grad und Histopathologie astrozytärer und oligodendroglialer Gliome (3) (8)...	4
Tab.: 2 verwendete Konzentrationen der Testsubstanzen mit entsprechendem Lösungsmittel	30
Tab.: 3 Verlaufsprotokoll statische Ploidiebestimmung	36
Tab.: 4 Nomenklatur in Abbildungen und Beschriftungen	42
Tab.: 5 : ausgewählte DIRAS3 knockdown Klone	43
Tab.: 6 Gemittelte Verdopplungszeit (mDT) in Tagen U251 und HS683	45
Tab.: 7 Proteome Profiler Array: Relative Phosphorylierungslevel prozentual zum Referenzspot; Bezug zu shCTRL5: Farbcodierung: rot - verminderte Phosphorylierung, grün - vermehrte Phosphorylierung; n b=1, nt=2.....	58

Erklärung zur eigenständigen Anfertigung

Die vorliegende Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. med. Markus J. Riemenschneider angeregt und die Ausarbeitung durch ihn selbst, sowie durch Frau Dr. rer. nat. Tanja Rothhammer-Hampl aus der Abteilung für Neuropathologie des Uniklinikums Regensburg betreut.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Bezugsorte gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Danksagung

Sehr geehrter Herr Professor Riemenschneider, vielen Dank dass Sie mir mit diesem Thema den Zugang zu dem hochinteressanten Feld der Tumorgenetik eröffnet haben. Vielen Dank für ihre wertvolle Unterstützung bei der Durchführung des Projekts sowohl während der experimentellen Phase als auch bei der Interpretation und Einordnung der Ergebnisse.

Vielen Dank Herr Professor Proescholdt für Ihre Bereitschaft diese Arbeit als Zweitbegutachter zu betreuen.

Zudem möchte ich mich an dieser Stelle nochmal ausdrücklich für Ihrer beider Unterstützung in der Bewerbungsphase für das IRE-Stipendium bedanken, die es mir ermöglicht hat etwas mehr als sechs Monate im Labor von Professor Frank Furnari an der University of California San Diego verbringen zu können, wo ich sowohl forschersich wie auch persönlich eine sehr spannende und lehrreiche Zeit verbracht habe.

Liebe Tanja ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich auch an dich richten, vielen Dank für deine Hilfe und Unterstützung bei Planung und Durchführung der Experimente und die hervorragende Betreuung über diese lange Zeit.

Liebe Maria, liebe Susanne für eure Hilfe in der Zellkultur und Rat und Tat bei akuten labortechnischen Fragen bedanke ich mich ganz herzlich.

Weiter möchte ich mich sehr bei den anderen Teammitgliedern bzw. zum Teil auch Alumni der Abteilung für Neuropathologie Sabine, Julia, Natalia und Markus bedanken, die viel dazu beigetragen haben, dass mir die Laborzeit in sehr guter Erinnerung bleibt.

Liebe Andrea, lieber Matthias, lieber Max und ganz besonders liebe Christina vielen Dank für eure Unterstützung auf ganz vielen Ebenen während des Studiums und der Promotion.