

**Genexpressionsanalyse von humanen Gehirntumoren mittels
cDNA Array Analyse**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg**

vorgelegt von

**Sabine Müller
aus Laupheim**

Hamburg, 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Westphal, Direktor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf und AGY Therapeutics, South San Francisco, CA durchgeführt.

Gutachter der Dissertationen:

1. Prof. Dr. Manfred Westphal, Direktor der Neurochirurgischen Klinik, UKE, Hamburg
2. Prof. Dr. Wolfgang Deppert, Abteilungsleiter Tumorvirologie am Heinrich-Pette für Exp. Virologie und Immunologie an der Universität, Hamburg

ABKÜRZUNGEN	8
EINFÜHRUNG	10
GLIOBLASTOME	10
ALLGEMEIN	10
HISTOLOGIE.....	11
MOLEKULARBIOLOGIE	12
FUNKTIONELLE CHARAKTERISTIKA.....	13
THERAPIE DES GLIOBLASTOMS	14
IMMUNTHERAPIE	16
ALLGEMEIN	16
WAS MACHT EIN MOLEKÜL ZU EINEM GUTEN IMMUNTARGET FÜR MÄK THERAPIE ?.....	17
KLINISCHE STUDIEN VON AUSGEWÄHLTEN BEISPIELEN	18
APPLIKATION VON MÄK.....	19
METHODEN ZUR IDENTIFIZIERUNG DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE.....	19
ALLGEMEIN	19
SUBTRAKTIVE HYBRIDISIERUNG	21
CDNA ARRAYS.....	22
ANALYSE VON ARRAY DATEN.....	22
ERWARTUNGEN UND LIMITATIONEN VON ARRAYS.....	24
RPTP ζ	25
ALLGEMEIN	25
RPTP UND SEIN LIGAND PLEIOTROPIN	30
ZIEL DER ARBEIT	31
METHODEN.....	32
KOLLEKTION VON PRIMÄRTUMOREN.....	32
KULTIVIERUNG VON EUKARYOTISCHEN ZELLINIEN	32
RNA ISOLIERUNG AUS PRIMÄRTUMOREN UND ZELLKULTUR.....	33
MESSANGER RNA (MRNA) ISOLIERUNG	33
PROTEINISOLIERUNG AUS ZELLKULTUR	34
CDNA SYNTHESE	34

HERSTELLUNG VON SUBTRAKTIVEN CDNA BANKEN.....	35
ADAPTERLIGATION	37
HYBRIDISIERUNG	37
SUPPRESSIONS- PCR	38
LIGATION DER SUBTRAKTIVEN CDNA BANKEN IN PCR2.1	39
KOLONIESELEKTION MITTELS Q-PIX	39
„HIGH THROUGHPUT“ PCR FÜR DIE AMPLIFIKATION VON EINZELNEN CDNA KLONEN FÜR ARRAY PRODUKTION.....	40
PCR.....	41
QUANTITATIVE RT-PCR.....	41
SEQUENZIERUNG.....	42
CDNA SCREENING ARRAY HERSTELLUNG.....	43
RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON CDNA SONDEN FÜR ARRAY HYBRIDISIERUNG	44
HYBRIDISIERUNG VON ARRAYS MIT MARKIERTEN CDNA SONDEN.....	44
ANALYSE VON CDNA ARRAYS	45
HERSTELLUNG VON BESTÄTIGUNGS-CDNA ARRAYS.....	47
NORTHERN BLOT ANALYSE.....	47
KNOCK DOWN MITTELS siRNA IN ZELLKULTUR.....	48
BOYDEN CHAMBER MIGRATIONSASSAY.....	49
PLEIOTROPIN STIMULATION VON GLIOBLASTOM-ZELLINIEN	50
PROLIFERATIONSASSAY	50
WESTERN BLOT ANALYSE	50
IMMUNHISTOCHEMIE	51
KLONIERUNG VON RPTP ζ.....	52
SCREENING VON PHAGEN CDNA BANKEN FÜR RPTP ζ TRANSKRIPTEN	53
<u>ERGEBNISSE</u>	<u>55</u>
CDNA SYNTHESE UND ERSTELLUNG VON SUBTRAKTIVEN CDNA BANKEN SPEZIFISCH FÜR GBM	55
RNA -ISOLIERUNG	55
CDNA SYNTHESE UND RSA I INKUBATION.....	56
ADAPTERLIGATION UND SUPPRESSIONS PCR.....	57
KLONIERUNG DER SUBTRAKTIVEN CDNA BANKEN.....	60
SYNTHESE VON GLIOBLASTOM-SPEZIFISCHEN CDNA ARRAYS	61
HYBRIDISIERUNG VON CDNA ARRAYS.....	61
IDENTIFIZIERUNG VON DIFFERENTIELL EXPRESMIERTEN GENEN IN HUMANEN GBM.....	63
RECEPTOR PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE ζ AND PLEIOTROPIN EXPRESSIONSANALYSE	66
CDNA ARRAY ANALYSE.....	66
QUANTITATIVE RT-PCR	67
NORTHERN BLOT ANALYSE VON RPTP ζ IN VERSCHIEDENEN GBM.....	68
IMMUNOHISTOCHEMIE	70

FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON RPTP ζ UND PTN IN GBM ZELLINIEN.....	72
„ <i>KNOCK DOWN</i> “ MITTELS siRNA	72
BOYDEN CHAMBER MIGRATIONSASSAY	75
PTN STIMULIERUNG	76
PROLIFERATIONSASSAY	78
KLONIERUNG VON RPTP ζ.....	80
EXON-INTRON STRUKTUR VON RPTP	80
KLONIERUNG DER LANGEN TRANSMEMBRANFORM VON RPTP	82
IDENTIFIZIERUNG VON SPLEIßVARIANTEN VON RPTP	83
<u>DISKUSSION</u>	<u>89</u>
EXPRESSIONSANALYSE MITTELS CDNA ARRAYTECHNOLOGIE	89
RPTP ζ UND SEINE ROLLE IN GLIOBLASTOMEN.....	97
RPTP ζ UND SEINE SPLEIßVARIANTEN	100
IST RPTP ζ EIN GUTES ZIELGEN FÜR DIE ENTWICKLUNG VON IMMUNTHERAPIEN?	102
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>105</u>
<u>ANHANG</u>	<u>89</u>
PRIMER UND ADAPTER SEQUENZEN:	89
VEKTORKARTEN	91
PCR2.1 VEKTORKARTE:	91
PSL 1180.....	92
PLNCX2.....	93
RPTP ζ PRIMER UND SPLEISSVARIANTEN.....	94
SEQUENZEN DER SPLEISSVARIANTEN:.....	95
<u>REFERENZEN</u>	<u>96</u>
<u>DANKSAGUNG</u>	<u>103</u>
<u>LEBENS LAUF</u>	<u>104</u>

PUBLIKATIONEN.....105

PATENTE.....105

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCNU	Carmustine
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
Ca.	Circa
CAT-1	Cool-associated, tyrosine phosphorylated 1
CAH	Carbonic Anhydrase Domäne
CDNA	Complementary DNA
CEDD	Convection enhanced drug delivery
CGAP	Cancer Genome Anatomy Project
CMAP	Cancer Molecular Analysis Program
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyxyloxy {1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate
CTEP	Cancer Therapy Evaluation Program
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Da	Dalton
DCC	Deleted I Colorectal Carcinoma
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ds cDNA	Doppelsträngige cDNA
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Et al.	Et alia
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	5-Iodoacetamidofluorescein
G3PDH	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastom
GIT-1	G protein –coupled receptor kinase interactor 1
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
K	Kalium
Kb	Kilobasen
KOH	Kaliumhydroxid
LOH	Loss of Heterozygosity
MAk	Monoklonale Antikörper
MDM	Murine Double Minute Homologue

MDM2	Mouse double minute 2
Mg	Magnesium
Na-Acetat	Natriumacetat
NCI	National Cancer Institute
Ng-Cam	Neuronal-glia cell adhesion molecule
Nr-Cam	Ng-CAM related cell adhesion molecule
PDGF-alpha	Platelet derived Growth Factor alpha
PDGFR	Platelet derived Growth Factor Receptor
PSD-95	Post synaptic density 95 (=PDZ=Dlg-A)
PTEN	Phosphatase and tensin Homologue
Ptn	Pleiotropin
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase zeta
RB	Retinoblastom Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RPTP	Receptor Protein Tyrosine Phosphatase beta
RPTP	Receptor Protein Tyrosine Phosphatase zeta
RT	Raumtemperatur
SAP-90	Synapse associated protein 90
SiRNA	Small Nucleotide RNA interference
Ss cDNA	Einzelstrang cDNA
TRK	Tyrosine Receptor Kinase
Vs	Versus
WHO	World Health Organization
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid
Z.B.	Zum Beispiel

In der folgenden Arbeit wird für RPTP /PTP als Abkürzung RPTP verwendet. Diese Abkürzung wurde auch in der aus dieser Arbeit hervorgegangenen Publikationen und Patente verwendet.

Einführung

Glioblastome

Allgemein

Das Glioblastom (GBM) ist der häufigste Gehirntumor und hat die schlechteste Prognose. Es macht ca. 15-20% aller intrakraniellen Tumore aus und ist mit über 50% der häufigste astrozytäre Tumor (Davis et al., 2001). Nach der WHO-Klassifikation zählt das Glioblastom zu den astrozytären Gliomen Grad IV. In Europa und USA liegt die Inzidenz bei ca. 2-3 neuen Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen der fünften und sechsten Lebensdekade, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (1,5:1). Grad III und Grad IV Astrozytome kommen bei Erwachsenen um ein zehnfaches häufiger vor als bei Kindern. GBMs machen nur 6-12% der primären Gehirntumore bei Kindern aus, bei Erwachsenen bis zu 80% (Pollack, 1994). Die Prognose des Glioblastoms ist trotz ständig neu entwickelter Therapieformen bis heute infaust. Die Tumore treten vor allem in den Hemisphären im subkortikalen weißen Marklager auf. Am häufigsten ist der Frontal- und Temporallappen betroffen. Der Tumor infiltriert oft in den angrenzenden Kortex, die Basalganglien und die contralaterale Hemisphäre. Gehirnstamm-Glioblastome sind sehr selten und betreffen eher Kinder und Jugendliche (Dohrmann et al., 1976; Packer & Vezina, 1994). Obwohl alle astrozytären Tumore ein infiltratives Wachstum zeigen, ist das Glioblastom vor allem durch seine rapide Invasion in umgebene Gehirnstrukturen charakterisiert (Burger et al., 1988). Ein häufig zu beobachtendes Phänomen ist die Ausbreitung von Glioblastomen über das Corpus callosum auf die contralaterale Hemisphäre (Schmetterlings-Glioblastom). Ebenso breitet sich der Tumor entlang anderer Gehirnstrukturen, wie zum Beispiel der Capsula interna, Fornix und Commissura anterior,

aus. Das heißt, die Ausbreitung der Tumorzellen erfolgt nicht zufällig, sondern ist an Leitstrukturen gebunden.

Welche zellulären Prozesse genau zur Tumorentstehung führen, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es ist allerdings bekannt, dass verschiedene genetische Veränderungen wie z. B. Genamplifikation oder Mutationen und Deletionen verschiedener Gene mit der Tumorentwicklung assoziiert sind. Häufig spielen die betroffenen Gene eine wichtige Rolle in der Wachstumskontrolle der Zellen. Diese genetischen Veränderungen führen meist zu einem invasiveren und proliferativeren Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp. Die meisten GBMs sind nicht mit vererbaren Krankheiten assoziiert, allerdings zeigen einige Syndrome wie z.B. Neurofibromatose 1, das Turcot Syndrom und das Li-Fraumeni Syndrom ein erhöhtes Risiko, an einem GBM zu erkranken (Malkin et al., 1990; Rosser & Packer, 2002; Shepherd et al., 1991).

Die drei wichtigsten prognostischen Faktoren ist die histologische Diagnose, das Patientenalter und die körperliche Verfassung des Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose. Patienten, die jünger als 60 Jahre alt sind, haben eine bessere Prognose als ältere Patienten (Laws et al., 2003).

Histologie

Histopathologisch besteht das Glioblastom vor allem aus undifferenzierten Astrozyten mit Kernatypien, mikrovaskulärer Proliferation und Nekrose. Es ist ein sehr heterogener Tumor, indem undifferenzierte Zellen neben mehr differenzierten Astrozyten vorliegen können. Charakteristisch für das Glioblastom ist Nekrose und vaskuläre Proliferation. Die mikrovaskuläre Proliferation besteht aus mitotisch aktiven Endothelzellen zusammen mit glatten Muskelzellen und Perizyten (Haddad et al., 1992). Die pseudopalisadenartige Nekrose ist vor allem ein Charakteristikum primärer Glioblastome und ist meist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Barker et al., 1996).

Molekularbiologie

Die Begriffe des primären und sekundären Glioblastoms wurden erstmalig von Scherer 1940 eingeführt. Dieses Konzept ist bis heute allgemein anerkannt. Es ist allerdings zu erwarten, dass durch Fortschritte in der molekularbiologischen Untersuchung von Glioblastomen und deren Anzahl, in der Zukunft weitere Unterteilungen stattfinden werden. Glioblastome, die sich aus Astrozytomen Grad II/III bilden, werden als sekundäre Glioblastome und das *de novo* entstehende, als primäres Glioblastom bezeichnet. Primäre Glioblastome sind vor allem bei älteren Patienten zu finden. Nach einer relativ kurzen Krankheitsgeschichte (ca. 3 Monate) bilden sich primäre Glioblastome *de novo*, das heißt ohne Anzeichen einer bereits vorhandenen malignen low-grade Läsion. Sekundäre Glioblastome finden sich hingegen vor allem bei jüngeren Patienten und entwickeln sich durch eine maligne Progression von diffusen Astrozytomen Grad II oder anaplastischen Astrozytomen (Kleihues & Ohgaki, 1999). Genetisch unterscheiden sich diese zwei Tumorentitäten durch folgende Charakteristika: typisch für das primäre Glioblastom ist eine EGFR- und MDM-Amplifikation, p16 Deletion, LOH von 10p und 10q, Mutationen des PTEN Gens und RB Veränderungen. Das sekundäre Glioblastom hingegen zeigt charakteristischerweise Mutationen im Tumorsuppressorgen p53, PDGF-A und PDGFR Überexpression, LOH von 19q, PTEN Mutationen, DCC Unterexpression und Amplifikation des PDGFR-alpha (Fujisawa et al., 1999; Kleihues & Ohgaki, 1999; Kleihues & Ohgaki, 2000). Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die einzelnen genetischen Veränderungen beim primären Glioblastom im Vergleich zum sekundären.

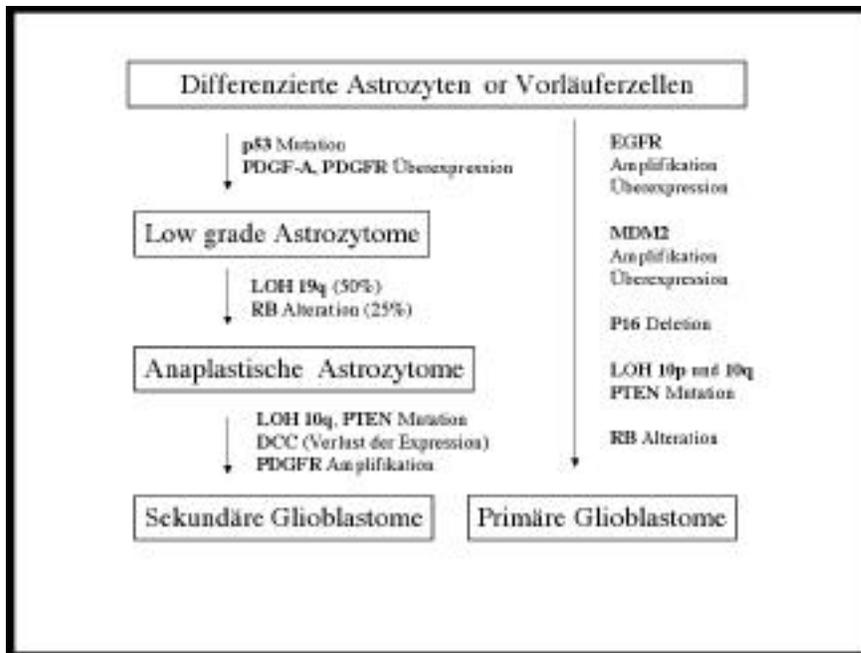


Abbildung 1

Übersicht der verschiedenen genetischen Veränderungen in sekundären (links) gegenüber primären GBM (rechts). Wie aus der Darstellung ersichtlich wird, ist die p53 Mutation im wesentlichen in sekundären GBM zu finden, wohingegen die EGFR Amplifikation vor allem primäre GBM charakterisiert.

Funktionelle Charakteristika

Ein besonderes Merkmal der Glioblastome ist ihr hoher Vaskularisierungsgrad. Sie zählen zu den am stärksten vaskularisierten Tumoren beim Menschen (Brem et al., 1972). Die mikrovaskuläre Proliferation bestehend aus mitotisch aktiven Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Perizyten ist charakteristisch für Grad III und Grad IV Astrozytome. Hingegen ist die Vaskularisierung von Grad I und II Astrozytomen der des Normalgehirns sehr ähnlich. Es scheint, dass Astrozytomzellen mit höherer Malignität die Fähigkeit gewinnen, Angiogenese zu induzieren. *In vivo* Studien haben gezeigt, dass Inhibition von Angiogenese das Wachstum von Glioblastomen hemmt. Des weiteren führt dies aber auch zu

einer verstärkten Invasion der Tumorzellen entlang existierender Blutgefäße (Lamszus et al., 2003). Diese Beobachtung macht den Erfolg reiner Anti-Angiogenese Therapien fraglich. Ein weiteres Charakteristikum von Glioblastomzellen ist ihre Fähigkeit zur Migration und invasivem Wachstum (Berens & Giese, 1999; Giese & Westphal, 1996). Glioblastome migrieren entlang vorgegebener Nervenbahnen, Nervenzellen und perivaskulären Räumen. Zum Zeitpunkt der Diagnose hat ein großer Anteil der Tumore bereits die kontralaterale Hemisphäre erreicht (Matsukado et al., 1961). Diese Fähigkeit stellt eine der größten Herausforderungen in der Entwicklung neuer Therapien da. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass migrierende Glioblastomzellen eine Anzahl von Genen, die mit Proliferation und Apoptose assoziiert sind, herunterregulieren. Gene hingegen, die in der Migration und in Anti-Apoptose Mechanismen eine Rolle spielen, werden in den gleichen Zellen hochreguliert (Mariani et al., 2001a). Untersuchungen an Tumoren konnten zeigen, dass sich das Expressionsprofil vom Kerntumor im Vergleich zu dem aus dem Tumor migrierenden Zellen, unterscheidet (Mariani et al., 2001b). Je mehr über den Mechanismus der Migration und der darin involvierten Gene bekannt wird, desto besser werden die therapeutischen Möglichkeiten sein, diese Eigenschaft der Glioblastomzellen selektiv zu inhibieren.

Therapie des Glioblastoms

Die Therapie der Glioblastome liegt vorrangig in der chirurgischen Entfernung der Tumormasse. Studien sprechen dafür, dass die Prognose abhängig von der postoperativen Resttumorgröße ist. Des weiteren hat sich gezeigt, dass eine anschließende Strahlentherapie die mittlere Überlebenszeit verlängert (Walker et al., 1980). Chemotherapien sind bis heute nur marginal wirksam. Bisher kann keine allgemeine Empfehlung für eine chemotherapeutische Behandlung von Glioblastom-Patienten ausgesprochen werden.

Eine Vielzahl von Studien beschäftigen sich heutzutage mit alternativen Behandlungsformen. Dabei ist ein wesentliches Ziel die Kontrolle der lokalen Rekurrenz des Tumors. Obwohl

Glioblastome eine hohe Tendenz zur Migration haben, erscheint der Tumor in über 80% der Fälle erneut am Ursprungsort (Burger et al., 1983; Earnest et al., 1988). Diese Beobachtung führte zu verschiedensten Behandlungsansätzen, die das Therapeutikum direkt in die postchirurgische Tumorköhle oder spontanen Zysten gaben wie z.B. BCNU, Interleukin-2 oder radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern (mAk) (Goetz et al., 2003; Merchant et al., 1990; Riva et al., 1997; Westphal et al., 2003). Ein weiteres Gebiet, das derzeit intensiv beforscht wird, ist die Entwicklung sogenannter *small molecule compounds*. Es handelt sich hierbei um kleine Moleküle mit guten pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften, die spezifisch verschiedenste Signalkaskaden der Tumorzellen blockieren. Z.B. wird derzeit in klinischen Studien ein EGFR Tyrosin Kinase Inhibitor (ZD 1839, Iressa, Astra Zeneca) getestet. Des Weiteren werden klinisch Inhibitoren des VEGF Rezeptors (SU5416, Sugen /Pharmacia) und der Phosphoinositid 3-Kinase (CCI-779, Wyeth Pharmaceuticals) untersucht (Huang & Houghton, 2002; Kunkel et al., 2001; Lamszus et al., 2003; Rich et al., 2004). Ein weiteres zelluläres System, welches immer mehr Aufmerksamkeit in der Entwicklung neuer Behandlungsformen für Tumore auf sich zieht, ist das wichtigste Degradierungssystem der eukaryotischen Zelle, das Ubiquitin/Proteasom System. Die Entwicklung von Substanzen, die das Degradierungsprogramm von Zellen ändern und somit Apoptose in Tumorzellen induzieren könnte, ist sehr vielversprechend. Derzeit wird PS-341 (Millenium Pharmaceuticals), ein Proteasom-Inhibitor, in einer klinischen Phase I Studie für Glioblastom Patienten evaluiert (Ling et al., 2003; Voorhees et al., 2003). Weitere Entwicklungen sind zum einen gentherapeutische Ansätze (Hamel & Westphal, 2003; Ikenaka et al., 2001; Nanda et al., 2001; Yamanaka et al., 2001), Stammzellen (Kirsch et al., 2003) und immuntherapeutische Verfahren (Merlo et al., 2003; Zalutsky et al., 1990). Im weiteren wird speziell auf die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern eingegangen.

Immuntherapie

Allgemein

Wie zuvor schon erwähnt, ist ein wesentliches Ziel in der Entwicklung neuer Therapieformen, die Kontrolle der lokalen Rezidivierung. Im folgenden wird speziell auf die Entwicklung von mAk und/oder Fab2 Fragmente zur Behandlung von Glioblastomen eingegangen, da dies Focus dieser Arbeit ist. Andere immuntherapeutische Verfahren wie z.B. die Applikation zytotoxischer T-Lymphozyten, dendritische Zellen oder Immunmodulation werden nicht näher beschrieben.

Die erste Antikörper-Studie an Glioblastompatienten wurde 1957 mit Iod¹²⁵ markierten polyklonalen Antikörpern gegen Glioblastome durchgeführt (Pressman et al., 1957). Mitte der sechziger Jahre wurden mehrere klinische Studien mit radioaktiv markierten polyklonalen Antikörpern durchgeführt. Diese zeigten, dass die Antikörper ausreichend zum Nachweis im Tumorgewebe aufgenommen wurden. Dennoch war die absolute Menge an Radioaktivität nicht im therapeutischen Bereich (Day et al., 1965; Mahaley, 1971; Mahaley & Day, 1965). Zu diesem Zeitpunkt waren nur polyklonale Antikörper mit multiplen Affinitäten erhältlich. In den späten siebziger Jahren entwickelten Köhler und Milstein die murine mAk Technologie, die es erstmals ermöglichte, große Mengen an einzelnen Immunglobulinklassen mit spezifischer Affinität zu produzieren (Kohler & Milstein, 1975). Diese Entdeckung legte den Grundstein für spezifischere Therapiemöglichkeiten mittels mAk. Derzeit werden eine Vielzahl von mAk/Fab2 Fragmente in klinischen Studien evaluiert.

Was macht ein Molekül zu einem guten Immuntarget für mAk Therapie ?

Verschiedene Kriterien müssen erfüllt sein, damit eine mAk Therapie erfolgsversprechend ist. Zum einen muss das Gen in den Tumorzellen überexprimiert sein im Vergleich zu normalen Gehirnstrukturen. Das Gen muss in hoher Konzentration auf den Tumorzellen

exprimiert werden, damit eine ausreichende Konzentration erreicht werden kann. Idealerweise ist das Zielmolekül ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert, so dass toxische Nebeneffekte gering sind. Das Zielgen muss *in vivo* für die Bindung mit dem therapeutischen mAk verfügbar sein. Das heißt Oberflächenmoleküle, die durch endogene Liganden blockiert sind, stehen dem Therapeutikum nicht zur Verfügung und sind somit ungeeignet.

Des Weiteren sollte das Zielgen starke antigene Eigenschaften haben, so dass eine hohe Affinität erreicht werden kann. Es wäre ebenfalls wünschenswert, wenn das Target eine essentielle Rolle in der Tumorbio­logie spielen würde. Dies würde ermöglichen, dass funktionelle Antikörper entwickelt werden könnten, die durch Bindung an das Zielgen essentielle Tumorfunktionen wie z.B. Proliferation, Angiogenese oder Migration blockieren könnten. In solch einem Fall könnte auf die Konjugation mit radioaktiven Stoffen verzichtet werden, was eine erhebliche Erleichterung in der Entwicklung, Applikation und Toxizität zur Folge hätte. Der therapeutische mAk selbst muss eine ausreichende Stabilität unter *in vivo* Bedingungen besitzen. Der mAk muss gute pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften haben. Je kleiner der verwendete mAk ist, desto günstiger werden seine Diffusions-eigenschaften sein und somit eine weitere Penetration in das umliegende Gehirngewebe gelingen. Bei der Auswahl von Oberflächenmolekülen, die sich potentiell für eine Immuntherapie eignen, werden diese Kriterien entscheidend für den langfristigen klinischen Erfolg sein.

Klinische Studien von ausgewählten Beispielen

EGFR war eines der ersten Gene, dass für die Entwicklung von therapeutischen mAk, evaluiert wurde. EGFR war das erste amplifizierte Gen, dass in Glioblastomen identifiziert wurde (Libermann et al., 1985b). Es ist in über 60% der Glioblastome und anaplastischen Astrozytome überexprimiert (Libermann et al., 1985a). In Tumorzellen kommt der Rezeptor als EGFRvIII Variante vor. Bei dieser Form liegt eine Deletion in der extrazellulären

Domäne vor und es entsteht somit ein tumorspezifisches Epitop (Mishima et al., 2001). Verschiedene Antikörper gegen die EGFRvIII Form wurden entwickelt. Zum einen ein muriner mAk L8A4 und ein sogenanntes *single chain variable region* (scFv) Molekül (Kurpad et al., 1995; Lorimer et al., 1996; Sampson et al., 2000).

Ein weiteres Beispiel für mAK Therapie in Glioblastompatienten ist Tenascin. Es ist in der extrazellulären Matrix der meisten Glioblastome exprimiert (Herold-Mende et al., 2002). Der Expressionsgrad korreliert mit der Malignität. MAk gegen Tenascin (81C6, BC-2, BC-4) werden derzeit intensiv in klinischen Studien erprobt (Brown et al., 1996; Zalutsky et al., 1996; Zalutsky et al., 2001). Bigner et al. haben die Ergebnisse einer Phase I Studie zusammengefasst (Bigner et al., 1998; Cokgor et al., 2000). Insgesamt wurden 34 Patienten mit radioaktiv markierten I¹³¹ mAk 81C6 behandelt. Die ermittelte Überlebenszeit der Patienten war zweimal so lang im Vergleich zur konventionellen Therapie. Eine Phase II Studie mit 33 Patienten unterstützte dieses positive Ergebnis (Reardon et al., 2002). Phase III Studien sind in der momentanen Planung. Weitere Beispiele für Zielgene zur mAK Therapie sind onkofetales Fibronectin und N-CAM (Papanastassiou et al., 1993; Ravic, 2003; Zardi et al., 1987).

Applikation von mAk

Einen wesentlichen Einfluss auf die Erfolgsaussicht all dieser verschiedenen therapeutischen Antikörper wird die Entwicklung neuer Applikationsformen haben. Zalutsky untersuchte den therapeutischen Unterschied zwischen intravenöser und intrakraniellen Applikationsformen für mAK (Zalutsky et al., 1990). Heutzutage gilt die *Convection enhanced drug delivery* (CEDD) als erfolgsversprechendste Applikationsform. Diese Methode nützt die tumoreigene Produktion extrazellulärer Flüssigkeit (Ödembildung) aus, um über zusätzliche Infusion mittels eines intrakraniellen Katheters Wirkstoffe innerhalb des Tumors effizient zu verteilen und eine hohe Lokaldosis zu erreichen (Bobo et al., 1994). Eine weitere Möglichkeit die

Blutgehirnschranke effizient zu überwinden, besteht in der Ausnutzung endogener Transportsysteme wie z.B. Diphtherietoxin konjugierte Transferrin Moleküle (Laske et al., 1997; Pardridge, 2002). Des Weiteren werden derzeit virale Vektoren als therapeutische Option intensiv beforscht. Diese Vektoren können zum einen Toxine zu Tumorzellen transportieren oder im Sinne der klassischen Gentherapie, z. B. die Funktion mutierter Tumorsuppressorgene wiederherstellen (Abe et al., 2002; Hamel & Westphal, 2003; Sandmair et al., 2000a; Sandmair et al., 2000b).

Methoden zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Allgemein

Die Fortschritte in unserem Wissen über Genetik sind bemerkenswert. Zu Beginn dieses Jahrhunderts wurde von W. Bateson der Begriff des Gens eingeführt. Die Entdeckung, dass Chromosomen die Erbinformationen speichern, erfolgte ein Jahrzehnt später und die Chromosomenstruktur wurde 1953 von Watson und Crick veröffentlicht (Watson & Crick, 1953). Die Sequenz des gesamten humanen und murinen Genoms erfolgte in weniger als 50 Jahren (Venter et al., 2001). Nur 1-2 % des humanen Genoms kodieren für Gene, die durch mRNA in Protein translatiert werden. Der Rest besteht aus Sequenzwiederholungen, regulatorischen Elementen und Regionen, deren Funktion bis heute nicht bekannt ist. Die ersten Schätzungen ergaben, dass das humane Genom für ca. 30.000-40.000 Gene kodiert. Die zweifache Anzahl, die man z.B. in Drosophila findet (Nelson, 2001; Venter et al., 2001). Dies lässt den Schluss zu, dass ein Grossteil der Unterschiede zwischen Mensch und Drosophila in der zeitlichen und örtlichen Regulation, alternativen Spleißen und post-translationalen Modifikationen zu suchen ist und nicht im wesentlichen durch Unterschiede in der Anzahl an Genen bestimmt ist. Der nächste Schritt, um nun die Entwicklung einzelner Zellarten und/oder Krankheiten besser verstehen zu können, war die Analyse des Transkriptoms. Das Transkriptom besteht aus der Gesamtheit der mRNAs, die in einer Zelle

zu einem bestimmten Zeitpunkt in relativen Konzentrationen vorliegen. In den letzten 20 Jahren sind verschiedenste Methoden dafür entwickelt worden. All diese Methoden eignen sich zur Untersuchung von z. B. Genen, die in der Tumorentstehung und -entwicklung eine Rolle spielen. Die folgende Abbildung zeigt einen zeitlichen Überblick der verschiedenen Methoden (adaptiert von (Liang & Pardee, 2003)):

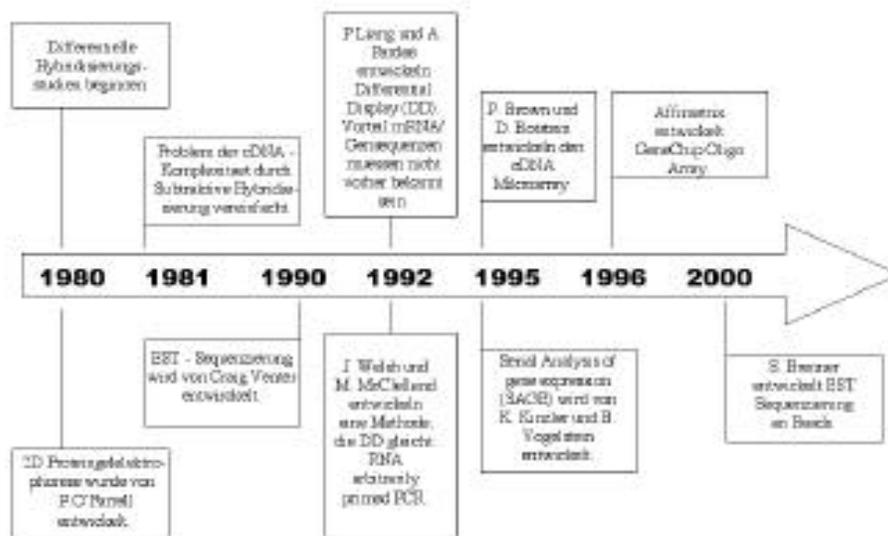


Abbildung 2

Zeitliche Darstellung von verschiedenen Technologien, die zur Untersuchung differentiell exprimierter Gene entwickelt wurden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird insbesondere auf die subtraktive Hybridisierung und Nylonmembran cDNA Arrays eingegangen, da diese zwei Methoden in Kombination angewandt wurden.

Subtraktive Hybridisierung

Die Komplexität von cDNA Proben stellt ein Problem bei der Identifizierung von Genen da, die nur in geringer Menge exprimiert werden. Der Begriff der cDNA Komplexität beschreibt

die Anzahl von komplementären cDNA Molekülen (oder mRNA Molekülen) und ihre relativen Konzentrationen in einer cDNA Probe. In der Regel werden cDNA Proben für Array Experimente durch reverse Transkription der gesamten mRNA einer Zelle mittels einem oligo dT Primer synthetisiert. Eine cDNA Probe kann somit über 10.000 verschiedene cDNA Moleküle beinhalten, die in unterschiedlichsten Kopienanzahl vorliegen.

Zimmermann et al. entwickelten daraufhin die Methode der subtraktiven Hybridisierung. Dieses Verfahren ermöglicht es, cDNA Proben für Sequenzen anzureichern, die nicht im Kontrollgewebe exprimiert sind und somit eine geringere Komplexität haben (Zimmermann et al., 1980). Die Identifizierung von T-Zell Rezeptoren Mitte der 80-iger Jahre durch Mark Davis, war eine sehr erfolgreiche Anwendung der subtraktiven Hybridisierungsstrategie zwischen B- und T-Zellen (Hedrick et al., 1984). Basierend auf dem Konzept der subtraktiven Hybridisierung wurde die Suppressions- PCR entwickelt. Dieses Verfahren ist geeignet subtraktive cDNA Banken und cDNA Proben herzustellen (siehe Methoden: Diatchenko et al., 1996).

CDNA Arrays

Das Prinzip der cDNA-Arrays basiert auf der Hybridisierung von markierter DNA bzw. RNA mit komplementärer, an einer definierten Stelle auf einer Trägermatrix immobilisierten DNA. Von der Grundidee ist es vergleichbar mit den schon lange in der Forschung routinemäßig angewendeten Methoden wie Northern und Southern Blotting.

Nukleinsäuren werden in hoher Dichte auf einem festem Trägermaterial immobilisiert oder *in situ* synthetisiert. Durch die Positionierung bekannter Moleküle in einem definiertem Raster entsteht eine Sonden Matrix, mittels der sich aus einem Pool einer komplexen Probe durch spezifische Hybridisierung genau das komplementäre Gegenstück finden und detektieren lässt. Pat Brown und David Botstein entwickelten an der Stanford Universität die ersten cDNA Mikroarrays (Schena et al., 1995), wohingegen die Firma Affymetrix (Santa

Clara, CA, USA) die Oligo Arrays entwickelte (Chee et al., 1996). Beide Methoden haben das Potential, gleichzeitig mehrere tausend Gene in einer Gewebeprobe zu untersuchen. Mittlerweile sind eine Vielzahl unterschiedlicher Trägermaterialien (Glas, Nylonmembranen), verschiedenste Detektionsmethoden (Radioaktivität, Fluoreszenz) und unterschiedliche Arten von immobilisierten Nukleinsäuren (Oligo, cDNA) erfolgreich kombiniert worden.

Analyse von Array Daten

Unabhängig von Art und Design des jeweiligen Experiments, haben die meisten Array Studien gemeinsam, dass die Anzahl der Variablen (Gene in Form von Oligo oder cDNA Molekülen) die Anzahl der Proben (z.B. verschiedene Tumorproben) um ein Vielfaches übertrifft. Häufig ist die gewünschte Anzahl an Replikaten und Probenanzahl für ein Experiment praktisch nicht durchführbar, was eine besondere Herausforderung an die statistische Auswertung stellt. Eine Vielzahl verschiedener Computerprogramme ist in den letzten Jahren speziell dafür entwickelt worden. Die Rohdaten werden mittels verschiedenen Methoden gefiltert, um möglichst verlässliche Datenpunkte zu erhalten. Was gute oder schlechte Daten sind, wird bis heute noch in der Array Gemeinschaft kontrovers diskutiert und es besteht kein Konsensus diesbezüglich (Chen et al., 2002). Für die weitere statistische Auswertung von Arraydaten, gibt es zwei Verfahren, die häufig in der Datenanalyse eingesetzt werden: kontrolliert und nicht kontrolliert. Im ersten Verfahren werden bekannte Variablen in die Analyse miteinbezogen. Dieses Verfahren erfolgt normalerweise in zwei Schritten, d.h. in der ersten Stufe wird eine Liste von Genen identifiziert, die als "*Classifier*" dienen. Diese *Classifier* dienen dann in der nächsten Stufe dazu, unbekannte Proben einer bestimmten Gruppe zuzuordnen. Im nicht kontrollierten Verfahren werden die Proben nur aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede in den Expressionswerten in verschiedene Cluster eingeteilt (reviewed in (Luo et al., 2003).

Tabelle 1 gibt eine Übersicht der am häufigsten angewendeten Methoden an.

Prinzip	Methode
Nicht Kontrollierte Clusteranalyse	Hierarchische oder K-means Clusterbildung, Multi-Dimensional Scaling,
Kontrollierte Clusteranalyse	F-test, t-Test, Mann-Whitney U-Test, MDS weighted gene analysis, Analysis of variance (ANOVA)

Tabelle 1:

Verschiedene Methoden der nicht kontrollierten und kontrollierten Clusteranalyse.

Erwartungen und Limitationen von Arrays

Seit ihrer Einführung Mitte der 90iger Jahre galten Arrays als das neue molekularbiologische Werkzeug, das dem Forscher ermöglichen soll, auf einfachem und schnellem Wege, neue Signalwege und deren Mitglieder in verschiedensten Geweben identifizieren zu können (Staudt & Brown, 2000). Dieses Vorhaben gestaltete sich allerdings schwieriger als erwartet. Die Interpretation der großen Datenmenge stellte Anforderungen sowohl an das Design der Experimente als auch an die Analysetechniken, die erst im Laufe der letzten Jahre entwickelt wurden. Mittlerweile sind eine Vielzahl von Computerprogrammen entwickelt worden. Des Weiteren sind internationale Standards eingeführt worden, die Wissenschaftlern ermöglichen soll, verschiedene Arraydaten miteinander vergleichen zu können (Microarray Gen Expression Data (MGED) society, www.mged.org).

Mittlerweile werden cDNA Arrays in einer Vielzahl verschiedener biologischer Fragestellung angewandt. Vor allem in der Krebsforschung konnten mittels Arrayanalyse neue Gene, die in der Tumorbologie eine Rolle spielen, identifiziert und charakterisiert werden

(Ramaswamy & Golub, 2002). Des Weiteren werden neue Klassifikationen von Glioblastomen basierend auf Expressionsprofilen erstellt (Mischel et al., 2003; Shai et al., 2003). Die Neuroonkologieabteilung des National Cancer Institute (NCI, <http://www.nci.nih.gov>) erstellte im Rahmen des Cancer Molecular Analysis Program (CMAP, <http://cmap.nci.nih.gov>) zusammen mit dem Cancer Genome Anatomy Project (CGAP, <http://cgap.nci.nih.gov>) und des NCI's Cancer Therapy Evaluation Program (CTEP, <http://ctep.cancer.gov>) einen cDNA/Oligo Array mit über 48.000 Elementen speziell für Tumore des ZNS. Mittels diesem Array sollen eine Vielzahl von Gehirntumoren aus aller Welt analysiert werden und die erstellten Expressionsprofile im Internet den Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt werden. Die Veröffentlichung solcher Expressionsprofile wird es der Wissenschaftsgemeinschaft möglich machen, die sehr viel zeitaufwendigeren Verfahren der funktionellen Genanalyse, auf mehrere Gruppen aufzuteilen. Die immensen Datenmengen, die mittels "high throughput" Verfahren wie cDNA Array Analyse in relativ kurzer Zeit produziert werden können, stellen für den Forscher ein großes Problem dar: wie validiert und charakterisiert man die differentiell exprimierten Gene? Welche Selektionskriterien etabliert man, um die besten Kandidaten auszuwählen? Die "Qual der Wahl" ist bis heute ein ungelöstes Problem. Allerdings werden täglich neue Verfahren entwickelt, die eine möglichst schnelle Validierung ermöglichen sollen, so dass keine große Selektion stattfinden muss. Zum anderen werden die Expressionsdaten anhand anderer Methoden wie zum Beispiel quantitative PCR bestätigt und dann erst funktionell charakterisiert. Weitere Entwicklungen führen dazu, dass Fragestellung und Arraydesign immer spezifischer aufeinander abgestimmt werden. Als ein Beispiel ist das oben aufgeführte NCI Programm zu nennen, das einen spezifischen ZNS Tumor Array erstellte und somit sich nur im Kontext befindliche Gene anschauen wird. Die Hoffnung solcher Designs ist, dass die Rate der falsch positiven Signale signifikant reduziert wird.

RPTP ζ

Allgemein

Die *Protein Tyrosine Phosphatase zeta* (PTP ζ) wird auch als RPTP ζ bezeichnet, da das Gen von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander kloniert wurde (Krueger & Saito, 1992; Levy et al., 1993). In dieser Arbeit wird im folgendem RPTP ζ als Abkürzung verwendet. RPTP ζ ist eine Mitglied einer Gruppe von Tyrosinphosphatasen. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation neuronaler Morphogenese und kontrollieren das Wachstum von Axonen. CD45 war die erste Rezeptortyrosinphosphatase, die identifiziert wurde (Tonks et al., 1988). Mittlerweile sind über 30 verschiedene RPTPs charakterisiert (Bixby, 2000). Sie sind in 8 Gruppen unterteilt: Typ I, IIa, IIb, III, IV, V, VI, VII und VIII (Andersen et al., 2001). Die intrazelluläre katalytische Domäne der meisten RPTPs besteht aus 2 Tandem Phosphatasedomänen, wobei die näher an der Zellmembran gelegene, die katalytisch aktive ist. Der anderen Einheit fehlt ein Cystein-rest, der für die Phosphataseaktivität essentiell ist. Während der intrazelluläre Anteil unter den verschiedenen Gruppen stark konserviert ist, unterscheidet sich der extrazelluläre Anteil der verschiedenen Mitglieder erheblich (Andersen et al., 2001; Hooft van Huijsduijnen, 1998). RPTP ζ gehört zusammen mit RPTP β in die Gruppe V. Diese Gruppe ist dadurch charakterisiert, dass sie eine extrazelluläre Carbonanhydrase (CAH) Domäne besitzen, die mit einer einzelnen Fibronectin Domäne verbunden ist (Barnea et al., 1993; Krueger & Saito, 1992).

Untersuchungen ergaben, dass diese Klasse von RPTPs in 2 verschiedenen Formen auftreten: zum einen als hochmolekularer transmembraner Rezeptortyp, zum anderen als niedermolekularer sekretorischer Typ. Die sekretorische, extrazelluläre Form von RPTP ζ wird auch als Phosphacan bezeichnet (Bixby, 2000). Die meisten RPTPs werden in den verschiedensten Geweben exprimiert, wohingegen RPTP ζ hauptsächlich im Gehirn gefunden wird (Krueger & Saito, 1992; Levy et al., 1993). Es ist stark während der

Entwicklung exprimiert: vor allem in den embryonalen ventrikulären und subventrikulären Zonen, dem Gyrus dentatus und der subependymalen Schicht des Seitenventrikels. Ebenso konnte RPTP in Gliazellen, Astrozyten und Neuronen nachgewiesen werden (Canoll et al., 1993; Maeda et al., 1995; Milev et al., 1994). Die transmembrane Form ist im wesentlichen auf migrierenden Neuronen zu finden (Maeda & Noda, 1998). Das Expressionsmuster scheint sich ebenfalls mit der Progression der Gliazelldifferenzierung zu ändern (Canoll et al., 1993; Canoll et al., 1996; Milev et al., 1994). In Arealen des adulten Gehirns, in denen kontinuierliche Neurogenese stattfindet, konnten ebenfalls hohe Expressionslevel von RPTP nachgewiesen werden. Es scheint eine wichtige Rolle in der Plastizität des Gehirns zu spielen.

Bisher konnten 4 verschiedene Spleißvarianten von RPTP identifiziert werden: eine lange transmembrane Form (9,4 kB), eine kurze 6.4 kB transmembrane Form, eine extrazelluläre Form (Phosphacan, 8.7kB) und eine kurze Form von Phosphacan mit 4 kB (Garwood et al., 2003; Krueger & Saito, 1992). In Abbildung 3 ist eine schematische Übersicht der einzelnen Spleißvarianten zu sehen.

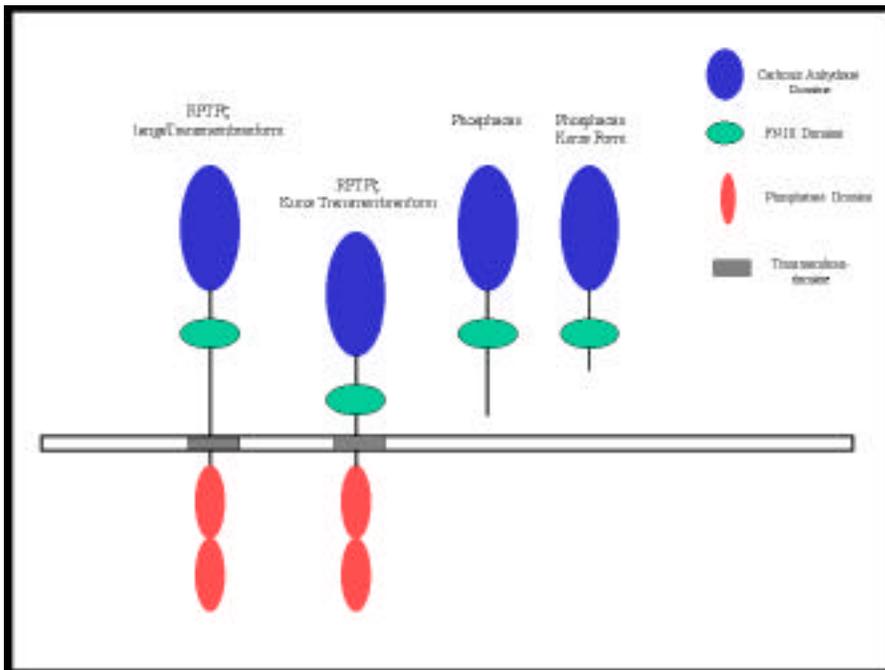


Abbildung 3

Schematische Übersicht der einzelnen Spleißvarianten von RPTP . Alle Moleküle exprimieren die Carbonic Anhydrase und Fibronectin III (FN III) Domäne. Die kurze Transmembranform unterscheidet sich in der extrazellulären Region von der langen Transmembranform. Phosphacan und die kurze Variante von Phosphacan sind sekretorische, extrazelluläre Proteine, die nicht in der Membran verankert sind. Phosphacan entspricht dem extrazellulären Anteil der langen Transmembranform von RPTP .

Die verschiedenen Spleißvarianten unterscheiden sich bezüglich ihrer zeitlichen und örtlichen Expression. Die transmembranen Formen werden vor allem in glialen Vorläuferzellen in der subventrikulären Zone exprimiert. Phosphacan wird von eher reifen Gliazellen, die aus dieser Zone migriert sind, synthetisiert (Canoll et al., 1996). Der höchste Expressionslevel der kurzen Phosphacanform scheint mit der Myelinisierung des Gehirns zusammenzufallen (Garwood et al., 2003).

Knock-out Studien haben gezeigt, das RPTP defiziente Mäuse überlebensfähig und fertil sind. Sie zeigen keine offensichtlichen anatomischen Veränderungen des ZNS oder anderer Organe. Die Feinstruktur der Nervenscheiden ist allerdings verändert, was auf eine Fragilität des Myelins zurückgeführt wurde (Harroch et al., 2000). Dennoch ist die Nervenleitungsgeschwindigkeit unverändert. Die normale Neuronen- und Gliaentwicklung in diesen RPTP defizienten Mäusen kann zum einen dadurch erklärt werden, dass RPTP für diesen Prozess *in vivo* nicht notwendig ist oder dass deren Funktion durch andere RPTPs kompensiert werden kann. Eine weitere Untersuchung an diesen *knock-out* Mäusen konnte zeigen, dass die Expression von RPTP in Oligodendrozyten für die Erholung von experimentell induzierter autoimmun Enzephalomyelitis, ein Modell für multiple Sklerose, notwendig ist (Harroch et al., 2002).

RPTP's extrazelluläre Domäne bindet an eine Vielzahl verschiedener Adhäsionsmoleküle. Da die extrazelluläre Domäne als transmembrane oder sekretorische, extrazelluläre Form auftritt, konkurrieren diese beiden Formen mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Bindung spezifischer Liganden. Dies stellt einen möglichen Mechanismus in der Kontrolle verschiedenster Signalkaskaden dar. Phosphacan wird im wesentlichen von Gliazellen exprimiert und bindet an neuronale Adhäsionsmoleküle wie Ng-CAM/L1, NCAM und an extrazelluläre Matrixmoleküle wie Tenascin-C und Tenascin-R. Es bindet ebenfalls an lösliche Liganden wie Amphoterin und HB-GAM (*heparin binding growth-associated molecule*). Die Interaktion wird im wesentlichen über N-gebundene Oligosaccharidketten vermittelt (Adamsky et al., 2001; Grumet et al., 1994; Maeda & Noda, 1998; Milev et al., 1998a). Phosphacan zeigt ebenso reversible Bindung von FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) (Milev et al., 1998b). Die CAH Domäne bindet selektiv Contactin (Peles et al., 1995). Contactin ist ein 140 kDa Membranprotein, das auf der Oberfläche von Neuronen exprimiert wird. Diese Interaktion induziert Zelladhäsion und Neuritenwachstum von vor allem tektalen Neuronen. Dies konnte durch Antikörper gegen Contactin blockiert werden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass Contactin ein neuronaler Rezeptor für RPTP darstellt. Mittels Synthese verschiedener Fusionsproteine konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von RPTP auf Gliazellen mit dem Contactin/Nr-CAM Komplex auf Neuronen, ein wichtiger Bestandteil für das Neuritenwachstum und neuronaler Differenzierung ist (Peles et al., 1995).

Die aktive Phosphatasedomäne von RPTP bindet β -Catenin und reduziert dessen Phosphorylierungslevel. Es konnte gezeigt werden, dass RPTP konstitutiv aktiv ist und somit ein wichtiges Kontrollelement bezüglich des Phosphorylierungsstatus von β -Catenin in einer Zelle darstellt (Meng et al., 2000). GIT1/Cat-1 ist ein weiteres Substratmolekül für RPTP (Kawachi et al., 2001). Über die katalytisch stumme Domäne bindet RPTP an PSD-95/SAP90. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben, dass RPTP und PSD-

95/SAP90 in den Dendriten der Pyramidalneuronen des Hippocampus und des Neokortex kolokalisiert sind. Subzelluläre Fraktionierungs-Experimente ergaben, dass RPTP und PSD-95/SAP90 sich beide in der postsynaptischen Fraktion anreichern. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass RPTP durch Komplexbildung mit PSD-95/SAP90 an der Regulation synaptischer Funktionen beteiligt ist (Kawachi et al., 1999). Spannungsabhängige Natriumkanäle in Neuronen assoziieren ebenfalls mit RPTP, sowohl über extra- als auch intrazelluläre Anteile des Rezeptors. Diese Kanäle sind an Tyrosinresten phosphoryliert und werden in ihrer Funktion durch Interaktion mit RPTP moduliert (Ratcliff et al., 2000).

RPTP und sein Ligand Pleiotropin

Pleiotropin (Ptn) ist ein induzierbarer Wachstumsfaktor, der als sekretorisches Zytokin Mitogenese, Angiogenese und Wachstum von Neuriten und Gliazellen stimuliert. Während der Entwicklung wird es im Gehirn, Darm, Muskel, Haut, Herz, Lunge und Nieren exprimiert (Deuel et al., 2002; Milner et al., 1989; Rauvala, 1989). Im adulten Organismus wird Ptn vor allem im Gehirn in Assoziation mit Axonen während aktiver Mitogenese gefunden. Es scheint somit eine wichtige Rolle für die Entwicklung des ZNS zu spielen (Silos-Santiago et al., 1996). Ptn bindet Heparin, Heparinsulfatproteoglykane und extrazelluläre Matrix Moleküle. Es hat onkogene Eigenschaften und kann maligne Transformation, Tumorstadium und Progression induzieren (Chauhan et al., 1993). Ptn wurde ebenfalls als Proto-Onkogen beschrieben, das in vielen humanen Tumoren und humanen Tumorzelllinien exprimiert wird (Kurtz et al., 1995; Wellstein et al., 1992). Es wirkt als Mitogen für Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen (Fang et al., 1992; Wellstein et al., 1992). Es stimuliert Tubebildung und kann als Angiogenesefaktor in Tumoren wirken (Deuel et al., 2002; Yeh et al., 1998).

Ptn bindet an den extrazellulären Anteil von RPTP und inaktiviert dadurch die Phosphataseaktivität. Es kommt sozusagen zu einer ligandenabhängigen

Rezeptorinaktivierung, die den Phosphorylierungsgrad von Signalmolekülen wie β -Catenin ändert (Meng et al., 2000). Röntgenstrukturanalysen und biochemische Studien führten zu der Modellvorstellung, dass RPTPs durch Dimerisierung inaktiviert werden, das heißt die katalytische Domäne des einen Rezeptormoleküls durch die des zweiten blockiert und dadurch inaktiviert wird (Bilwes et al., 1996). Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, ob dieses Modell auf alle RPTPs und Liganden anwendbar ist oder es charakteristisch für verschiedene Untergruppen ist.

Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung eines Oberflächenmoleküls, das sich als potentiell geeignetes Ziel für die Entwicklung einer Immuntherapie für Glioblastome eignet. Hierfür sollen zunächst Glioblastom-spezifische cDNA Arrays mittels subtraktiver cDNA-Banken hergestellt und anschließend mit mehreren Tumorproben und Kontrollen hybridisiert werden. Es soll ein Verfahren etabliert werden, das eine hohe spezifische Aussagekraft hat, um die Anzahl falsch positiver Signale möglichst gering zu halten. Die ermittelten Gene sollen dann bezüglich ihrer Hochregulation mit anderen Methoden wie quantitative PCR, Northern- und Western Blot bestätigt werden. Geeignete Oberflächengene sollen anschließend näher charakterisiert und ihre Funktion in Glioblastomen etabliert werden.

Methoden

Die Sequenzen der verwendeten Vektoren und Primer, sowie die jeweiligen PCR Bedingungen, befinden sich im Anhang dieser Arbeit, falls sie nicht gesondert im Text angegeben sind.

Kollektion von Primärtumoren

Die in dieser Arbeit untersuchten Glioblastome wurden in der Klinik für Neurochirurgie der Universität Hamburg und am Gehirntumorzentrum der Duke University, North Carolina gesammelt. Die Tumorpräparate wurden nach der Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Klassifizierung der einzelnen Tumore erfolgte in der Pathologie bzw. Neuropathologie der jeweiligen Institute. Normalgehirn wurde von den Firmen Clontech (Palo Alto, USA) und der Firma Ambion (Austin, USA) als mRNA oder totale RNA bezogen und für die Experimente verwendet.

Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Falls nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Glioblastom Zelllinien in Earle's Minimum Essential Medium mit 2mM Glutamin, 1mM Pyruvat, 2.5 mmol/ml Amphotericin B, 40mg/ml Gentamycin und 10% FCS (Gibco, Carlsbad, USA) unter Standardbedingungen gehalten (Westphal et al., 1994). Die Zelllinie D566 wurde von Prof. D. Bigner, Duke University, NC, USA zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie wird in MEM Zinc Option Media mit 10%FCS (Gibco, Carlsbad, USA) unter Standardbedingungen kultiviert.

RNA Isolierung aus Primärtumoren und Zellkultur

Totale RNA wurde mittels *TriStar* Reagenz® (*acid guanidinium*) aus Zellen und Tumoren isoliert (Invitrogen, Carlsbad, USA). Die Zellen und Tumore wurden in *TriStar*

homogenisiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phasentrennung durch Zugabe von Chloroform. Die obere, wässrige Phase (enthält RNA) wurde nach Zentrifugation (10min, 14000g) abgenommen. Die totale RNA wurde mit 0.7-fachen Volumen an Isopropanol für 30 Minuten bei RT präzipitiert. Nach 30 Minuten Zentrifugation (14000g) wurde das RNA Pellet mit 70%-igen Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 30µl H₂O resuspendiert. Anschließend wurde die totale RNA mit DNase, RNasefrei (Ambion, Austin, USA) bei 37°C für 40 Minuten inkubiert, um eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA zu beseitigen. Die Proben wurden über eine Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt und erneut mit 2.5-fachem Volumen an 100%-igen Ethanol und 10%iger 3M NaAcetat Lösung präzipitiert. Die totale RNA wurde bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Messenger RNA (mRNA) Isolierung

Die mRNA wurde von totaler RNA mit *Oligotex* (Qiagen, Chatsworth, USA) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die Integrität der mRNA wurde mittels 6% Formaldehydagarosegel überprüft und photometrisch die Quantität bestimmt. Die mRNA wurde entweder direkt in cDNA überführt oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Proteinisolierung aus Zellkultur

Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit RIPA Puffer (50 mM MOPS, 0.2 mM DTT, 300 mM EDTA, 1 M EGTA, 100 mM Na₃VO₄, 500 mM MgCl₂, 500 mM NaF, 0.4% NP40) und 1x Proteaseinhibitorenmix (Clontech, Palo Alto, USA) für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst, in ein 1.5 ml Eppendorf Gefäß überführt und mit Ultraschall behandelt.

Proteinkonzentrationen wurden mittels dem *BCA-200 Proteinassay* (Pierce, Rockford, USA) gemäß Herstellerangaben bestimmt und bis zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

CDNA Synthese

Die Reverse Transkriptase-Reaktion zur Synthese von komplementärer 1. Strang DNA (cDNA) und die Zweitstrangsynthese wurden mit dem *Superscript II Reverse Transcription Kit* (Invitrogen, Carlsbad, USA) und einem verankertem Oligo dT (30) Primer durchgeführt. Für die Synthese wurden entweder 100 μg totale RNA oder 10 μg mRNA eingesetzt. Der verankerte Oligo dT (30) Primer wurde in einer Konzentration von 5 μM pro Reaktion verwendet. Die 1. Strang Synthese wurde für 90 Minuten bei 42°C durchgeführt. Die Zweitstrangsynthese erfolgte für mindestens 12 Stunden bei 16°C . Die ds cDNA wurde über eine Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt und mit 100% Ethanol und 7.5 M Ammoniumacetat präzipitiert. Anschließend wurde die ds cDNA mit 70% Ethanol gewaschen, in 20 μl H_2O resuspendiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Herstellung von subtraktiven cDNA Banken

Die ds cDNA Synthese wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die ds cDNA wurde mit RSA I (New England Biolabs, Beverly, USA) für 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend über eine Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt und mit 100% Ethanol und 7.5 M Ammoniumacetat gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 20 μl H_2O resuspendiert. Die ds cDNA wurde gelelektrophoretisch vor und nach der Spaltung auf ihre Integrität überprüft. Die Herstellung der subtraktiven cDNA Banken erfolgte mit dem *PCR Select cDNA Subtraction Kit* (Clontech, Palo Alto, USA) nach den Herstellerangaben. Das Prinzip

basiert auf der Suppression-PCR Methode, die von Diatchenko 1996 entwickelt wurde (Diatchenko et al., 1996). Die präparierte ds cDNA von Glioblastomen wurde hierfür mit jeweils 2 unterschiedlichen Adaptern ligiert und diente als Tester. Die cDNA des Normalgehirns diente als Driver und wird nur für Kontrollexperimente mit Adaptern ligiert. Das folgende Diagram zeigt eine Übersicht des Prinzips der Suppressions-PCR.

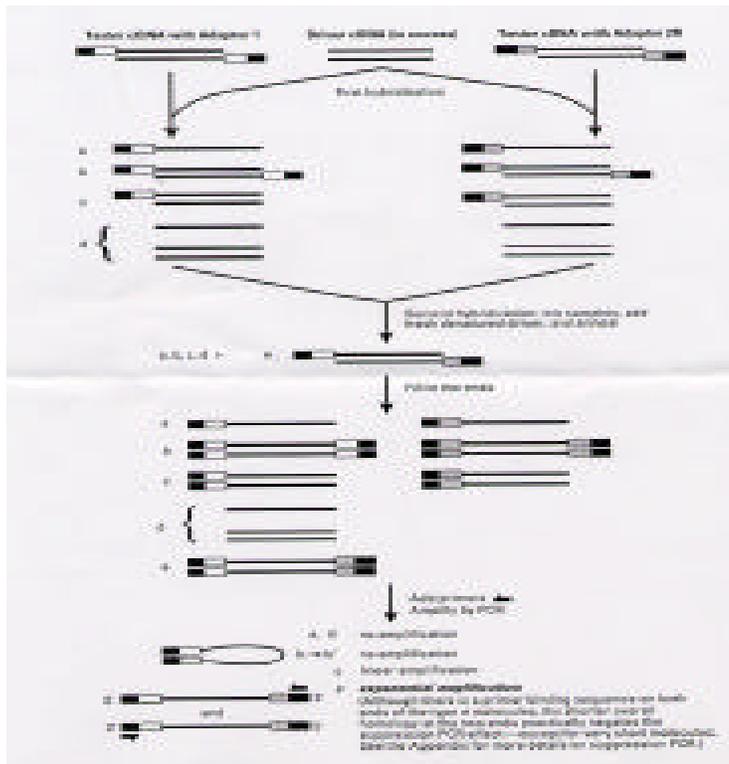


Abbildung 4

Schematische Darstellung der Suppressions-PCR zur Herstellung subtraktiver cDNA Banken nach Diatchenko (Diatchenko et al., 1996). Wie im Text beschrieben, wird die cDNA des Gewebes, für das man Transkripte anreichern möchte (in diesem Fall Tumor = Tester), zum einen mit Adapter 1 (linke Seite der Abbildung) und zum anderen mit Adapter 2 (rechte Spalte der Abbildung) ligiert. In zwei unterschiedlichen Reaktionen werden jeweils zu Adapter 1 bzw. Adapter 2 ligierten Tester, cDNA des Kontrollgewebes (in diesem Fall Normalgehirn = Driver) gegeben. Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, können mehrere

Hybride geformt werden. Transkripte, die in beiden Geweben stark vorhanden sind, bilden im wesentlichen Hybride b, c and d. Dieser Schritt entspricht einer Normalisierung, da in hoher Anzahl vorhandene Moleküle schneller hybridisieren (b, c, d) als Moleküle, die nur in geringer Konzentration vorliegen (a). Des weiteren kommt es in diesem Schritt zu einer Subtraktion, da Moleküle, die nur im Tumorgewebe vorkommen, einzelsträngig bleiben (a) und Transkripte, die in beiden Geweben vorkommen, Typ c Hybride formen. Im zweiten Schritt der Subtraktion werden die Adapter 1 und 2 Reaktionen, ohne erneut denaturiert zu werden, vereint und erneut denaturierte Kontroll cDNA hinzugefügt. Nun können nur die einzelsträngigen Moleküle neue Typ e Hybride formen. Dies sind doppelsträngige Tumortranskripte, die unterschiedliche Enden haben. Die Sequenzen entsprechen Adapter 1 bzw. Adapter 2. Diese werden mit DNA Polymerase aufgefüllt und über Suppressions PCR amplifiziert. Hierfür werden zunächst Primer verwendet, die an das 5' Ende der Adaptersequenzen binden (schwarze Box). Es folgt dann eine weitere Amplifikation mit Primern, die mehr 3' binden und spezifisch für die jeweiligen Adapter 1 und 2 sind (weiße Box). Somit werden nur Hybride exponentiell amplifiziert, die Adapter 1 und Adapter 2 Sequenzen enthalten. Typ a und d Hybride werden mittels PCR nicht amplifiziert, da Primerbindungssequenzen fehlen. Typ b Hybride formen während der Suppressions-PCR schleifenartige Strukturen, so dass sie nicht exponentiell amplifiziert werden. Typ c Hybride haben nur eine Primerbindungssequenz und werden linear amplifiziert. Nur Typ e Moleküle haben 2 verschiedene Adaptersequenzen und werden somit exponentiell amplifiziert.

Adapterligation

Die RSA I behandelte und gereinigte ds cDNA der Glioblastome wurde mit den entsprechenden Adaptern ligiert (Adaptersequenzen siehe Anhang). Es wurden nur subtraktive cDNA Banken erstellt, die Gene von Glioblastomen anreichern. Die reverse

Suppression, d.h. die Synthese einer cDNA Bank, die im wesentlichen für Transkripte des Normalgehirns angereichert ist, wurde aufgrund der Fragestellung nicht angefertigt. Der Erfolg der Adapterligation wurde mittels Adapterspezifischer PCR überprüft. Falls nicht anders angegeben wurden jeweils 3 verschiedene PCR Reaktionen angesetzt: zum einen wurde G3PDH mit spezifischen Primern nachgewiesen, zum anderen wurde ein Adapter 1 spezifischer Primer und der entsprechende G3PDH Primer und das andere Mal ein Adapter 2 spezifischer Primer und der entsprechende G3PDH Primer kombiniert (Primersequenzen siehe Anhang, PCR Protokoll erfolgte nach Herstellerangaben). Die PCR Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Bei erfolgreicher Adapterligation wurde nach Herstellerprotokoll die erste und zweite Hybridisierung angesetzt.

Hybridisierung

In der ersten Hybridisierung wurde zu dem Tester mit Adapter 1 (Tester-Adapter 1) ein Überschuss an Normalgehirn cDNA (Driver) gegeben. Das gleiche wurde für den Tester, der mit Adapter 2 ligiert wurde (Tester-Adapter 2), angesetzt. Die erste Hybridisierung wurde für 8 Stunden bei 68°C in einem Gesamtvolumen von 4µl durchgeführt. Anschließend wurde sofort die zweite Hybridisierung angesetzt. Hierfür wurde erneut Normalgehirn cDNA denaturiert. Anschließend wurde das Hybridisierungsprodukt von Tester-Adapter 1 möglichst schnell zu dem frisch denaturierten Driver pipettiert und durch zweimaliges vorsichtiges Pipettieren gemischt. Dann wurde das Hybridisierungsprodukt von Tester-Adapter 2 möglichst schnell in das gleiche Reaktionsgefäß pipettiert, so dass sich nun Driver, Tester-Adapter 1 und Tester Adapter 2 in dem gleichen Reaktionsgefäß befanden. Beim Ansetzen der zweiten Hybridisierung sollte vermieden werden, dass sich die Hybridisierungsprodukte aus dem ersten Schritt abkühlen. Die zweite Hybridisierung wurde ebenfalls bei 68°C für 18 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden 200µl Verdünnungspuffer (Clontech, Palo Alto,

USA) zu der Hybridisierung pipettiert und bei -20°C gelagert. Falls nicht gesondert im Text angegeben, wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt.

Suppressions- PCR

Für jedes Hybridisierungsprodukt wurde zunächst eine Suppressions- PCR mit 19, 21, 23, 25 und 27 Zyklen durchgeführt. Zur Amplifikation wurde Primer 1 und die Advantage Taq Polymerase (Clontech, Palo Alto, USA) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach den Richtlinien des *PCR Select cDNA Subtraction Kits* (Clontech, Palo Alto, USA).

Anschließend erfolgte eine zweite PCR Amplifikation mit den Primern *Nested Primer 1* und *Nested Primer 2* für 12 Zyklen. Pro subtraktiver cDNA Bank wurde jeweils eine negative Kontrolle, d.h. ohne DNA Zusatz, durchgeführt. Die Produkte wurden über eine Phenol Chloroform Extraktion gereinigt und auf einem 1.5% Agarosegel aufgetrennt. Nachdem bestimmt wurde, welche Zyklenzahl sich am besten eignet, wurde von der ersten PCR Amplifikation jeweils dreimal 25 μl PCR Produkt angesetzt und in der 2. PCR unter den entsprechenden Bedingungen amplifiziert. Nach der 2. Amplifikation wurde 1 Unit Taq DNA Polymerase (Sigma, St. Louis, USA) in die Reaktion pipettiert und für 60 Minuten bei 72°C inkubiert. Die einzelnen PCR Reaktionen wurden kombiniert (Gesamtvolumen von 75 μl) und Phenol Chloroform extrahiert. Die subtraktive cDNA Bank wurde nun über eine ChromaSpin 200-TE Säule aufgereinigt (Clontech, Palo Alto, USA) und anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

Ligation der subtraktiven cDNA Banken in pCR2.1

Die so hergestellten subtraktiven cDNA Banken wurden anschließend in den Vektor pCR2.1 (Vektorsequenz siehe Anhang) mittels *TA cloning Kit* (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert.

Die Banken wurden in DH5⁻E Zellen (GibcoBRL, Gaithersburg, USA) elektroporiert. Pro 50µl elektrokompenter Zellen wurden 1µl subtraktive cDNA Bank verwendet. Für die Elektroporation wurde der BioRad Gene Pulser bei 1.8kV, 25µF und 200 (BioRad, Hercules, USA) verwendet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die elektroporierten Zellen wurden anschließend auf LB-Ampicillin (100µg/ml), X-Gal (50µg/ml), IPTG (10µg/ml) Agarplatten mit einer ungefähren Dichte von 3000 Klonen pro 24x24cm² plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Kolonieselektion mittels Q-Pix

Zur Selektion von einzelnen Kolonien wurde ein automatisierte Koloniepicker, Q-Pix (Genetix, Cambridge, UK) verwendet. Dieser Roboter benutzt einen 96-Pin-Kopf zum Picken. Die integrierte Software analysiert die Kolonien auf Größe und Farbe. Die Kolonien wurden in eine 384-Mikrotiterplatte (Genetix, Cambridge, UK) mit je 500µl LB-Ampicillin (100µg/ml) pro Well gepickt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und am nächsten Tag das Bakterienwachstum kontrolliert. Pro 384-Mikrotiterplatte wurden jeweils 4 Positionen ohne Kolonie inkubiert, so dass eventuelle Kontaminationen bemerkt werden konnten. Kontaminierte Platten wurden vollständig entsorgt und die nicht kontaminierten Platten für PCR Amplifikation verwendet.

Anschließend wurden die Bakterienplatten mit Glycerol versetzt (Endkonzentration 15% Glycerol). Hierfür wurde ein 96 Pin Roboter Biomek FX (BeckmanCoulter, Fullerton, USA) verwendet. Die Bakterienplatten wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

„High Throughput“ PCR für die Amplifikation von einzelnen cDNA Klonen für Array Produktion

Die PCR wurde in 384-PCR Platten (Perkin Elmer, Foster City, USA) durchgeführt. Für die Amplifikation wurden vektorspezifische pCR2.1 *sense* und *antisense* Primer (0.2 μ M), dNTPs (0.2mM) und 0.5 U/Reaktion Hot Start Polymerase (Qiagen, Chatsworth, USA) verwendet. Die PCR Lösung wurde in großen Mengen angesetzt und mittels eines 96 Well Dispensionsroboters HYDRA (Robbins Scientific, Sunnyvale, USA) in 384 PCR Platten aliquotiert. Für den Transfer des Templates wurde ein 384 Pin Replikator VP381A (VP Scientific, San Diego, USA) aus Stahl verwendet. Dieser wurde in die 384 Bakterienplatte mit den gewachsenen Kolonien getaucht und dann in die 384 PCR Platte mit je 20 μ l PCR Lösung überführt. Zwischen den einzelnen Bakterienplatten wurde der Replikator mit Ethanol und Ultraschall gesäubert. Er wurden regelmäßig Negativkontrollen angesetzt und analysiert. Die Amplifikation fand in 384 Thermoblöcken der Firma Perkin Elmer (Foster City, USA) statt. Das Temperaturprogramm lief von 95°C, 15 Minuten für die Aktivierung der Hot Start Polymerase, über 30 Zyklen (94°C, 20 s, 58°C 20s, 72°C 2 Minuten) zu 10 Minuten 72°C. Pro 384 Platte wurden 16 Wells gelelektrophoretisch kontrolliert und die Platten bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

PCR

PCR Reaktionen wurden mit ca. 100ng cDNA als Template durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden die Reaktionen mit Advantage Taq Polymerase (Clontech, Palo Alto, CA), 0.2mM dNTP Mix (Clontech, Palo Alto, CA), 10pmol der jeweiligen Primerpaare und 1x Advantage Taq Polymerase Puffer (Clontech, Palo Alto, CA) in einer PTC 200 PCR Maschine (MJ Research, Waltham, MA) durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden die PCR Reaktionen in 20 μ l vorgenommen. Die Primersequenzen und Zyklusprogramme

sind im Anhang zu finden. Für Amplifikationen von PCR Produkten, die anschließend zur Klonierung und Expression verwendet werden sollten, wurden die Reaktionen mit dem *High Fidelity Plus^{PCR} System* (Roche, Basel, CH) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Quantitative RT-PCR

Für die quantitative RT-PCR wurden 200ng einzelsträngiger cDNA als Vorlage, Primer für das entsprechende Gen (siehe Anhang) und der *Perkin-Elmer Sybr Mix* (enthält Polymerase, MgCl₂, dNTPs und nicht veröffentlichte Substanzen; Perkin Elmer, Foster City, CA) und der *iCycler* der Firma Biorad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) verwendet. Die Reaktionen wurden in 200µl *Perkin-Elmer* PCR Reaktionsgefäßen (Perkin Elmer, Foster City, CA) in einem 25µl Gesamtvolumen durchgeführt. Die Primer wurden in 5 µM Konzentration für die einzelnen Reaktionen verwendet. Pro Reaktion wurden 12.5 µl dieses Gemisch verwendet. Die Amplifikate wurden zur Überprüfung der Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Temperaturprogramm startete bei 50°C für 2 Minuten gefolgt von 95°C für 10 Minuten. Anschließend folgten 45 Zyklen bei 95°C für 15 s, 60°C für 30 s und 72 °C für 40 s. Die kritische Hintergrundzykluszahl (critical threshold cycle (Ct)) ist definiert als die Anzahl an Zyklen, bei der die Fluoreszenz den Hintergrundwert übersteigt. Diese Anzahl ist invers proportional zu dem Logarithmus der initialen Anzahl an amplifizierten Molekülen. Eine Standardkurve wurde für jedes Primerpaar ausgewertet und die Effizienz der einzelnen Primerpaare getestet. Als endogenes Kontrollgen für die quantitative Analyse wurde Tubulin verwendet. Alle Reaktionen wurden in Duplikaten durchgeführt. Die Quantifizierung wurde mit der komparativen Ct Methode durchgeführt. Die Werte für das Zielgen wurden bezüglich des endogenen Kontrollgens Tubulin normalisiert und relative Unterschiede berechnet (Pfaffl, 2001).

Sequenzierung

Sequenzierungsreaktionen wurden mittels vektorspezifischen M13 *sense* und *antisense* Primer (siehe Anhang PCR Primer) angesetzt. In der Regel wurden die zu sequenzierenden Plasmide oder PCR Produkte mittels *PCR Purification Kit* (Qiagen, Chatsworth, USA) gemäß den Herstellerangaben gereinigt und elektrophoretisch auf Reinheit überprüft. Die Reaktionen wurden mit *ABI PRISM BigDye Terminators v 3.0* (Perkin Elmer, Foster City, USA) angesetzt und anschließend mit *ABI PRISM 3700 DNA Analyser* (Perkin Elmer, Foster City, USA) gemäß Herstellerangaben analysiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels einer Software automatisch getrimmt, d.h. die Vektorsequenz, die über die M13 Primer amplifizierte, wurde eliminiert. Die Identifizierung der einzelnen Klone erfolgte über Homologievergleich mit bereits sequenzierten ESTs unter Verwendung von *Blast* und *Smith Waterman Algorithmen*. Verglichen wurden folgende EST Datenbanken: NCBI, Unigene, Swiss-Prot/TrEMBL (GeneBio, Genf, CH) und Derwent Patentdatenbank (Alexandria, USA).

CDNA Screening Array Herstellung

Für die Herstellung von cDNA Arrays wurde ein automatisierter 384 Pin Arrayer, *Q-Bot* (Genetix, Cambridge, UK) verwendet. Die wie oben beschrieben gewonnenen PCR Produkte aus den erstellten subtraktiven cDNA Banken wurden mit diesem Roboter auf Nylonmembranen Nytran N (Schleicher & Schuell, Keene, USA) gespottet. Je nach Arraytyp wurde auf eine Fläche von 24 cm² eine verschiedene Anzahl von 384 PCR Platten gespottet. Die Maximale Anzahl eines solchen Arrays betrug 27.684 einzelne Spots pro Array (entspricht 72 x 384 Platten). In der Regel wurde neben den subtraktiven cDNA Banken auch ein 384 Standard Platte gespottet. Diese beinhaltet verschiedene Gene wie -Aktin, GAPDH, Tubulin in unterschiedlichen Verdünnungen (1;1, 1:10, 1:100, 1:1000). Diese Gene

werden praktisch von allen Zelltypen exprimiert und erlaubt somit eine interne Kontrolle des Experiments. Diese Standardplatte wurde an verschiedenen Stellen auf dem Array gespottet, so dass eventuelle Hybridisierungsartefakte bei der anschließenden Analyse korrigiert werden konnten. Pro Array wurden ebenfalls mindestens 1200 Spots frei gelassen. Diese dienen im weiteren dazu, den Hintergrund zu kalkulieren und die Arrays zu normalisieren. Die Position der einzelnen gespotteten PCR Platten wurde automatisch gespeichert. Somit wurde sichergestellt, dass zu jedem Signal auf dem Array, das entsprechende PCR Produkt und somit der ursprüngliche Bakterienklon zugeordnet werden konnte. Anschließend wurden die Membranen in 1.5 M NaCl und 0.5M NaOH für 5 Minuten denaturiert und in 1.5M NaCl, 0.5M Tris pH 7.2 und 0.001M EDTA für 2 Minuten neutralisiert. Die DNA wurde auf den Membranen mit UV Licht verankert. Hierzu wurde der UV Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Die so hergestellten cDNA Arrays wurden bei RT bis zur Hybridisierung gelagert.

Radioaktive Markierung von cDNA Sonden für Array Hybridisierung

Für die Markierung wurde radioaktiv markiertes dCTP in die cDNA Probe eingebaut. Es wurde der *DECAprime II DNA Labeling Kit* (Ambion, Austin, USA) verwendet. In der Regel wurde P^{33} für die Markierung verwendet. 20-100 ng cDNA, RSA I inkubiert (siehe cDNA Synthese) wurde mit 2.5 μ l 10xDecamer Lösung und 11 μ l Wasser versetzt. Die Proben wurden anschließend für 5 Minuten bei 100°C erhitzt und direkt auf Trockeneis schockgefroren. Dann wurde 5.0 μ l 5x Reaktion Puffer (-dCTP), 5 μ l P^{33} dCTP (Perkin-Elmer Lifesciences, Boston, USA) und 1 μ l Exonuklease freies Klenow Fragment pro Probe hinzupipettiert und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden von nicht eingebauten P^{33} über P-30 Säulen (Biorad, Hercules, USA) gereinigt und sofort für die Hybridisierung verwendet. 100 μ l der markierten Proben wurden für Szintillationszählung

verwendet, um sicherzustellen, dass ungefähr gleiche Mengen in verschiedene Proben eingebaut wurde.

Hybridisierung von Arrays mit markierten cDNA Sonden

Die Filter wurden mit Pre-Hybridisierungslösung (PHL: 0.025% NaPyrophosphate, 5x SSC, 5X Denhardts, 1% SDS, 50%Formamide) inkubiert. Pro Filter wurden 25ml PHL verwendet. Die PHL wurde auf 68°C vorgewärmt und denaturierte Lachssperm DNA (1ml/100ml PHL) dazugegeben. Die Prehybridisierungen und Hybridisierungen fanden in Plastikboxen statt, die der Größe der Arrays entsprach. Pro Box wurden maximal 3 Filter gleichzeitig hybridisiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Seite der Filter mit der DNA, nach oben zeigte. Die Prehybridisierung fand bei 55°C für 30 Minuten statt. Anschließend wurde die PHL entsorgt und die Filter mit Hybridisierungslösung inkubiert. Die Hybridisierungslösung setzte sich wie die PHL zusammen, nur das frisch denaturierte, P³³ markierte Probe (siehe oben) hinzugefügt worden war. Pro Hybridisierung wurden 25 ml Hybridisierungslösung verwendet. Es erfolgte dann eine sogenannte „*Touch Down*“ Hybridisierung, d.h. die Ofentemperatur betrug zu Beginn der Hybridisierung 55°C und wurde dann auf 42°C erniedrigt. Dies ermöglichte eine langsame Abkühlung der Hybridisierung. Die Hybridisierung erfolgte für mindestens 14 Stunden bei 42°C. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung verworfen und die Arrays mit 5xSSC, 0.5% SDS bei 68°C für 15 Minuten gewaschen. Danach wurden die Filter bei 68°C mit 2xSSC, 1% SSC für 2 mal für je 30 Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte der letzte Waschschrift mit 0.1xSSC, 0.5% SDS für 15 Minuten.

Danach wurden die Filter sofort in Plastikfolie eingepackt. Hierfür wurden die Filter auf eine Polycarbonatplatte gelegt, ein entsprechend großes Stück Plastikfolie auf die Filter gelegt und so eingepackt, dass möglichst keine Luftblasen oder Falten entstanden. Es wurde darauf

geachtet, dass die Filter zwischen den einzelnen Schritten bis zur Exposition nicht austrocknen. Es wurde sichergestellt, dass sich keine Flüssigkeit auf der Außenseite der Plastikfolie befand. Dann wurde pro Filter ein *Phosphoimagerscreen SR* (Packard Biosciences, Meriden, USA) auf die Arrays gelegt und in einzelnen Kassetten verschlossen. Die Exposition erfolgte in der Regel für 4-6 Tage. Die densitometrische Messung der P³³ Signale erfolgte mit dem *Cyclone Phosphorimaging System* (Packard Biosciences, Meriden, USA). Die Screens wurden von dem Gerät eingelesen und für die weitere Analyse gespeichert. Arrays, die eine sehr ungleichmäßige Hybridisierung zeigten, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Analyse von cDNA Arrays

Die Pixeldichte der einzelnen Signalpunkte auf dem Array wurde mit der *GenePix Software* (Axon Instruments, Foster City, USA) oder mit der *ArrayPro V 4.0 Software* (MediaCybergenetics, Carlsbad, USA) bestimmt. Die individuellen Datenpunkte wurden zum Hintergrund, der aus der Intensität von 1100 leeren Positionen auf dem Array berechnet wurde, normalisiert. Für Screening Arrays, d.h. Arrays mit ca. 25.000 einzelnen cDNA Klonen, wurde der Mittelwert und die Standardabweichung von Triplikaten bestimmt. Diese wurden dann für die Berechnung des Konfidenzintervalls mittels *Student's t Test* verwendet. Es wurde dann das Verhältnis der Expression im Tumor im Vergleich zur Expression im Normalgehirn ermittelt. Diese Werte wurden anhand von Computerprogrammen berechnet und die Werte in Datenbanken gespeichert. Klone, die in diesen Screening Arrays eine erhöhte Expression von über dem zweifachen Wert in einem 95% Konfidenzintervall (*Student's t Test*) im Vergleich zum Kontrollgewebe zeigten, wurden selektioniert und für die Synthese eines sogenannten Bestätigungs-Arrays verwendet. Die Bestätigung Arrays wurden wie die Screening Arrays hybridisiert und die Pixeldichte bestimmt. Die statistische

Auswertung unterschied sich etwas von der der Screening Arrays. Die Rohdaten von den Bestätigungs-Arrays wurden \log_2+1 transformiert, um eine bessere Normalisierung zu erhalten (Quackenbush, 2002). Anschließend wurden die Daten in drei aufeinanderfolgenden Schritten analysiert. Die erste Analyse war eine *ANOVA* Analyse (Partek, St.Charles, USA; siehe Einleitung). Der zweite Schritt war ein paarweiser Vergleich von jeder Tumorprobe mit den Werten vom Normalgehirn. Hierfür wurde der *Tukey-HSD* Test verwendet. Der dritte Analyseschritt war eine Verhältniskalkulation für jedes Wertepaar von Expressionswerten Tumor-Normalgehirn (Butte, 2002). Es wurden ebenfalls der propagierte Fehler und der p-Wert berechnet. Klone, die auf diesen Bestätigungsarrays eine Überexpression von mehr als 1.2-fachem Wert, p-Wert < 0.05 in mindestens zwei verschiedenen Tumorproben im Vergleich zur Kontrolle zeigten, wurden anschließend sequenziert.

Herstellung von Bestätigungs-cDNA Arrays

Wie oben beschrieben wurde bei den Screening Arrays festgelegt, dass Klone, die zweifach im Tumor im Vergleich zum Normalgehirn hochreguliert sind, auf einen sogenannten Bestätigungs-Array neu gespottet werden. Hierfür wurden die Klone aus den ursprünglichen subtraktiven cDNA Banken mittels einem 4 Nadel Pipettor, *Multiprobe II* (Packard Biosciences, Meriden, USA) selektioniert und in neue 384 Bakterienplatten arrangiert. Diesen so erstellten Platten wurde eine neue Nummer zugeordnet, so dass eine eindeutige Identifizierung später stattfinden konnte. Diese Platten wurden wie oben beschrieben über „*High Throughput*“ PCR amplifiziert und die PCR Produkte anschließend für die Herstellung von Bestätigungs Arrays verwendet. Die einzelnen Schritte der Array Synthese sind die gleichen wie beim Screening Array. Allerdings wurden beim Bestätigungs-Array die Klone in Triplikaten auf einen einzelnen Filter aufgetragen, wohingegen beim Screening Array die Klone nur einmal gespottet werden.

Northern Blot Analyse

Für die Northern Blot Analyse wurde mRNA oder totale RNA von verschiedenen Geweben auf in einem 1% Agarosegel, das 6% Formaldehyd enthält, aufgetrennt. Der Elektrophoresepuffer enthielt 0.5 x MOPS und 1.5% Formaldehyd. Pro Gel wurden jeweils 2 µg RNA Millennium Marker (Ambion, Austin, TX) zur Größenbestimmung geladen. Die Integrität wurde über Ethidiumbromidfärbung und UV Licht bestimmt. Anschließend wurde das Gel in 0.15M NaCl/ 0.05M NaOH für 30 Minuten denaturiert und dann für 30 Minuten in 0.1M Tris (pH 8.0) /0.15 M NaCl neutralisiert. Die RNA wurde anschließend mittels Kapillarchromatographie für ca. 16 Stunden in 10xSSC auf eine Nylonmembran (Roche, Basel, CH) transferiert. Die RNA wurde entweder mittels UV Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla, USA) oder mittels Inkubation bei 120°C für 30 Minuten auf der Membran verankert. Die Hybridisierung der Northern Blots erfolgte entweder mittels radioaktiv oder Digoxigenin markierten Sonden. Für die Markierung mittels Radioaktivität wurde das gleiche Protokoll wie für die Markierung der cDNA Sonden für die Array Hybridisierung verwendet (siehe oben). Die Markierung einer RPTP spezifischen Sonde erfolgte mittels Digoxigenin. Hierfür wurde ein 503 bp Fragment (Gen Bank Accession Nummer: NM_002851 bp 614-1117) in den Vektor pGEM-T easy (Promega, Madison, WI) kloniert. Der Vektor wurde linearisiert und mittels T7 Polymerase Digoxigenin markierte antisense RNA Transkripte nach den Angaben des Herstellers hergestellt (*siehe DIG RNA Labeling Kit SP6/T7*, Roche, CH). Der Northern Blot wurde zweimal bei RT mit 2xSSC, 0.1 % SDS und zweimal bei 50°C mit 0.2xSSC, 0.1% SDS gewaschen. Der Blot wurde anschließend mit alkalischer Phosphatase markierten anti-Digoxin Ak (Roche, Basel, CH) inkubiert und das Signal mittels CSPD (Roche, Basel, CH) auf Röntgenfilmen nach Angaben des Herstellers detektiert. Die semiquantitative, densitometrische Analyse wurde mit dem Programm Optiquant (Packard Biosciences, Meriden, CT) durchgeführt. Hierfür wurden die Signale der rRNA Banden als auch die Signale der RPTP Banden gemessen und das Hintergrundsignal subtrahiert. Das

Verhältnis von RPTP zu rRNA wurde anschließend berechnet. Für den Nachweis der Exon 9 Variante wurde eine Sonde mittels PCR amplifiziert, die homolog zu dem 3' Ende dieser Variante war, radioaktiv mit P³² CTP markiert und der Northern Blot wie oben beschrieben durchgeführt (Sequenzen siehe Anhang).

Knock Down mittels siRNA in Zellkultur

RNA Oligos wurden von der Firma Dharmacon Res. Inc. (Lafayette, USA) bestellt. Die folgenden siRNA Moleküle wurden für die Experimente verwendet:

RPTP sense: AAA UGC GAA UCC UAA AGC GUU, RPTP antisense: AAC GCU UUA GGA UUC GCA UUU. Die siRNA Moleküle wurden basierend auf den Ergebnissen von Elbashir et al. entworfen (Elbashir et al., 2001). Als Kontrolle dienten:

sense: GGA CUU UCU GCC ACU CUA CUU; antisense: GUA GAG UGG CAG AAA GUC CUU. 20µM einzelsträngige RNA Primern wurden in *Annealing Puffer* (100 mM K-Acetat, 30 mM HEPES KOH pH 7.4, 2 mM MgAcetat) für 1 Minuten bei 90°C und dann für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das *Annealing* wurde mittels Gelelektrophorese kontrolliert. Für die Elektrophorese wurde die speziell für sehr kurze Basenlänge entwickelte *Metaphor* Agarose (Biowhittaker, Walkersville, USA) verwendet. Die dsRNAi wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden in 60 mm Schalen zu 60-70% Konfluenz unter oben angegebenen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit den doppelsträngigen siRNA Molekülen transfiziert. Für die Transfektion wurde *Effectene* (Qiagen, Chatsworth, USA) und 2µg doppelsträngige siRNA gemäß Herstellerangaben verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und Protein isoliert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels einem FITC markierten DNA Oligonukleotid (Sequitur Inc., New York, USA) ermittelt.

Boyden Chamber Migrationsassay

Der Migrationassay wurde mit dem *ChemoTx Disposable Chemotaxis System* (Neuroprobe, Gaithersburg, USA) durchgeführt. Die Zellen wurden 24 Stunden vor dem Migrationsassay in DMEM mit 0.1% BSA gehalten. Die Zellen wurden anschließend geerntet, dreimal mit DMEM, 0.1% BSA gewaschen und auf den Filter gemäß Herstellerangaben aufgetragen. Es wurde eine Porengröße von 8 µm verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden in die oberen Wells jeweils 10.000 Zellen ausgesät. In die unteren Wells wird entweder DMEM mit 5% FBS oder DMEM ohne FBS als Hintergrundkontrolle gegeben. Der Assay wurde für 2.5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Filter mit dem *Diff.-Quick dye Kit* (Dade, Behring AG, Duding, CH) gefärbt. Die Analyse erfolgte mit der Software *ImagePro* (Version 4.1.0.0., Media Cybernetics, St. Louis, USA). Für jeden Assay wurde der Hintergrund bestimmt, indem der Mittelwert aus 12 Wells ohne FBS gezählt und von den experimentellen Werten subtrahiert wurde. Für jeden experimentellen Wert wird der Mittelwert aus 24 individuellen Wells berechnet.

Pleiotropin Stimulation von Glioblastom-Zelllinien

Die Zellen wurden mit Ptn (Sigma, St. Louis, USA) in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37°C vor dem Migrationsassay inkubiert und anschließend wie oben beschrieben der Migrationsassay durchgeführt.

Proliferationsassay

Die Proliferation wurde mit dem *Celltiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, Madison, USA) bestimmt. Die Anzahl der lebenden Zellen in Kultur wurde mittels ATP

Quantifizierung bestimmt. ATP dient als Indikator für metabolische Aktivität in diesem Assay. Der Test wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Western Blot Analyse

Gleiche Mengen an Protein verschiedener Proben wurden auf einem 4-20% Tris-Glycine Gel, Novex (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) bei 120V für 90 Minuten aufgetrennt. Der Elektrophoresepuffer setzte sich aus 25mM Tris, 192mM Glycine und 0.1% SDS zusammen. Anschließend wurde das Gel für 5 Minuten im Transferpuffer (12.5mM Tris, 96mM Glycine, 0.05% SDS, 20% Methanol) äquilibriert. Der Transfer erfolgte unter Kühlung für 3 Stunden bei 500mA auf eine Nitrozellulosemembran, Protran, 0.45µm Porengröße (Schleicher & Schuell Inc., Keene, USA). Die Membran wurde dann für 1 Stunde bei RT im Blockierungspuffer (PBS, 0.1% Tween 20, 5% Milchpulver) unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran für dreimal 5 Minuten in Waschpuffer (PBS, 0.1% Tween 20) inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Inkubation mit dem *anti-RPTPβ mouse anti-human AK* (Transduction Laboratories, Lexington, USA) wurde der Antikörper 1:250 in Blockierungspuffer verdünnt und für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal jeweils 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Beim Nachweis von RPTP wurde als zweiter Antikörper ein Peroxidase konjugierter rabbit anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotechnology, Little Chalfont, England) verwendet. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei RT. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten gewaschen. Danach erfolgte die Detektion mit dem *ECL™ Western blotting Detection Kit* (Amersham Pharmacia Biotechnology, Little Chalfont, England) gemäß den Angaben des Herstellers.

Immunhistochemie

Es wurden 4µm dicker Paraffinschnitte aus der Neuropathologie der Universität Hamburg mit dem *Vectastain ABC Kit* (Vector, Burlingame, USA) immunhistochemisch gefärbt. Die Schnitte wurden mit Ziegen Serum für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem RPTP spezifischen Antikörper (BD Transduction Laboratories, Lexington, USA) erfolgte über Nacht bei 4°C. Der Antikörper wurde hierfür 1:200 in PBS Puffer verdünnt.

Die Detektion erfolgte mit einem biotinylierten zweiten Antikörpers des *ABC Kits* und 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochlorid als Substrat nach den Angaben des Herstellers.

Klonierung von RPTP ζ

Das folgende Diagramm zeigt eine Übersicht der Klonierungsstrategie für die lange Transmembranform von RPTP ζ . Die einzelnen Segmente wurde von verschiedenen cDNA Quellen amplifiziert: Fragment A von fetaler Normalgehirn cDNA (Clontech, Palo Alto, CA), Fragment B von adulter Normalgehirn cDNA (Clontech, Palo Alto, CA) und Fragment C von GBM Zelllinie G122.

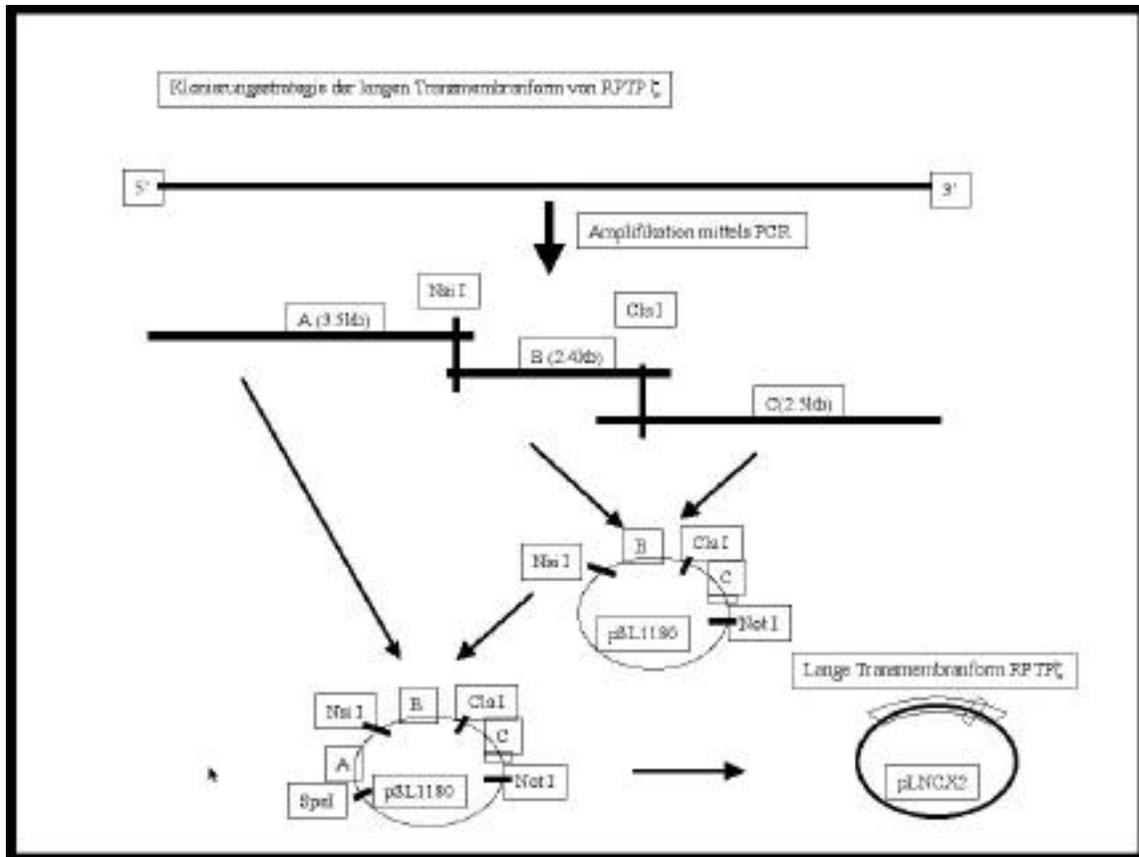


Abbildung 5

Übersicht der Klonierungsstrategie von der langen Transmembranform von RPTP mittels PCR. Es werden drei individuelle Fragmente amplifiziert und in den Klonierungsvektor pSL1180 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) kloniert. Anschließend kann die klonierte cDNA der langen RPTP Transmembranform in den retroviralen Vektor pLNCX2 (Clontech, Palo Alto, CA) für Expressionsexperimente überführt werden.

Die einzelnen Restriktionsenzyme wurden von NEB (New England Biolabs, Beverly, MA) bezogen und gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Produkte wurden jeweils über Gelelektrophorese und *PCR Purification Kit* (Qiagen, Chatsworth, USA) aufgereinigt. Der pSL1180 Vektor wurde von der Firma Pharmacia (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und der retrovirale Vektor pLNCX2 von der Firma Clontech (Clontech, Palo Alto, CA) bezogen. Die

einzelnen klonierten Zischenprodukte wurden in *One Shot Cells*® *INFaF'* (Invitrogen, Carlsbad, CA) gemäß Herstellerangaben transformiert, amplifiziert und mittels *Plasmid Purification Kit* (Qiagen, Chatsworth, USA) aufgereinigt und sequenziert.

Screening von Phagen cDNA Banken RPTP ζ Transkripte

Für das Screening der Phagenbank *λ-TriplEX2 large insert human fetal brain cDNA Bank* (Clontech, Palo Alto) standen Phagenpools zur Verfügung (Munroe et al., 1995). Diese Pools konnten mittels PCR für spezifische Gene untersucht werden. Für das Screening dieser Bank für RPTP wurden die Primer RPTP 1 und 5 verwendet (siehe Anhang). Die PCR Reaktionen wurden in 20µl durchgeführt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 1µM eingesetzt und für die Amplifikation wurde die Advantage Taq Polymerase verwendet. Das Amplifikationsprogramm lief von 95°C für 3 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 95°C für 30s, 58°C für 30s und 72°C für 1 Minute. Die positiven Pools wurden anschließend plattiert und weiter untersucht. Die Amplifikation erfolgte nach Angaben des Herstellers in *XLI blue E.coli*. Das Screening der plattierten Phagenklone erfolgte mit einer RPTP spezifischen PCR Sonde nach Angaben des Herstellers, die mit den Primern RPTP 1 und 5 hergestellt wurde und mittels *DECAprime II DNA Labeling Kit* (Ambion, Austin, USA) mit P³² markiert wurde. Zur Hybridisierung wurde *Express Hyb* (Clontech, Palo Alto, CA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Isolierung des positiven Phagenklones erfolgte über drei individuelle Runden. Anschließend wurde der aufgereinigte Phagenklon in Plasmid nach Angaben des Herstellers überführt und sequenziert.

Ergebnisse

Im folgenden werden die einzelnen Teilergebnisse für die Array-Analyse und anschließende Validierung dargestellt. Zunächst wurden subtraktive cDNA Banken hergestellt, um die Klonsammlung für Tumortranskripte anzureichern. Diese cDNA Banken wurden anschließend für die GBM spezifische Arraysynthese verwendet. In der ersten Arrayanalyse wurden 25.000 Klone gescreent. Über 1000 selektionierte Klone wurden anschließend erneut auf einen Array gespottet, hybridisiert und analysiert. Von diesen differentiell exprimierten Genen wurde RPTP als potentielles Zielgen für die Entwicklung einer Immuntherapie ausgewählt, das in weiterführenden Experimenten validiert und funktionell charakterisiert wurde.

CDNA Synthese und Erstellung von subtraktiven cDNA Banken spezifisch für GBM

Für die Synthese von subtraktiven cDNA Banken wurde RNA aus GBM isoliert und doppelsträngige cDNA (dscDNA) synthetisiert. Diese cDNA wurde mit spezifischen Adaptern ligiert, mit cDNA von Normalgehirn hybridisiert und über Suppressions PCR spezifisch für Tumortranskripte angereichert.

RNA -Isolierung

Totale RNA wurde aus mehreren Glioblastomen isoliert und gelelektrophoretisch zur Qualitätskontrolle aufgetrennt. Die folgende Abbildung zeigt ein Beispiel für das Ergebnis einer solchen Aufreinigung mit anschließender Auftrennung auf einem 6% Formaldehyd-

Agarosegel. Die Qualität wird anhand der beiden prominenten ribosomalen Banden bestimmt.

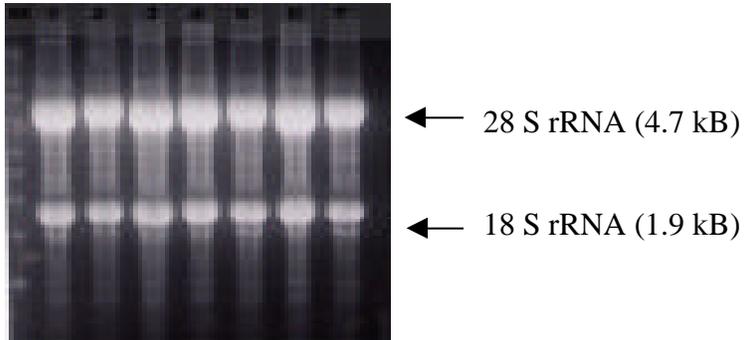


Abbildung 6

Gelelektrophoretische Auftrennung von totaler RNA aus 7 verschiedenen Glioblastomen.

1-7: Totale RNA von primären Glioblastomen, M=RNA Längenmarker (Ambion, Austin, USA). Die 18 S und 28 S rRNA sind eindeutig als distinkte Banden zu erkennen.

CDNA Synthese und RSA I Inkubation

Anschließend erfolgte eine mRNA Isolierung und ds cDNA Synthese. Die cDNA wurde mit RSAI inkubiert. Dies führt zu einer Veränderung in der Größenverteilung der ds cDNA Transkripte von 4-5kb zu 1-2kb. Dieser Schritt ist für die anschließende Klonierung notwendig, so dass keine Größenselektion auf der Ebene der Klonierung stattfindet.

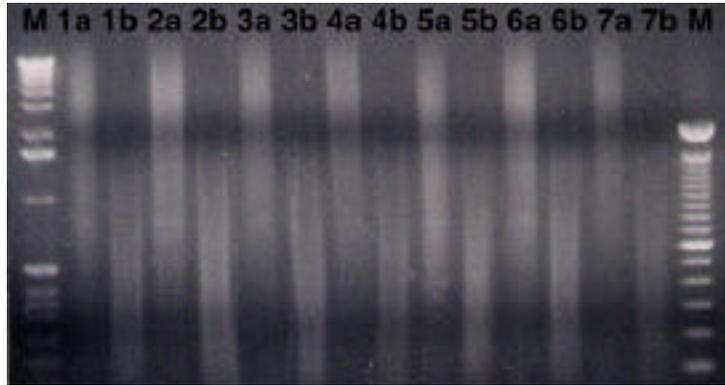


Abbildung 7

Gelelektrophoretische Auftrennung von ds cDNA vor und nach RSA I Inkubation von sieben Glioblastomen. Deutlich zu sehen ist eine Größenverschiebung der 4-5kb zu etwa 1-2kb langen Transkripte nach der RSA I Inkubation. M=1kb (links) bzw. 100bp (rechts) DNA Marker (Roche,Basel, CH), a=ds cDNA vor RSAI Inkubation, b=ds cDNA nach RSAI Inkubation, Bahn1-7: 7 verschiedene Glioblastome.

Adapterligation und Suppressions PCR

Für die anschließende Suppressions-PCR müssen spezifische Adapter an die dsDNA von Tumoren ligiert werden. Nach der RSA I Inkubation wurde die cDNA aufgereinigt und Adaptersequenzen für die anschließende Suppressions-PCR an die cDNA ligiert. Die Effizienz der Ligation wurde mittels adapterspezifischer PCR geprüft. In Abbildung 8 ist das PCR Ergebnis einer solchen Kontroll-PCR zu sehen.

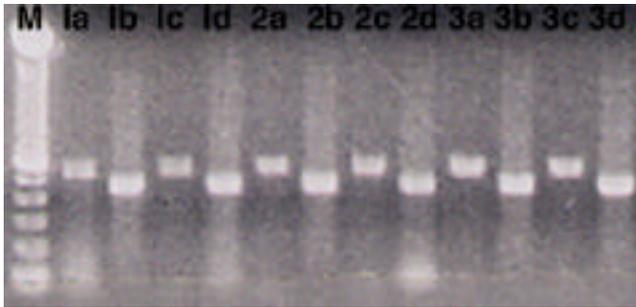


Abbildung 8

Gelelektrophoretische Auftrennung der Kontroll-PCR der Adapterligation. An jede Rsa I-inkubierte ds cDNA wurde Adapter 1 und Adapter 2 ligiert. Die Abbildung zeigt das Ergebnis jeweils einer Adapter-spezifischen PCR mit G3PDH (5' Primer: Adapter spezifisch, 3' Primer: G3PDH spezifisch) und eine G3PDH spezifische PCR (5' und 3'Primer G3PDH spezifisch). Bei erfolgreicher Ligation sollten diese Reaktionen die gleiche Bandenintensität zeigen. Zeigt die Adapterspezifische PCR eine wesentlich geringere Amplifikation, kann von einer schlechten Ligationseffizienz ausgegangen werden. In diesem Fall zeigen die Banden ähnliche Intensitäten und bestätigen somit eine gute Adapterligationseffizienz. M= 100bp Marker (Roche, Basel, CH), a=Adapter-spezifische PCR, Adaptorligation1, b=G3PDH-spezifische PCR, Adapterligation 1, c= Adapterspezifische PCR, Adapterligation 2, d=G3PDH-spezifische PCR, Adaptorligation2; 1-2 verschiedene Glioblastome, 3=Adultes Normalgehirn, human.

Nachdem die Adapterligation erfolgreich nachgewiesen wurde, konnte die Hybridisierung zur Herstellung von subtraktiven cDNA Banken angesetzt werden.

Diese Hybridisierungsprodukte wurden anschließend mittels Suppressions- PCR amplifiziert und für Tumortranskripte angereichert (siehe Methoden Abbildung 4). Die geeigneten Bedingungen für die Amplifikation wurden per Gelelektrophorese ermittelt. Ziel war die Amplifikationszyklen der Suppressions- PCR möglichst gering zu halten, um eventuelle PCR

Artefakte zu verhindern. Dementsprechend wurden verschiedene Zyklusprotokolle getestet und die Bedingung gewählt, die bei niedriger Zykluszahl eine ausreichende Menge Produkt für die anschließende Klonierung liefert.

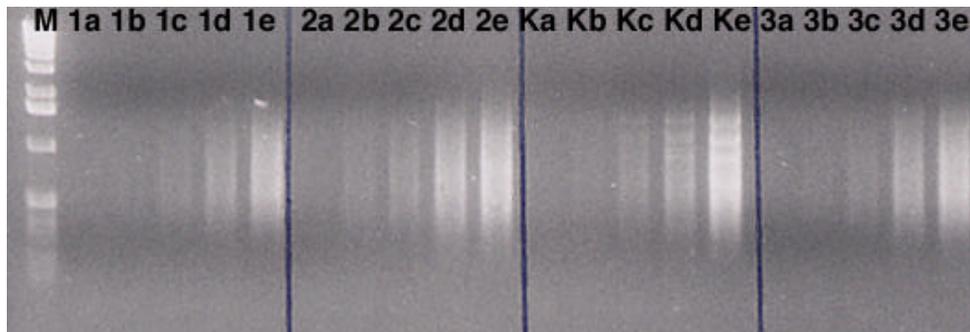


Abbildung 9

Gelelektrophoretische Auftrennung der Suppressions- PCR Produkte von drei verschiedenen subtraktiven cDNA Banken (Glioblastom vs. Normalgehirn) und Kontrolle des PCR Select cDNA Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto, CA). Zur Amplifikation wurden unterschiedliche Bedingungen geprüft. Die Suppressions- PCR der 1. Amplifikation wurde mit 19, 21, 23, 25 und 27 Zyklen durchgeführt und die 2. Amplifikation mit jeweils 12 Zyklen. Als Kontrolle wurde eine cDNA Probe Normalgehirn mit 0.2% X174DNA (inkubiert mit HaeIII) versetzt. Wie in Kc-d zu sehen ist, wurden diese X174DNA Fragmente nach der Suppressions-PCR sichtbar. Bei den drei gezeigten subtraktiven cDNA Banken für GBM konnte bei 23 Zyklen ausreichend Produkt für die anschließende Klonierung nachgewiesen werden.

a= 19 Zyklen, b=21 Zyklen, c=23 Zyklen, d=25 Zyklen und e=27 Zyklen in der ersten Suppressions-PCR; 1-3: drei unterschiedliche cDNA Banken (Glioblastome vs. Normalgehirn), K= Kontrolle, M=1kbp Marker (Roche, Basel, CH).

Für die in Abbildung 9 gezeigten Beispiele wurden 23 Zyklen für die Amplifikation der subtraktiven cDNA Banken gewählt. Diese Zykluszahl ergab ausreichend DNA für die

anschließende Klonierung, ohne dass einzelne Banden stärker repräsentiert waren. Die mit X174DNA Fragmenten versetzte Kontrolle zeigte, dass diese mit steigender Zykluszahl stärker repräsentiert waren. Dies verdeutlicht, dass eine möglichst kleine Zykluszahl für eine gleichmäßige Amplifikation der subtraktiven cDNA Bank gewählt werden sollte.

Klonierung der subtraktiven cDNA Banken

Die so hergestellten, subtraktiven spezifischen Glioblastom cDNA Banken wurden in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und in DH5alpha Bakterien elektroporiert. Dieser Vektor ermöglicht eine Selektion von Kolonien, die ein Insert enthalten (weiße Kolonien), von denen die kein Insert tragen (blaue Kolonien). Zur Qualitätskontrolle der cDNA Banken wurden mittels eines automatischen Kolonie-Pickers jeweils 172 Klone selektioniert, mit vektorspezifischen Primern amplifiziert und sequenziert. Die Analyse der rekombinante Inserts ergab einen ungefähren Anhaltspunkt für die Qualität der subtraktiven Bank.



Abbildung 10

Beispiel einer gelelektrophoretischen Auftrennung von Amplifikationsprodukten, die mit vektorspezifischen PCR Primern von einer subtraktiven Glioblastom-cDNA Bank generiert wurden. Die Amplifikate zeigen eine geeignete Verteilung zwischen 500bp-1kb. Marker: 1kb Leiter (Roche, Basel, CH).

Synthese von Glioblastom-spezifischen cDNA Arrays

Die auf diese Weise für Tumortranskripte angereicherte Klonkollektion wurde für die anschließende Arrayproduktion verwendet. Klone von drei verschiedenen subtraktiven cDNA Banken (Glioblastom vs. Normalgehirn) wurden mit vektorspezifischen Primern amplifiziert. Die PCR Produkte wurden anschließend mittels eines 384-Pin-Head Roboters der Firma Genetix auf Nylon Membranen gespottet. Pro Array sind ca. 27.000 Spots vorhanden. Jedes PCR Produkt wurde einmal geprintet. Des Weiteren wurde auf jeden Array eine Standardplatte geprintet, die für die anschließende Hybridisierung und Analyse interne Kontrollen enthielt. Es handelt sich hierbei um universell exprimierte Gene in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Methodenteil). Die so hergestellten cDNA Arrays wurden in mehrfacher Ausführung gespottet und bei RT bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Hybridisierung von cDNA Arrays

Für die Hybridisierung der Arrays wurden RSA I behandelte cDNAs von 14 verschiedenen Glioblastomen und 5 Normalgehirnen mit P^{33} dCTP markiert. Aufgrund besserer Streuungsqualität eignen sich ^{33}P markierte Sonden für Arrayexperimente besser als ^{32}P markierte. Als Kontrolle wurde jeweils eine vektorspezifische Probe mitmarkiert. Diese Kontrollen erlauben es sowohl die Printqualität, als auch die Hybridisierung zu überprüfen. Es wurden pro Probe jeweils drei Filter in 50% Formamid haltiger Hybridisierungslösung bei $42^{\circ}C$ über Nacht inkubiert, gewaschen und exponiert. Abbildung 11 zeigt zwei Beispiele für eine charakteristische Screeningarray-hybridisierung.

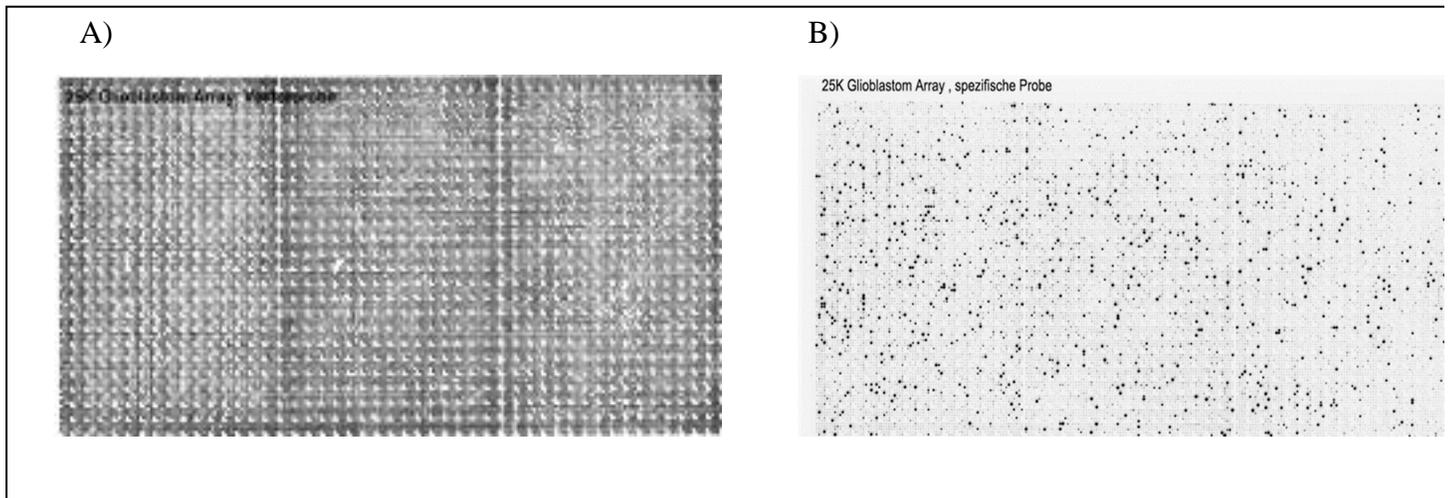


Abbildung 11

A: Screening Glioblastom cDNA Array hybridisiert mit einer PCR Probe spezifisch für die Vektorsequenz als Kontrolle für die Hybridisierung und Printqualität. B: Der gleiche Screening Glioblastom cDNA Array wie in A. In diesem Fall wurde der Array mit einer spezifischen Glioblastomprobe hybridisiert. Die Analyse der Kontrolle zeigt ein gleichmäßiges Hybridisierungsmuster entlang des Arrays (A). Wird der gleiche Array mit einer tumorspezifischen Probe hybridisiert, wird deutlich, dass manche Klone ein stärkeres Hybridisierungssignal zeigen als andere (B).

Zur Hintergrundnormalisierung wurde der Mittelwert der leeren Spots verwendet, die deutlich auf dem Array zu sehen sind. Die Hybridisierung des gleichen Arrays mit einer spezifischen Probe aus primären Glioblastomen zeigt eine deutliche Überexpression einiger

Klone (sehr intensive Schwarzfärbung) im Vergleich zu anderen Klonen auf demselben Array.

Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in humanen GBM

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurden die Arrays quantitativ ausgewertet. Hierfür wurden die einzelnen hybridisierten cDNA Arrays mittels einer spezifischen Software (Optiquant, ArrayPro v4.0) analysiert. Mittels dieser Software wird die Pixeldichte jedes einzelnen Spots auf dem Array bestimmt. Hierfür legt das Programm automatisch ein Grid auf den Filterarray. Dieses Grid kann unterschiedlichen Arraygrößen individuell angepasst werden und gegebenenfalls für jeden Filter per Hand korrigiert werden. Die Intensität jedes einzelnen Spots wurde per Computerprogramm gemessen und in einer Tabelle gespeichert. Anschließend erfolgte für jeden Array eine Hintergrundnormalisierung. Dieser Wert wurde anhand der leeren Spots, die pro Array geprintet wurden (insgesamt 1100) errechnet und von der Intensität der Einzelwerte abgezogen. Dies ermöglicht einen Vergleich zwischen den einzelnen Arrays. Für jede Probe wurden 6 Datenpunkte per Screeningarray bestimmt. Hierfür wurden pro Hybridisierungslösung drei Filter inkubiert und das Experiment einmal wiederholt. Nach der Hintergrundnormalisierung jedes einzelnen Arrays wurden anschließend für jeden Spot die Mittelwerte bestimmt. Aus den Werten für die Tumorproben und den Normalgehirnproben als Kontrollen ließen sich die Verhältnisse berechnen. Es konnte somit bestimmt werden, ob ein spezifischer Klon in einer Probe im Vergleich zu einer Kontrolle hoch- oder herabreguliert war.

Die Selektionskriterien für dieses Screening Experiment wurden wie folgt festgelegt: Signale einzelner Klone müssen im Verhältnis zur Kontrolle in mehr als 2 von den 14 Proben über 2-fach hochreguliert sein. In diesem Arrayscreening wurden 1152 (3x384) Klone

selektioniert. Diese potentiell hochregulierten Klone wurden dann erneut auf einen Array gespottet und nochmals mit den gleichen Proben hybridisiert. Dies verringert die Anzahl falsch positiver Werte und erhöht die Genauigkeit der Analyse. Dieser Array wird Bestätigungsarray genannt. In diesem Fall wurden die Klone dreifach auf dem gleichen Array geprintet. Dies verbessert die Qualität der Daten und war aufgrund der nun wesentlich geringeren Klonzahl möglich. Leider konnten 6 der 14 hybridisierten Tumorproben nicht in der endgültigen Analyse verwendet werden. Die Hybridisierungen der 6 eliminierten Proben zeigten Gradienten, die potentiell durch Degradierung der cDNA erklärt werden kann. Auch Wiederholungen der Experimente ergab keine Verbesserung der Qualität und somit wurden diese Proben von der Analyse ausgeschlossen. Es wurden 3x384 selektierte Klone und eine 384 Standardplatte in Triplikaten auf einen Array gespottet. Dies ergab eine Gesamtzahl von 1563 Klone pro Bestätigungsarray. Als Triplikate gespottet entspricht das 4.608 Elementen. Von diesem Arrayexperiment wurden ebenfalls wieder Klone selektioniert, die mehr als 1.2-fach in 2 oder mehr Tumorproben hochreguliert waren.

Insgesamt wurden 860 Klone selektioniert. Diese Strategie erlaubte eine Minimalisierung von falsch positiven Signalen, die ein wesentliches Problem der heutigen Arraytechnologie darstellen.

Die so selektionierten Klone wurden sequenziert und über Homologievergleich identifiziert (siehe Methodenteil). Dies ergab eine nicht redundante Liste von 218 Genen. Unter diesen Genen befanden sich CD44, Brevican, Tenascin, Osteopontin und SPARC. Diese Gene wurden schon vorher in der Literatur als hochreguliert in Glioblastomen beschrieben (Gary & Hockfield, 2000; Huang et al., 2000; Kim et al., 2000; Oz et al., 2000). Die identifizierten hochregulierten Gene wurden auf bisher nicht mit Glioblastomen assoziierte Oberflächenmoleküle, die sich potentiell für eine Immunotherapie mit mAk eignen, untersucht. Hierbei

wurde RPTP als potentieller Kandidat ausgewählt und weitere funktionelle Studien durchgeführt.

Das folgende Diagramm veranschaulicht die Ergebnisse aus den einzelnen Teilschritten der Arrayexperimenten.



Abbildung 12

Schematische Übersicht der cDNA Array Ergebnisse. Im ersten Screening Array Experiment wurden pro Probe (14 Glioblastome und 5 Normalgehirnproben) 3 Arrays hybridisiert und analysiert. Klone, die mehr als zweifach in mehr als 2 Tumorproben hochreguliert waren, wurden selektioniert und für die Herstellung von sogenannten Bestätigungsarray verwendet. Es wurden 1152 Klone selektioniert und zusammen mit einer 384 Well Standardplatte in Triplikaten auf einen neuen Array gespottet. Dieser sogenannte Bestätigungsarray wurde anschließend mit den gleichen Proben wie im ersten Schritt (Screening Array) hybridisiert.

Klone, die mehr als 1.2-fach (p-Wert <0.05) in mindestens 2 Tumorproben hochreguliert waren, wurden selektioniert und sequenziert. Es wurden insgesamt 860 Klone ausgewählt.

Receptor Protein Tyrosine Phosphatase ζ and Pleiotropin Expressionsanalyse

Receptor Tyrosine Phosphatase (RPTP) und sein Ligand Pleiotropin (Ptn) konnten in den cDNA Array Experimenten als hochreguliert in GBM identifiziert werden. Im folgenden wurde versucht, diese Ergebnisse zu validieren und eine funktionelle Rolle für RPTP in GBM Zellen zu identifizieren.

CDNA Array Analyse

RPTP und Ptn wurden beide als hochreguliert in den cDNA Array Analysen identifiziert. RPTP wurde in den Screening Arrays in 4 von 14 Tumoren als hochreguliert im Vergleich zu Normalgehirn gefunden. Die Werte lagen zwischen 1.62-4.08, p-Wert < 0.05 (Student's T Test). Ptn war in 7 von 14 Tumoren hochreguliert. Die Werte lagen zwischen 2.3-15.37, p-Wert < 0.05 (Student's T Test). Im Bestätigungsarray wurde RPTP in 6 von 8 gewerteten Tumoren als hochreguliert gefunden. Die Werte lagen zwischen 1.53-1.76, p-Wert < 0.05. Für Ptn ergab die Analyse eine Hochregulation in 7 von 8 Tumoren. Die Werte lagen zwischen 1.65- 2.41, p-Wert < 0.04.

Um diese Ergebnisse mit einer weiteren Methode zu überprüfen, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt.

Quantitative RT-PCR

Es wurden drei verschiedene Normalgehirnproben und drei verschiedene GBM Proben bezüglich der quantitativen Expression von Ptn und RPTP untersucht.

Abbildung 13 zeigt die relative Expression dieser Gene in Bezug auf die endogene Expression von Tubulin (siehe Methodenteil für Analyse).

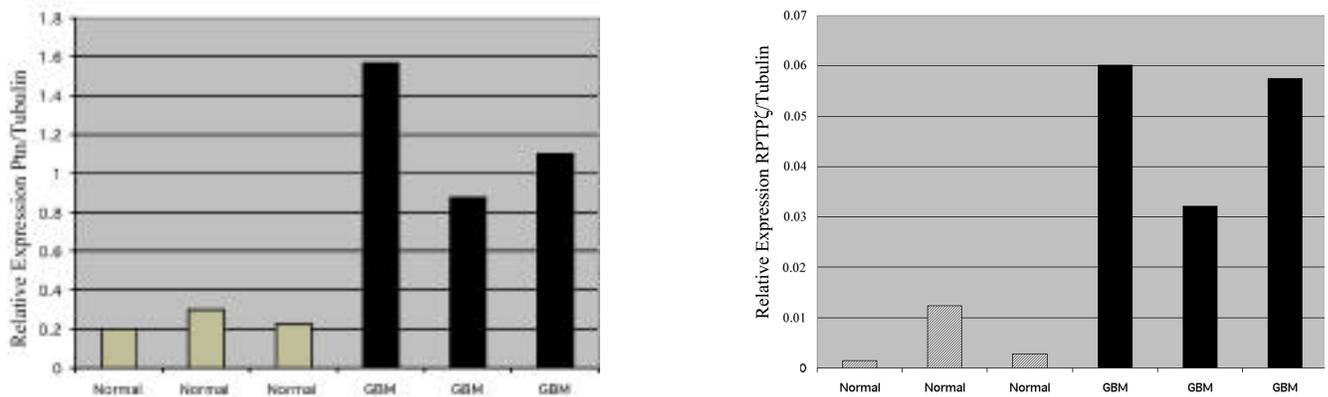


Abbildung 13

Quantitative RT-PCR von Ptn und RPTP mRNA in Relation zur endogenen Tubulin-Expression in drei verschiedenen Normalgehirnproben und drei individuellen GBM Proben. Die linke Abbildung zeigt, dass Ptn in den Tumorproben im Vergleich zum Normalgehirn eindeutig hochreguliert ist. Die rechte Abbildung zeigt die relative RPTP Expression in den gleichen Proben. Auch für RPTP kann eine eindeutige Hochregulation der mRNA im Vergleich zu Tubulin in den Tumoren gezeigt werden.

Die Ergebnisse der quantitative RT-PCR Analyse bestätigte die Hochregulation von Ptn und RPTP in GBM Proben im Vergleich zum Normalgehirn. Da beide Methoden nur die Gesamtzahl der mRNA Transkripte nachweisen, ohne eine Information bezüglich der

Expression der Spleißvarianten zu geben, wurde anschließend ein Northern Blot für RPTP durchgeführt.

Northern Blot Analyse von RPTP in verschiedenen GBM

Northern Blot Analyse eignet sich besonders zum Aufschluss der Expression einzelner Spleißvarianten. Für die humane Form von RPTP wurden bisher drei verschiedene Spleißvarianten beschrieben. Welche Varianten in den Tumorproben exprimiert werden, ist in Abbildung 14 zu sehen.

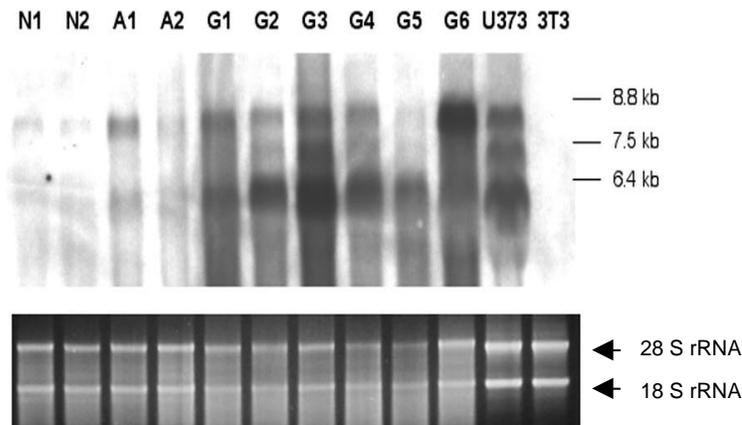


Abbildung 14

Northern Blot Analyse der RPTP mRNA Expression. Die Expression von RPTP ist in GBM im Vergleich zu Normalgehirn induziert. Die Abbildung zeigt eine Northern Blot Analyse der RPTP mRNA in zwei verschiedenen Normalgehirn mRNA Proben (N1, N2). A1 und A2 mRNA wurde aus atrogliotischem Gewebe isoliert, dass in der Nähe von arteriovenösen Angiomen entnommen wurde. G1-G6 sind verschiedene GBM. U373 ist eine GBM Zelllinie, die als Positivkontrolle in diesem Northern Blot verwendet wurde und 3T3 ist eine Maus Fibroblasten Zelllinie, die als Negativkontrolle dient. Die 8.8 kB Bande entspricht der langen Transmembranform von RPTP ζ . Die 7.5 kb Bande entspricht der sekretorischen

Form Phosphacan und die kurze Transmembranform ist in der 6.4 kb Bande repräsentiert. Die U373 Zelllinie zeigt wie erwartet die Expression aller drei Spleißvarianten, wohingegen die 3T3 Zelllinie keine Expression zeigt. Es erscheint, als ob die kurze transmembrane Form in den GBM am stärksten exprimiert wird. Der untere Teil der Abbildung zeigt 28S und 18S rRNA als Ladungskontrolle.

Mittels Northern Blot konnte die Hochregulation von RPTP in Gliomen bestätigt werden. Es zeigte sich, dass alle drei Spleißvarianten in den Tumoren exprimiert wurden. Die kurze Transmembranform scheint am stärksten exprimiert zu werden. Dies kann zum einen eine biologische Ursache haben, zum anderen könnte es auf einem Unterschied der mRNA Stabilität der einzelnen Spleißvarianten beruhen. Des weiteren könnte eine rein technisch bedingte Ursache zugrunde liegen, da längere Moleküle schlechter auf die Membran transferiert werden. In weiteren Experimenten muss geklärt werden, ob dieser Expressionsunterschied eine funktionelle Bedeutung für die Tumorzellen hat.

Um eine quantitative Aussage über die Expression von RPTP treffen zu können, wurden die Signale des Northern Blots und der Ladungskontrollen densitometrisch vermessen und semiquantitativ ausgewertet. Folgende Expressionsverhältnisse wurden im Vergleich zur rRNA ermittelt. Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert aller Spleißvarianten dar:

N1	N2	A1	A2	G1	G2	G3	G4	G5	G6
0.22	0.23	0.06	0.15	0.86	0.76	1.60	1.00	1.32	1.29

Aus der Aufstellung wird ersichtlich, dass RPTP im Vergleich zu den Normalgehirnproben (N1, N2) und dem astrogliotischem Gewebe (A1, A2) eindeutig stärker in den Tumorproben (G1-G6) exprimiert wird.

Immunohistochemie

Bisher konnte mit verschiedenen Methoden gezeigt werden, dass die mRNA von RPTP in GBM im Vergleich zu Normalgehirn hochreguliert ist. Entscheidend für die Entwicklung einer mAk Therapie ist allerdings die Expression des Proteins. Hierfür wurden immunhistochemische Untersuchungen an Tumorschnitten durchgeführt. Die immunhistochemischen Daten ergaben, dass ebenfalls das Protein von RPTP in den GBM hochreguliert ist. Der verwendete mAk ist spezifisch für eine Sequenz im intrazellulären Teil des Proteins und somit kann keine Aussage bezüglich der Expressionsverhältnisse der einzelnen transmembranen Spleißvarianten gemacht werden. Zum Zeitpunkt dieser Experimente war kein Antikörper gegen die einzelnen Spleißvarianten vorhanden. Die nächste Abbildung zeigt ein Beispiel einer solchen Untersuchung.

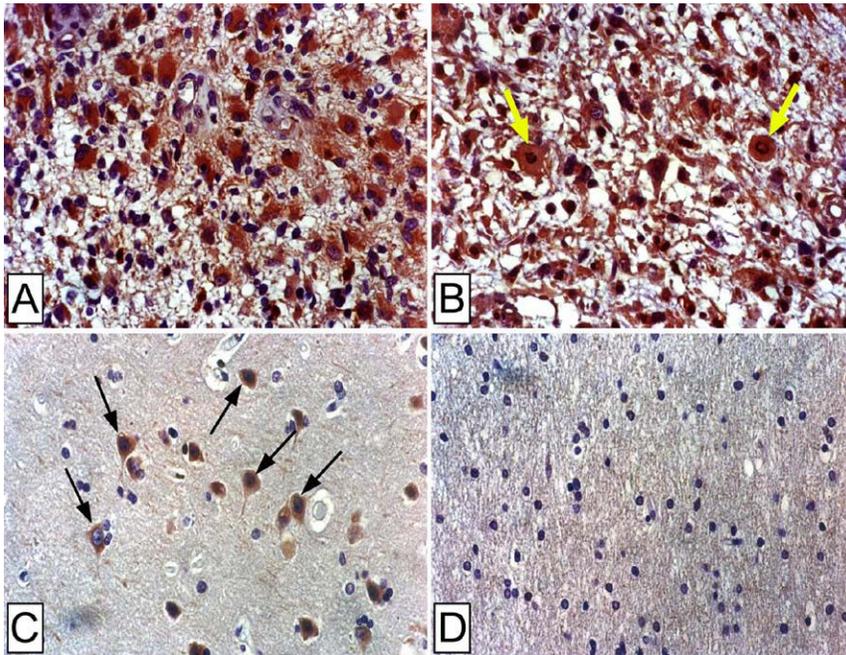


Abbildung 15

Immunhistochemische Darstellung der RPTP Expression mittels eines mAk gegen die intrazelluläre Domäne von RPTP (BD Transduction Laboratories, Lexington, USA) in zwei

verschiedenen GBM (A, B) und Normalgehirn (C,D). Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, ist auch das RPTP Protein in den Tumoren hochreguliert. (A) Starke Immunreaktivität der einzelnen Tumorzellen in einem GBM und (B) in einem weiteren GBM mit astrozytärer Mitose (siehe Pfeil). (C) zeigt schwache Immunreaktivität einiger kortikaler Neurone in Normalgehirn, wohingegen die weiße Substanz (D) keine Immunreaktivität zeigt.

Funktionelle Charakterisierung von RPTP ζ und Ptn in GBM Zelllinien

Für die funktionelle Charakterisierung eignen sich zum einen „Knock Down“ Experimente, zum anderen Überexpressionssysteme. Im folgenden wurde versucht, die RPTP Expression mittels „short interfering“ RNA (siRNA) zu unterdrücken, um anschliessend funktionelle Studien durchzuführen. Des weiteren wurde versucht, die lange Transmembranform von RPTP für anschließende Überexpression oder Herstellung stabiler Zelllinien zu klonieren.

„Knock Down“ mittels siRNA

Um die Funktion von RPTP in GBM Zellen zu evaluieren, wurden verschiedene GBM Zelllinien auf die endogene Expression von RPTP mittels Northern Blot überprüft. Das Ziel war eine GBM Zelllinie zu finden, die RPTP in gut detektierbaren Mengen exprimiert und

somit für weitere „*Knock Down*“ Experimente verwendet werden konnte. Des Weiteren sollte eine Zelllinie charakterisiert werden, die RPTP in nicht nachweisbaren Mengen exprimiert. Die folgende Abbildung zeigt die Northern Blot Analyse von drei verschiedenen GBM Zelllinien, die in weiteren Experimenten für die funktionelle Charakterisierung verwendet wurden.

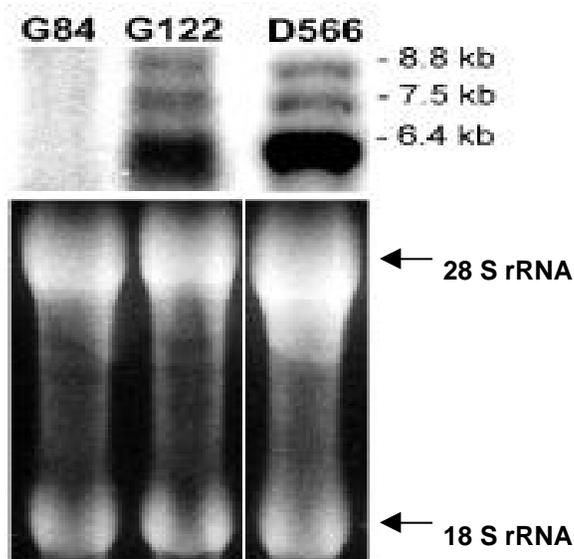


Abbildung 16

Northern Blot Analyse von drei verschiedenen GBM Zelllinien: G84, G122 und D566. Der obere Teil der Abbildung zeigt, dass die Zelllinie G84 RPTP nicht exprimiert, wohingegen die Zelllinien G122 und D566 alle drei Spleißvarianten von RPTP exprimieren. Der untere

Teil zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der mRNA als Ladungskontrolle mit deutlich nachweisbaren Banden der 28S und 18S rRNA.

Die Zelllinien D566 und G122 wurden für die „Knock down“ Experimente von RPTP mittels siRNA verwendet. Ob siRNA in diesen Zelllinien für die Herabregulation von RPTP verwendet werden kann, wurde mittels Western Blot Analyse überprüft. Die Zellen wurden mit den ds siRNA Molekülen inkubiert (siehe Anhang und Methodenteil) und anschließend die Expression durch Western Blot bestimmt. Für jedes Experiment wurde eine Negativkontrolle mit einem unspezifischen siRNA Moleküle (siControl) durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt ein Beispiel eines solchen „Knock Down“ Experiments im Western Blot.

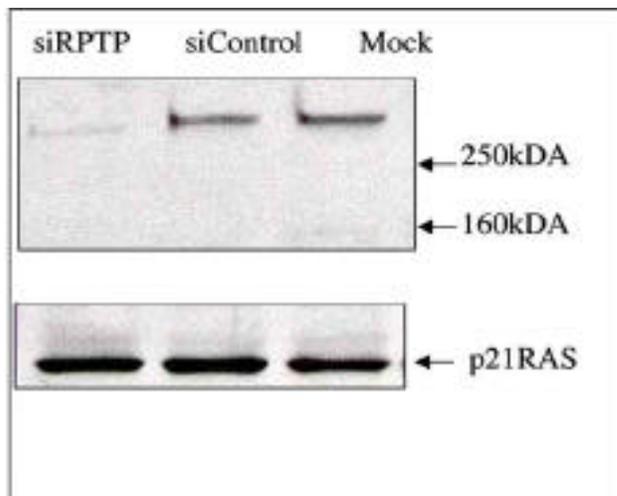


Abbildung 17

Der obere Teil der Abbildung zeigt einen Western Blot von D566 GBM-Zellen mit einem mAb gegen den intrazellulären Anteil des RPTP Proteins (BD Transduction Laboratories, Lexington, USA). Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass D566 Zellen, die mit siRNA spezifisch für RPTP (siRPTP) inkubiert wurden, eine geringere Expression zeigen, als D566 Zellen, die mit einem unspezifischen siRNA (siControl) oder nur mit Transfektionsagens (Mock) behandelt wurden. Der untere Teil der Abbildung bestätigt, dass

gleiche Mengen an Protein geladen wurden. Hierfür wurde das 21Ras Protein nachgewiesen, das in GBM Zellen exprimiert wird.

Wie aus Abbildung 17 zu entnehmen ist, konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Expression von RPTP in GBM Zellen mittels siRNA vermindert werden kann. Die Ergebnisse wurden densitometrisch ausgewertet. Hierfür wurden die Signalintensitäten von RPTP im Verhältnis zur p21 Ras Signalen bestimmt. Dies ergab eine relative Expression von siRPTP /p21 Ras von 0.21, für siControl/p21Ras von 0.45 und für Mock/p21Ras von 0.46. Ähnliche Ergebnisse wurden für G122 Zellen erzielt. Diese Methode konnte daraufhin für die weitere funktionelle Charakterisierung von RPTP in GBM Zellen verwendet werden.

Boyden Chamber Migrationsassay

Um zu untersuchen, ob RPTP das Migrationsverhalten von GBM Zellen beeinflusst, wurden D566 und G122 GBM Zellen mit siRPTP behandelt und anschließend im Boyden Chamber Migrationassay untersucht. Zur Kontrolle dienten siControl behandelte Zellen. Dieses Experiment wurde für jede Zelllinie mehrfach wiederholt. Wie aus der Abbildung 18 ersichtlich wird, führte eine verminderte Expression von RPTP mittels siRNA zu einer geringeren Migration von zwei unterschiedlichen GBM Zelllinien im Boyden Chamber Assay.

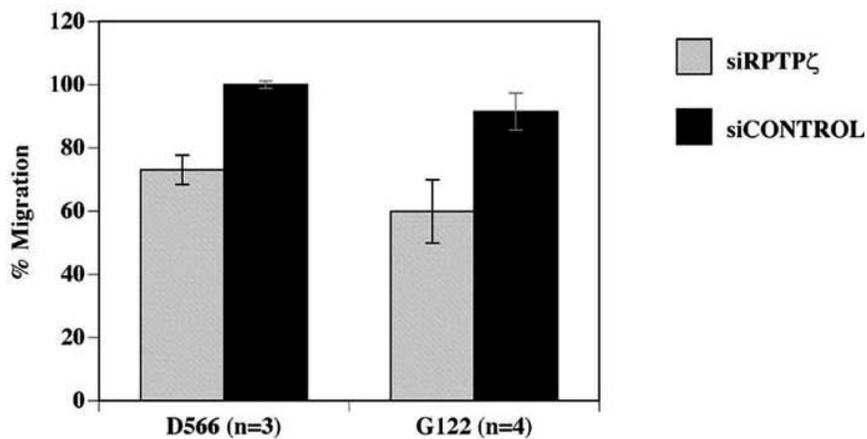


Abbildung 18

Boyden Chamber Migrationsassay von D566 und G122 GBM Zellen. Die Abbildung zeigt eine deutlich verringerte Migration der Zelllinien D566 und G122, wenn diese mit siRPTP im Vergleich zu siCONTROL behandelt wurden. Der Graph zeigt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten für die D566 Zelllinie (Student's T Test, $p < 0.01$) und vier unabhängigen Experimenten für die G122 Zellen (Student's T Test, $p < 0.003$).

Ptn Stimulierung

Wie eingangs beschrieben wurde, ist Ptn ein Ligand von RPTP. Es konnte ebenfalls in den Arrayanalysen gezeigt werden, dass Ptn in GBM hochreguliert ist. Daraufhin wurde in dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss Ptn auf das Migrationsverhalten von GBM Zellen hat. Hierfür wurde die G84 GBM Zelllinie, die RPTP nicht exprimiert und die D566 GBM Zelllinie, die RPTP exprimiert (siehe Abbildung 16) mit Ptn stimuliert und das Migrationsverhalten im Boyden Chamber Assay untersucht. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis einer solchen Untersuchung.

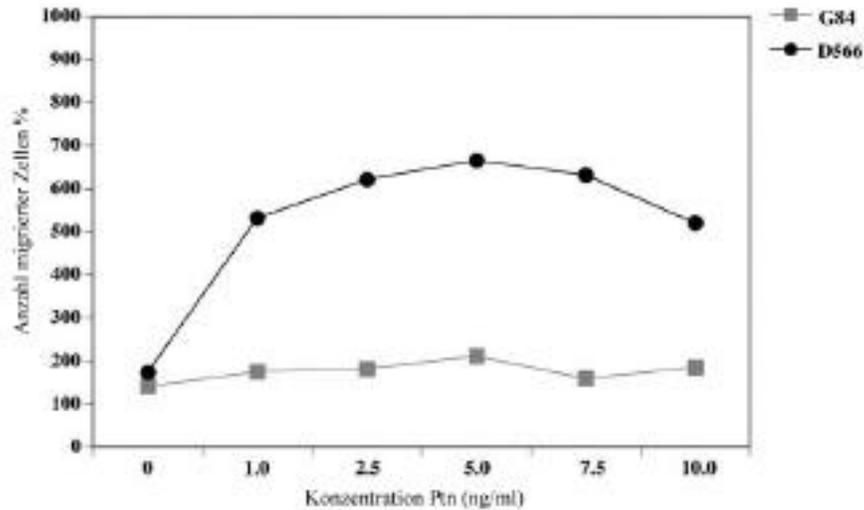


Abbildung 19

Boyden Chamber Migrationsassay der GBM Zelllinien G84 und D566. Die Abbildung zeigt den Effekt von Ptn auf das Migrationsverhalten von G84 Zellen (RPTP negativ) und D566 Zellen (RPTP positiv). Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, stimuliert Ptn das Migrationsverhalten von RPTP exprimierenden D566 Zellen, wohingegen es keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von RPTP nicht exprimierenden G84 Zellen hat. Der stärkste Effekt konnte bei einer Konzentration von 5 ng Ptn/ml Medium nachgewiesen werden.

Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, stimulierte Ptn das Migrationsverhalten von RPTP exprimierenden D566 Zellen, wohingegen es keinen Effekt auf das Migrationsverhalten von G84 Zellen hatte, die RPTP nicht exprimieren. Um den stimulatorischen Effekt von Ptn näher zu untersuchen, wurden D566 Zellen mit siRPTP und siControl behandelt, mit Ptn stimuliert und anschließend im Boyden Chamber das Migrationsverhalten ermittelt. Wenn Ptn über die Interaktion mit RPTP das Migrationsverhalten stimuliert, dürften siRPTP behandelte Zellen keine Veränderung in der Migration zeigen, wohingegen

siControl behandelten Zellen, weiterhin in ihrem Migrations-verhalten mit Ptn stimuliert werden sollten. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse dieser Experimente.

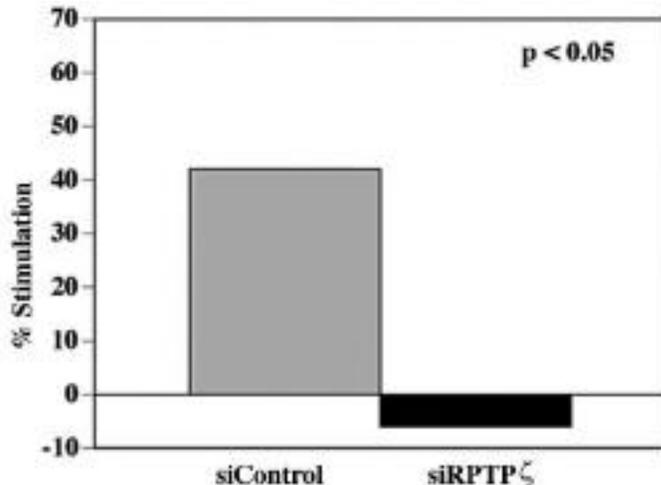


Abbildung 20

Migrationsassay von Ptn stimulierten D566 GBM Zellen, die zum einen mit siControl (links) und zum anderen mit siRPTP ζ (rechts) behandelt wurden. Ptn stimulierte D566 Zellen, die mit siRPTP ζ behandelt wurden, zeigten keinen stimulatorischen Migrations-effekt im Gegensatz zu siControl behandelten Zellen. SiControl behandelte D566 GBM Zellen zeigten einen >40% igen Anstieg in der Migrationsrate nach Ptn Stimulation (5ng/ml). SiRPTP ζ behandelte Zellen konnten mittels Ptn nicht stimuliert werden. Die Abbildung zeigt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten als % Stimulation im Vergleich zu nicht mit Ptn behandelten Zellen (Student's T test, $p < 0.05$).

Wie aus der Abbildung 20 ersichtlich wurde, konnte in den Experimenten gezeigt werden, dass mit siRPTP ζ behandelte D566 GBM Zellen nicht mit Ptn stimuliert werden können, wohingegen siControl behandelte Zellen weiterhin einen stimulatorischen Effekt im Boyden Chamber Assay nach Ptn Behandlung zeigen.

Proliferationsassay

Proteintyrosinphosphorylierung spielt eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen wie Zellmobilität und Proliferation. Im weiteren Verlauf soll untersucht werden, welche Rolle RPTP im Proliferationsverhalten von GBM Zellen spielt. Hierfür wurden D566 Zellen mit siRPTP und siControl behandelt und in einem Proliferationsassay untersucht. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis eines solchen Experimentes.

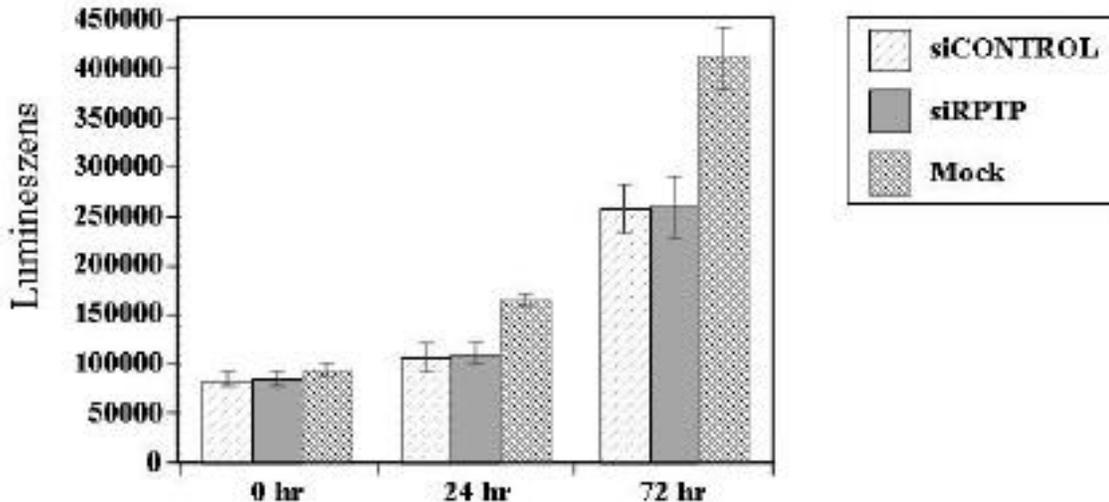


Abbildung 21

Die Abbildung zeigt einen Proliferationsassay von siRPTP, siControl und nur mit Transfektionsagens (Mock) behandelten D566 Zellen nach 0 h, 24 h und 72 h. Die Abbildung zeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen siRPTP und siControl behandelten Zellen gemessen werden konnte. Die Werte stellen den Mittelwert von 12 unabhängigen Messungen da. Angegeben ist die Standardabweichung des Mittelwertes.

Im Proliferationsassays konnte kein Unterschied im Verhalten von siRPTP und siControl behandelten GBM Zellen gemessen werden. Die Expression von RPTP scheint somit keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von GBM Zellen zu haben.

Klonierung von RPTP ζ

Für weitere funktionelle Studien sollte zunächst die lange Transmembranform von RPTP kloniert werden. Zunächst wurde die Intron-Exon Struktur evaluiert und dann verschiedene Ansätze für die Klonierung angewendet. Hierfür wurden zum einen Phagenbanken untersucht, zum anderen wurde die cDNA Sequenz mittels PCR amplifiziert. Da es sich bei RPTP um ein sehr langes Transkript handelt (>8 kb), wurden diese Ansätze parallel bearbeitet.

Exon-Intron Struktur von RPTP

Basierend auf der veröffentlichten cDNA Sequenz von RPTP (Accession No. M93426) wurde im Vergleich mit der NCBI humanen Genomsequenz des Chromosoms 7 (NT_007845.3) mittels Blast Analyse die Intron-Exon Grenzen bestimmt. Es konnten 30 konsekutive Exons identifiziert werden. Ausgehend von dieser Analyse konnten die bekannten Spleißvarianten bezüglich Exonstruktur näher charakterisiert werden. Die folgende Tabelle gibt die einzelnen ermittelten Exongrenzen bezüglich der cDNA Sequenz wieder.

Exon	5' Nukleotid	Position	3'Nukleotid	Position
5' UTR		1		147
1		147		205
2		205		272
3		270		451
4		450		603
5		602		701
6		698		772
7		766		924
8		922		1075
9		1074		1261
10		1260		1387
11		1387		1435
12		1432		4987
13		4985		5133
14		5131		5224
15		5223		5310
16		5309		5332
17		5329		5428
18		5429		5512
19		5512		5646
20		5646		5782
21		5780		5945
22		5943		6082
23		6080		6228
24		6225		6322
25		6322		6397
26		6396		6526
27		6525		6673
28		6671		6816
29		6816		6952
30		6952		7072

Tabelle 2

Exon-Intron Grenzen des RPTP Gens. Die Grenzen wurden aus dem Sequenzvergleich der cDNA von RPTP (Accession No. M93426) und der genomischen DNA von Chromosom 7 (NT_007845.3) erstellt.

Die folgende Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Exonstruktur der bekannten Spleißvarianten.

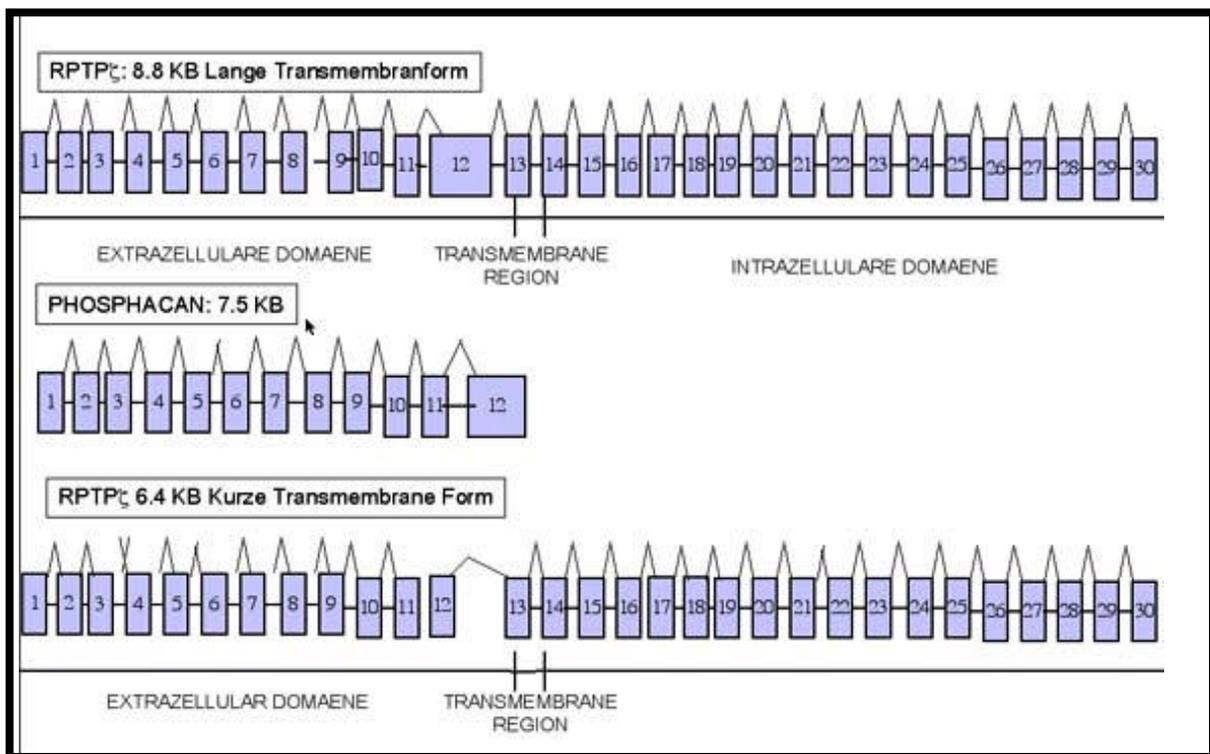


Abbildung 22

Schematische Übersicht der einzelnen Exone der bekannten Spleißvarianten von RPTP .

Die lange Transmembranform besteht aus 30 Exonen. Der extrazelluläre Anteil besteht aus Exon 1-12, die auch vollständig in Phosphacan präsentiert sind. Die kurze Transmembranform wird in Exon 12 gespleißt. Exon 12 ist 3.5 kB lang. Die

Transmembranregion besteht aus Exon 13 und 14. Der intrazelluläre Teil besteht aus Exon 15-30.

Klonierung der langen Transmembranform von RPTP

Die PCR-Klonierung der langen Transmembranform von RPTP wurde in drei aufeinanderfolgenden Schritten unternommen. Die Sequenzen wurden von fetaler und adulter Normalgehirn cDNA, sowie von cDNA der GBM Zelllinie G122 amplifiziert. Die einzelnen Teilsegmente wurden in verschiedene Vektoren kloniert und sequenziert. Die vollständige cDNA Sequenz der langen Transmembranform wurde in den Vektor psL1180 kloniert und nochmals sequenziert. Im Anhang befindet sich eine vollständige Vektorkarte des kompletten Klons, sowie die verwendeten Primersequenzen.

Identifizierung von Spleißvarianten von RPTP

Exon 9 RPTP ζ Variante

Bei der Klonierung der langen Transmembranform wurden ursprünglich verschiedene Strategien parallel bearbeitet, da eine ausschließlich auf PCR basierende Klonierung eines 8.8 kb langen Fragmentes als nicht ideal erschien.

Deshalb wurde eine λ -TriplEX2 large insert human fetal brain cDNA Bank (Clontech, Palo Alto, CA) mit einer RPTP spezifischen Sonde untersucht. Es wurde ein Plaque als eindeutig positiv identifiziert und über drei Phagenisolierungen aufgereinigt. Der erhaltene Phagenklon wurde in Plasmid überführt und sequenziert. Die Analyse ergab einen 2.88 kb großen Klon, der 100% Sequenzidentität mit Exon 1-9 von RPTP zeigte. Das 3' Ende entsprach der Intronsequenz zwischen Exon 8 und 9 mit einem 3'UTR Signal. Diese Variante wird im folgendem als RPTP Exon 9 Variante bezeichnet.

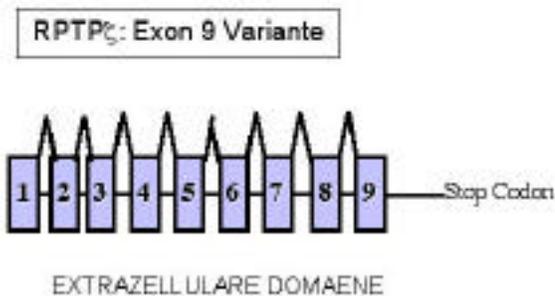


Abbildung 23

Schematische Darstellung der RPTP Exon 9 Variante. Diese Variante ist 1.88 kb lang. Sie endet in der Intronsequenz zwischen Exon 9 und 10 und hat noch einen 3'UTR.

Um zu überprüfen, ob diese Variante in GBM Zellen exprimiert wird, wurde eine spezifische Sonde für diese 3' Region via PCR hergestellt und mRNA von verschiedenen GBM Zelllinien im Northern Blot untersucht.

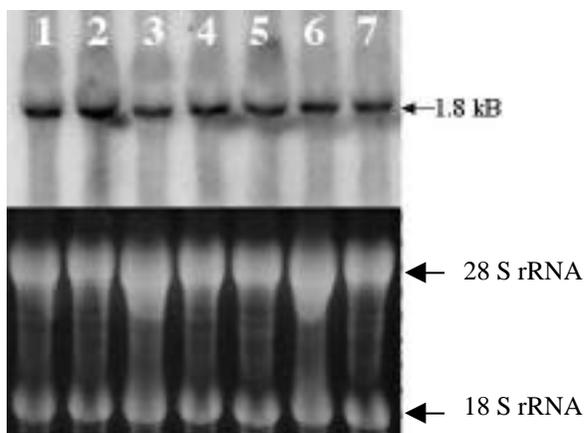


Abbildung 24

Northern Blot Analyse von 7 verschiedenen GBM Zelllinien mit einer Exon 9 RPTP spezifischen 3' Sonde. Die Abbildung zeigt, dass alle untersuchten Zelllinien diese Variante

exprimieren. Die Größe dieser Variante wurde mit 1.8 kB bestimmt. Im unteren Teil der Abbildung ist die Ladungskontrolle der totalen RNA mit der 28 S und 18 S rRNA zu sehen.

Die Northern Blot Analyse von verschiedenen GBM Zelllinien ergab, dass die Exon 9 RPTP Variante als 1.8 kB transkribiert wird. Im Anhang befindet sich eine vollständige Sequenz dieser neu identifizierten Variante von RPTP .

Exon 23 A RPTP ζ Variante

Bei der Klonierung der langen Transmembranform von RPTP wurden wie oben beschrieben verschiedene PCR Fragmente erstellt: Fragment A von fetaler Normalgehirn cDNA (Clontech, Palo Alto, CA), Fragment B von adulter Normalgehirn cDNA (Clontech, Palo Alto, CA) und Fragment C von GBM Zelllinie G122.

Die Sequenzanalyse der verschiedenen Produkte ergab, dass bei einem erhaltenen Amplifikat ein zusätzliches 117 bp Fragment in der intrazellulären Region am 3' Ende zwischen den beiden Phosphatasedomänen enthalten war. Die genomische Analyse ergab, dass sich dieses Fragment zwischen Exon 23 und Exon 24 befindet und sequenzhomolog zu der Intronsequenz zwischen diesen beiden Exonen ist. Im folgenden wird diese Variante als Exon 23 A RPTP Variante bezeichnet. Diese entspricht der langen Transmembranform mit einer nicht gespleißten Intronsequenz zwischen den Exons 23 und 24, die für die Phosphatasedomäne kodieren.

Die folgende Abbildung stellt graphisch die Exon 23 A RPTP Variante dar.

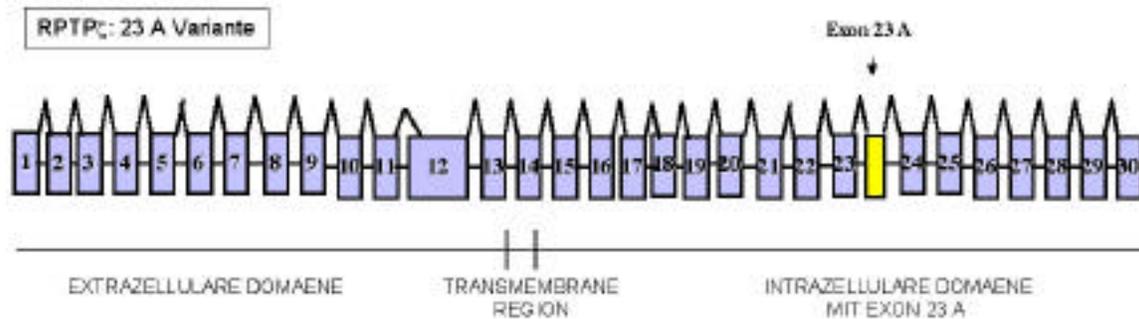


Abbildung 25

Die Abbildung zeigt eine graphische Darstellung der Exon Struktur der RPTP Exon 23 A Variante. In der intrazellulären Domäne ist zwischen Exon 23 und 24 eine weitere 118 bp eingefügt. Diese entspricht der Intronsequenz auf genomischer Ebene. Dieses zusätzliche Fragment befindet sich zwischen den Exons, die für die Phosphatasedomäne kodieren.

Versuche diese 23 A RPTP Variante mittels Northern Blot nachzuweisen, ist in der vorliegenden Arbeit nicht gelungen. Die kurze Sondengröße (118 bp), die die einzige spezifische Sequenz für diese Variante ist, scheint ein Problem beim Nachweis im Northern Blot zu sein. Um dennoch eine Aussage über die Expression dieser Variante in GBM zu bekommen, wurden 28 Tumore mittels RT-PCR untersucht. Es wurde ebenfalls für die oben beschriebene Exon 9 Variante spezifische RT-PCR durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis einer solchen Untersuchung.

(A)



(B)



Abbildung 26

RT-PCR Ergebnisse von 28 individuellen GBM spezifisch für (A) Exon 9 RPTP Variante und (B) für Exon 23 A RPTP Variante. In 19 von 28 untersuchten Tumoren konnte die Exon 9 Variante per RT-PCR nachgewiesen werden. In 18 von 28 untersuchten Tumoren konnte die Exon 23 A Variante nachgewiesen werden.

1-28 individuelle GBM, NK: Negativkontrolle, M: 1kb bzw 100bp Marker (Clontech, Palo Alto, CA).

Die verschiedenen Varianten konnten in einer Vielzahl von GBM nachgewiesen werden. Die Exon 9 RPTP Variante konnte in 19 von 28 untersuchten Tumoren via RT-PCR nachgewiesen werden. 18 von 28 Tumoren waren positiv für die Exon 23 A Variante. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der RT-PCR Ergebnisse der einzelnen Spleißvarianten in 28 individuellen GBM.

Spleißvariante	Exon 9 Variante	23 A Variante	Lange Transmembranform	Kurze Transmembranform
Anzahl Tumore positiv	19/28	18/28	16/28	19/28

Tabelle 3

Zusammenfassung der RT-PCR Ergebnisse in 28 GBM für die verschiedenen Spleißvarianten von RPTP . Es konnte mittels RT-PCR keine signifikante Präferenz für eine der Spleißvarianten identifiziert werden.

Die Exon 9 RPTP Variante wurde nicht weiter für funktionelle Studien untersucht, da das Ziel dieser Arbeit war, Oberflächenmoleküle als potentielle Kandidaten für Immuntherapie in GBM Patienten zu untersuchen.

Des weiteren wurde auch die Exon 23 A Variante nicht näher bearbeitet, da sich der extrazelluläre Anteil dieser Variante nicht von der langen Transmembranform unterscheidet und somit keinen Einfluss auf die Entwicklung von mAk als Therapeutikum hat. Inwieweit die zusätzliche 118 bp Sequenz die intrazelluläre Signaltransduktion verändert und eventuell die Bindung von Signalmolekülen beeinflusst, wurde nicht weiter verfolgt.

Die Charakterisierung der langen und kurzen Transmembranform von RPTP in GBM Zellen wurde mittels denen in dieser Arbeit erstellten Klonen von einer anderen Arbeitsgruppe weiterverfolgt.

Diskussion

Expressionsanalyse mittels cDNA Arraytechnologie

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass cDNA Array Analyse bei der Identifizierung von potentiellen therapeutischen Zielgenen für Glioblastome erfolgreich eingesetzt werden kann.

Das Ziel war, ein hochreguliertes Oberflächenprotein für die Entwicklung einer Immuntherapie zu identifizieren. Hierfür wurden spezifische cDNA Arrays hergestellt und in mehreren aufeinanderfolgenden Experimenten analysiert. Insgesamt wurden in den Screeningarrays über 2.8 Millionen Datenpunkte generiert. Diese enorme Anzahl konnte durch eine stringente Selektion auf 175.000 Datenpunkte für die Bestätigungsarrays reduziert werden und davon 860 Klone ausgewählt und weiter analysiert werden. Diese enormen Datenmengen, die in Arrayexperimenten routinemäßig produziert werden, stellen eine immense Herausforderung an die heutige Arraytechnologie dar. Trotz immensen Fortschritten, vor allem in der Entwicklung neuer Computerprogramme zur Analyse, stellt die anschließende Bestätigung und Validierung bis heute den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Die Frage, welche Selektionskriterien die relevanteste Genkollektion für eine biologische Fragestellung liefert, ist bis heute nicht eindeutig zu beantworten. Welche von diesen vielen differentiell exprimierten cDNAs in aufwendigeren Experimenten näher charakterisiert werden sollen, ist ebenfalls ungelöst. Sogenannte "*high throughput*" Validierungsverfahren sind in der Entwicklung, aber bisher noch nicht routinemäßig einsetzbar (Boutros et al., 2004; Therianos et al., 2004; Chen et al., 2004). Diese Entwicklung scheint aber das Problem nur aufzuschieben und nicht wirklich zu lösen. Spätestens bei der *in vivo* Validierung wird eine Selektionierung stattfinden müssen. Entscheidend für den Erfolg sind somit ein intelligentes Design der Arrayexperimente und an die Fragestellung angepasste Selektionskriterien. In dieser Arbeit wurde versucht, die

Arrayexperimente so spezifisch wie möglich zu entwerfen, um die Anzahl an falsch positiven Klonen (Typ I Fehler) möglichst gering zu halten. Hierfür wurden zum einen spezielle GBM Arrays hergestellt. Diese Arrays enthielten außer Kontrollen nur cDNA Klone, die aus subtraktiven cDNA Banken von Gliomen isoliert wurden. Die vorangegangene Subtraktion, die bei der Herstellung der cDNA Banken angewendet wurde, reichert die Klonkollektion für GBM spezifische Gene im Vergleich zu Normalgehirn an. Dies verringert die Komplexität der cDNA Banken und vereinfacht dadurch die Identifizierung differentiell exprimierter Gene (Zimmermann et al., 1980). Dieser Schritt stellt eine erste wichtige Selektion dar. Jeder Klon, der auf die cDNA Arrays gespottet wurde, stammte aus diesen speziell hergestellten cDNA Banken und stand somit im Zusammenhang mit der zu untersuchenden Krankheit. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu den kommerziell erhältlichen Arrays, die meist eine willkürliche Anzahl von unspezifischen humanen Genen enthalten. Auch sogenannte Tumorarrays sind in der Regel ungeeignet für Gehirntumore und meist sind die Sequenzen der gespotteten cDNA vorselektioniert, was die Möglichkeit, bisher nicht mit Tumoren in Zusammenhang gebrachte Gene zu identifizieren, verringert. Um die Sensitivität der Arrayanalyse weiter zu verbessern und vor allem falsch positive Selektionen zu minimieren, wurde hier ein Verfahren verwendet, das auf mehreren aufeinanderfolgenden Arrays beruhte. Zunächst wurden ca. 25.000 Klone aus den subtraktiven cDNA Banken im Screeningarray mit 14 Tumorproben und 5 Normalgehirnproben in zwei unabhängigen Experimenten hybridisiert. Pro gespotteten cDNA Klon wurden somit 6 Datenpunkte generiert und statistisch ausgewertet. Als Selektionskriterium wurde eine zweifache Hochregulation in mehr als zwei Tumorproben in einem Konfidenzintervall von 95% (*Student's T test*; $p < 0.05$) gefordert. Dies bedeutet, dass von 1150 selektionierten Klonen, ca. 50 Klone eventuell fälschlicherweise als positiv ausgewählt wurden. Eine Aussage über falsch negative Selektion kann über diese Analyse nicht gemacht werden. Allerdings stellt dies bei der hohen Anzahl an positiven Klonen kein Problem dar. Ziel der Analyse ist es, eine hohe Sicherheit zu erreichen, dass die ausgewählten Klone wirklich in den Tumoren induziert sind.

Nur Klone, die diese oben aufgeführten Kriterien erfüllten, wurden selektioniert und auf den so genannten Bestätigungsarray gespottet. Aufgrund der geringeren Klonanzahl konnten diese nun in Triplikaten auf den gleichen Array gespottet werden, was einen enormen Qualitätsgewinn bezüglich der Hybridisierungsergebnisse brachte. Dieser Array wurde erneut zweimal mit den Proben hybridisiert und analysiert. Hierfür wurden mehrere statistische Verfahren angewendet. Für die Analyse der Bestätigungsarrays wurden alle Werte zunächst $\log_2 + 1$ transformiert. Die $\log_2 + 1$ Transformation ist ein mathematischer Schritt, der im Weiteren die Analyse der Daten vereinfacht. Nach \log Transformation können herauf- oder herabregulierte Gene gleichermaßen dargestellt werden, da die reziproken Werte ähnlich ausgedrückt werden ($\log_2(1)=0$, $\log_2(2)=1$, $\log_2(0.5)=-1$ etc.) Das heißt, dass ein Gen, das um den Faktor zwei hochreguliert ist, der Wert 1 zugeordnet wird bzw. wenn das Gen um den Faktor zwei herunterreguliert ist, ihm der Wert -1 zugewiesen wird. Desweiteren wird durch diese Transformation eine bessere Normalverteilung der Werte gewährleistet, die die anschließende Aussage statistischer Tests verstärkt (Quackenbush, 2002). Zunächst wurde eine Anova Analyse (Partek, St, Charles, MO) für alle Tumorproben und Kontrollen vorgenommen. Dieser Schritt selektioniert Klone, die signifikant in allen Tumorproben hochreguliert sind. Wie in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei diesem Verfahren um eine kontrollierte Clusteranalyse, d.h. es werden die Kontroll- und Tumorproben vorgegeben. Der zweite Schritt war ein paarweiser Vergleich von jeder Tumorprobe mit den Werten von den Normalgehirnproben. Hierfür wurde der Tukey-HSD Test verwendet, der prinzipiell dem Student's T test entspricht, aber Experimentenfehler im Sinne von Typ I Fehlern (falsch positive) mit einbezieht und sich somit besser für die Analyse eignet. Im dritten Schritt wurde eine Verhältniskalkulation für jedes Wertepaar von Expressionswerten Tumor zu Normalgehirn vorgenommen (Butte, 2002). Mittels dieser statistischen Analyse konnten 860 Klone der ursprünglichen 1152 in einem Konfidenzintervall von 95% selektioniert werden. Dies entspricht maximal 40 falsch positiv selektionierten Klonen. Mit diesem „Two-Step“ Arraydesign konnte sichergestellt werden, dass

zunächst eine große Anzahl von GBM-relevanten Klonen gescreent werden konnte, die anschließend mit einem sensitiveren Array weiter selektioniert wurden. Nur Klone, die in diesem zweiten Bestätigungsarray weiterhin als hochreguliert identifiziert werden konnten, wurden sequenziert und näher auf Oberflächenmoleküle analysiert. Dadurch konnte die ursprüngliche Anzahl von ca. 25.000 untersuchten Klonen auf 860 Klone reduziert werden. Dies entsprach etwa 200 Genen. Viele von diesen Genen waren schon in der Literatur in Assoziation mit GBM beschrieben worden, was die Vorgehensweise der Experimente validierte. Unter anderem wurde Brevican und Tenascin als hochreguliert identifiziert. Beide Gene sind Komponenten der extrazellulären Matrix und spielen somit eine Rolle im invasiven Verhalten von Gliomen (Zhang et al., 1998). Antitenascin-¹³¹I markierte Antikörper werden momentan in klinischen Studien evaluiert und zeigen vielversprechende Erfolge (Reardon et al., 2002). RPTP wurde als ein interessantes Oberflächenmolekül, das bisher noch nicht mit GBM assoziiert worden war, in dieser Genkollektion identifiziert und für weitere Charakterisierung in dieser Arbeit ausgewählt.

Die Selektionskriterien jedes Arrayexperimentes muss an die jeweilige Fragestellung angepasst werden. Welcher Wert als Grenze für die Hochregulation festgelegt wird, ist meist eher durch praktische Gegebenheiten bestimmt. Die erste Analyse ergibt einen Hinweis, welcher Wert eine sinnvolle Anzahl an Klonen liefert. Setzt man den Wert zu niedrig an, ist der Selektionsdruck sehr gering. Wird der Wert sehr hoch angesetzt, verliert man zu viele potentielle Kandidaten. Ein Wert, der häufig in der Literatur angegeben wird, ist eine zweifache Hochregulation, die auch in dieser Analyse verwendet wurde (Quackenbush, 2002). Welchen Stellenwert der numerische Wert der Hochregulation in einem Arrayexperiment biologisch hat, ist ein bis heute in der Arraytechnologie kontrovers diskutiertes Thema (Butte et al., 2001; Kuo et al., 2002). Eine Arbeit von Yang et al. konnte zeigen, dass geringere Schwellenwerte für eine Hochregulation als zweifach bei entsprechender Normalisierung und Wiederholungen der Experimente zuverlässig bestimmt

werden kann (Yang et al., 2002). In dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass ein Gen eine signifikantere Rolle in der Tumorbilogie spielt, wenn es in mehreren biologischen Proben wiederholt als hochreguliert identifiziert werden kann, als wenn es in wenigen Proben als sehr hochreguliert identifiziert werden kann. Somit wurden Klone, die in nur einer Tumorprobe eine Hochregulation zeigten, nicht selektioniert. Für die anschließende Auswahl eines Zielgens wurde ebenfalls der Anzahl der Tumorproben, indem das spezifische Gen als hochreguliert nachgewiesen werden konnte, stärkere Bedeutung beigemessen als dem absoluten Wert der Hochregulation. RPTP konnte in einem Großteil der analysierten Tumore, nämlich in 75%, als induziert gemessen werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Interpretation von Array Daten ist die Methode der Normalisierung. Ohne diesen Schritt wäre ein Vergleich zwischen verschiedenen Proben und Kontrollen nicht möglich. Mittlerweile sind eine Vielzahl von verschiedenen Methoden publiziert worden (Fan et al., 2004; Leung & Cavalieri, 2003; Quackenbush, 2002). Zum Teil normalisieren diese Methoden auf der Basis von Mittelwerten aller Expressionswerte eines Arrays oder auf der Grundlage von so genannten „*house keeping*“ Genen. Diese werden auf der Annahme selektioniert, dass ihre Expression in Kontroll- und Tumorgewebe konstant ist (Hsiao et al., 2001; Kroll & Wolf, 2002). Klassische Beispiele für solche Gene sind β -Aktin und GAPDH. In dieser Arbeit konnte allerdings bei der Analyse der Kontrollgene, die auf jeden cDNA Array gespottet wurden, festgestellt werden, dass die Expression dieser Gene stark von Probe zu Probe variierte. Weitere Arbeiten berichteten ebenfalls, dass so genannte „*house keeping*“ Gene reguliert werden (Bhatia et al., 1994; Savonet et al., 1997). Da zwei sehr unterschiedliche Gewebe wie Normalgehirn und Tumor hybridisiert wurden, erschien auch der Mittelwert der Expression aller Klone auf dem Array zur Normalisierung als nicht geeignet. In dieser Arbeit wurde die Normalisierung anhand leerer Positionen auf dem Array vorgenommen und für den Bestätigungsarray eine \log_2+1 Transformation vorgenommen. Dies erscheint eine relativ vom Gewebe unabhängige und gut zu kontrollierende Methode zu

sein. Eine weitere Herausforderung der Arraytechnologie ist die Identifizierung differentieller Expression aufgrund technischer Gegebenheiten. Warum ein Gen in einer Probe als hochreguliert identifiziert werden kann und nicht in einer anderen, kann zum einen eine biologische Ursache haben, zum anderen aber auch auf Verfahrensgegebenheiten wie zum Beispiel Gewebequalität, RNA Stabilität, cDNA Synthese und Hybridisierungsunterschieden beruhen. Es ist schwierig, für diese genannten Faktoren geeignete Kontrollen in den Experimenten zu integrieren. Hier wurde die Qualität jedes verwendeten Gewebes mittels Gelelektrophorese der isolierten RNA getestet. Allerdings kann auf diesem Wege nur eine grobe qualitative Abschätzung erfolgen. Inwieweit zum Beispiel mRNAs, die in geringerer Menge vorliegen, betroffen sind, ist damit nicht abzuschätzen. Es wurde ebenfalls versucht, die Tumore sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockzugefrieren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C zu lagern. Dies sollte eine best mögliche Qualität gewährleisten. Bei der cDNA Synthese wurde darauf geachtet, dass die exakt gleichen Materialien und Geräte verwendet wurden. Die cDNA wurde anschließend für die verschiedenen Experimente aliquotiert und bei -20°C gelagert, so dass Artefakte durch das Ein- und Auftauen der Proben möglichst gering gehalten wurde. Inwieweit die Zusammensetzung der Proben die reverse Transkription der einzelnen mRNA Moleküle beeinflusst, kann bis heute nicht eindeutig beantwortet werden. Verschiedene Ansätze wurden von anderen Arbeitsgruppen gewählt, um diese Fragen in der Probensynthese zu klären. Ein interessanter Ansatz war die Markierung der Proben mit artifiziell hergestellten mRNAs, die nicht in humanen Geweben exprimiert werden und keine „Cross“-Hybridisierung mit humanen Transkripten zeigen. Eine Arbeit von Eickhoff et al. verwendete synthetisch hergestellte Kanamycin und Ampicillin mRNAs mit Poly-A-Enden, die in die Zellextrakte gegeben wurden, um einen Aufschluss über die Qualität der einzelnen Schritte während der Probenherstellung zu bekommen und eine externe Kontrolle für die Arraynormalisierung zu generieren (Eickhoff et al., 1999). Dieses Verfahren wurde in der

vorliegenden Arbeit nicht verwendet. Theoretisch war es sehr reizvoll, praktisch erschien es jedoch sehr aufwendig und schlecht kontrollierbar zu sein, da bisher keine Aussage getroffen wurde, ob diese zusätzlichen mRNA das Hybridisierungsverhalten der anderen mRNAs in der Probe beeinflusst. In dieser Arbeit wurde deshalb versucht, den Einfluss dieser Variablen, durch eine erhöhte Anzahl an Proben und Experimenten, auszugleichen. Hierfür wurde jedes Experiment mit den gleichen Proben einmal wiederholt und insgesamt 14 Tumore und 5 Normalgehirnproben hybridisiert und analysiert.

Wie oben dargestellt, kann mit entsprechendem Arraydesign, Statistik und Probenmenge, die Anzahl der falsch positiven Signale gering gehalten werden, dennoch ist sie nicht null. Es ist deshalb entscheidend, die Ergebnisse der Arrays mit einer möglichst schnellen und spezifischen Methode zu validieren. Die quantitative RT-PCR eignet sich hierfür besonders gut und hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Es ist eine sehr schnelle Methode, die auf jedes Gen angewendet werden kann. Voraussetzung für diese Methode ist allerdings, dass die Sequenz des zu untersuchenden Gens bekannt ist. Eine aufwendigere Methode zur quantitativen Analyse ist der Northern Blot. Diese Methode ist nicht als *“high throughput”* Screening Methode geeignet, sondern wird nur als Validierungsmethode einzelner selektionierten Kandidatengene verwendet. Ein wichtiger Unterschied in der Northern Blot Analyse besteht allerdings in dem Informationsgewinn über die Expression von Spleißvarianten. Mittels cDNA Array Analyse kann meist keine Aussage über diese getroffen werden. Die Analyse von Spleißvarianten anhand von Arrays kann nur dann erreicht werden, wenn im Vorfeld die Sequenzen festgelegt werden und somit die Analyse auf bekannte Sequenzen limitiert wird. Somit erscheint es sinnvoll, die Arrayergebnisse zunächst mit quantitativer RT-PCR zu bestätigen und anschließend weitere Informationen über Northern Blot Analyse zu gewinnen. Beide Methoden konnten unabhängig voneinander die Arrayergebnisse bestätigen und zeigen, dass RPTP in GBM im Vergleich zu Normalgehirn hochreguliert ist.

CDNA Arrays, RT-PCR und Northern Blot Analyse beruhen alle auf dem Nachweis von mRNA. Ob sich die Hochregulation auf mRNA Ebene auch auf Proteinebene widerspiegelt, ist für jedes Gen individuell zu verifizieren. In den meisten Therapiekonzepten ist das Protein der Angriffspunkt und nicht die mRNA. Dieser Gedanke liegt auch der Entwicklung der Proteomik zugrunde. Die momentane Entwicklung versucht die Ansätze der Genomik auf Proteine zu übertragen (Yates & Snyder, 2004). Derzeit werden eine Vielzahl von Proteinchips entwickelt, die es ermöglichen sollen, Proteine in *“high throughput”* Verfahren zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde RPTP aufgrund seiner Hochregulation auf mRNA Ebene und seiner Expression als ZNS-spezifisches Oberflächenmolekül in einer großen Anzahl von untersuchten Tumoren für die nähere Charakterisierung ausgewählt. Es konnte aber mittels Western Blot Analyse und Immunhistochemie gezeigt werden, dass auch das RPTP Protein in GBM hochreguliert ist. Dies ist eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung einer Antikörper-Immuntherapie. Eine weiterführende Studie von Ulbricht et al. untersuchte immunhistochemisch die Expression von RPTP und seines Liganden Ptn in 70 individuellen Gehirntumoren und konnte zeigen, dass RPTP in 33 untersuchten GBM induziert war (Ulbricht et al., 2003). Diese Studie bestätigte eindeutig die Hochregulation von RPTP in GBM auf Proteinebene und validierte die bisher erzielten Ergebnisse. Es konnte somit in dieser Arbeit gezeigt werden, dass potentielle Kandidatengene für Immuntherapieentwicklungen mittels cDNA Analyse in GBM erfolgreich identifiziert werden können. Entscheidend für den Erfolg ist ein sorgfältiges ausgewähltes Arraydesign mit spezifischer Klonkollektion, ausreichender Probenanzahl und Experimentenwiederholungen, sowie geeigneten Selektionskriterien.

RPTP ζ und seine Rolle in Glioblastomen

Wie bereits oben erwähnt, konnte die induzierte Expression von RPTP ζ auf mRNA und Proteinebene in GBMs im Vergleich zu Normalgehirn eindeutig gezeigt werden. Es stellte sich nun die Frage, welche Rolle RPTP ζ und Ptn in GBM Zellen spielt? RPTP ζ wurde mit der Migration von Astrozyten während der Entwicklung und der Migration von Schwannzellen in Zusammenhang gebracht (Maeda et al., 1995; Thomaidou et al., 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass RPTP ζ der Rezeptor für Tenascin in glialen Tumorzellen ist (Adamsky et al., 2001). Interaktionen von Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix sind für das invasive Verhalten wichtig, was ein wesentliches Merkmal von GBM Zellen ist. In dieser Arbeit wurde die Expression von RPTP ζ mit diesem phänotypischen Charakteristika korreliert. Für die funktionelle Charakterisierung wurden „*Knock Down*“- Experimente durchgeführt. SiRNA konnte in Glioblastom Zellen für solche Experimente erfolgreich verwendet werden und eine bisher unentdeckte Rolle für RPTP ζ bezüglich des Migrationsverhaltens von GBM Zellen identifiziert werden. SiRNA Technologie beruht auf der Einführung von kurzen doppelsträngigen RNA Molekülen, die sequenzhomolog zu dem zu untersuchendem Gen sind. SiRNA bindet an die mRNA und ist als doppelsträngiges RNA Molekül (dsRNA) in der Lage, spezifisch Genprodukte auf posttranskriptioneller Ebene zu unterdrücken. Dieses Phänomen, das auch als RNA Interferenz (RNA *interference* oder RNAi) bezeichnet wird, ist weit verbreitet. Es konnte bereits in zahlreichen Organismen wie Pflanzen, Protozoen, Nematoden und Insekten nachgewiesen werden und kann auch *in vitro* induziert werden (Elbashir et al., 2001; Hammond et al., 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RPTP ζ nach siRNA Behandlung in wesentlich geringeren Mengen in GBM Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen exprimiert wurde. Die Expression konnte um ca. 73% mittels siRNA reduziert werden. Bislang sind keine weiteren Studien veröffentlicht, die siRPTP ζ in GBM Zellen oder anderen

Zellen zur funktionellen Analyse verwendet haben. Ob dieses Ergebnis somit mit anderen Studien vergleichbar ist, kann nicht beantwortet werden. Als Kontrolle für RNA *interference* eignen sich unspezifische Sequenzen, die ähnlich wie die spezifische ds siRNA aufgebaut sind. Ein Problem der Ergebnisinterpretation besteht darin, dass nach der siRNA Behandlung meist nur die Expression des Gens analysiert wird, dessen Expression unterdrückt werden sollte. Das heißt, man erhält keinen Aufschluss über andere Gene, die eventuell durch die siRNA Behandlung ebenfalls in ihrer Expression verändert wurden. Dies kann mittels Array-analyse untersucht werden, indem man das Expressionsprofil von GBM Zellen, die mit siRPTP behandelt wurden mit dem von siControl behandelten GBM Zellen vergleicht. Diese Experimente können auch weitere Aufschlüsse über die Signalkaskade von RPTP in GBM Zellen geben. Diese Experimente wurden von einer anderen Gruppe weitergeführt und nicht näher in dieser Arbeit analysiert. Bei dem Design der siRNA muss darauf geachtet werden, dass keine Homologien in dem gewählten Bereich zu anderen Genen bestehen. Somit konnte in dieser Arbeit siRNA erfolgreich für die weitere Charakterisierung von RPTP und Ptn in GBM Zellen etabliert werden.

Um die Funktion von RPTP und seines Liganden Ptn bezüglich des Migrationverhaltens zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zum einen wurden RPTP exprimierende und nicht exprimierende GBM Zellen bezüglich ihrer Fähigkeit durch Ptn stimuliert zu werden, im Migrationsassay untersucht. Es ist bekannt, dass einzelne Zelllinien ein unterschiedliches Migrationsverhalten zeigen und nicht direkt miteinander verglichen werden können. In diesem Fall wurde aber vor allem der stimulatorische Effekt von Ptn untersucht. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass RPTP exprimierende Zellen durch Inkubation mit Ptn bezüglich ihres Migrationsverhaltens stimuliert werden können, wohingegen GBM-Zellen, in denen keine Expression von RPTP nachgewiesen werden konnte, keine gesteigerte Migration zeigten. Um weiter zu überprüfen, ob Ptn über RPTP diesen stimulatorischen Effekt vermittelt, wurden RPTP exprimierende Zellen mit siRPTP und

siControl behandelt. Wenn Ptn über Interaktion mit RPTP das migratorische Verhalten beeinflusst, sollten nur siControl behandelte Zellen weiterhin stimulierbar sein, wohingegen siRPTP behandelte Zellen keinen Effekt mehr zeigen sollten. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig gezeigt werden. Beide Ergebnisse weisen daraufhin, dass Ptn über RPTP das Migrationsverhalten von GBM Zellen stimuliert. Dennoch konnte auch gezeigt werden, dass Zellen, die RPTP nicht exprimieren, die Fähigkeit zur Migration haben. Ein so komplexes Phänomen wie die Migration wird von vielen Signalen beeinflusst und somit ist nicht zu erwarten, dass die verminderte Expression eines Gens zum vollständigen Verlust dieser Fähigkeit führt. Weitere Arbeiten, die sich mit der Analyse von Migration und Invasion von GBM Zellen befasst haben, konnten zeigen, dass Zellen, die mit einem *anti-sense* Adenovirus für ein spezifisches Gen, das das Migrationsverhalten von GBM Zellen beeinflusst, eine ca. 27%-ige Reduktion der Invasion in einem Matrigel Assay zeigten. In dieser Studie war die Expression des Gens um 90% reduziert gewesen (Lakka et al., 2002a; Lakka et al., 2002b). Weiterführende Experimente von Ulbricht et al. konnten zeigen, dass Ptn vor allem das haptotaktische Migrationsverhalten von GBM Zellen stimuliert. Dies bedeutet, dass an eine Oberfläche gebundenes Ptn das Migrationsverhalten stärker beeinflusst als wenn es gelöst ist. Dies konnte mit einem kommerziell erhältlichen Ak gegen RPTP in C6 Gliom Zellen inhibiert werden (Ulbricht et al., 2003). Diese Ergebnisse etablieren eindeutig eine bisher unbekannte Rolle von RPTP bezüglich des Migrationsverhaltens von GBM Zellen. Weiterführende Studien werden evaluieren müssen, über welchen Signaltransduktionsweg dies geschieht. Bisher ist sehr wenig über die intrazelluläre Liganden und Signalkaskaden bekannt. Des weiteren muss erforscht werden, inwieweit die einzelnen Spleißvarianten von RPTP für diese Funktion verantwortlich sind.

In dieser Arbeit sollte ebenfalls untersucht werden, welchen Einfluss RPTP und Ptn auf das Proliferationsverhalten von GBM Zellen hat. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass Ptn als Mitogen auf Fibroblasten und Endothelzellen wirkt. Des weiteren konnte gezeigt

werden, dass es onkogenes Potential hat (Chauhan et al., 1993). Ribozyme spezifisch für Ptn konnten das Wachstum von Melanomen und Pankreazkarzinomen im Mausmodell verhindern (Souttou et al., 1998; Weber et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass RPTP keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von GBM Zellen hat. Dies war etwas überraschend, da Ptn als Mitogen in vorangegangenen Arbeiten charakterisiert worden war (Muramatsu, 2002). Allerdings wurde in einer Arbeit von Stoica et al. die anaplastische Lymphom Kinase (ALK) als ein weiterer Rezeptor für Ptn beschrieben (Stoica et al., 2001) und Powers et al. identifizierte die Bindung von Ptn an ALK als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in GBM Wachstum (Powers et al., 2002). Diese Veröffentlichungen stehen im Einklang mit den in dieser Arbeit erforschten Ergebnissen. Ptn scheint das Proliferationsverhalten über Interaktion mit ALK und nicht RPTP zu beeinflussen.

Somit konnte eine bisher unbekannt Funktion für RPTP im Migrationsverhalten von GBM Zellen identifiziert werden.

RPTP ζ und seine Spleißvarianten

In der Literatur wurden bisher 4 Spleißvarianten von RPTP beschrieben. Zwei extrazelluläre, sekretorische und zwei transmembrane Moleküle (Garwood et al., 2003; Krueger & Saito, 1992). In dieser Arbeit wurden zwei weitere Spleißformen identifiziert. Die Exon 9 Variante besteht aus dem extrazellulären Anteil und ist ähnlich zu der kurzen Phosphacanform, die in Mäusen identifiziert wurde. Ein Vergleich dieser zwei Varianten ergab, dass die in dieser Arbeit identifizierte Variante homolog zu der kurzen Phosphacanvariante einschließlich Exon 9 ist, dann aber die kurze Phosphacanform an anderer Stelle gespleißt wird und im Vergleich zur Exon 9 Variante mehr Exons enthält. Eine nähere Charakterisierung wurde hier nicht vorgenommen, da es sich um eine sekretorische Form handelt, die sich nicht als Zielgen für eine Immuntherapie eignet. Allerdings könnte

diese Form, wie auch Phosphacan oder andere möglicherweise unentdeckte sekretorische Formen von RPTP , durch kompetitive Bindung des potentiellen Therapeutikums in Form eines mAk entscheidend beeinflussen. Ein vergleichbares System ist das des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR). VEGF ist ein Hauptmediator von Angiogenese in GBMs. Bisher sind zwei Rezeptoren identifiziert worden: VEGFR-1 und VEGFR-2. VEGFR-2 wird neben einer transmembranen Form auch als lösliche Form exprimiert (sVEGFR-1). Hornig et al. und Shibuya et al. zeigten, dass sVEGFR-1 im wesentlichen eine inhibitorische Funktion auf Angiogenese ausübt, indem es VEGF als Komplex bindet und somit die Bioverfügbarkeit des Liganden reguliert (Hornig et al.; 1999; Shibuya et al.; 2001). Eine Studie von Lamszus et al. untersuchte den Einfluss von sVEGFR-1 im Verhältnis zu VEGF-A auf Angiogenese in Gehirntumoren (Lamszus et al.; 2003b). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sVEGFR-1 in höhergradigen Astrozytomen stärker exprimiert wurde, als in niedriggradigen. Die Hochregulation eines Angiogenese-Antagonisten in höhergradigen Tumoren erschien zunächst unlogisch, da ja bekannterweise GBM sich vor allem durch ihren hohen Grad an Angiogenese auszeichnen. Die Autoren konnten allerdings zeigen, dass das Verhältnis von sVEGFR-1 zu VEGF-A in GBM um 2.6 fach niedriger ist als in diffusen Astrozytomas. Dies unterstützt die Theorie, dass die Expression eines löslichen Rezeptors, die Bioverfügbarkeit entscheidend beeinflussen kann. Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei RPTP und sekretorischen Spleißvarianten wie Phosphacan/Exon 9 vorliegen und sollte bei einer eventuellen Epitopauswahl berücksichtigt werden, so dass eine maximal hohe Konzentration des applizierten Aks an der Tumorzelloberfläche erreicht werden kann. Die Exon 23 A Variante ist im extrazellulären Anteil mit der langen Transmembranform identisch. Sie enthält ein zusätzlichen 118 bp Fragment im intrazellulären Anteil zwischen den Exonen 23 und 24, die für die zwei Phosphatasedomäne kodieren. Dieses zusätzliche Fragment könnte entscheidend die Phosphataseaktivität und Bindung intrazellulärer

Signalmoleküle beeinflussen. Die Herstellung stabiler Zelllinien für die nähere Charakterisierung der einzelnen Spleißvarianten wurde in einer anderen Arbeitsgruppe weitergeführt. Diese Ergebnisse werden entscheidend die Auswahl des Epitops bestimmen und eventuell zu neuen Therapiestrategien führen.

Ist RPTP ζ ein gutes Zielgen für die Entwicklung von Immuntherapien?

Die Zukunft der Gehirntumorthherapie liegt in der Kombination verschiedener Behandlungsmodalitäten, die auf den individuellen Tumor speziell zugeschnitten sind. In Kombination mit den klassischen Optionen wie Neurochirurgie, Chemo- und Bestrahlungstherapie, ist die Immuntherapie derzeit eine der erfolgsversprechendsten Entwicklungen. Es gibt verschiedene Faktoren, die den Erfolg eines individuellen Immuntherapeutikums bestimmen. Wie in der Einleitung schon dargestellt, ist die Überexpression des Zielgens im Tumor von entscheidender Bedeutung. Des weiteren sollte das Zielprotein eine essentielle Funktion für die Tumorzellen haben, so dass bei Blockade dieser, die Tumorzellen ihr onkogenes Potential verlieren. Weitere Faktoren, die den Erfolg wesentlich beeinflussen, beruhen eher auf die Interaktion des therapeutischen mAKs mit dem Antigen und dessen Stabilität.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass RPTP ζ zwei wesentliche Bedingungen erfüllt. Zum einen ist es sehr stark in Tumorzellen im Vergleich zu Normalgehirn exprimiert, zum anderen ist es funktionell für ein wesentliches Charakteristikum der GBM Zellen verantwortlich. Eine Hemmung der RPTP ζ Expression mittels siRNA führte zu einer verminderten Migration dieser Zellen. Die Verfügbarkeit von RPTP ζ *in vivo* muss in Tiermodellen getestet werden. Ein entscheidender Nachteil könnte die starke Interaktion von RPTP ζ mit der extrazellulären Matrix sein. Des weiteren bleibt die Frage offen, inwieweit Phosphacan oder andere sekretorische Spleißvarianten, die Bindung eines mAK an eine der

Transmembranformen und somit Tumorzellen beeinflusst. Basierend auf der Proteinstruktur können spezifisch Epitope für die kurze Transmembranform gewählt werden. Sollte sich aber herausstellen, dass vor allem die lange Transmembranform den Phänotyp der Tumorzellen beeinflusst, wird dies aufgrund der identischen Anteile zwischen der langen Transmembranform und Phosphacan unmöglich. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie ein RPTP Immuntherapeutikum aussehen könnte. Es könnte entweder mit einem Toxin konjugiert werden oder so entwickelt werden, dass es die Interaktion von Ptn/RPTP blockiert und somit das Migrationsverhalten reduziert. Die erste Variante könnte verbleibende Tumorzellen in der Resttumorphöhle zerstören, die zweite Variante würde die Migration der verbleibenden Zellen eventuell limitieren. Weitere Studien werden zeigen müssen, inwieweit sich RPTP auch in *in vivo* Modelle als gutes Zielgen darstellt.

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass GBM spezifische cDNA Arrays zur Entdeckung von neuen Targetmolekülen erfolgreich eingesetzt werden können. Ziel war die Identifizierung und nähere Charakterisierung eines Moleküls, das sich potentiell für die Entwicklung einer Immuntherapie eignet. RPTP konnte in dieser Arbeit als Oberflächmolekül identifiziert werden, das in einer Vielzahl der untersuchten GBMs hochreguliert war. Dies wurde mittels Immunhistochemie auch auf Proteinebene bestätigt. Durch die Anwendung von siRNA und funktionellen Tests konnte gezeigt werden, dass RPTP und Ptn das Migrationsverhalten von GBM Zellen beeinflusst und eine Hemmung der Expression von RPTP zu einer verminderten Migrationsrate führte. Weiterführende Studien werden zeigen müssen, inwieweit sich dieses System auch *in vivo* für eine Immuntherapie in GBM eignet. Vergleichbare komplexe Systeme wie die Interaktion des *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) wird seit fast 10 Jahren in der Gehirntumorbiologie intensivst beforscht. Wie in der Einleitung beschrieben, ist EGFR

das erste amplifizierte Gen, das in Glioblastomen identifiziert wurde (Liebermann et al., 1985b). Bis heute sind verschiedenste Therapieverfahren für diesen Rezeptor und Liganden immer noch in der Entwicklung und noch weit entfernt von einer generellen klinischen Anwendung. Dieser Vergleich zeigt, dass noch vieles über RPTP und seine Liganden in Gehirntumoren beforscht werden muss und verschiedenste Ansätze parallel entwickelt werden müssen, um eventuell eine therapeutische Rolle für diese Rezeptorphosphatase in Patienten zu entwickeln.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von neuen Oberflächenmolekülen für eine Antikörper-Immuntherapie für Glioblastome (GBM). Um neue Zielgene zu identifizieren wurde die differentielle Expression in GBM im Vergleich zu Normalgehirn mittels cDNA Array Analyse untersucht. Es wurden zunächst subtraktive cDNA Banken hergestellt, um eine spezifische, für Tumortranskripte angereicherte Klonkollektion zu etablieren. Um die Genauigkeit des Arrayanalyse zu optimieren, wurde ein Verfahren

angewendet, das auf zwei aufeinanderfolgenden Arrayhybridisierungen beruht. Zunächst wurden die rekombinanten Klone der subtraktiven cDNA Banken auf sogenannten Screening Arrays mit einer Dichte von ca. 25.000 Elementen pro Array gespottet. Diese wurden mit insgesamt 14 Tumorproben und 5 Normalgehirnproben hybridisiert und analysiert. Von diesen Screening Arrays konnten mehr als 1000 Klone als hochreguliert identifiziert werden. Darunter befand sich auch die *Receptor Protein Tyrosine Phosphatase* (RPTP), die bisher noch nicht mit GBM in Verbindung gebracht worden war und einer ihrer Liganden, *Pleiotropin* (Ptn). RPTP war mehr als 1.5-fach in vier Tumorproben hochreguliert (1.62-4.08, n=3, p-Wert < 0.5, Student's T test). Die rekombinanten Inserts der hochregulierten Klone dieses Screens wurden erneut in Triplikaten auf einen zweiten Array, dem sogenannten Bestätigungsarray, gespottet. Dieser Array wurde erneut mit den 14 GBM Proben und 5 Normalgehirnproben aus dem ersten Screen in zwei unabhängigen Experimenten hybridisiert. Die Bestimmung von Triplikaten per Klon in zwei unabhängigen Experimenten erlaubte eine strengere statistische Analyse der Bestätigungsarrays im Vergleich zu den Screening Arrays. 860 Klone konnten in diesem zweiten Arrayexperiment als hochreguliert bestätigt werden. RPTP war in 6 von 8 GBM Proben hochreguliert (1.53 (p=0.0047) bis 1.76 (p<0.0001)). Insgesamt wurden für die Analyse über 3 Millionen Datenpunkte generiert. Unter anderem wurde Brevican, Tenascin, c-met Rezeptor, CD44, Osteopontin und SPARC (secreted protein acidic and cysteine rich), die schon in der Literatur in Assoziation mit GBM beschrieben worden waren, als hochreguliert identifiziert. Die cDNA Array Ergebnisse wurden mittels quantitativer RT-PCR und Northern Blot Analyse bestätigt. Die Hochregulation von RPTP auf Proteinebene konnte immunhistochemisch ebenfalls bestätigt werden.

Eine funktionelle Charakterisierung erfolgte mittels Anwendung von small RNA interference (siRNA) und einem modifiziertem Boyden Chamber Migrationsassay. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Ptn das Migrationsverhalten von RPTP

exprimierenden GBM Zellen konzentrationsabhängig stimuliert, wohingegen kein Effekt bei GBM Zellen zu sehen war, die RPTP nicht exprimieren. Um dieses System näher zu charakterisieren, wurde die Expression von RPTP in GBM Zellen mittels siRNA herunterreguliert. Es konnte nach siRNA Behandlung eine effiziente Suppression der RPTP Expression nachgewiesen werden. Diese „*Knock Down*“ Experimente ergaben, dass Ptn über RPTP das Migrationsverhalten von GBM Zellen stimuliert. Die Suppression der Expression von RPTP führte zu einem verminderten stimulatorischen Effekt von Ptn auf das Migrationsverhalten von GBM Zellen. Einen Einfluss auf das proliferative Verhalten konnte nicht entdeckt werden.

Um die Rolle von RPTP in GBM Zellen näher zu untersuchen, wurde das vollständige Gen für die lange Transmembranform für anschließende Überexpressionsexperimente kloniert. Während der Klonierung von RPTP konnten zwei bisher nicht veröffentlichte Spleißvarianten von RPTP identifiziert werden. Eine Form gleicht der in Mäusen beschriebenen kurzen Phosphacanform, die andere enthält ein zusätzliches 118bp Fragment zwischen den beiden Exonen, die im intrazellulären Anteil für die Phosphatasedomänen kodieren. Es konnte mittels RT-PCR keine eindeutige Expressionspräferenz für eine der Spleißvarianten in GBM gefunden werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass krankheitspezifische cDNA Arraytechnologie erfolgreich für die Identifizierung von potentiellen Immuntherapie-Zielgenen angewendet werden kann. RPTP wurde als potentieller Kandidat näher charakterisiert und eine funktionelle Rolle im Migrationsverhalten von GBM Zellen etabliert.

Anhang

Primer und Adapter Sequenzen:

Falls nicht gesondert angegeben wurden die Primer von der Firma Operon bestellt (Alameda, CA, USA). Die Primer wurden in 10µM Konzentrationen bei 4°C aufbewahrt. Zur längeren Lagerungen wurde 100µM Konzentration hergestellt und bei -20°C gelagert.

- Verankerter Oligo-dT Primer für die Synthese von cDNA:

5'-TTTTGTACAAGCTT(30)VN-3'

V= A, G, C

N= A, G, C, T

- Adapter Sequenzen für die Synthese von subtraktiven cDNA Banken:

Adapter1:

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'
3'-GGCCCGTCCA-5'

Adapter2:

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'
3'-GCCGGCTCCA-5'

- Primer für die Suppressions PCR

- 1. Suppressions-PCR

Primer 1:

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Temperaturprogramm:

19, 21, 23, 25, 27 Zyklen bei

- 94°C für 30 s
- 66°C für 30 s
- 72°C für 90s

- 2. Suppressions-PCR

Nested Primer 1:

5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'

Nested Primer 2:

5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

Temperaturprogramm:

12 Zyklen:

- 94°C für 30 s
- 68°C für 30 s
- 72°C für 90 s

- Primer für Kontrolle für Adapterligation GAPDH:

Sense Primer G3PDH: 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

Antisense Primer G3PDH: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Adapter spezifische Primer nested Primer 1 und 2 siehe oben.

Temperaturprogramm:

75°C für 5 Minuten zum Auffüllen der Enden

20 Zyklen bei:

- 94°C für 30 s
- 65°C für 30 s
- 68°C 2.5 Minuten
- Vektorspezifische Primer für die Amplifikation der klonierten cDNA Banken in pCR2.1 Vektor:

PCR2.1 sense: 5'-CCGGCTCGTATGTTGTGTGGAA-3'

PCR2.1 antisense: 5'-GCTGGCGAAAGGGGATGTGCT-3'

Temperaturprogramm:

95°C für 15 Minuten für die Aktivierung der Hot Start Polymerase

30 Zyklen bei:

- 94°C für 20 s
- 58°C für 20 s
- 72°C 2.0 Minuten

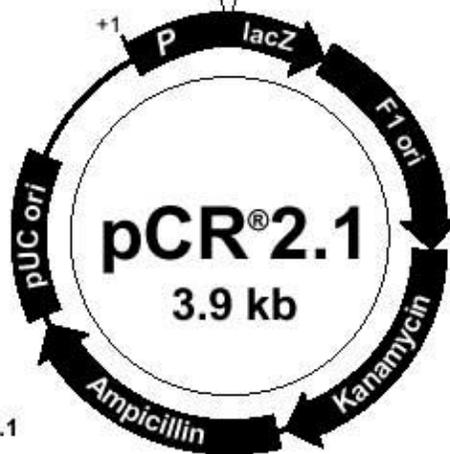
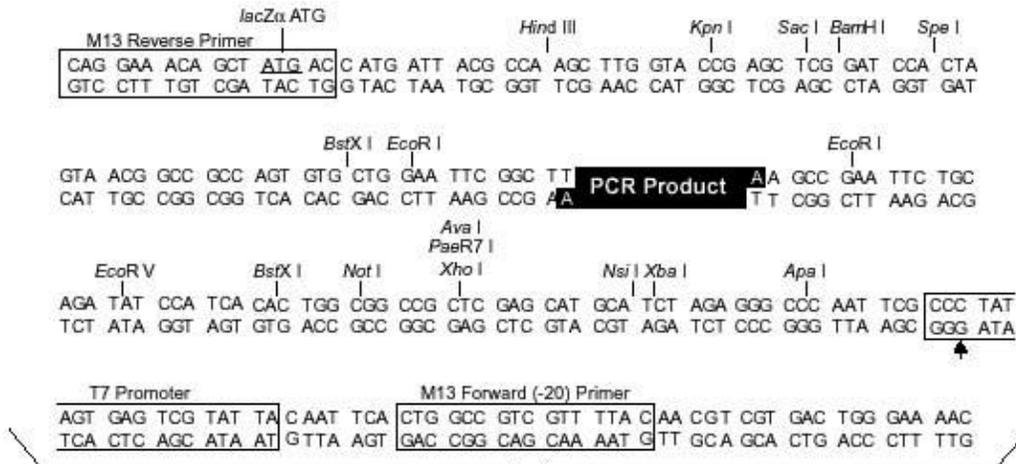
Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 72°C für 10 Minuten.

- Sequenzierungsprimer

M13 sense: 5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG-3'
M13 antisense: 5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTACG-3'

Vektorkarten

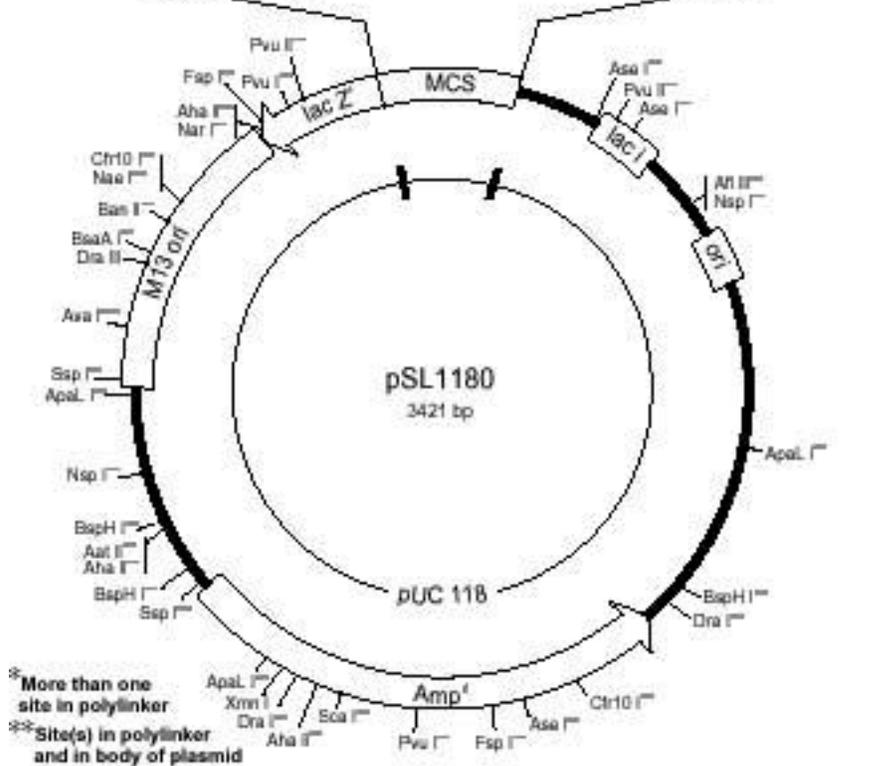
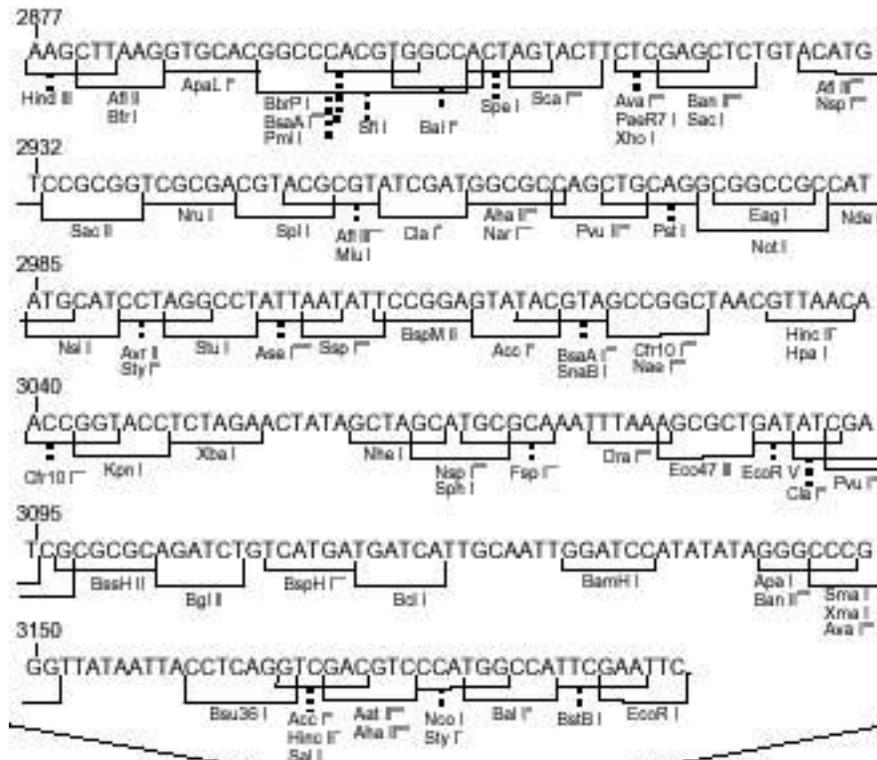
PCR2.1 Vektorkarte:



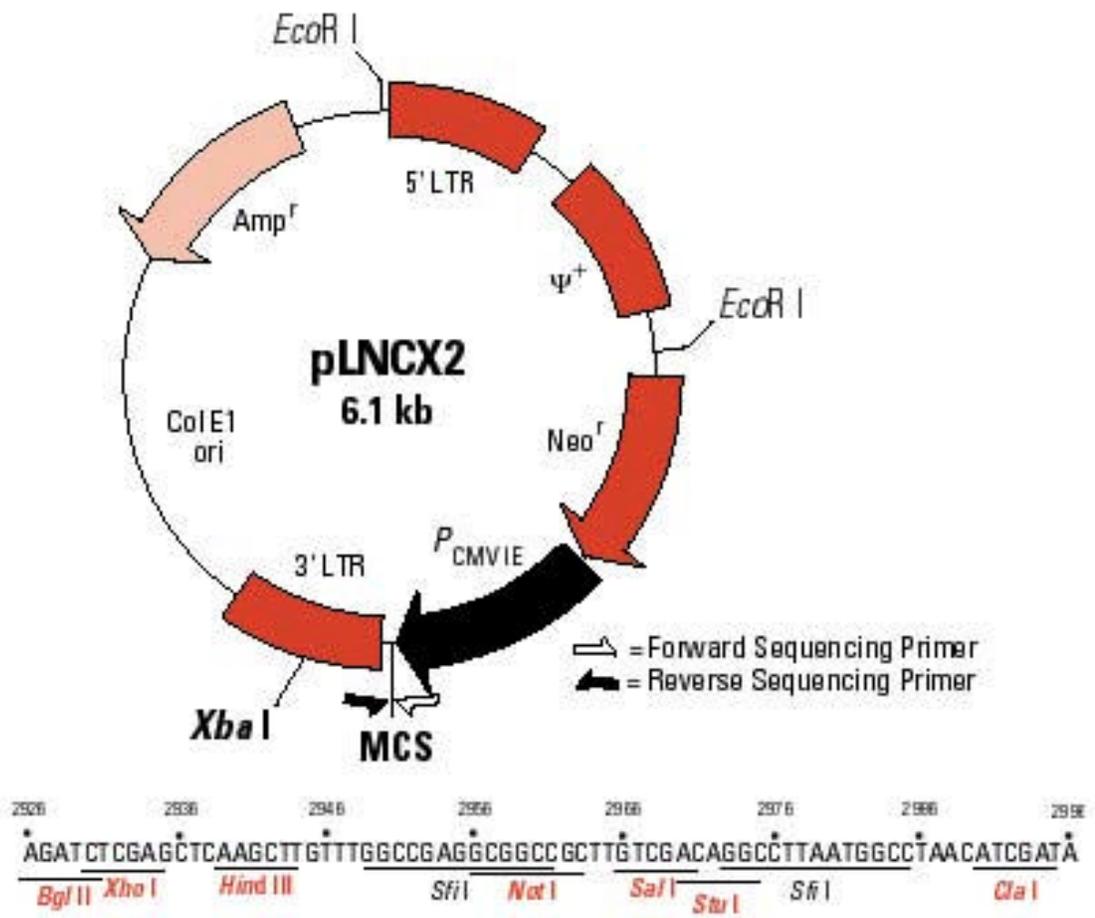
Comments for pCR[®]2.1
3929 nucleotides

LacZα gene: bases 1-545
M13 Reverse priming site: bases 205-221
T7 promoter: bases 362-381
M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
f1 origin: bases 546-983
Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
pUC origin: bases 3134-3807

PSL 1180 Vektorkarte:



PLNCX2 Vektorkarte:



RPTP ζ Primer und Spleissvarianten

Primer für Sondenherstellung spezifisch für Exon 9 Variante:

Sense Primer: 5' CAG ATG GCT ATC AAG ACT TGG 3'

Antisense Primer: 5' CTT TTA TTG GCA TGC GCT GGT 3'

Die Sondengrösse betrug 556 bp.

Primer für RT-PCR der einzelnen Spleissvarianten:

Exon 9 Variante:

Sense Primer: 5' CAG ATG GCT ATC AAG ACT TGG 3'

Antisense Primer: 5' CTT TTA TTG GCA TGC GCT GGT 3'

Exon 23 A Variante

Sense Primer: 5' AGC TAG AGA AAC AAT TCC AGC 3'

Antisense Primer: 5' GTA TAT TTG ACT GGC TCA GG 3'

Temperaturprogramm:

30 Zyklen bei:

- 94°C für 20 s
- 60°C für 20 s
- 72°C für 60 s

Klonierungsprimer für RPTP

Fragment A

Sense Primer: 5' CAG ACC GTC TGG AAA ATG CGA ATC 3'

Antisense Primer: 5' CCC TTG GTG CTA GAA ATG GAA AC 3'

Produktgrösse: 3.5 kb

Fragment B:

Sense Primer: 5' TGG CTG GGG GTG ATT TGC TAT TAG 3'

Antisense Primer 5' TCA GTT TGC CAT CCT TTT CAG C 3'

Produktgrösse 3.2 kb

Fragment C:

Sense Primer: 5' CCA CAC CTC CAA CAC CTA TCT TTC C 3'

Antisense Primer: 5' AAT TTG GCG GCA GAA TCC TAT GTC 3'

Produktgrösse 2.0kb

Sequenzen der Spleissvarianten:

Exon 9 Variante

5' UTR: 1-147

ORF: 148-1272

Alternative Spleißseite: 1262

5' UTR: 1273-3092

ORF:

5'(147)ATGCGAATCCTAAAGCGTTTCCTCGCTTGCATTCAGCTCCTCTGTGTTTGC
CGCCTGGATTGGGCTAATGGATACTACAGACAACAGAGAAAACCTTGTTGAAGAG
ATTGGCTGGTCCTATACAGGAGCACTGAATCAAAAAAATTGGGGAAAGAAATAT
CCAACATGTAATAGCCCAAACAATCTCCTATCAATATTGATGAAGATCTTACAC
AAGTAAATGTGAATCTTAAGAACTTAAATTTTCAGGGTTGGGATAAAACATCAT
TGAAAAACACATTCATTCATAACACTGGGAAAACAGTGGAAATTAATCTCTACTA
ATGACTACCGTGTGTCAGCGGAGGAGTTTCAGAAATGGTGTTTAAAGCAAGCAAGA
TAACTTTTCACTGGGGAAAATGCAATATGTCATCTGATGGATCAGAGCATAGTTT
AGAAGGACAAAAATTTCCACTTGAGATGCAAATCTACTGCTTTGATGCGGACCG
ATTTTCAAGTTTTGAGGAAGCAGTCAAAGGAAAAGGGAAGTTAAGAGCTTTATC
CATTTTGTGTTGAGGTTGGGACAGAAGAAAATTTGGATTTCAAAGCGATTATTGAT
GGAGTCGAAAGTGTTAGTCGTTTTGGGAAGCAGGCTGCTTTAGATCCATTCATAC
TGTTGAACCTTCTGCCAACTCAACTGACAAGTATTACATTTACAATGGCTCATT
GACATCTCCTCCCTGCACAGACACAGTTGACTGGATTGTTTTTAAAGATACAGTT
AGCATCTCTGAAAGCCAGTTGGCTGTTTTTTGTGAAGTTCTTACAATGCAACAAT
CTGGTTATGTCATGCTGATGGACTACTTACAAAACAATTTTCGAGAGCAACAGTA
CAAGTTCTCTAGACAGGTGTTTTCTCATACTGGAAAGGAAGAGATTCATGAA
GC 3'

Exon 23 Variante:

118 bp Insert zwischen Exon 23 und 24, Position 6228 (Accession Nummer: M93426).

5'GGTCTCACTCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAGAGGCACAATCTCGGCTCACTG
CAACCTTCCTCTCCCTGGCTTAACTGATCCTCCTACCTCAGCCTCCCGAGTGGCTG
GGACTATA 3'

Referenzen

- Abe, T., Wakimoto, H., Bookstein, R., Maneval, D.C., Chiocca, E.A. & Basilion, J.P. (2002). *Cancer Gene Ther*, **9**, 228-35.
- Adamsky, K., Schilling, J., Garwood, J., Faissner, A. & Peles, E. (2001). *Oncogene*, **20**, 609-18.
- Andersen, J.N., Mortensen, O.H., Peters, G.H., Drake, P.G., Iversen, L.F., Olsen, O.H., Jansen, P.G., Andersen, H.S., Tonks, N.K. & Moller, N.P. (2001). *Mol Cell Biol*, **21**, 7117-36.
- Barker, F.G., 2nd, Davis, R.L., Chang, S.M. & Prados, M.D. (1996). *Cancer*, **77**, 1161-6.
- Barnea, G., Silvennoinen, O., Shaanan, B., Honegger, A.M., Canoll, P.D., D'eustachio, P., Morse, B., Levy, J.B., Laforgia, S., Huebner, K. & Et Al. (1993). *Mol Cell Biol*, **13**, 1497-506.
- Berens, M.E. & Giese, A. (1999). *Neoplasia*, **1**, 208-19.
- Bhatia, P., Taylor, W.R., Greenberg, A.H. & Wright, J.A. (1994). *Anal Biochem*, **216**, 223-6.
- Bigner, D.D., Brown, M.T., Friedman, A.H., Coleman, R.E., Akabani, G., Friedman, H.S., Thorstad, W.L., Mclendon, R.E., Bigner, S.H., Zhao, X.G., Pegram, C.N., Wikstrand, C.J., Herndon, J.E., 2nd, Vick, N.A., Paleologos, N., Cokgor, I., Provenzale, J.M. & Zalutsky, M.R. (1998). *J Clin Oncol*, **16**, 2202-12.
- Bilwes, A.M., Den Hertog, J., Hunter, T. & Noel, J.P. (1996). *Nature*, **382**, 555-9.
- Bixby, J.L. (2000). *Neuroreport*, **11**, R5-10.
- Bobo, R.H., Laske, D.W., Akbasak, A., Morrison, P.F., Dedrick, R.L. & Oldfield, E.H. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2076-80.
- Boutros, M., Kiger, A.A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., Haas, S.A., Consortium, H.F., Paro, R. & Perrimon, N. (2004). *Science*, **303**, 832-5.
- Brem, S., Cotran, R. & Folkman, J. (1972). *J Natl Cancer Inst*, **48**, 347-56.
- Brown, M.T., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Mclendon, R.E., Reiman, R., Felsberg, G.J., Tien, R.D., Bigner, S.H., Zalutsky, M.R., Zhao, X.G., Wikstrand, C.J., Pegram, C.N., Herndon, J.E., 2nd, Vick, N.A., Paleologos, N., Fredericks, R.K., Schold, S.C., Jr. & Bigner, D.D. (1996). *Clin Cancer Res*, **2**, 963-72.
- Burger, P.C., Dubois, P.J., Schold, S.C., Jr., Smith, K.R., Jr., Odom, G.L., Crafts, D.C. & Giangaspero, F. (1983). *J Neurosurg*, **58**, 159-69.
- Burger, P.C., Heinz, E.R., Shibata, T. & Kleihues, P. (1988). *J Neurosurg*, **68**, 698-704.
- Butte, A. (2002). *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 951-60.
- Butte, A.J., Ye, J., Haring, H.U., Stumvoll, M., White, M.F. & Kohane, I.S. (2001). *Pac Symp Biocomput*, 6-17.
- Canoll, P.D., Barnea, G., Levy, J.B., Sap, J., Ehrlich, M., Silvennoinen, O., Schlessinger, J. & Musacchio, J.M. (1993). *Brain Res Dev Brain Res*, **75**, 293-8.

- Canoll, P.D., Petanceska, S., Schlessinger, J. & Musacchio, J.M. (1996). *J Neurosci Res*, **44**, 199-215.
- Chang, S.M., Kuhn, J. G., Ian Robins, H., Clifford Schold, S., Spence, A. M., Berger, M. S., Mehta, M. P., Pollack, I., Gilbert, M. and Prados, M. D (2003). *Invest New Drugs*, **21**, 429-33.
- Chauhan, A.K., Li, Y.S. & Deuel, T.F. (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 679-82.
- Chee, M., Yang, R., Hubbell, E., Berno, A., Huang, X.C., Stern, D., Winkler, J., Lockhart, D.J., Morris, M.S. & Fodor, S.P. (1996). *Science*, **274**, 610-4.
- Chen, Y., Kamat, V., Dougherty, E.R., Bittner, M.L., Meltzer, P.S. & Trent, J.M. (2002). *Bioinformatics*, **18**, 1207-15.
- Cokgor, I., Akabani, G., Kuan, C.T., Friedman, H.S., Friedman, A.H., Coleman, R.E., Mclendon, R.E., Bigner, S.H., Zhao, X.G., Garcia-Turner, A.M., Pegram, C.N., Wikstrand, C.J., Shafman, T.D., Herndon, J.E., 2nd, Provenzale, J.M., Zalutsky, M.R. & Bigner, D.D. (2000). *J Clin Oncol*, **18**, 3862-72.
- Davis, F.G., Kupelian, V., Freels, S., Mccarthy, B. & Surawicz, T. (2001). *Neuro-oncol*, **3**, 152-8.
- Day, E.D., Lassiter, S., Woodhall, B., Mahaley, J.L. & Mahaley, M.S., Jr. (1965). *Cancer Res*, **25**, 773-8.
- Deuel, T.F., Zhang, N., Yeh, H.J., Silos-Santiago, I. & Wang, Z.Y. (2002). *Arch Biochem Biophys*, **397**, 162-71.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. & Siebert, P.D. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6025-30.
- Dohrmann, G.J., Farwell, J.R. & Flannery, J.T. (1976). *J Neurosurg*, **44**, 442-8.
- Earnest, F.T., Kelly, P.J., Scheithauer, B.W., Kall, B.A., Cascino, T.L., Ehman, R.L., Forbes, G.S. & Axley, P.L. (1988). *Radiology*, **166**, 823-7.
- Eickhoff, B., Korn, B., Schick, M., Poustka, A. & Van Der Bosch, J. (1999). *Nucleic Acids Res*, **27**, e33.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001). *Nature*, **411**, 494-8.
- Fan, J., Tam, P., Woude, G.V. & Ren, Y. (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1135-40.
- Fang, W., Hartmann, N., Chow, D.T., Riegel, A.T. & Wellstein, A. (1992). *J Biol Chem*, **267**, 25889-97.
- Fujisawa, H., Kurrer, M., Reis, R.M., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. (1999). *Am J Pathol*, **155**, 387-94.
- Garwood, J., Heck, N., Reichardt, F. & Faissner, A. (2003). *J Biol Chem*, **278**, 24164-73.
- Gary, S.C. & Hockfield, S. (2000). *Clin Neurosurg*, **47**, 72-82.
- Giese, A. & Westphal, M. (1996). *Neurosurgery*, **39**, 235-50; discussion 250-2.
- Goetz, C., Riva, P., Poepperl, G., Gildehaus, F.J., Hischa, A., Tatsch, K. & Reulen, H.J. (2003). *J Neurooncol*, **62**, 321-8.

- Grumet, M., Milev, P., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Bourdon, M., Margolis, R.K. & Margolis, R.U. (1994). *J Biol Chem*, **269**, 12142-6.
- Haddad, S.F., Moore, S.A., Schelper, R.L. & Goeken, J.A. (1992). *J Neuropathol Exp Neurol*, **51**, 488-92.
- Hamel, W. & Westphal, M. (2003). *Acta Neurochir Suppl*, **88**, 125-35.
- Hammond, S.M., Caudy, A.A. & Hannon, G.J. (2001). *Nat Rev Genet*, **2**, 110-9.
- Harroch, S., Furtado, G.C., Brueck, W., Rosenbluth, J., Lafaille, J., Chao, M., Buxbaum, J.D. & Schlessinger, J. (2002). *Nat Genet*, **32**, 411-4.
- Harroch, S., Palmeri, M., Rosenbluth, J., Custer, A., Okigaki, M., Shrager, P., Blum, M., Buxbaum, J.D. & Schlessinger, J. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 7706-15.
- Hedrick, S.M., Cohen, D.I., Nielsen, E.A. & Davis, M.M. (1984). *Nature*, **308**, 149-53.
- Herold-Mende, C., Mueller, M.M., Bonsanto, M.M., Schmitt, H.P., Kunze, S. & Steiner, H.H. (2002). *Int J Cancer*, **98**, 362-9.
- Hooft Van Huijsduijnen, R. (1998). *Gene*, **225**, 1-8.
- Hornig, C. and Weich, H.A. (1999), *Angiogenesis* **3**:33-39
- Hsiao, L.L., Dangond, F., Yoshida, T., Hong, R., Jensen, R.V., Misra, J., Dillon, W., Lee, K.F., Clark, K.E., Haverty, P., Weng, Z., Mutter, G.L., Frosch, M.P., Macdonald, M.E., Milford, E.L., Crum, C.P., Bueno, R., Pratt, R.E., Mahadevappa, M., Warrington, J.A., Stephanopoulos, G. & Gullans, S.R. (2001). *Physiol Genomics*, **7**, 97-104.
- Huang, H., Colella, S., Kurrer, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. (2000). *Cancer Res*, **60**, 6868-74.
- Huang, S. & Houghton, P.J. (2002). *Curr Opin Investig Drugs*, **3**, 295-304.
- Ikenaka, K., Sasaki, M., Tamura, K., Tamura, M., Miyao, Y., Nanmoku, K., Kawano, Y., Nakahira, K., Yoshimine, T. & Shimizu, K. (2001). *Hum Cell*, **14**, 49-58.
- Kawachi, H., Fujikawa, A., Maeda, N. & Noda, M. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6593-8.
- Kawachi, H., Tamura, H., Watakabe, I., Shintani, T., Maeda, N. & Noda, M. (1999). *Brain Res Mol Brain Res*, **72**, 47-54.
- Kim, C.H., Bak, K.H., Kim, Y.S., Kim, J.M., Ko, Y., Oh, S.J., Kim, K.M. & Hong, E.K. (2000). *Surg Neurol*, **54**, 235-40.
- Kirsch, M., Heese, O., Westphal, M. & Schackert, G. (2003). *Acta Neurochir Suppl*, **88**, 143-51.
- Kleihues, P. & Ohgaki, H. (1999). *Neuro-oncol*, **1**, 44-51.
- Kleihues, P. & Ohgaki, H. (2000). *Toxicol Pathol*, **28**, 164-70.
- Kohler, G. & Milstein, C. (1975). *Nature*, **256**, 495-7.
- Kroll, T.C. & Wolfl, S. (2002). *Nucleic Acids Res*, **30**, e50.
- Krueger, N.X. & Saito, H. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7417-21.

- Kunkel, P., Ulbricht, U., Bohlen, P., Brockmann, M.A., Fillbrandt, R., Stavrou, D., Westphal, M. & Lamszus, K. (2001). *Cancer Res*, **61**, 6624-8.
- Kuo, W.P., Jenssen, T.K., Butte, A.J., Ohno-Machado, L. & Kohane, I.S. (2002). *Bioinformatics*, **18**, 405-12.
- Kurpad, S.N., Zhao, X.G., Wikstrand, C.J., Batra, S.K., McLendon, R.E. & Bigner, D.D. (1995). *Glia*, **15**, 244-56.
- Kurtz, A., Schulte, A.M. & Wellstein, A. (1995). *Crit Rev Oncog*, **6**, 151-77.
- Lakka, S.S., Jasti, S.L., Gondi, C., Boyd, D., Chandrasekar, N., Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M. & Rao, J.S. (2002a). *Oncogene*, **21**, 5601-8.
- Lakka, S.S., Rajan, M., Gondi, C., Yanamandra, N., Chandrasekar, N., Jasti, S.L., Adachi, Y., Siddique, K., Gujrati, M., Olivero, W., Dinh, D.H., Kouraklis, G., Kyritsis, A.P. & Rao, J.S. (2002b). *Oncogene*, **21**, 8011-9.
- Lamszus, K., Kunkel, P. & Westphal, M. (2003). *Acta Neurochir Suppl*, **88**, 169-77.
- Lamszus, K., Ulbricht, U., Matschke, J., Brockmann, M.A., Fillbrandt, R. and Westphal, M. (2003b). *Clinical Cancer Research*, **9**, 1399-1405.
- Laske, D.W., Youle, R.J. & Oldfield, E.H. (1997). *Nat Med*, **3**, 1362-8.
- Laws, E.R., Parney, I.F., Huang, W., Anderson, F., Morris, A.M., Asher, A., Lillehei, K.O., Bernstein, M., Brem, H., Sloan, A., Berger, M.S. & Chang, S. (2003). *J Neurosurg*, **99**, 467-73.
- Leung, Y.F. & Cavalieri, D. (2003). *Trends Genet*, **19**, 649-59.
- Levy, J.B., Canoll, P.D., Silvennoinen, O., Barnea, G., Morse, B., Honegger, A.M., Huang, J.T., Cannizzaro, L.A., Park, S.H., Druck, T. & Et Al. (1993). *J Biol Chem*, **268**, 10573-81.
- Liang, P. & Pardee, A.B. (2003). *Nat Rev Cancer*, **3**, 869-76.
- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1985a). *J Cell Sci Suppl*, **3**, 161-72.
- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1985b). *Nature*, **313**, 144-7.
- Ling, Y.H., Liebes, L., Jiang, J.D., Holland, J.F., Elliott, P.J., Adams, J., Muggia, F.M. & Perez-Soler, R. (2003). *Clin Cancer Res*, **9**, 1145-54.
- Lorimer, I.A., Keppler-Hafkemeyer, A., Beers, R.A., Pegram, C.N., Bigner, D.D. & Pastan, I. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14815-20.
- Luo, J., Isaacs, W.B., Trent, J.M. & Duggan, D.J. (2003). *Cancer Invest*, **21**, 937-49.
- Maeda, N., Hamanaka, H., Oohira, A. & Noda, M. (1995). *Neuroscience*, **67**, 23-35.
- Maeda, N. & Noda, M. (1998). *J Cell Biol*, **142**, 203-16.
- Mahaley, M.S., Jr. (1971). *J Neurosurg*, **34**, 458-9.
- Mahaley, M.S., Jr. & Day, E.D. (1965). *J Neurosurg*, **23**, 363-70.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Jr., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tainsky, M.A. & Et Al. (1990). *Science*, **250**, 1233-8.

- Mariani, L., Beaudry, C., Mcdonough, W.S., Hoelzinger, D.B., Demuth, T., Ross, K.R., Berens, T., Coons, S.W., Watts, G., Trent, J.M., Wei, J.S., Giese, A. & Berens, M.E. (2001a). *J Neurooncol*, **53**, 161-76.
- Mariani, L., Mcdonough, W.S., Hoelzinger, D.B., Beaudry, C., Kaczmarek, E., Coons, S.W., Giese, A., Moghaddam, M., Seiler, R.W. & Berens, M.E. (2001b). *Cancer Res*, **61**, 4190-6.
- Matsukado, Y., Maccarty, C.S. & Kernohan, J.W. (1961). *J Neurosurg*, **18**, 636-44.
- Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M. & Deuel, T.F. (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2603-8.
- Merchant, R.E., Ellison, M.D. & Young, H.F. (1990). *J Neurooncol*, **8**, 173-88.
- Merlo, A., Mueller-Brand, J. & Maecke, H.R. (2003). *Acta Neurochir Suppl*, **88**, 83-91.
- Milev, P., Chiba, A., Haring, M., Rauvala, H., Schachner, M., Ranscht, B., Margolis, R.K. & Margolis, R.U. (1998a). *J Biol Chem*, **273**, 6998-7005.
- Milev, P., Friedlander, D.R., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Flad, M., Margolis, R.K., Grumet, M. & Margolis, R.U. (1994). *J Cell Biol*, **127**, 1703-15.
- Milev, P., Monnerie, H., Popp, S., Margolis, R.K. & Margolis, R.U. (1998b). *J Biol Chem*, **273**, 21439-42.
- Milner, P.G., Li, Y.S., Hoffman, R.M., Kodner, C.M., Siegel, N.R. & Deuel, T.F. (1989). *Biochem Biophys Res Commun*, **165**, 1096-103.
- Mischel, P.S., Shai, R., Shi, T., Horvath, S., Lu, K.V., Choe, G., Seligson, D., Kremen, T.J., Palotie, A., Liau, L.M., Cloughesy, T.F. & Nelson, S.F. (2003). *Oncogene*, **22**, 2361-73.
- Mishima, K., Johns, T.G., Luwor, R.B., Scott, A.M., Stockert, E., Jungbluth, A.A., Ji, X.D., Suvarna, P., Volland, J.R., Old, L.J., Huang, H.J. & Cavenee, W.K. (2001). *Cancer Res*, **61**, 5349-54.
- Munroe, D.J., Loebbert, R., Bric, E., Whitton, T., Prawitt, D., Vu, D., Buckler, A., Winterpacht, A., Zabel, B. & Housman, D.E. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2209-13.
- Muramatsu, T. (2002). *J Biochem (Tokyo)*, **132**, 359-71.
- Nanda, D., Driesse, M.J. & Sillevs Smitt, P.A. (2001). *Prog Brain Res*, **132**, 699-710.
- Nelson, N.J. (2001). *J Natl Cancer Inst*, **93**, 493.
- Oz, B., Karayel, F.A., Gazio, N.L., Ozlen, F. & Balci, K. (2000). *Pathol Oncol Res*, **6**, 118-24.
- Packer, R.J. & Vezina, G. (1994). *Semin Oncol*, **21**, 260-72.
- Papanastassiou, V., Pizer, B.L., Coakham, H.B., Bullimore, J., Zananiri, T. & Kemshead, J.T. (1993). *Br J Cancer*, **67**, 144-51.
- Pardridge, W.M. (2002). *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 131-9.
- Peles, E., Nativ, M., Campbell, P.L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D.O., Schilling, J., Barnea, G., Plowman, G.D. & Et Al. (1995). *Cell*, **82**, 251-60.

- Pfaffl, M.W. (2001). *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Pollack, I.F. (1994). *N Engl J Med*, **331**, 1500-7.
- Powers, C., Aigner, A., Stoica, G.E., McDonnell, K. & Wellstein, A. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 14153-8.
- Pressman, D., Day, E.D. & Blau, M. (1957). *Cancer Res*, **17**, 845-50.
- Quackenbush, J. (2002). *Nat Genet*, **32 Suppl**, 496-501.
- Ramaswamy, S. & Golub, T.R. (2002). *J Clin Oncol*, **20**, 1932-41.
- Ratcliffe, C.F., Qu, Y., McCormick, K.A., Tibbs, V.C., Dixon, J.E., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (2000). *Nat Neurosci*, **3**, 437-44.
- Rauvala, H. (1989). *Embo J*, **8**, 2933-41.
- Ravic, M. (2003). *Acta Neurochir Suppl*, **88**, 77-82.
- Reardon, D.A., Akabani, G., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Herndon, J.E., 2nd, Cokgor, I., Mclendon, R.E., Pegram, C.N., Provenzale, J.M., Quinn, J.A., Rich, J.N., Regalado, L.V., Sampson, J.H., Shafman, T.D., Wikstrand, C.J., Wong, T.Z., Zhao, X.G., Zalutsky, M.R. & Bigner, D.D. (2002). *J Clin Oncol*, **20**, 1389-97.
- Rich, J.N., Reardon, D.A., Peery, T., Dowell, J.M., Quinn, J.A., Penne, K.L., Wikstrand, C.J., Van Duyn, L.B., Dancey, J.E., Mclendon, R.E., Kao, J.C., Stenzel, T.T., Ahmed Rasheed, B.K., Tourt-Uhlig, S.E., Herndon, J.E., 2nd, Vredenburgh, J.J., Sampson, J.H., Friedman, A.H., Bigner, D.D. & Friedman, H.S. (2004). *J Clin Oncol*, **22**, 133-42.
- Riva, P., Franceschi, G., Arista, A., Frattarelli, M., Riva, N., Cremonini, A.M., Giuliani, G. & Casi, M. (1997). *Cancer*, **80**, 2733-42.
- Rosser, T. & Packer, R.J. (2002). *J Child Neurol*, **17**, 630-7; discussion 646-51.
- Sampson, J.H., Crotty, L.E., Lee, S., Archer, G.E., Ashley, D.M., Wikstrand, C.J., Hale, L.P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A.H., Friedman, H.S. & Bigner, D.D. (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7503-8.
- Sandmair, A.M., Loimas, S., Puranen, P., Immonen, A., Kossila, M., Puranen, M., Hurskainen, H., Tyynela, K., Turunen, M., Vanninen, R., Lehtolainen, P., Paljarvi, L., Johansson, R., Vapalahti, M. & Yla-Herttuala, S. (2000a). *Hum Gene Ther*, **11**, 2197-205.
- Sandmair, A.M., Turunen, M., Tyynela, K., Loimas, S., Vainio, P., Vanninen, R., Vapalahti, M., Bjerkvig, R., Janne, J. & Yla-Herttuala, S. (2000b). *Cancer Gene Ther*, **7**, 413-21.
- Savonet, V., Maenhaut, C., Miot, F. & Pirson, I. (1997). *Anal Biochem*, **247**, 165-7.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. & Brown, P.O. (1995). *Science*, **270**, 467-70.
- Shai, R., Shi, T., Kremen, T.J., Horvath, S., Liau, L.M., Cloughesy, T.F., Mischel, P.S. & Nelson, S.F. (2003). *Oncogene*, **22**, 4918-23.
- Shepherd, C.W., Gomez, M.R., Lie, J.T. & Crowson, C.S. (1991). *Mayo Clin Proc*, **66**, 792-6.

- Silos-Santiago, I., Yeh, H.J., Gurrieri, M.A., Guillerman, R.P., Li, Y.S., Wolf, J., Snider, W. & Deuel, T.F. (1996). *J Neurobiol*, **31**, 283-96.
- Souttou, B., Juhl, H., Hackenbruck, J., Rockseisen, M., Klomp, H.J., Raulais, D., Vigny, M. & Wellstein, A. (1998). *J Natl Cancer Inst*, **90**, 1468-73.
- Staudt, L.M. & Brown, P.O. (2000). *Annu Rev Immunol*, **18**, 829-59.
- Stoica, G.E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D.J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A.T. & Wellstein, A. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 16772-9.
- Therianos, S., Zhu, M., Pyun, E. & Coleman, P.D. (2004). *Am J Pathol*, **164**, 795-806.
- Thomaidou, D., Coquillat, D., Meintanis, S., Noda, M., Rougon, G. & Matsas, R. (2001). *J Neurochem*, **78**, 767-78.
- Tonks, N.K., Charbonneau, H., Diltz, C.D., Fischer, E.H. & Walsh, K.A. (1988). *Biochemistry*, **27**, 8695-701.
- Ulbricht, U., Brockmann, M.A., Aigner, A., Eckerich, C., Muller, S., Fillbrandt, R., Westphal, M. & Lamszus, K. (2003). *J Neuropathol Exp Neurol*, **62**, 1265-75.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., Mckusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., et al. (2001). *Science*, **291**, 1304-51.
- Voorhees, P.M., Dees, E.C., O'neil, B. & Orlowski, R.Z. (2003). *Clin Cancer Res*, **9**, 6316-25.
- Walker, M.D., Green, S.B., Byar, D.P., Alexander, E., Jr., Batzdorf, U., Brooks, W.H., Hunt, W.E., Maccarty, C.S., Mahaley, M.S., Jr., Mealey, J., Jr., Owens, G., Ransohoff, J., 2nd, Robertson, J.T., Shapiro, W.R., Smith, K.R., Jr., Wilson, C.B. & Strike, T.A. (1980). *N Engl J Med*, **303**, 1323-9.
- Watson, J.D. & Crick, F.H. (1953). *Nature*, **171**, 737-8.

- Weber, D., Klomp, H.J., Czubayko, F., Wellstein, A. & Juhl, H. (2000). *Cancer Res*, **60**, 5284-8.
- Wellstein, A., Fang, W.J., Khatri, A., Lu, Y., Swain, S.S., Dickson, R.B., Sasse, J., Riegel, A.T. & Lippman, M.E. (1992). *J Biol Chem*, **267**, 2582-7.
- Westphal, M., Hansel, M., Hamel, W., Kunzmann, R. & Holzel, F. (1994). *Acta Neurochir*, **126**, 17-26.
- Westphal, M., Hilt, D.C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P.C., Whittle, I.R., Jaaskelainen, J. & Ram, Z. (2003). *Neuro-oncol*, **5**, 79-88.
- Yamanaka, R., Zullo, S.A., Ramsey, J., Onodera, M., Tanaka, R., Blaese, M. & Xanthopoulos, K.G. (2001). *Cancer Gene Ther*, **8**, 796-802.
- Yang, I.V., Chen, E., Hasseman, J.P., Liang, W., Frank, B.C., Wang, S., Sharov, V., Saeed, A.I., White, J., Li, J., Lee, N.H., Yeatman, T.J. & Quackenbush, J. (2002). *Genome Biol*, **3**, research0062.
- Yates, J., 3rd & Snyder, M. (2004). *Curr Opin Chem Biol*, **8**, 1-2.
- Yeh, H.J., He, Y.Y., Xu, J., Hsu, C.Y. & Deuel, T.F. (1998). *J Neurosci*, **18**, 3699-707.
- Zalutsky, M.R., Archer, G.E., Garg, P.K., Batra, S.K. & Bigner, D.D. (1996). *Nucl Med Biol*, **23**, 449-58.
- Zalutsky, M.R., Moseley, R.P., Benjamin, J.C., Colapinto, E.V., Fuller, G.N., Coakham, H.P. & Bigner, D.D. (1990). *Cancer Res*, **50**, 4105-10.
- Zalutsky, M.R., Zhao, X.G., Alston, K.L. & Bigner, D. (2001). *J Nucl Med*, **42**, 1508-15.
- Zardi, L., Carnemolla, B., Siri, A., Petersen, T.E., Paoletta, G., Sebastio, G. & Baralle, F.E. (1987). *Embo J*, **6**, 2337-42.
- Zhang, H., Kelly, G., Zerillo, C., Jaworski, D.M. & Hockfield, S. (1998). *J Neurosci*, **18**, 2370-6.
- Zimmermann, C.R., Orr, W.C., Leclerc, R.F., Barnard, E.C. & Timberlake, W.E. (1980). *Cell*, **21**, 709-15.

Danksagung

Prof. Dr. Manfred Westphal gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit. Ich danke ihm für seine Unterstützung dieses Projektes und dass er mir ermöglichte, diese Arbeit in Zusammenarbeit mit AGY Therapeutics, durchzuführen.

Des weiteren möchte ich mich herzlichst für die zahlreichen Gespräche und Diskussionen bedanken, die nicht nur wissenschaftlich von großer Bedeutung für mich sind.

Herrn Prof. Wolfgang Deppert danke ich für die Betreuung meiner Dr. Arbeit.

Dr. Karoly Nikolich danke ich für die Unterstützung des Projektes bei AGY Therapeutics.

Dan Chin und Scott Lohr danke ich sehr für Ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Arrayergebnisse.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Philip Kunkel und Gustavo Lorente, die mich wissenschaftlich und persönlich sehr unterstützt haben und mir in der ganzen Zeit eine große Hilfe waren.

Dr. Katrin Lamszus und Dr. Ulrike Ulbricht danke ich für die Unterstützung beim immunhistochemischen Nachweis und Northern Blot Analysen von RPTP .

Allen Mitgliedern von AGY Therapeutics gilt mein Dank, dass Sie mir eine unvergessliche Zeit geschaffen haben.

Dr. Katrin Lamszus, Dr. David von Schack, Scott Lohr und Prof. Dr. Manfred Westphal danke ich sehr für Ihre Hilfe bei der Publikation dieser Ergebnisse.

Dr. Dirk van den Boom danke ich für seine Freundschaft und Unterstützung.

Special thanks to my husband Chris for all his support, trust and patience.

“Everybody who lives within their means suffers a lack of imagination”

Lebenslauf

Name:	Sabine Müller
Geburtsdatum, -ort:	6.August, 1971, Laupheim
Nationalität:	deutsch
Anschrift:	56 Linden Street, Brookline, MA 02445, USA

09/1981 - 06/1990	Gymnasium Laupheim, Valckenburgschule Ulm Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife (Note 1.1)
10/1990 - 05/1992	Vordiplom in Biotechnologie, Universität Braunschweig (Gesamynote: 1.2)
11/1992 – 10/1994	Studium der Biochemie, Universität Hamburg
11/1994 - 08/1995 Sep.20, 1995	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Dr. Vogel, Fachbereich Chemie Diplomprüfungen in Biochemie, Biotechnologie and Immunologie (Gesamtnote: 1.0)
10/1995-12/1995	Praktikum im Seattle Medical Center
01/1996-02/1996	Praktikum im Tabea Krankenhaus, Hamburg
04/1996- 10/03	Studium der Medizin, Universität Hamburg
9/97-6/99	Mitglied des Graduiertenkolleegs " <i>Neuronale Signal - transduktion und deren pathologische Störungen</i> " des Zentrums für molekulare Neurobiologie, Hamburg. Wissenschaftliche Arbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Westphal.
September 1997	Physikum (Gesamtnote 2.0)
August 1998	1. Staatsexamen Medizin (Gesamtnote 2.0)
September 2002	2. Staatsexamen (Gesamtnote 1.66)
November 2003	Abschluss der Studiums der Medizin (Gesamtnote sehr gut).
2001-2004	Promotion betreut von Prof. Dr. Westpahl und Prof. Dr. Deppert in Zusammenarbeit mit AGY Therapeutics, South SF, CA.
Juni, 2004	Harvard Medical School, Department of Pediatric Neurology.

Publikationen

Lorente, G., Nelson, A., **Müller, S.**, Kuo, J., Urfer, R., Nikolich, K., Foehr, E.D.
Functional comparison of RPTPb long and short receptor splice forms: Implications for
glioblastoma treatment. (in review, J. Neurooncology).

Müller S, Lamszus K, Nikolich K and Westphal M. (2004). RPTP as a Therapeutic Target
for Glioblastoma therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (2004), Vol. **8**(3).

Müller, S., Kunkel, P., Lamszus, K., Ulbricht, U., Lorente, G. A., Nelson, A. M., von Schack, D., Chin, D. J., Lohr, S. C., Westphal, M. and Melcher, T. (2003). A role for receptor tyrosine phosphatase in glioma cell migration. *Oncogene*, **22**, 6661-8.

Ulbricht, U., Brockmann, M.A., Aigner, A., Eckerich, C., **Müller, S.**, Fillbrandt, R., Westphal, M. & Lamszus, K. (2003). Expression and function of the receptor protein tyrosine phosphatase and its ligand pleiotropin in human astrocytomas *J Neuropathol Exp Neurol*, **62**, 1265-75.

Kunkel, P., **Müller, S.**, Schirmacher, P., Stavrou, D., Fillbrandt, R., Westphal, M., and Lamszus, K. (2001). Expression and localization of scatter factor/hepatocyte growth factor in human astrocytomas. *Neuro-oncol* **3**, 82-8.

Müller, S., van den Boom, D., Zirkel, D., Koster, H., Berthold, F., Schwab, M., Westphal, M., and Zumkeller, W. (2000). Retention of imprinting of the human apoptosis-related gene TSSC3 in human brain tumors. *Hum Mol Genet* **9**, 757-63.

Müller, S., Zirkel, D., Westphal, M., and Zumkeller, W. (2000). Genomic imprinting of IGF2 and H19 in human meningiomas. *Eur J Cancer* **36**, 651-5.

Wang, Y., Hagel, C., Hamel, W., **Müller, S.**, Kluwe, L., and Westphal, M. (1998). Trk A, B, and C are commonly expressed in human astrocytes and astrocytic gliomas but not by human oligodendrocytes and oligodendroglioma. *Acta Neuropathol (Berl)* **96**, 357-64.

Patente

Use of Protein tyrosine phosphatase as a biomolecular target in the treatment and visualization of brain tumors (No. 09/816,703)

Use of protein biomolecular targets in the treatment and visualization of brain tumors (No. 10/328.544)

Use of protein biomolecular targets in the treatment and visualization of brain tumors (No. 10/329528)