



**Der Cofilin-Signalweg im Glioblastoma multiforme -
Ursachen für den Verlust von Chronophin und Einfluss von LIM-Kinase-Inhibitoren**

**The cofilin pathway in glioblastoma multiforme -
Reasons for chronophin loss and effect of LIM-kinase inhibitors**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Thomas Gerd Zink (geb. Sondergeld)

aus Bad Hersfeld

Würzburg, 2015



Eingereicht am: 15. September 2015
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: Prof. Dr. Antje Gohla

2. Betreuer: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

3. Betreuer: Prof. Dr. Stefan Gaubatz

4. Betreuer: Dr. Camelia-Maria Monoranu

Tag des Promotionskolloquiums: 28. Januar 2016

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Der Promovend ist Arzt

Für Miriam, Heike und Michael

<< Wege entstehen dadurch, dass man sie geht. >>

Franz Kafka

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das Glioblastoma multiforme und der Cofilin-Signalweg	1
1.1.1	Systematik und Ätiologie maligner Gliome	1
1.1.2	Klinik, Diagnostik und Therapie maligner Gliome	2
1.1.3	Molekulare Charakteristika von Glioblastomen	6
1.1.4	Das Aktin-Zytoskelett und seine Regulatorproteine: Motor für Zellmigration und -invasion	10
1.1.5	Der Cofilin-Signalweg und seine Akteure	12
1.2	Chronophin: Welche Ursachen führen zum Verlust in Glioblastomen ?	15
1.2.1	Chronophin: Struktur, Regulation und Bedeutung	15
1.2.2	Mechanismen der Geninaktivierung: Genetische und epigenetische Alterationen	18
1.2.3	Grundlagen epigenetischer Alterationen	19
1.2.4	Epigenetische Charakteristika maligner Gliome	21
1.2.5	Epigenetische Alterationen: Neue Biomarker und pharmakologische Angriffspunkte in der Diagnostik und Therapie maligner Gliome ?	23
1.3	LIM-Kinasen: Neue Angriffspunkte in der Therapie maligner Gliome ?	25
1.3.1	Rho-GTPasen und ihre Effektormoleküle: Regulatoren von Zellmorphologie und -motilität	25
1.3.2	LIM-Kinasen: Struktur, Regulation und Bedeutung	27
1.3.3	LIMK- und ROCK-Inhibitoren: Struktur, Wirkung und Bedeutung	28
2.	ZIELE DER ARBEIT	31
3.	MATERIALIEN	33
3.1	Hersteller- und Händlerliste	33
3.2	Chemikalien	35
3.3	Zellkultur	37
3.3.1	Zelllinien	37
3.3.2	Zellkulturmedien, Zusätze und Materialien	37

3.4	Western Blot Analyse	37
3.5	Immunhistochemie	38
3.6	Sequenzierung des Chronophin-Locus	38
3.7	Analyse des Promotor-Methylierungsstatus von Chronophin	39
3.8	<i>Loss of heterozygosity</i>-Analyse	39
3.9	Inhibitor-Versuche	40
3.9.1	Verwendete Inhibitoren	40
3.9.2	Neutralrot-Test	40
3.9.3	Immunzytochemie	40
3.9.4	2D-Zellmigrations-Versuch	40
3.9.5	3D-Zellinvasions-Versuch	40
3.10	Enzyme und Vektoren	41
3.11	Primer	41
3.12	Primärantikörperliste	42
3.13	Andere Materialien	42
3.14	Geräte	43
3.14.1	Zellkultur	43
3.14.2	Western Blot Analyse	43
3.14.3	Photometer	43
3.14.4	Thermocycler	43
3.14.5	Immunhistochemie	44
3.14.6	Waagen	44
3.14.7	Zentrifugen	44
3.14.8	Mikroskope	44
3.14.9	Sonstiges	45
3.15	Software und Datenbanken	45
3.16	Lösungen und Puffer	46
3.16.1	Zellkultur	46
3.16.2	(Mn ²⁺ -Phos-tag TM)-SDS-PAGE zur Proteinauftrennung	46
3.16.3	Western Blot	47
3.16.4	Immunhistochemie	49

3.16.5	Agarose-Gelelektrophorese	50
3.16.6	Herstellung kompetenter Zellen, Transformation und Selektionsstrategien	50
3.16.7	Präparation von Plasmid-DNA	51
3.16.8	<i>Loss of heterozygosity</i> -Analyse	51
3.16.9	Inhibitor-Versuche	52
3.16.10	Sonstiges	52
4.	METHODEN	53
4.1	Zellkultur	53
4.1.1	Zelllinien	53
4.1.2	Kultivierung von Monolayerkulturen	54
4.1.3	Passagieren von Zellen	54
4.1.4	Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer	54
4.1.5	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	55
4.1.6	Mykoplasmandetektion mittels PCR	55
4.2	Western Blot Analyse	57
4.2.1	Proteinlysate aus Zellkultur	57
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	57
4.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Mn ²⁺ -Phos-tag TM -SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Proteinauftrennung	58
4.2.4	Western Blot	58
4.2.5	Stripping von Western Blot Membranen	59
4.3	Immunhistochemie	60
4.3.1	Methode	60
4.3.2	Auswahl und Vorbereitung der Präparate	60
4.3.3	Reevaluation der Tumorproben	61
4.3.4	Optimierung der Färbeprotokolle	61
4.3.5	Durchführung der Immunfärbung	62
4.3.6	Histologische Auswertung	63

4.4	Sequenzierung des Chronophin-Locus	64
4.4.1	Verwendete Proben	64
4.4.2	Aufreinigung von genomischer DNA aus Zellkulturen und kryokonservierten Gewebeproben	64
4.4.3	Polymerase-Kettenreaktion	65
4.4.3.1	Methode	65
4.4.3.2	Primer-Design	65
4.4.3.3	Optimierung der Polymerase-Kettenreaktion	67
4.4.3.4	Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion	69
4.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	70
4.4.5	Gelelution von Nukleinsäuren	71
4.4.6	3'-Adenylierung von PCR-Produkten	71
4.4.7	Ligation der PCR-Produkte	72
4.4.8	Herstellung kompetenter Zellen	73
4.4.9	Transformation und Selektionsstrategien	74
4.4.10	Präparation von Plasmid-DNA	77
4.4.11	Restriktionsanalyse mit EcoRI	77
4.4.12	DNA-Sequenzierung	79
4.5	Analyse des Promotor-Methylierungsstatus von Chronophin	80
4.5.1	Verwendete Proben	80
4.5.2	Aufreinigung von genomischer DNA aus Zellkulturen und FFPE-Proben	80
4.5.3	Grundlagen der DNA-Methylierungsanalyse	80
4.5.4	Methylierungsabhängiger Restriktionsverdau	83
4.5.4.1	Methode	83
4.5.4.2	Durchführung	84
4.5.5	Quantitative Real-Time-PCR	84
4.5.5.1	Methode	84
4.5.5.2	Durchführung und Auswertung	85
4.6	<i>Loss of heterozygosity</i>-Analyse	87
4.6.1	Verwendete Proben	87
4.6.2	Aufreinigung von genomischer DNA aus Blutproben	87

4.6.3	PCR-basierte Mikrosatellitenanalyse	87
4.6.3.1	Methode	87
4.6.3.2	Identifikation eines Mikrosatellitenmarkers	88
4.6.3.3	Amplifikation des Mikrosatellitenmarkers mittels PCR	88
4.6.3.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	89
4.7	Inhibitor-Versuche	91
4.7.1	Verwendete Inhibitoren	91
4.7.2	Vorbereitung der Inhibitoren	92
4.7.3	Neutralrot-Test	93
4.7.4	Western Blot nach Inhibitorbehandlung	94
4.7.5	Immunzytochemie	94
4.7.5.1	Methode	94
4.7.5.2	Durchführung und Auswertung	95
4.7.6	2D-Zellmigrations-Versuch	96
4.7.6.1	Methode	96
4.7.6.2	Durchführung und Auswertung	96
4.7.7	3D-Zellinvasions-Versuch	97
4.7.7.1	Methode	97
4.7.7.2	Durchführung und Auswertung	98
4.8	Statistische Auswertung	99
5.	ERGEBNISSE	100
5.1	Chronophin-Expression und Cofilin-Phosphorylierung in humanen Glioblastom-Zelllinien	100
5.2	Expression von Cofilin, Chronophin und LIMK-2 in Glioblastom-Gewebeproben	103
5.2.1	Lokalisation und Verteilung der Antigene in Normal- und Tumorgewebe	103
5.2.1.1	Chronophin	105
5.2.1.2	Cofilin-1	109
5.2.1.3	Phospho-Cofilin	112
5.2.1.4	LIM-Kinase-2	114

5.2.2	Semi-quantitative Expressionsanalyse	117
5.2.3	Cofilin, Chronophin und LIMK-2 in perivaskulären, Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten	124
5.3	Ursachen für den Verlust von Chronophin in Glioblastomen	127
5.3.1	Sequenzierung des Chronophin-Locus in humanen Glioblastom-Zelllinien und -Gewebeproben	128
5.3.2	Analyse des Promotor-Methylierungsstatus von Chronophin in humanen Glioblastom-Zelllinien und -Gewebeproben	133
5.3.3	Vorstudie zur <i>Loss of heterozygosity</i> -Analyse des Chronophin-Locus	141
5.4	Einfluss von LIM-Kinase-Inhibitoren auf Glioblastomzellen	144
5.4.1	Zellviabilität unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren	144
5.4.2	Phosphorylierung von Cofilin und Myosin-Leicht-Ketten unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren	146
5.4.3	Zellmorphologie unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren	149
5.4.4	Migration und Invasion unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren	155
5.4.4.1	2D-Zellmigration unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren	155
5.4.4.2	3D-Zellinvasion unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren	158
5.4.5	Zusammenfassung: Einfluss von ROCK- und LIMK-Inhibitoren auf Glioblastomzellen	162
6.	DISKUSSION	163
6.1	Der Cofilin-Signalweg in astrozytären Gliomen	163
6.2	Chronophin: Welche Ursachen führen zum Verlust in Glioblastomen ?	167
6.3	LIM-Kinasen: Neue Angriffspunkte in der Therapie maligner Gliome ?	171
7.	ZUSAMMENFASSUNG	179
8.	SUMMARY	180
9.	ABKÜRZUNGEN	181

10. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	187
10.1 Tabellen	187
10.2 Abbildungen	188
11. LITERATURVERZEICHNIS	192
DANKSAGUNG	
CURRICULUM VITAE / PUBLIKATIONEN	
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG / AFFIDAVIT	

1. EINLEITUNG

1.1 Das Glioblastoma multiforme und der Cofilin-Signalweg

1.1.1 Systematik und Ätiologie maligner Gliome

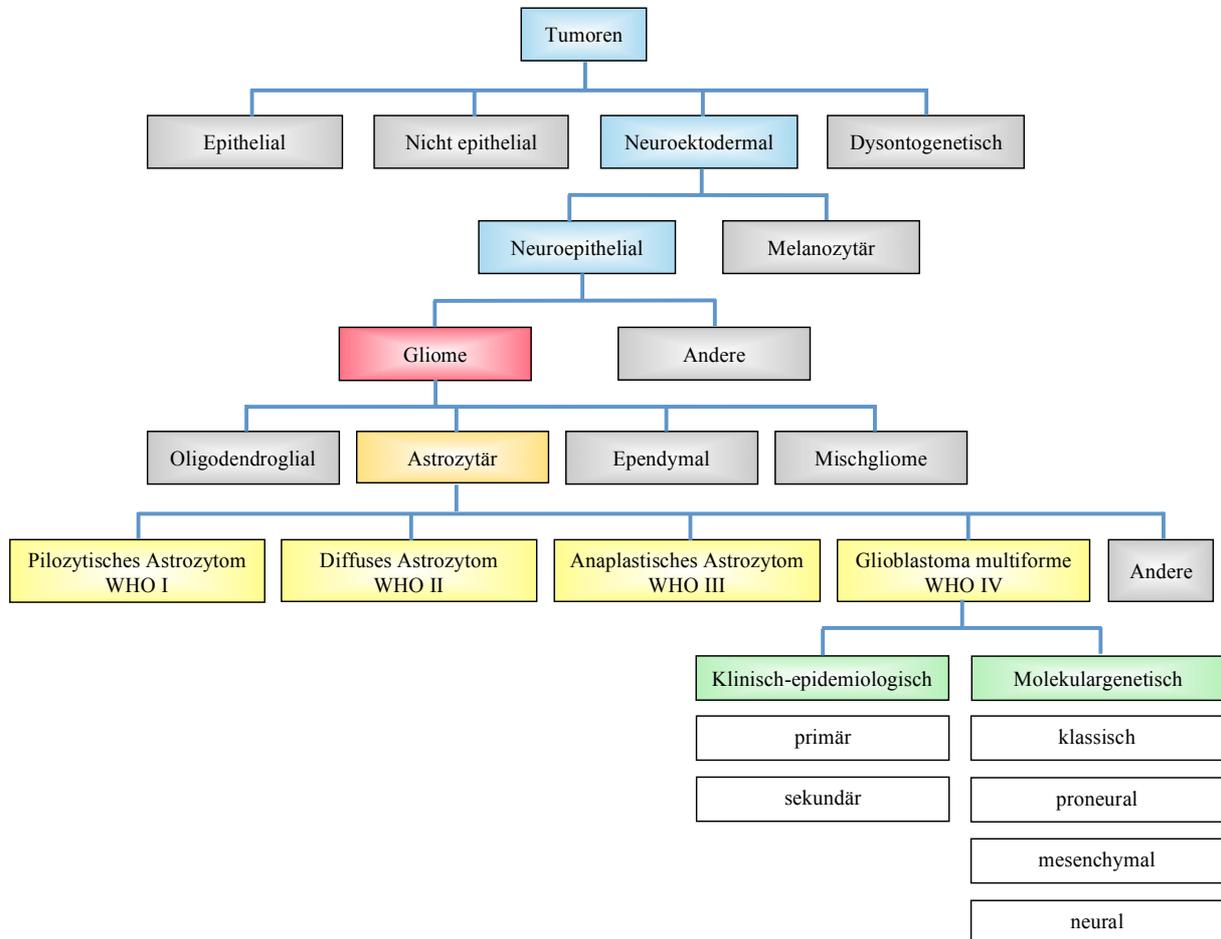
Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) werden nach der *World Health Organisation* (WHO) anhand ihres zellulären Ursprungs, ihrer Zellzusammensetzung und ihres Wachstumsverhaltens klassifiziert (Louis et al. 2007). Die Einteilung von Gliomen erfolgt dabei nach ihrem zytogenetischen Ursprung, wobei neben den astrozytären Gliomen als häufigste Vertreter noch oligodendrogliale, ependymale und Mischgliome unterschieden werden (Gladson et al. 2010) (s. Abb. 1). Darüber hinaus werden Gliome anhand ihres Malignitätsgrades (WHO *Grading System*) beurteilt: Das Glioblastoma multiforme (GBM) stellt dabei die aggressivste Form astrozytärer Gliome dar und ist zugleich der häufigste maligne primäre Hirntumor im Erwachsenenalter (Inzidenz: jährlich 3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner; Altersgipfel: 45-70 Jahre) (Martinez et al. 2010).

Klinisch-epidemiologisch werden primäre Glioblastome, die *de novo* entstehen, sowie sekundäre Glioblastome, die aus niedrig-malignen Gliomen hervorgehen, unterschieden (Ohgaki et al. 2013). Während die histologische Differenzierung dieser Entitäten nur selten gelingt, korrelieren spezifische molekulargenetische Veränderungen mit der klinischen Einteilung der Tumoren (s. 1.1.3).

Der Ursprung maligner Gliome ist bislang nur unzureichend geklärt: Einerseits werden neurale Stammzellen der subventrikulären Zone (Sanai et al. 2005; Barami 2007), andererseits bereits differenzierte neuronale und gliale Zellen als mögliche Ursprungszellen diskutiert (Friedmann-Morvinski et al. 2012).

Die Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung gilt neben nicht beeinflussbaren Faktoren wie Alter, Geschlecht und ethnischer Herkunft als bislang einziger gesicherter Risikofaktor für die Entstehung maligner Gliome (Bondy et al. 2008). Darüber hinaus treten Gliome gehäuft bei Patienten mit Neurofibromatose, Li-Fraumeni- oder Turcot-Syndrom sowie im Rahmen weiterer seltener hereditärer Tumorsyndrome auf (Farrell et al. 2007). Einige Studien dokumentieren außerdem einen Zusammenhang zwischen Gliomagenese und bestimmten genetischen Polymorphismen (SNPs), die wichtige Zellfunktionen wie Apoptose, Zellzyklus, Stoffwechsel und DNA-Reparatur beeinflussen (Bondy et al. 2008; Purow et al. 2009).

Abbildung 1: Systematik maligner Gliome. Gliome gehören zu den neuroepithelialen Tumoren. Neuropathologisch-anatomische, histologische und genetische Tumormerkmale bilden die Grundlage für die Einteilung in vier WHO-Malignitätsgrade: Pilozytische Astrozytome (AZ I, Grad I), diffuse Astrozytome (AZ II, Grad II), anaplastische Astrozytome (AZ III, Grad III) und Glioblastome (GBM, Grad IV) sind dabei die häufigsten Vertreter astrozytärer Gliome. Glioblastome werden wiederum in klinisch-epidemiologische oder in molekulargenetische Subgruppen untergliedert.



1.1.2 Klinik, Diagnostik und Therapie maligner Gliome

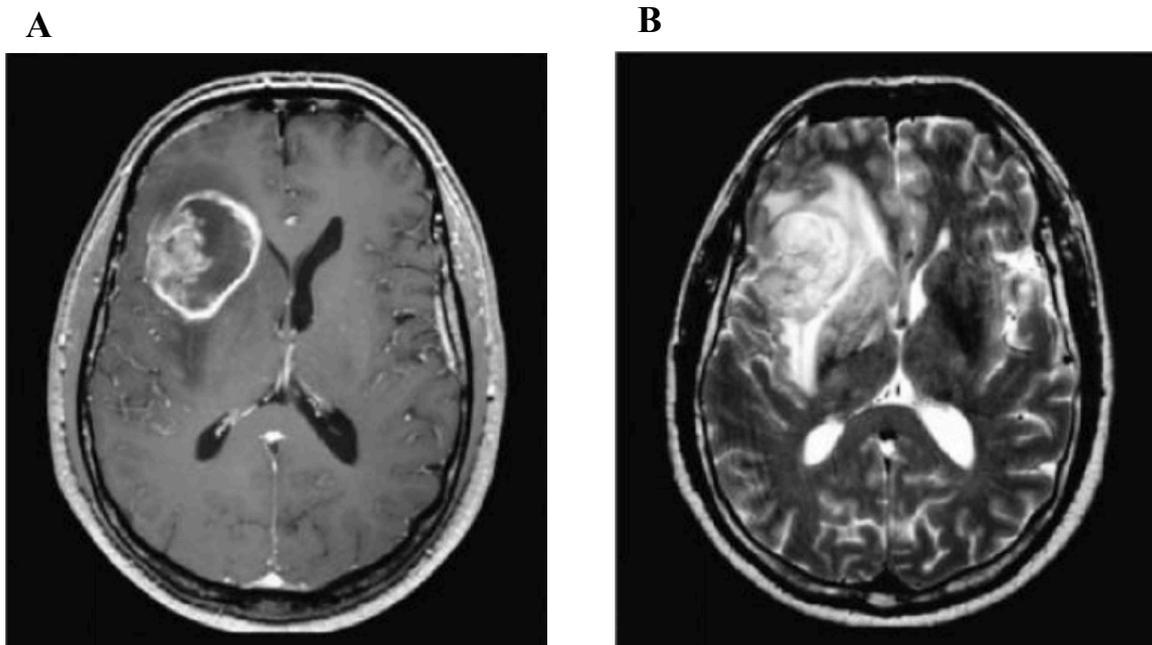
Klinisch manifestieren sich Gliome meist durch klassische Leitsymptome zerebraler Tumoren (Schlegel et al. 2003; Masuhr et al. 2013). Aufgrund ihrer zunehmenden raumfordernden Wirkung und der Ausbildung eines begleitenden Ödems kommt es zu Zeichen erhöhten intrakraniellen Drucks, wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen sowie Seh- und Bewusstseinsstörungen. Temporal lokalisierte Tumoren verursachen zusätzlich fokale oder generalisierte epileptische Anfälle, Tumoren im Bereich des Frontallappens gehen dagegen mit kognitiven Störungen und Persönlichkeitsveränderungen einher. Hinzu kommen lokalisationsabhängige fokal neurologische Defizite wie Störungen von Motorik und Sensibilität.

Der klinische Verdacht wird durch weiterführende neuroradiologische Bildgebung gestützt (Schlegel et al. 2003; Reiser et al. 2011; Forsting et al. 2014). Glioblastome stellen sich im CT als randständig Kontrastmittel anreichernde Läsion (ring- oder girlandenförmiges Enhancement) mit hypodensem Zentrum und ausgeprägtem perifokalem, fingerförmigem Marklagerödem dar. Im MRT (s. Abb. 2) zeigt sich im T1-gewichteten Bild eine hyperintense, heterogene Läsion u.a mit zentraler Nekrose, zystischen Anteilen sowie punktuellen Blutungen. Häufig ist im T2-gewichteten Bild ein ausgeprägtes Marklagerödem nachweisbar. Im Erwachsenenalter sind Glioblastome vor allem in den Großhirnhemisphären, insbesondere frontotemporal, lokalisiert. Ein bifrontaler Befall mit Ausbreitung über das Corpus callosum wird als sog. Schmetterlingsglioblastom bezeichnet. Die seltenen Glioblastome des Kindesalters treten dagegen auch im Bereich des Hirnstamms auf.

Abbildung 2: MRT-Befund eines Glioblastoma multiforme. Aus Forsting et al. 2014.

(A) Die T1-gewichtete Aufnahme zeigt einen girlandenförmig Kontrastmittel aufnehmenden, zentral nekrotischen Tumorkern rechts frontal.

(B) T2-gewichtete Aufnahme mit hyperintensens, peripheren Tumoranteilen und peritumoralem Ödem.



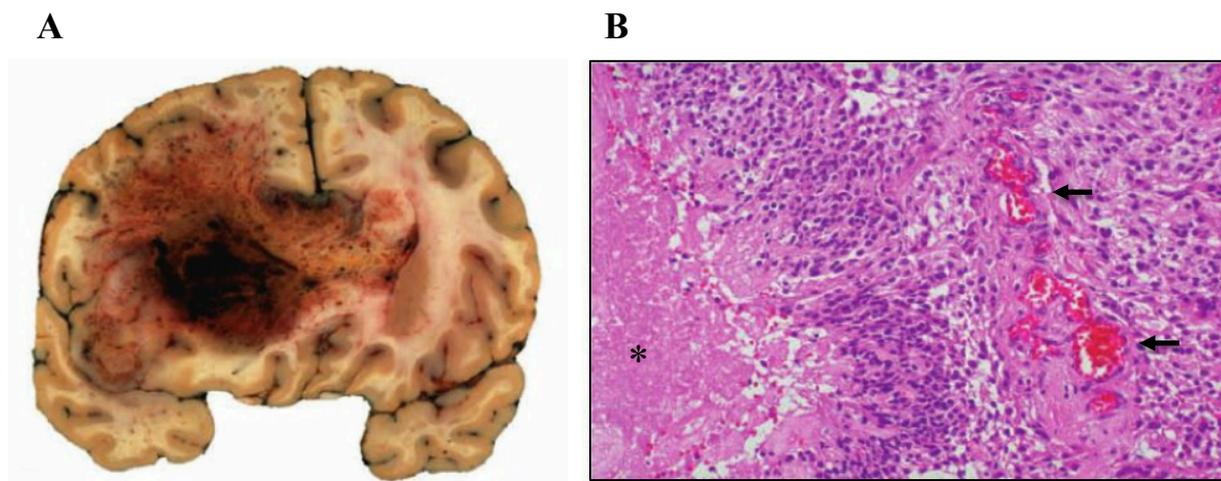
Die histopathologische Begutachtung stereotaktisch oder operativ gewonnener Tumorproben sichert schließlich die Diagnose und ist Grundlage des WHO Gratings (Louis et al. 2007). Glioblastome sind dabei durch eine hohe makro- und mikroskopische Variabilität gekennzeichnet, die zur Namensgebung „Glioblastoma multiforme“ beigetragen hat (Forsting et al. 2014). Makroskopisch zeigt sich eine charakteristische „bunte“ Schnittfläche mit

gelblichen Nekrosen, Blutungen und grau-weißem Tumorgewebe (Böcker et al. 2012). Histologisch weisen die Tumoren eine hohe Zelldichte, nukleäre Pleomorphien sowie eine hohe Mitoserate auf. Entscheidende Diagnosekriterien sind flächenhafte oder strichförmige Nekrosen mit palisadenartigem Tumorzellsaum sowie glomeruloid konfigurierte Gefäßproliferate (s. Abb. 3). Multinukleäre Riesenzellen sind typisch und definieren die seltene histologische Variante des Riesenzellglioblastoms, die aufgrund ihres besser abgegrenzten Wachstums eine günstigere Prognose aufweist (Schlegel et al. 2003). Trotz Entdifferenzierung exprimiert zumindest ein Teil der Glioblastomzellen GFAP und S100.

Abbildung 3: Makro- und mikroskopischer Befund eines Glioblastoma multiforme. Aus Böcker et al. 2012.

(A) Der linksfrontal lokalisierte Tumor breitet sich auf Corpus callosum und rechte Hemisphäre aus und weist eine charakteristische „bunte“ Schnittfläche auf.

(B) Histologisch zeigen sich zahlreiche undifferenzierte, palisadenartig-angeordnete Tumorzellen, die eine Nekrose (*) begrenzen, sowie typische Kapillarproliferate (→).



Glioblastome haben eine äußerst schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 1,2 bis 3,3 % (Bondy et al. 2008; Böcker et al. 2012) bzw. einem mittleren Überleben von 12 bis 15 Monaten (Wen et al. 2008). Ursächlich ist einerseits die ausgeprägte diffuse Dissemination von Gliomzellen in das benachbarte Hirnparenchym, die eine komplette chirurgische Resektion nahezu unmöglich macht (Holland 2000; Giese et al. 2003). Andererseits stehen die Heterogenität des Tumors, die schnelle Entwicklung von Resistenzen sowie die schwierige Passage der Blut-Hirn-Schranke einer effizienten Pharmakotherapie entgegen (Stupp et al. 2007).

Abhängig von Tumorlokalisierung, Alter und Gesundheitszustand des Patienten umfasst die Primärtherapie eine möglichst radikale chirurgische Tumoresektion, gefolgt von einer Radio-Chemotherapie mit 60 Gy und Temozolomid sowie einer antiödematösen Therapie mit Dexamethason (Stupp et al. 2005; Wen et al. 2008; Jones et al. 2012). Temozolomid ist ein Imidazo-Tetrazin-Prodrug aus der Gruppe der Alkylanzien, das nach Umwandlung in seine aktive Wirkform die Addition von Methylgruppen an die Nukleinbase Guanin bewirkt und dadurch die DNA-Replikation hemmt (Friedman et al. 2000). Das DNA-Reparaturenzym O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), dessen Aktivität epigenetisch reguliert wird, ist in der Lage diesen Effekt zu antagonisieren. Die Hypermethylierung des MGMT-Promotors führt zur Inaktivierung des Enzyms und steigert damit vermutlich die Suszeptibilität von Tumorzellen gegenüber Temozolomid (Esteller et al. 2000; Hegi et al. 2005; Stupp et al. 2009). Ob sich der Methylierungsstatus von MGMT tatsächlich als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf Temozolomid eignet oder lediglich einen allgemeinen positiven prognostischen Faktor darstellt, ist jedoch umstritten (Linz 2010).

Trotz optimaler Therapie kommt es bei Glioblastomen meist innerhalb kurzer Zeit zu einem progressiven Krankheitsverlauf mit nur begrenzten therapeutischen Möglichkeiten (Reoperation; Chemotherapie u.a. mit Carmustin, Irinotecan, Carboplatin oder Etoposid; monoklonaler VEGF-Antikörper Bevacizumab) (Wen et al. 2008; Jones et al. 2012).

Das nun zunehmende Verständnis der molekularen Pathogenese maligner Gliome bildet die Grundlage neuer therapeutischer Ansätze. Versuche mit Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Erlotinib, das gezielt den in Glioblastomen häufig mutierten *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor hemmt, sind jedoch möglicherweise aufgrund von Parallelaktivierung anderer Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bislang wenig erfolgreich (Mellinghoff et al. 2005; Sathornsumetee et al. 2007; Stommel et al. 2007). Einen anderen molekularen Angriffspunkt stellt der Angiogenesefaktor *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dar, dessen stimulierende Wirkung auf Endothelzellen durch den monoklonalen Antikörper Bevacizumab blockiert werden kann. Während unter Bevacizumab einerseits positive Effekte auf das progressionsfreie Überleben beschrieben werden, zeigen andere Studien ein gesteigertes invasives Potential der Tumorzellen auf (Norden et al. 2009; Keunen et al. 2011). Eine mögliche Lösung bietet die Kombination von anti-angiogenetischer und anti-invasiver Therapie. So zeigt eine aktuelle Studie, dass die gleichzeitige Verwendung des *Src family kinases* (SFK)-Inhibitors Dasatinib die proinvasive Wirkung von Bevacizumab aufheben kann (Huvelde et al. 2013). Eine Studie, die das Zytostatikum Doxorubicin mit dem anti-invasiven Wirkstoff Imipraminblau kombiniert, unterstreicht darüber hinaus den vielversprechenden

Ansatz einer adjuvanten anti-invasiven Therapie (Munson et al. 2012). Vor dem Hintergrund der Heterogenität maligner Gliome setzt der Erfolg eines therapeutischen Paradigmenwechsels jedoch ein besseres Verständnis der komplexen molekularen Invasionsmechanismen voraus.

1.1.3 Molekulare Charakteristika von Glioblastomen

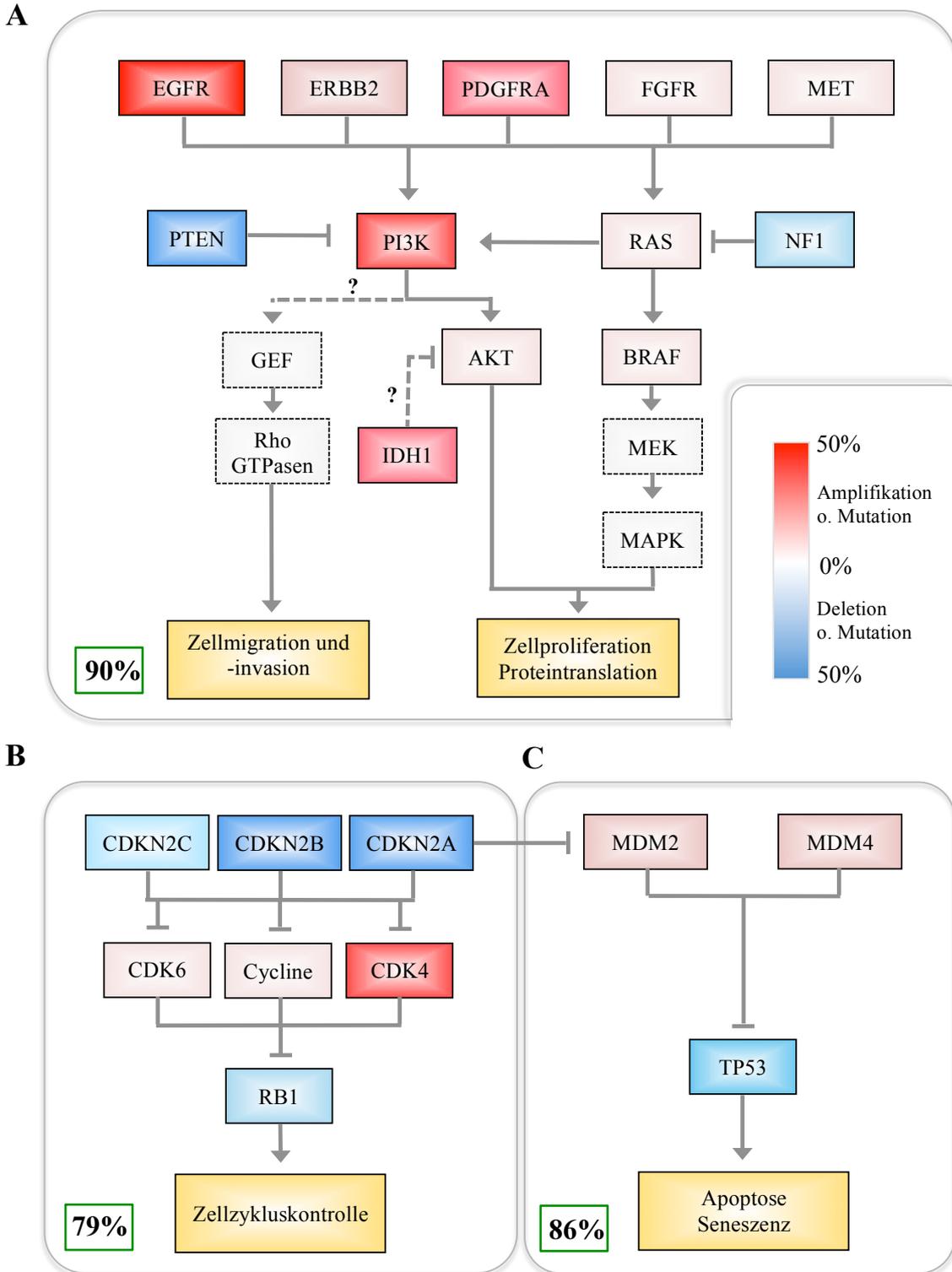
Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms sowie die Verbesserung von Sequenzierungstechniken und bioinformatischen Analysen ermöglichten in den letzten Jahren einen umfangreichen Einblick in die molekularen Mechanismen, die der Genese und Progression von Gliomen zugrunde liegen. Genomweite Expressions- und Sequenzierungsprojekte wie *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) trugen zur Identifikation von Schlüsselmutationen und -signalwegen bei und zeigten damit neue diagnostische, prognostische und therapeutische Marker auf (Cancer Genome Atlas Research 2008; Parsons et al. 2008; Brennan et al. 2013; Frattini et al. 2013).

Entscheidende molekulare Alterationen betreffen dabei vor allem den p53-Signalweg, den pRb1-Signalweg sowie den RTK/Ras/PI3K-Signalweg (Cancer Genome Atlas Research 2008; Riemenschneider et al. 2010) (s. Abb. 4).

Einige der identifizierten molekularen Veränderungen korrelieren mit der klinischen Subklassifizierung von Glioblastomen und dienen als diagnostische Entscheidungshilfe. Primäre Glioblastome, die innerhalb kurzer Zeit und ohne klinisch oder histologisch fassbare Vorläuferläsion entstehen, weisen häufig EGFR-Amplifikationen und PTEN-Mutationen auf (Riemenschneider et al. 2010). Dagegen gilt die Mutation von IDH1/2, neben der TP53-Mutation, als entscheidender Marker der seltenen sekundären Glioblastome, die sich aus niedrig-malignen Gliomen entwickeln, vor allem jüngere Patienten betreffen und eine etwas bessere Prognose aufweisen (Ohgaki et al. 2013).

Das mutierte IDH1-Enzym katalysiert die Synthese des Onkometaboliten D-2-Hydroxyglutarat (D2HG), der α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen, epigenetische Schlüsselenzyme, inhibieren kann (Dang et al. 2009; Xu et al. 2011). Folge ist ein genomweit verändertes Histon- und DNA-Methylierungsmuster, das zur Inaktivierung von Genen führt, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Noushmehr et al. 2010). Eine aktuelle Studie beschreibt darüber hinaus die D2HG-vermittelte Inhibition der PI3K-Effektorkinase Akt und zeigt damit einen Zusammenhang zwischen der IDH1-Mutation und dem RTK/Ras/PI3K-Signalweg auf (Birner et al. 2014) (s. Abb. 4).

Abbildung 4: Alterationen von GBM-Schlüsselsignalwegen. Zusammengestellt aus Cancer Genome Atlas Research 2008, Parsons et al. 2008, Yang et al. 2012, Brennan et al. 2013 und Birner et al. 2014. Gezeigt werden häufige genetische Alterationen des (A) RTK/Ras/PI3K-, (B) pRb1- und (C) p53-Signalweges. Aktivierende Alterationen werden rot, inaktivierende Alterationen blau dargestellt; die Farbintensität korreliert dabei mit der Häufigkeit der Alterationen (siehe Legende). Die grünen Boxen indizieren die Häufigkeit von zumindest einer genetischen Alteration im entsprechenden Signalweg. Noch unklare Interaktionen sind markiert (?).



Neben der klinisch-epidemiologischen Einteilung, die der Heterogenität von Glioblastomen nur bedingt gerecht wird, legen neuere Erkenntnisse nun die Definition molekularer Glioblastom-Subklassen nahe, die genaueren Aufschluss über Prognose und therapeutisches Vorgehen geben soll (Theeler et al. 2012; Huse et al. 2013). Verschiedene Studien konnten dabei übereinstimmend drei Glioblastom-Subklassen identifizieren, wobei der klassische, der proneurale und der mesenchymale Subtyp unterschieden werden (Brennan et al. 2009; Verhaak et al. 2010; Shen et al. 2012). Häufig wird eine vierte molekulare Subklasse beschrieben, allerdings ist die Existenz des neuralen Subtyps, der möglicherweise nur eine Mischung aus anderen Subtypen und Normalgewebe darstellt, umstritten (Huse et al. 2013). Im Folgenden wird daher nur auf die molekularen Charakteristika der anderen Subtypen eingegangen (s. Abb. 5):

Der klassische Subtyp zeichnet sich durch Amplifikation oder Mutation des EGF-Rezeptors bzw. durch Expression einer konstitutiv aktiven Rezeptorvariante (EGFRvIII, (Wikstrand et al. 1997)) aus. Während sich keine Veränderungen innerhalb des p53-Signalweges finden, ist der pRb1-Signalweg durch Deletion von CDKN2A betroffen (Verhaak et al. 2010). Außerdem werden vor allem astrozytäre Marker exprimiert.

PDGFRA-Amplifikation und TP53-Mutation charakterisieren den proneuralen Subtyp, dem die meisten sekundären Glioblastome zugeordnet werden. Darüber hinaus umfasst der proneurale Subtyp wiederum drei epigenetische Subgruppen: Einerseits den mit der IDH1-Mutation assoziierten *glioma-CpG island methylator phenotype* (G-CIMP), der durch Hypermethylierung zahlreicher Gene sowie eine bessere Prognose gekennzeichnet ist (Noussmehr et al. 2010; Turcan et al. 2012); andererseits zwei Subgruppen, die durch Histon-Modifikationen definiert werden (H3F3A G34- bzw. K27-Mutation) (Sturm et al. 2012). Neben PDGFRA werden NKX2-2 und OLIG-2 als oligodendrogliale Marker exprimiert (Verhaak et al. 2010).

Der mesenchymale Subtyp weist Mutationen und Deletionen von NF1 auf und exprimiert die mesenchymalen Marker MET und CHI3L1 (Verhaak et al. 2010). Charakteristisch ist außerdem die Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP β und STAT3, die die mesenchymale Differenzierung des Subtyps entscheidend prägen (Carro et al. 2010).

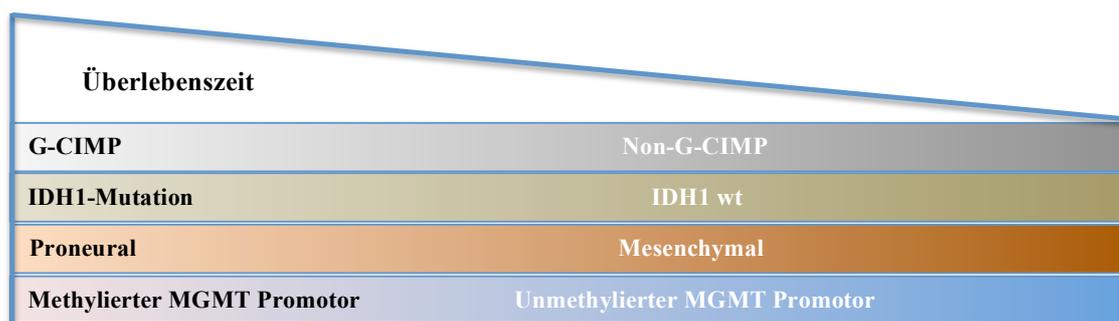
Mesenchymaler und klassischer Subtyp sind mit einem aggressiven Wachstum und einer schlechteren Prognose assoziiert (Phillips et al. 2006), wobei die bessere Prognose des proneuralen Subtyps vermutlich auf die untergeordnete G-CIMP-Subgruppe zurückzuführen ist (Brennan et al. 2013).

Abbildung 5: Charakteristika der Glioblastom-Subtypen. Gezeigt werden genetische und epigenetische Alterationen, Manifestationsalter und Prognose der verschiedenen Glioblastom-Subtypen; besonders relevante Marker sind hervorgehoben.

Klassischer Subtyp	Mesenchymaler Subtyp	Proneuraler Subtyp		
EGFR- Amplifikation/Mutation EGFRvIII CDKN2A-Deletion Erwachsene schlechte Prognose	NF1- Mutation/Deletion MET CHI3L1 C/EBPβ STAT3 Alle Altersgruppen schlechte Prognose	PDGFRA-Amplifikation TP53-Mutation, NKX-2, OLIG-2		
		IDH1-Mutation	H3F3A G34-Mutation	H3F3A K27-Mutation
		Hypermethylierung (G-CIMP)	Hypomethylierung	
		Junge Erwachsene gute Prognose	Jugendliche schlechte Prognose	Kinder Sehr schlechte Prognose

Die verbesserte molekulare Charakterisierung von Glioblastomen hat zur Definition prognostischer Subgruppen beigetragen. Allerdings weisen nur 10 % der Patienten ein günstiges Biomarker-Profil (proneuraler Subtyp, G-CIMP, IDH1-Mutation, MGMT-Promotorhypermethylierung) auf, während die Prognose für die Mehrheit der Patienten schlecht ist (Theeler et al. 2012) (s. Abb. 6).

Abbildung 6: Assoziation von molekularen Markern und Überlebenszeit. Adaptiert nach Theeler et al. 2012.



Hoffnung verspricht nur die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, die jedoch ein verbessertes Verständnis der Mechanismen erfordert, die das invasive Potential der Tumorzellen und damit maßgeblich die schlechte Prognose dieser Tumorentität bedingen. Richtungsweisend sind möglicherweise die beschriebenen Veränderungen des RTK/Ras/PI3K-Signalweges, die über nachgeschaltete Signalmoleküle den zentralen Mechanismus von Zellmigration und -invasion, die Umstrukturierung des Zytoskeletts, beeinflussen können.

1.1.4 Das Aktin-Zytoskelett und seine Regulatorproteine: Motor für Zellmigration und -invasion

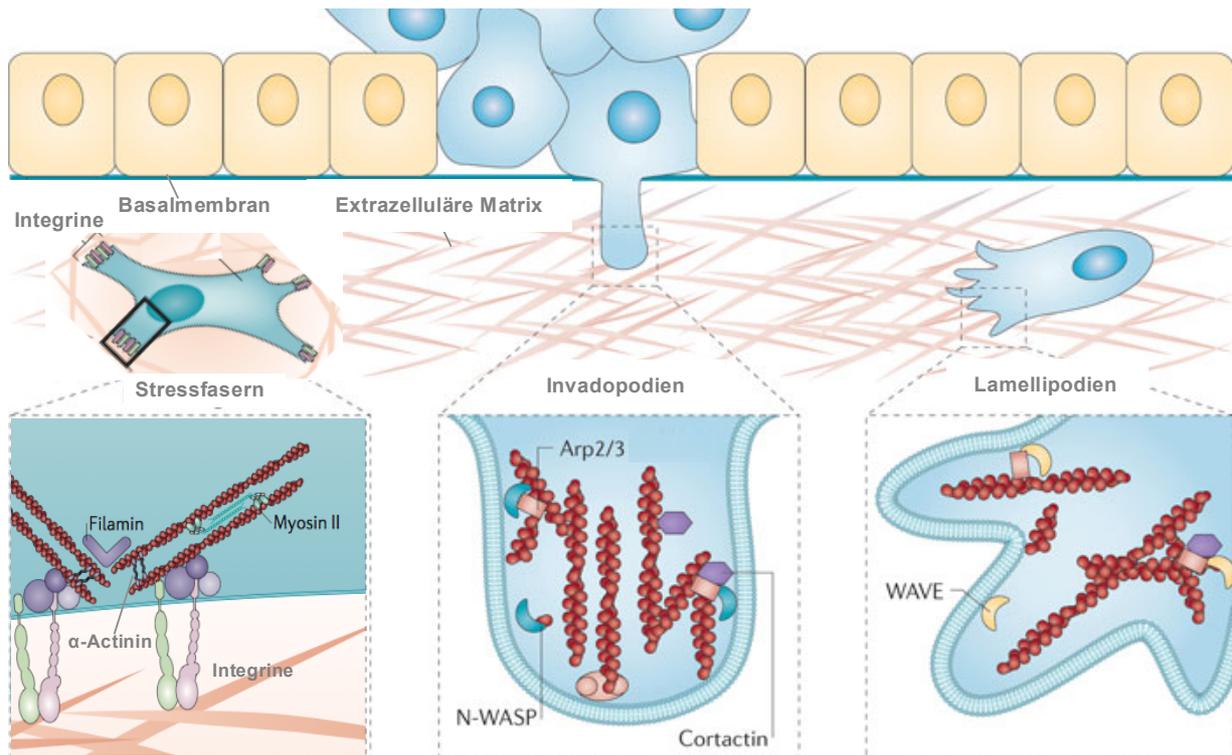
Die eukaryotische Zelle wird von einem dreidimensionalen Netzwerk durchzogen. Dieses sogenannte Zytoskelett besteht aus drei Klassen von Filamenten: Aktin- oder Mikrofilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Jede erfüllt spezifische Aufgaben innerhalb der Zelle. Dazu zählen u.a. mechanische Stabilisierung und Zellpolarität, Zellmigration und Zellteilung sowie intrazellulärer Transport. Die Umstrukturierung von Aktinfilamenten und Mikrotubuli bildet die Grundlage von Migration und Invasion (Akhshi et al. 2014), wobei die Polymerisation von Aktin und die Aktin-Myosin-vermittelte Kontraktilität die treibende Kraft der Zellmotilität darstellen (Pollard et al. 2003; Bugyi et al. 2010; Wiggan et al. 2012). Im Folgenden wird daher nur auf die komplexen Regulationsmechanismen näher eingegangen, die die Umstrukturierung von Aktinfilamenten bedingen und deren Untersuchung im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht.

Aktinfilamente sind mit 7 nm Dicke die dünnsten Fasern des Zytoskeletts. Unterhalb der Zellmembran formen sie das kortikale Aktinnetz und verleihen der Zelle dadurch Form und Stabilität. Darüber hinaus haben sie einen entscheidenden Einfluss auf Mitose und Meiose (Field et al. 2011) und bilden Schlüsselstrukturen der Zellmigration und -invasion, wie Invadopodien, Lamellipodien und kontraktile Aktin-Stressfasern (Chhabra et al. 2007; Naumanen et al. 2008; Nurnberg et al. 2011) (s. Abb. 7).

Aktinfilamente (F-Aktin) entstehen durch Polymerisation von globulären Aktin-Monomeren (G-Aktin) und besitzen einen doppelhelikalen, polaren Aufbau mit einem schnell wachsenden Plus- und einem langsam wachsenden Minusende. Die dynamische Umstrukturierung der Aktinfilamente unterliegt dabei der Kontrolle einer Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen wie Cofilin, Arp2/3-Komplex, WASP/WAVE-Proteine, Profilin und *Capping* Proteine (Bugyi et al. 2010). Der Arp2/3-Komplex vermittelt dabei die Neuformation und Verzweigung von Aktinfilamenten und wird seinerseits durch WASP/WAVE-Proteine aktiviert.

Von zentraler Bedeutung für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts ist außerdem die ADF/Cofilin-Familie, die die drei Isoenzyme Destrin (v.a. in Epi- und Endothelzellen exprimiert, auch *actin depolymerizing factor* (ADF) genannt), Cofilin-1 (ubiquitär exprimiert, auch *non-muscle* (n-cofilin) genannt) und Cofilin-2 (v.a. in Muskelzellen exprimiert, daher auch *muscle-cofilin* (m-cofilin) genannt) umfasst (Vartiainen et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wird Cofilin-1, das im ZNS eine entscheidende Rolle spielt, näher untersucht und daher im Folgenden als Cofilin bezeichnet.

Abbildung 7: Schlüsselstrukturen der Zellmigration und -invasion. Zusammengestellt aus Nurnberg et al. 2011 und Humphrey et al. 2014. Die kontraktile Stressfasern entstehen als Reaktion auf Scherkräfte, bestehen aus F-Aktin, Myosin II und dem Begleitprotein α -Actinin und werden durch Filamin quervernetzt. Sie sind über Adaptorproteine und Integrine mit der extrazellulären Matrix (EZM) verbunden (Fokalkontakt). Invadopodien sind F-Aktin-reiche Membranprotrusionen, die durch die WASP-Arp2/3-abhängige Formation von F-Aktin entstehen und durch Cortactin stabilisiert werden. Sie reichen tief in die EZM, deren Degradation schließlich durch Matrix-Metalloproteasen (MMP) vermittelt wird. Lamellipodien entstehen durch WAVE-Arp2/3-abhängige Polymerisation von F-Aktin am vorderen Zellpol und schieben dadurch die Zelle vorwärts.



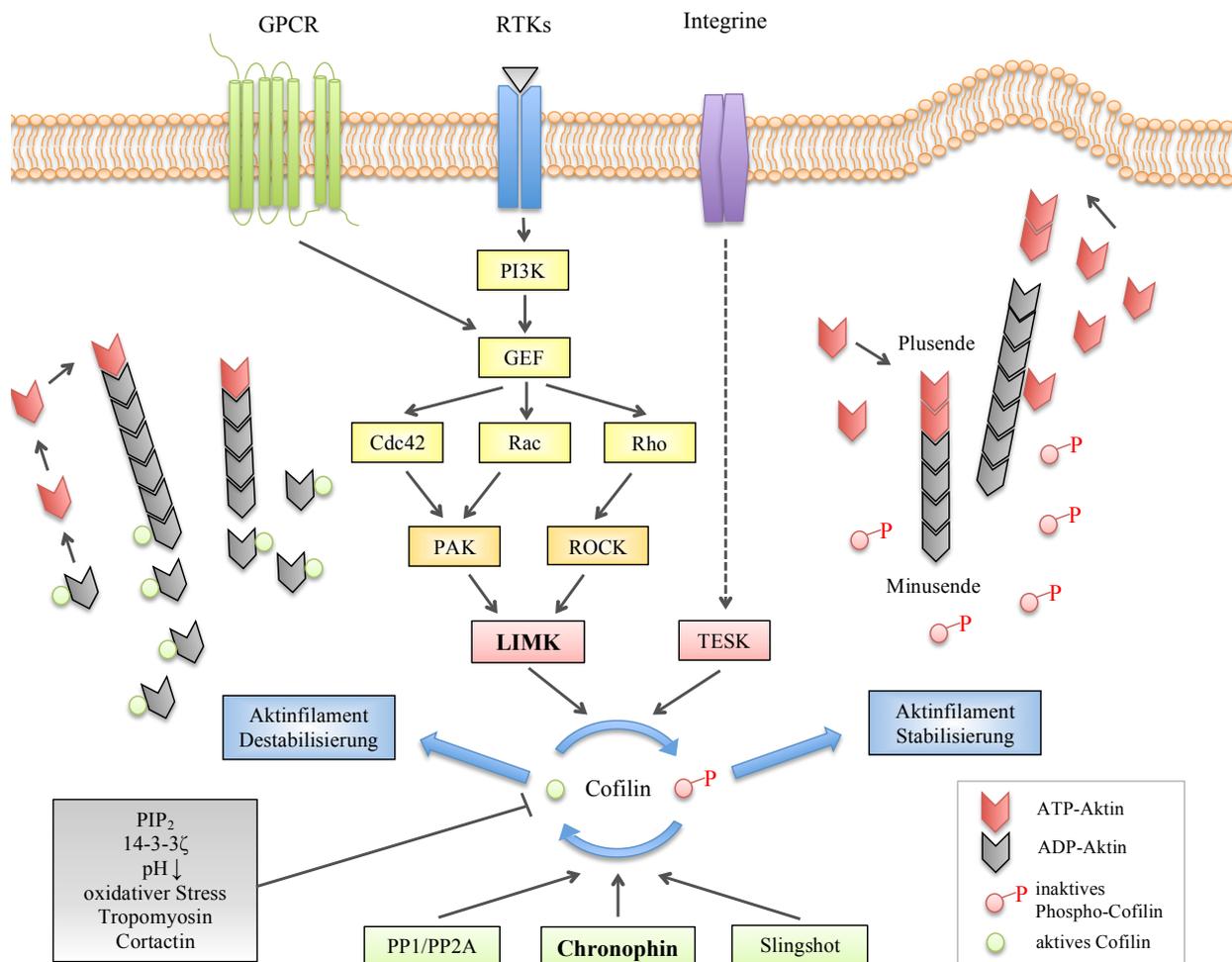
Der Einfluss von Cofilin auf das Aktin-Zytoskelett ist divergent: Einerseits bewirkt Cofilin die Depolymerisation und Fragmentation von filamentärem Aktin (Bamburg 1999) und fördert so beispielsweise die Retraktion des hinteren Zellpols während der Zellmigration (Mseka et al. 2011). Gleichzeitig erhöht es jedoch die Verfügbarkeit neuer Aktinmonomere und freier Plusenden, die wiederum Voraussetzung für die Formation neuer Aktinfilamente sind, und begünstigt die Arp2/3-Komplex-vermittelte Verzweigung von Aktinfilamenten (Ichetovkin et al. 2002; Ghosh et al. 2004). Cofilin katalysiert daher sowohl die Polymerisation als auch die Depolymerisation von F-Aktin, erhöht also den Umsatz an Aktinfilamenten (Carlier et al. 1997; Bravo-Cordero et al. 2013).

Die Aktivität von Cofilin wird durch verschiedene Kontrollmechanismen beeinflusst, wobei Umfang und Ort der Cofilin-Aktivierung streng koordiniert werden.

1.1.5 Der Cofilin-Signalweg und seine Akteure

Die Aktivität von Cofilin wird u.a. durch Phosphorylierung eines einzelnen Serin-Restes (Serin 3) reguliert, die die Bindung von Cofilin an Aktin verhindert (Bernstein et al. 2010; Mizuno 2013). Kinasen und antagonistische Phosphatasen kontrollieren dabei das Gleichgewicht zwischen aktivem Cofilin und inaktivem Phospho-Cofilin. Einen Überblick gibt Abbildung 8.

Abbildung 8: Der Cofilin-Signalweg und seine Regulatorproteine. Aktives Cofilin vermittelt einerseits die Depolymerisation von F-Aktin, induziert andererseits jedoch auch die Neuformation von Aktinfilamenten durch Bereitstellung neuer Plusenden und von G-Aktin. Die Phosphoregulation von Cofilin unterliegt dem inhibitorischen Einfluss der Kinasen LIMK und TESK, sowie dem reaktivierenden Einfluss der Phosphatasen Chronophin, Slingshot und PP1/PP2A. Darüber hinaus beeinflussen weitere Faktoren (graue Box) die Cofilin-Aktivität. Weitere Einzelheiten siehe Text.



Die Phosphorylierung und Inaktivierung von Cofilin wird durch membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCRs) vermittelt, die die nachgeschalteten kleinen GTPasen der Rho-Familie RhoA, Rac und Cdc42 aktivieren (Hall 2005; Hall 2012). Die Signaltransduktion verläuft nun einerseits über die Rac- bzw. Cdc42-abhängigen *p21-activated kinases* (PAKs) (Bokoch 2003) sowie über die RhoA-abhängigen *Rho-associated coiled-coil kinases* (ROCKs) (Maekawa et al. 1999). Gemeinsames Zielprotein der PAKs bzw. ROCKs sind wiederum die *LIM (Lin-11/Isl-1/Mec-3) domain kinases 1 und 2* (LIMK-1 bzw. -2), die schließlich Cofilin phosphorylieren und dadurch inaktivieren können (Arber et al. 1998; Yang et al. 1998).

LIM-Kinasen vermitteln die globale Inaktivierung von Cofilin, lassen nur eine lokale Aktivierung zu (*local excitation, global inhibition* LEGI-Modell) und sind daher entscheidende Koordinatoren der Cofilin-Aktivität (Mouneimne et al. 2006).

Strukturelle Ähnlichkeiten zu den LIMK weisen die Cofilin-inaktivierenden *testicular protein kinases* (TESKs) auf, deren Aktivierung unabhängig von PAKs oder ROCKs durch Integrine vermittelt wird (Toshima et al. 2001a; Toshima et al. 2001b).

Gegenspieler der LIM- und TES-Kinasen sind die Cofilin-Phosphatasen Slingshot (SSH) (Niwa et al. 2002) und Chronophin (Gohla et al. 2005) sowie die Phosphatasen PP1/PP2A, die zusätzlich zu Cofilin noch ein breites Spektrum weiterer Substrate dephosphorylieren (Ambach et al. 2000).

Slingshot katalysiert die Reaktivierung von Cofilin einerseits unmittelbar durch Cofilin-Dephosphorylierung, andererseits indirekt durch Dephosphorylierung und Inaktivierung der LIM-Kinasen (Niwa et al. 2002; Soosairajah et al. 2005). Die Funktion der Cofilin-Phosphatase wird ebenfalls streng kontrolliert (Inaktivierung durch PAK4-vermittelte Phosphorylierung und Bindung des Gerüstproteins 14-3-3 ζ ; Aktivierung durch Calcineurin, Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und Coronin 1B) (Nishita et al. 2004; Soosairajah et al. 2005; Wang et al. 2005; Cai et al. 2007).

Chronophin ist von zentraler Bedeutung für die Phosphoregulierung von Cofilin, wobei die Inaktivierung der Phosphatase mit erhöhten Phospho-Cofilin-Leveln und einem Anstieg von F-Aktin assoziiert ist (Gohla et al. 2005).

Neben der Phosphoregulierung unterliegt die Aktivität von Cofilin weiteren Einflüssen. Inhibitorisch wirken dabei die Bindung des Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) oder des Gerüstproteins 14-3-3 ζ , ein sinkender pH-Wert, die Ausbildung

von Disulfidbrücken durch oxidativen Stress sowie bestimmte Modulatorproteine wie Tropomyosin und Cortactin (Gohla et al. 2002; Bernstein et al. 2010). Nicht-phosphoryliertes Cofilin darf daher nicht unmittelbar mit aktivem Cofilin gleichgesetzt werden (Bravo-Cordero et al. 2013).

Die Dysregulation des Cofilin-Signalweges ist ein Schlüsselmechanismus für die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen (Wang et al. 2007; van Rheenen et al. 2009; Bravo-Cordero et al. 2013). Cofilin ist dabei von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der zellulären Polarität, die Ausbildung von Lamellipodien sowie die Definition der Migrationsrichtung (Ghosh et al. 2004; Kiuchi et al. 2007).

Analysen der Expression (Ding et al. 2004; Lee et al. 2005; Keshamouni et al. 2006; Turhani et al. 2006) und Phosphorylierung (Yoshioka et al. 2003; Wang et al. 2006; Collazo et al. 2014) von Cofilin liefern bislang jedoch widersprüchliche Erkenntnisse. Umstritten bleibt, ob eine verstärkte Cofilin-Aktivität, die die Formation neuer Aktinfilamente fördert und damit die Ausbildung invasiver Zellfortsätze ermöglicht, oder eine verminderte Cofilin-Aktivität, die zur Stabilisierung vorhandener Aktinfilamente führt und damit die Aktin-Myosin-vermittelte Kontraktilität unterstützt, Voraussetzung für die Invasion von Tumorzellen ist (Wang et al. 2006; Sanz-Moreno et al. 2011).

Ausschlaggebend könnte die Balance zwischen aktivem und inaktivem Cofilin sein: Yap et al. postulieren einen konzentrationsabhängigen Zusammenhang zwischen der Migration von Glioblastomzellen und der Expression von Cofilin, wobei Zellen mit mittlerer Cofilin-Expression die höchste Beweglichkeit aufweisen (Yap et al. 2005). Diese Beobachtung erklärt möglicherweise die bisher widersprüchliche Studienlage: Sowohl die Inaktivierung von Cofilin in Zellen mit hoher, als auch die Aktivierung von Cofilin in Zellen mit niedriger Cofilin-Basalaktivität könnten demnach zu einer gesteigerten Motilität führen.

Entscheidend für das Verständnis von Tumorinvasion und -metastasierung ist darüber hinaus die Analyse zentraler Regulatorproteine der Cofilin-Signalkaskade (Wang et al. 2007). Chronophin und LIM-Kinasen nehmen eine Schlüsselposition für die Regulierung von Cofilin ein, koordinieren dessen Aktivität und beeinflussen damit maßgeblich Aktin-vermittelte Prozesse, insbesondere die Zellmotilität. Ihre Bedeutung für die Migration und Invasion maligner Gliome ist jedoch bislang nur unzureichend geklärt.

1.2 Chronophin: Welche Ursachen führen zum Verlust in Glioblastomen ?

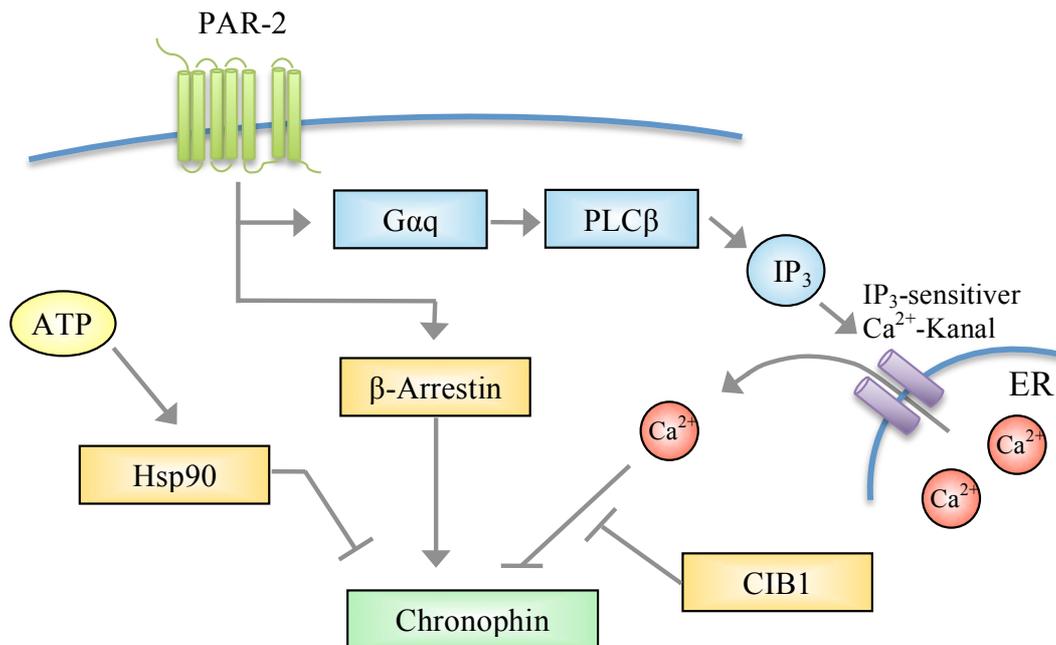
1.2.1 Chronophin: Struktur, Regulation und Bedeutung

Chronophin (CIN/PDXP) gehört zur Familie der *haloacid dehalogenase* (HAD)-Phosphatasen, die sich durch eine modifizierte Rossmann-Falte und die katalytische Domäne DxDx(V/T) auszeichnen und deren katalytische Aktivität auf einer Magnesium-abhängigen Phosphoaspartyl-Transferase-Reaktion beruht (Ridder et al. 1999; Seifried et al. 2013). Voraussetzung für katalytische Effizienz und Substratspezifität ist die Formation eines stabilen Homodimers (Kestler et al. 2014).

Die Phosphatase wird in Abhängigkeit ihrer Funktion unterschiedlich bezeichnet: Als PDXP katalysiert sie die Dephosphorylierung von aktivem Vitamin B6 (Pyridoxal-5-phosphat/PLP) (Fonda 1992; Jang et al. 2003), als Chronophin dephosphoryliert und aktiviert sie spezifisch Cofilin (Gohla et al. 2005). In Leukozyten vermittelt Chronophin die Formation von Lamellipodien am vorderen Zellpol durch lokale Induktion neuer Aktin-Plusenden (Sun et al. 2007; Zoudilova et al. 2010). Darüber hinaus ist Chronophin vermutlich an der morphologischen Umstrukturierung und Apoptose-Induktion von Astrozyten im Rahmen eines epileptischen Anfalls beteiligt (Kim et al. 2008; Kim et al. 2010). Chronophin dephosphoryliert und inaktiviert außerdem das Onkoprotein *steroid receptor co-activator* SRC-3, das eine entscheidende Rolle für die Invasion von Mammakarzinomzellen spielt (Li et al. 2008).

Regulationsmechanismen, die die Aktivität von Chronophin beeinflussen, wurden bisher nur wenig untersucht (s. Abb. 9). In Leukozyten vermittelt der Protease-aktivierte Rezeptor PAR-2 die Formation eines β -Arrestin/Chronophin/Cofilin-Komplexes und koordiniert dadurch die räumliche Aktivierung von Cofilin (Zoudilova et al. 2007; Zoudilova et al. 2010). Die ATP-abhängige inhibitorische Assoziation zwischen Chronophin und dem Chaperon Hsp90, die unter oxidativem Stress aufgehoben wird, stellt einen weiteren Kontrollmechanismus dar (Huang et al. 2008). Darüber hinaus beeinflusst das *calcium- and integrin-binding protein 1* (CIB1) die Aktivität von Chronophin (Fedorchenko 2009), das der Calcium-abhängigen Inhibition der HAD-Phosphatase entgegenwirkt (Peeraer et al. 2004).

Abbildung 9: Regulation von Chronophin. Zusammengestellt aus Zoudilova et al. 2007, Huang et al. 2008 und Fedorchenko 2009. Der G-Protein-gekoppelte-Rezeptor PAR-2 vermittelt einerseits über die α -Untereinheit eines Gq-Proteins ($G_{\alpha q}$) die Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β) und dadurch die Freisetzung von Inositoltrisphosphat (IP $_3$) aus PIP $_2$. IP $_3$ kann entsprechende Ca $^{2+}$ -Kanäle des endoplasmatischen Retikulums (ER) öffnen. Andererseits aktiviert PAR-2 β -Arrestin. Die Aktivität von Chronophin unterliegt dem Einfluss von 1) Kalzium, das Chronophin inhibiert; 2) CIB1, das Kalzium bindet und dadurch Chronophin reaktiviert; 3) β -Arrestin, das die Aktivität von Chronophin räumlich koordiniert und 4) Hsp90, das Chronophin ATP-abhängig binden und inaktivieren kann.



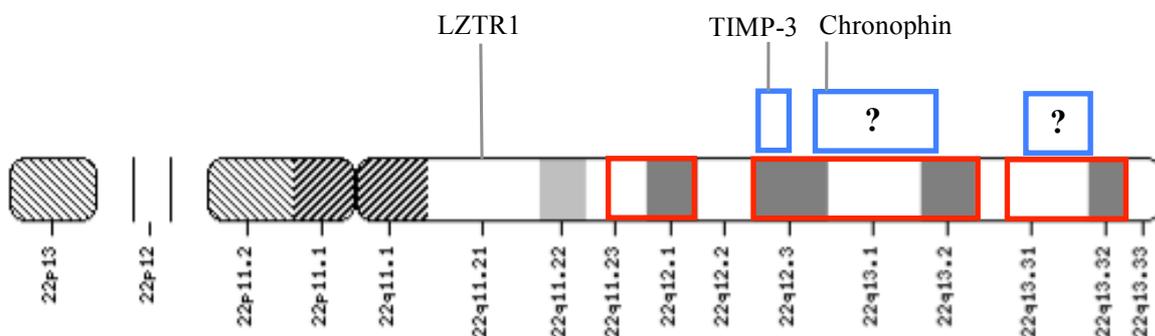
Chronophin wird in nahezu allen menschlichen Geweben exprimiert, wobei das ZNS mit Ausnahme des Rückenmarks den höchsten Gehalt aufweist (Jang et al. 2003; Gohla et al. 2005). In Ratten- und Mäusegehirnen konnte insbesondere im Hippocampus eine hohe Expression nachgewiesen werden (Kim et al. 2008; Fedorchenko 2009).

Der humane Chronophin-Locus ist auf Chromosom 22q12.3 lokalisiert, umfasst 8203 Basenpaare (bp) und besitzt zwei Exons, die die Sequenz des 296 Aminosäuren langen Proteins definieren (s. Abb. 59).

Interessanterweise ist der monoallelische Verlust des langen Arms von Chromosom 22 (*Loss of heterozygosity* (LOH) 22q) mit der Genese und Progression verschiedener Tumoren, insbesondere von Gliomen assoziiert (Ino et al. 1999; Oskam et al. 2000; Nakamura et al. 2005; Laigle-Donadey et al. 2006). LOH 22q kann bereits in niedrig-malignen Astrozytomen nachgewiesen werden (Hartmann et al. 2004; Seng et al. 2005) und tritt in jeweils einem Drittel der molekularen Glioblastom-Subtypen auf (Sturm et al. 2014). Auf der Suche nach

möglichen Tumorsuppressorgenen wurden in der Region 22q12.3 das *tissue inhibitor of metalloproteinases-3* (TIMP3)-Gen, das in sekundären Glioblastomen häufig inaktiviert ist, sowie in der Region 22q11.21 das *Leucine-zipper-like transcriptional regulator 1* (LZTR1)-Gen, dessen Inaktivierung das Wachstum von Gliom-Sphären stimuliert, identifiziert (Nakamura et al. 2005; Frattini et al. 2013). Neben der Region 22q12.3 charakterisierten Nakamura et al. zwei weitere *minimal common regions of deletion* (MCRD) auf Chromosom 22q (Regionen 22q12.3-13.2 und 22q13.31), deren Verlust vermehrt in primären Glioblastomen auftritt, denen jedoch bislang kein Tumorsuppressorgen zugeordnet werden konnte (s. Abb. 10).

Abbildung 10: LOH 22q in humanen Astrozytomen. Die roten Boxen markieren identifizierte MCRDs basierend auf LOH-Analysen von Hartmann et al. 2004 (11.23-12.1), Ino et al. 1999 (12.3-13.2) und Oskam et al. 2000 (13.31-13.32). Die blauen Boxen markieren die von Nakamura et al. 2005 identifizierten MCRDs; ein Verlust der Region 12.3 tritt vor allem in sekundären Glioblastomen, der Regionen 12.3-13.2 und 13.31 vor allem in primären Glioblastomen auf. Außerdem wird die Lokalisation der potentiellen Tumorsuppressorgene LZTR1 (11.21), TIMP-3 (12.3) sowie Chronophin (12.3) angezeigt. Den MRCDS 12.3-13.2 und 13.31 konnte bislang kein Tumorsuppressorgen zugeordnet werden (?).



Expressionsanalysen von Chronophin auf mRNA- und Protein-Ebene (Fedorchenko 2009) sowie *in silico*-Analysen des *REMBRANDT data portal* (Schulze 2015; Schulze et al. 2015) dokumentieren nun eine deutlich verminderte Expression in astrozytären Gliomen. Gleichzeitig führt die Reexpression von Chronophin in der humanen Glioblastom-Zelllinie U-87MG zu einer deutlich verminderten Migration und Invasion der Gliomzellen (Schulze 2015; Schulze et al. 2015).

Die molekularen Mechanismen, die dem Verlust von Chronophin in Gliomen zugrunde liegen, wurden jedoch bislang nicht untersucht. Ihre Aufdeckung könnte zu einem verbesserten Verständnis von Migration und Invasion von Gliomzellen beitragen und möglicherweise neue Ansätze für die Therapie maligner Gliome aufzeigen.

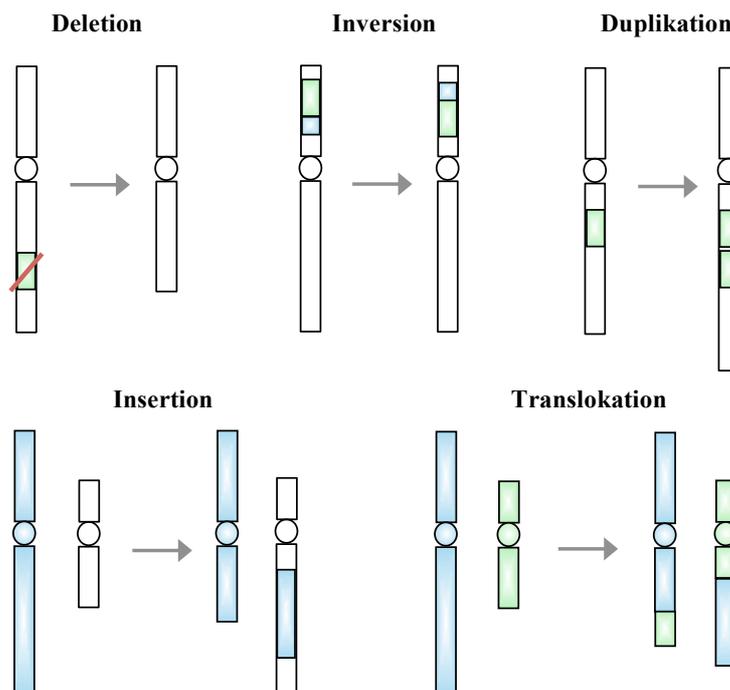
1.2.2 Mechanismen der Geninaktivierung: Genetische und epigenetische Alterationen

Initiation und Progression maligner Tumoren beruhen auf der Akkumulation verschiedener genetischer und epigenetischer Alterationen, die ein verändertes Genexpressionsmuster bedingen (Sadikovic et al. 2008). Schlüsselmechanismen sind die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die Aktivierung von Onkogenen sowie die damit assoziierte genomische Instabilität (Sadikovic et al. 2008; Negrini et al. 2010).

Genetische Alterationen sind auf eine veränderte Nukleotidsequenz zurückzuführen und umfassen numerische (Aneuploidie, Polyploidie) und strukturelle (Amplifikation/Duplikation, Deletion, Insertion, Inversion, Translokation) Chromosomenaberrationen sowie Mutationen einzelner Genabschnitte (Punkt-, Rastermutationen). Häufige genetische Alterationen maligner Gliome werden unter 1.1.3 dargestellt.

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die wesentlichen Grundlagen epigenetischer Alterationen sowie ihre Bedeutung für maligne Gliome.

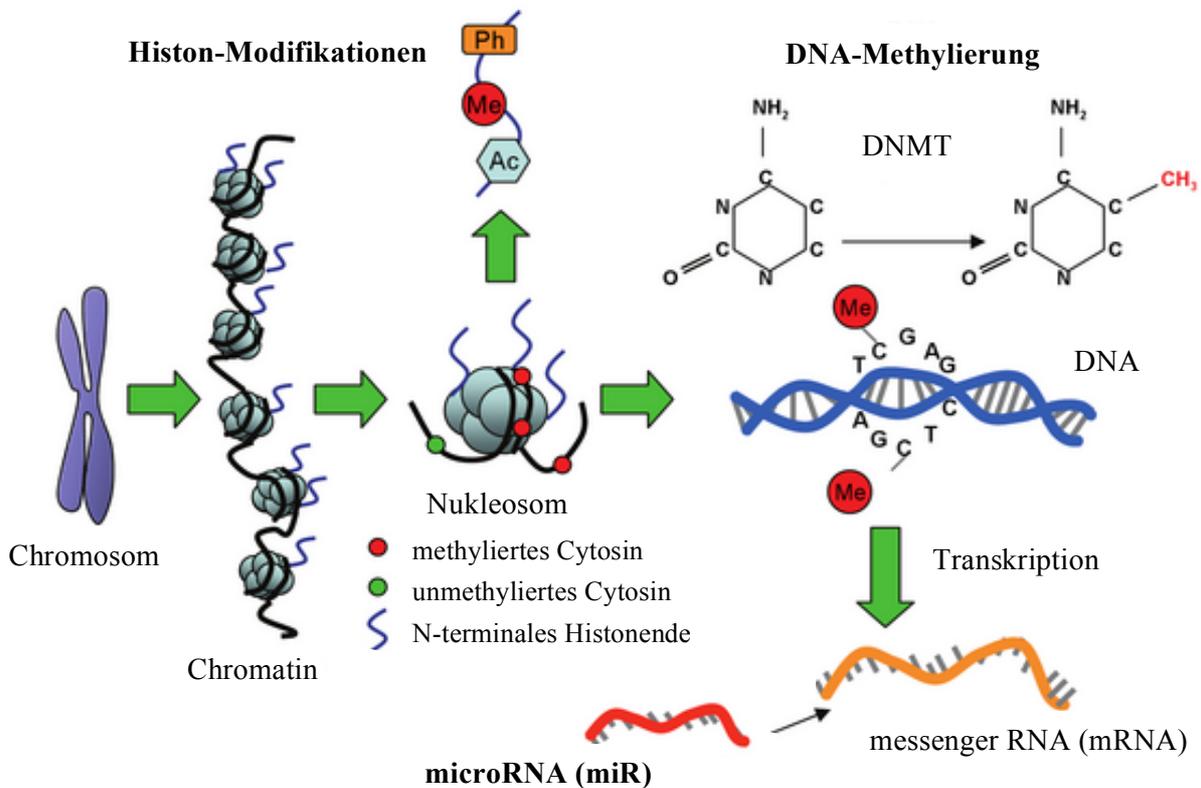
Abbildung 11: Häufige strukturelle Chromosomenaberrationen. Deletion = Verlust eines Chromosomenabschnitts; Inversion = umgekehrter Einbau von Chromosomenabschnitten; Duplikation = Verdopplung eines Chromosomenabschnitts; Insertion = Übertragung eines Chromosomenabschnitts auf ein anderes Chromosom; Translokation = Austausch von Chromosomenbruchstücken zwischen zwei Chromosomen.



1.2.3 Grundlagen epigenetischer Alterationen

Epigenetische Alterationen schließen alle mitotisch und meiotisch vererbaren Veränderungen der Genexpression ein, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz zurückzuführen sind (Holliday 1987; Egger et al. 2004). Die epigenetische Regulation umfasst dabei die DNA-Methylierung, die posttranslationale Modifikation von Histonen sowie die Expression von microRNAs (Jones et al. 2002; Sandoval et al. 2012) (s. Abb. 12).

Abbildung 12: Epigenetische Modifikationen. Adaptiert nach Relton et al. 2010. Epigenetische Mechanismen beruhen auf der Modifikation N-terminaler Enden von Histonen (Ac = Acetylierung, Ph = Phosphorylierung, Me = Methylierung), der Addition von Methylgruppen an die Nukleinbase Cytosin durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) sowie der Translationsinhibition durch microRNAs.

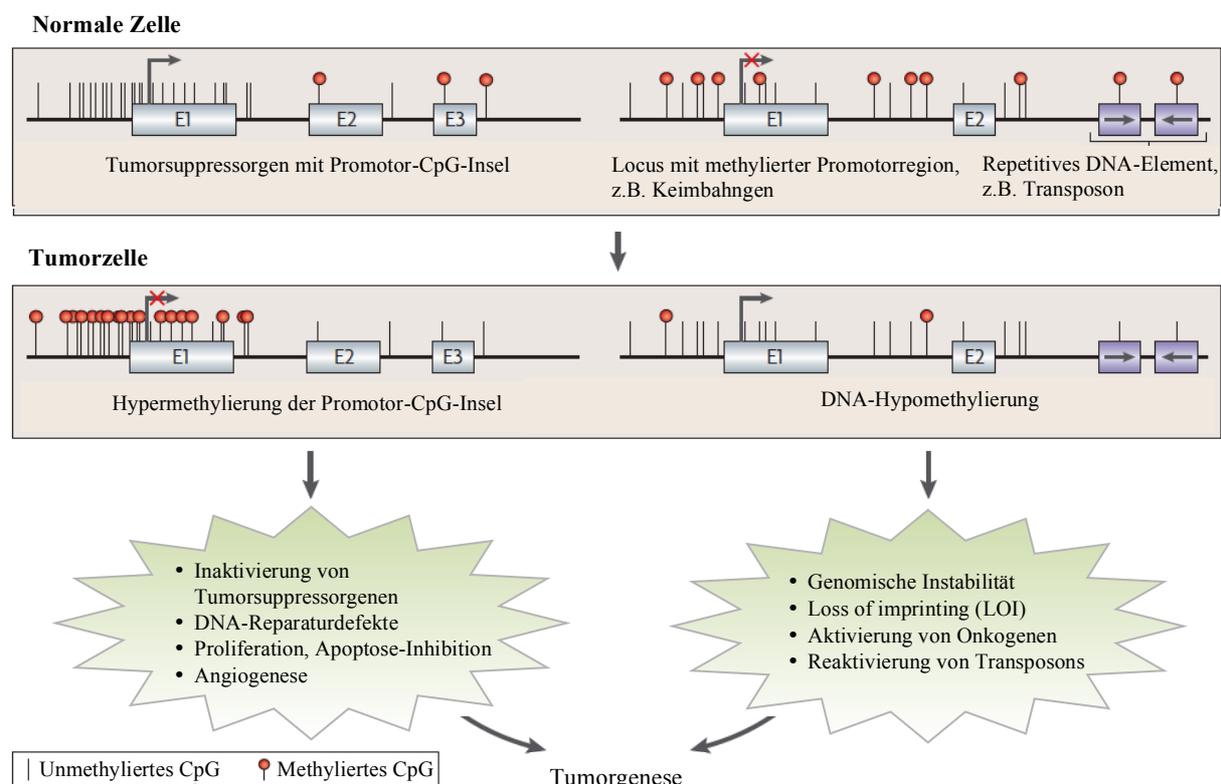


Die DNA-Methylierung beruht auf der Addition einer Methylgruppe an die Nukleinbase Cytosin eines CpG-Dinukleotids durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) (Kumar et al. 1994). Methylierte CpG-Dinukleotide finden sich im Genom überwiegend im Bereich repetitiver DNA-Elemente (*interspersed* und *tandem repeats*), während Promotoren, initiale Exons und CpG-Inseln weitgehend unmethyliert sind (Rollins et al. 2006). CpG-Inseln (CGI) sind Regionen, die mindestens 200bp umfassen, einen GC-Gehalt von über 50 % aufweisen und häufig im Bereich von Promotoren lokalisiert sind (Sandoval et al. 2012).

Die Methylierung ursprünglich unmethylierter CpG-Inseln im Bereich von Promotoren (Hypermethylierung) ist mit der Inaktivierung zahlreicher Gene insbesondere von Tumorsuppressor- bzw. DNA-Reparaturgenen assoziiert (Herman et al. 2003; Esteller 2008). 5-Methylcytosin bewirkt vermutlich einerseits die unmittelbare Verdrängung von Transkriptionsfaktoren und ermöglicht andererseits die Bindung von *methyl-CpG-binding domain proteins* (MBDs), die die Formation von schwer zugänglichem, transkriptionell inaktivem Heterochromatin vermitteln (Adalsteinsson et al. 2014).

Der Verlust von DNA-Methylierung (Hypomethylierung) korreliert mit der Progression verschiedener Tumoren und führt zur genomischen Instabilität, zur Reaktivierung von Transposons und zu einem *loss of imprinting* (LOI) bzw. zur Aktivierung von Onkogenen (Esteller 2007; Jelinic et al. 2007).

Abbildung 13: Bedeutung der DNA-Methylierung für die Tumorgene. Adaptiert nach Esteller 2007. Gezeigt werden Mechanismus und Auswirkungen der DNA-Hyper- und Hypomethylierung. E = Exon.



Histone vermitteln die Kondensation von DNA in Form von Nukleosomen. Die Interaktion von DNA und Histonen wird durch posttranslationale, N-terminale Histon-Modifikationen beeinflusst, die die Umstrukturierung von Chromatin und dadurch eine veränderte Genexpression bewirken (Jenuwein et al. 2001; Kouzarides 2007). Die Auswirkungen der Histon-Modifikation hängen von der modifizierten Aminosäure (Lysin, Arginin, Serin), der Art (z.B. Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung) und der Anzahl (z.B. Mono-, Di-, Trimethylierung) der Modifikationen ab (Esteller 2008).

MicroRNAs sind kurze, nichtkodierende RNAs, die die posttranskriptionale Inaktivierung von Genen vermitteln (Bartel 2004; Bartel 2009). Sie binden an komplementäre Sequenzen der 3' untranslatierten Region (3'UTR) der entsprechenden Ziel-mRNA und verhindern dadurch die Translation bzw. induzieren die Destabilisation oder Degradation des mRNA-Moleküls (Fabian et al. 2010; Guo et al. 2010).

1.2.4 Epigenetische Charakteristika maligner Gliome

Neben genetischen Alterationen (s. 1.1.3) spielen verschiedene epigenetische Veränderungen eine zentrale Rolle für die Initiation und Progression maligner Gliome (Nagarajan et al. 2009; Martinez 2012). Cadieux et al. konnten in primären Glioblastomen und verschiedenen Gliomzelllinien eine genomweite Hypomethylierung in repetitiven DNA-Elementen (u.a. des *tandem repeat satellite 2* (Sat2)), die Demethylierung und Aktivierung des möglichen Onkogens *Melanoma-associated antigen-1* (MAGE-A1) sowie die gleichzeitige Defizienz des Schlüsselenzyms Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) nachweisen (Cadieux et al. 2006). MTHFR ist entscheidend an der Bereitstellung des Methyl donors *S*-Adenosylmethionin (SAM) beteiligt, der ein wichtiges Cosubstrat der DNA-Methyltransferasen darstellt (Kumar et al. 1994). Eine weitere Studie bestätigte die Hypomethylierung von Sat2 in Glioblastomen und postulierte einen möglichen Zusammenhang mit der verminderten Expression der DNA-Methyltransferase (DNMT3a) (Fanelli et al. 2008).

Zahlreiche Studien belegen darüber hinaus eine Locus-spezifische Hypermethylierung und Inaktivierung von Genen, die den Zellzyklus, die DNA-Reperatur sowie die Invasion und Apoptose von Gliomzellen regulieren (Martinez 2012). Die Hypermethylierung von CpG-Inseln betrifft dabei insbesondere Gene von GBM-Schlüsselsignalwegen wie CDKN2, RB1, PTEN und TP53 (Costello et al. 1996; Nakamura et al. 2001; Baeza et al. 2003; Amatya et al.

2005). Neuere Studien dokumentieren außerdem die Hypermethylierung der möglichen Tumorsuppressorgene *epithelial membrane protein 3* (EMP3) und *protocadherin- γ subfamily A11* (PCDH- γ -A11), die an der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind (Alaminos et al. 2005; Waha et al. 2005).

Ein weiteres Beispiel ist die bereits erwähnte therapeutisch relevante Hypermethylierung von CpG-Inseln im Bereich des MGMT-Promotors von Glioblastomen, die vermutlich ein verbessertes Ansprechen auf das Alkylanz Temozolomid indiziert (Esteller et al. 2000; Hegi et al. 2005). Die Hypermethylierung des *suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1)-Gens vermindert dagegen vermutlich die Wirksamkeit einer Strahlentherapie (Zhou et al. 2007).

Interessant ist, dass verschiedene Tumorentitäten häufig durch charakteristische Methylierungsmuster gekennzeichnet sind (Costello et al. 2000). Astrozytäre Gliome zeichnen sich beispielsweise durch Subtyp-spezifische epigenetische Alterationen aus (Uhlmann et al. 2003) und auch die klinisch definierten Glioblastom-Subgruppen weisen unterschiedliche epigenetische Marker auf, wobei insbesondere sekundäre Glioblastome durch die Hypermethylierung zahlreicher GBM-Schlüsselgene charakterisiert sind (Nakamura et al. 2001; Ohgaki et al. 2007; Wiencke et al. 2007). Noushmehr et al. konnten darüber hinaus eine bereits erwähnte molekulare Glioblastom-Subgruppe (G-CIMP) identifizieren, die sich durch Hypermethylierung zahlreicher Gene sowie eine bessere Prognose auszeichnet (Noushmehr et al. 2010).

Neben der veränderten DNA-Methylierung spielt die aberrante Expression bzw. Repression von microRNAs (z.B. miR-221, miR-128) eine wichtige Rolle für die Proliferation, Differenzierung und Invasion maligner Gliomzellen (Ciafre et al. 2005; Gabriely et al. 2008; Godlewski et al. 2008; Silber et al. 2008).

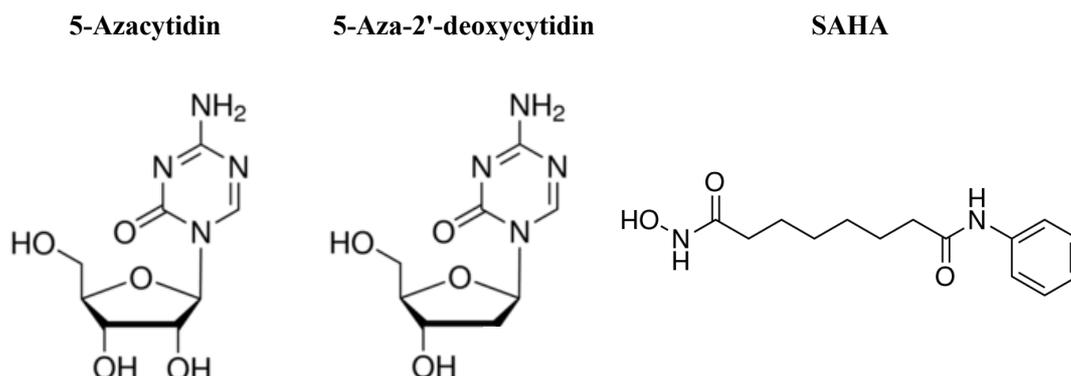
Neuere Studien zeigen außerdem veränderte Expressionsmuster von Histon-modifizierenden Enzymen in Glioblastomen auf. Alterationen betreffen dabei u.a. Proteine der Polycomb-Gruppe (PcG), Histon-Deacetylasen (HDAC), Histon-Demethylasen, Histon-Methyltransferasen und die bereits erwähnten MBDs (Hayry et al. 2008; Lucio-Eterovic et al. 2008; Parsons et al. 2008). Sturm et al. konnten zusätzlich zwei Mutationen des Histons H3F3A in Glioblastomen identifizieren (Sturm et al. 2012).

1.2.5 Epigenetische Alterationen: Neue Biomarker und pharmakologische Angriffspunkte in der Diagnostik und Therapie maligner Gliome ?

Im Gegensatz zu genetischen Mutationen sind epigenetische Alterationen wie Promotorhypermethylierung und Histonacetylierung theoretisch reversibel und daher vielversprechende neue pharmakologische Angriffspunkte, insbesondere in der Therapie maligner Gliome (Nagarajan et al. 2009; Malzkorn et al. 2011). Zentrale Probleme bisheriger epigenetischer Ansätze sind jedoch die fehlende Spezifität und die geringe Bioverfügbarkeit der verwendeten Wirkstoffe. Die globale Demethylierung der DNA birgt neben dem vermeintlichen Nutzen durch Reaktivierung epigenetisch inaktivierter Tumorsuppressorgene die Gefahr, gleichzeitig bisher inaktive Onkogene zu aktivieren (Kelly et al. 2010). Die gezielte Umkehr epigenetischer Alterationen ohne die gleichzeitige Veränderung globaler epigenetischer Muster sowie eine verbesserte Bioverfügbarkeit sind Gegenstand aktueller Studien (Mund et al. 2010; Rius et al. 2012; Dhanak et al. 2014).

Bereits etablierte Ansätze umfassen DNMT-Inhibitoren aus der Gruppe der Azanukleotide (5-Azacytidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin) in der Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms und HDAC-Inhibitoren aus der Gruppe der Hydroxamsäuren (Suberoylanilid-Hydroxamsäure; SAHA) in der Behandlung des kutanen T-Zelllymphoms (Mack 2006) (s. Abb. 14). Azanukleotide werden in die DNA eingebaut, binden DNMTs und vermitteln ihre Degradation (Issa et al. 2009). HDAC-Inhibitoren inaktivieren HDACs, steigern die Acetylierung von Histonen, vermitteln eine offene Chromatin-Struktur und machen die DNA dadurch empfänglicher für Chemo- und Strahlentherapie (Lane et al. 2009).

Abbildung 14: Chemische Struktur verschiedener epigenetisch-aktiver Wirkstoffe. Aus Kelly et al. 2010. Gezeigt wird die chemische Struktur der DNMT-Inhibitoren 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-deoxycytidin und des HDAC-Inhibitors Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA).



Erste Studien zur Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf Gliomzellen zeigen eine verminderte Proliferation sowie eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Chemo- und Strahlentherapie unter SAHA auf (Eyupoglu et al. 2005; Ugur et al. 2007; Yin et al. 2007). Eine erhöhte Chemo- und Radiosensitivität von Gliomzellen wurde außerdem unter HDAC-Inhibitoren aus der Gruppe der Carbonsäuren wie AN-9 (Pivaloyloxymethylbutyrat) (Entin-Meer et al. 2005; Entin-Meer et al. 2007) und Valproinsäure (Chinnaiyan et al. 2008; Masoudi et al. 2008; Weller et al. 2011) beschrieben.

Neben neuen Therapieansätzen liefert das bereits erwähnte spezifische Methylierungsmuster zahlreicher Tumoren neue diagnostische Möglichkeiten. Bereits geringe Mengen methylierter DNA, die im Rahmen von Tumorzellapoptose und -nekrose ins Blut und in andere Körperflüssigkeiten gelangen, können mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) detektiert werden (Laird 2003). Einige Studien dokumentieren bereits die Bedeutung dieser epigenetischen Marker für die Diagnostik (Hypermethylierung von *glutathione S-transferase P* (GSTP1) beim Prostatakarzinom), Prognose (Hypermethylierung von *death-associated protein kinase* (DAPK) in Bronchialkarzinomen) und Therapie (Hypermethylierung von MGMT in Gliomen) verschiedener Tumorentitäten (Esteller 2008). Weaver et al. untersuchten erstmals tumorspezifische epigenetische Marker in Blut und Tumorgewebe von Patienten mit Gliomen und konnten eine 60 %-ige Übereinstimmung nachweisen (Weaver et al. 2006).

Neuere Studien konnten darüber hinaus charakteristische microRNA-Muster in Blut- und Liquorproben von Patienten detektieren, die sich zur Diagnose von Gliomen eignen könnten (Roth et al. 2011; Baraniskin et al. 2012).

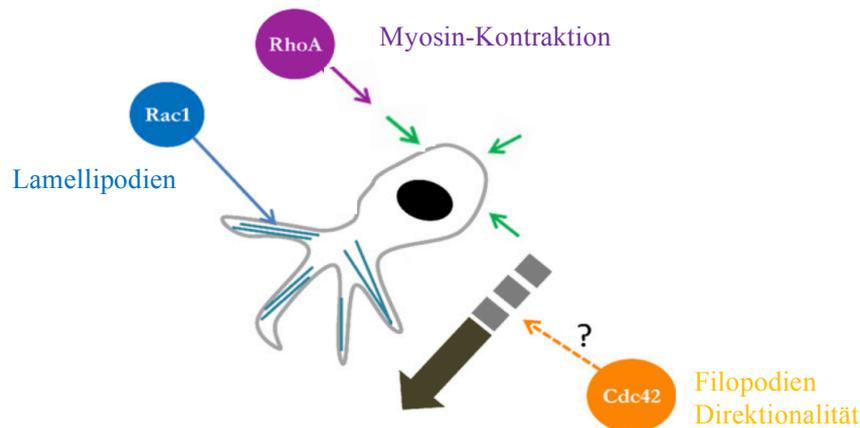
Diese Erkenntnisse zeigen das Potential epigenetischer Alterationen als vielversprechende Biomarker in der Diagnostik maligner Gliome auf.

1.3 LIM-Kinasen: Neue Angriffspunkte in der Therapie maligner Gliome ?

1.3.1 Rho-GTPasen und ihre Effektormoleküle: Regulatoren von Zellmorphologie und -motilität

Die Rho-GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 sind wichtige Regulatoren der dynamischen Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, beeinflussen maßgeblich die zelluläre Polarität, Morphologie und Motilität und steuern damit Migration und Invasion von Tumorzellen (Hall 2005; Rathinam et al. 2011; Murali et al. 2014).

Abbildung 15: Rho-GTPasen regulieren die Zellmorphologie und -polarisation. Adaptiert nach Rougerie et al. 2012. Einzelheiten siehe Text.



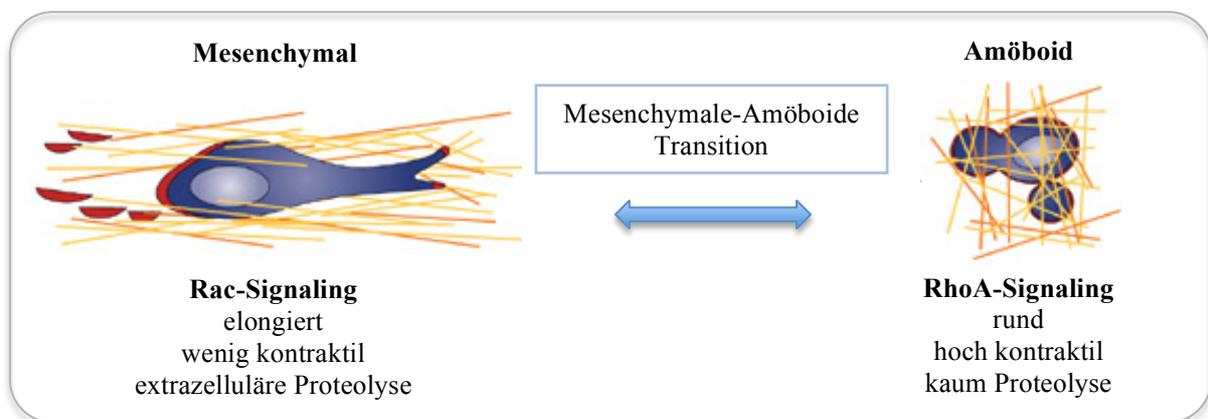
Die Aktivität der Rho-GTPasen unterliegt dem Einfluss von Regulatorproteinen, die drei Klassen zugeordnet werden können: *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs), *GTPase-activating proteins* (GAPs) und *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs) (Ellenbroek et al. 2007). GEFs, die den Austausch von GDP durch GTP katalysieren, sind die wichtigsten Aktivatoren der Rho-GTPasen. Neuere Erkenntnisse zeigen die PI3K-vermittelte Aktivierung von GEFs auf und stellen so eine Verbindung zwischen den Rho-GTPasen und dem in Glioblastomen häufig alterierten RTK/Ras/PI3K-Signalweg her (Welch et al. 2003; Hanna et al. 2013) (s. Abb. 4 und 8). Im Rahmen einer positiven Feedback-Schleife können Rho-GTPasen wiederum die PI3K aktivieren (Yang et al. 2012).

Die Polarisation von Zellen beruht auf einer gezielten, räumlich-koordinierten Aktivierung der Rho-GTPasen (Nobes et al. 1999; Fortin Ensign et al. 2013): Während Rac am vorderen Zellpol die Ausbildung von Lamellipodien induziert, vermittelt RhoA am hinteren Zellpol die

Kontraktion von Aktin-Myosin-Filamenten (Stressfasern). Cdc42 koordiniert schließlich die Migrationsrichtung und reguliert die Formation von Filopodien (s. Abb. 15).

Die unterschiedliche Aktivität des RhoA/ROCK-Signalweges bzw. des Rac/PAK-Signalweges prägt darüber hinaus die zelluläre Motilität (Sadok et al. 2014): Eine hochkontraktile, amöboide Motilität wird dabei durch RhoA/ROCK-Aktivierung, eine weniger kontraktile, mesenchymale Motilität durch Rac/PAK-Aktivierung induziert. Unter dem Einfluss bestimmter Umgebungsfaktoren ist allerdings ein Wechsel des Bewegungsmusters möglich (Sanz-Moreno et al. 2008) (s. Abb. 16).

Abbildung 16: Rho-GTPasen prägen die Form der Zellmotilität. Adaptiert nach Friedl et al. 2003.



Glioblastome infiltrieren das umliegende Gewebe in Form einzelner, elongierter, mesenchymaler Zellen (Friedl et al. 2003), ein Vorgang, der überwiegend durch den Rac/PAK-Signalweg vermittelt wird (Yamazaki et al. 2009). Die Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges ist dagegen vermutlich mit einer verminderten Migration der Gliomzellen assoziiert (Fortin Ensign et al. 2013).

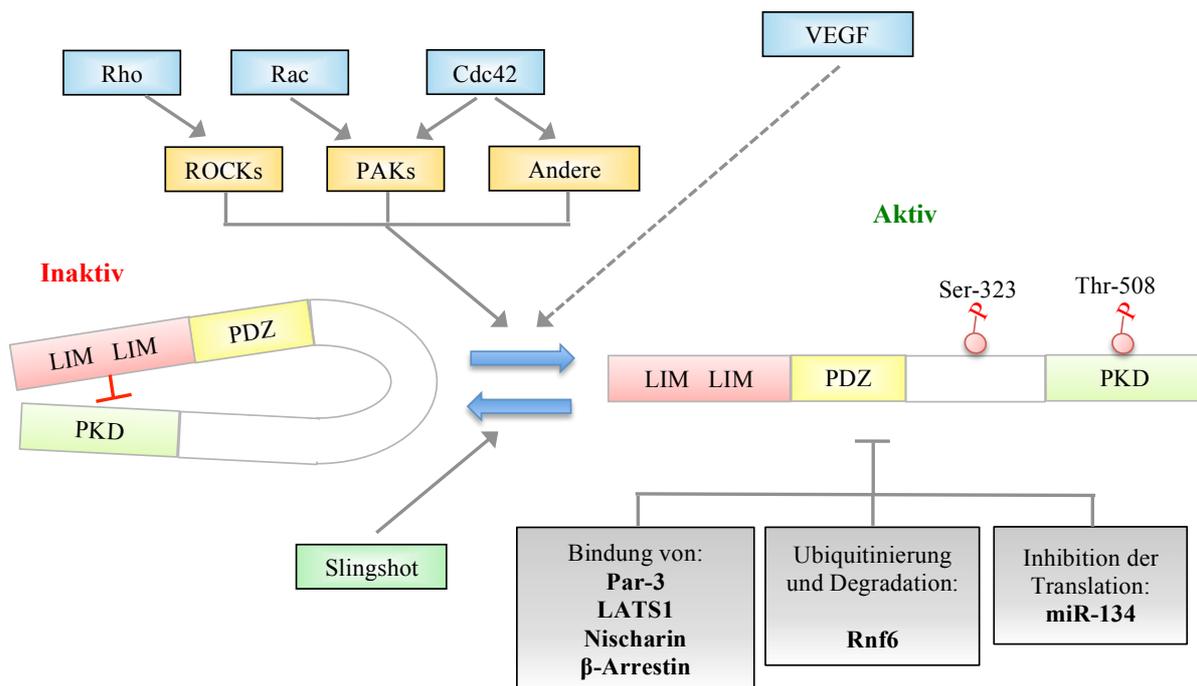
Ein verändertes Gleichgewicht zwischen Rac- und RhoA-Aktivierung beeinflusst Motilität- und Morphologie von Gliomzellen (Goldberg et al. 2006). So führt die Inhibition des Rac/PAK-Signalweges zu einer verminderten Migration, verhindert die Ausbildung von Lamellipodien und wirkt apoptotisch (Senger et al. 2002; Chan et al. 2005). Die Auswirkungen der RhoA/ROCK-Inhibition auf Gliomzellen sind hingegen umstritten (s. 1.3.3).

1.3.2 LIM-Kinasen: Struktur, Regulation und Bedeutung

Als gemeinsames Zielprotein der Rho-GTPasen vermitteln die LIM-Kinasen die Phosphorylierung und Inaktivierung von Cofilin und sind möglicherweise Schlüsselenzyme der Tumorzellinvasion und -metastasierung (Scott et al. 2007).

LIM-Kinasen besitzen zwei autoinhibitorische N-terminale LIM/Zinkfinger-Domänen, eine interne PDZ-Domäne sowie eine C-terminale Proteinkinase-Domäne (PKD) (Mizuno et al. 1994; Nagata et al. 1999) (s. Abb. 17). Neben der Phosphoregulierung von Cofilin beeinflussen sie die Aktivität der Transkriptionsfaktoren CREB und Nurr1 sowie des *p25/tubulin polymerization promoting* Proteins (TPPP) (Yang et al. 2004; Sacchetti et al. 2006; Acevedo et al. 2007).

Abbildung 17: Struktur und Regulation der LIM-Kinasen. Modifiziert nach Mizuno 2013. Einzelheiten siehe Text.



Die Aktivität der LIMK unterliegt einer komplexen Kontrolle (Scott et al. 2007; Mizuno 2013) (s. Abb. 17): PAKs, ROCKs und weitere Kinasen induzieren über Phosphorylierung eines Threonin-Restes (Thr-508 von LIMK-1, Thr-505 von LIMK-2) eine Konformationsänderung, heben dadurch die LIM-Domäne-vermittelte Autoinhibition auf und aktivieren so die LIM-Kinasen. Aktivierend wirken darüber hinaus die VEGF-vermittelte

Phosphorylierung von Serin-323, die limitierte Proteolyse von Aspartat-240 sowie möglicherweise die Bindung von *bone morphogenic protein receptor II* (BMPRII). Einen inhibitorischen Einfluss haben u.a. die Bindung von Par-3, LATS1, Nischarin und β -Arrestin, die Rnf6-vermittelte Ubiquitinierung und proteasomale Degradation, die Dephosphorylierung durch Slingshot sowie die Translationsinhibition durch die microRNA miR-134.

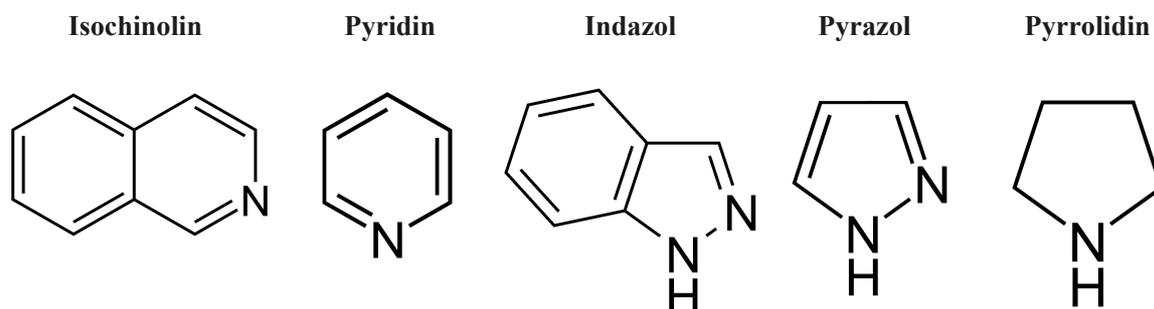
Sowohl LIMK-1 als auch LIMK-2 werden nahezu ubiquitär, insbesondere jedoch im ZNS exprimiert (Foletta et al. 2004; Acevedo et al. 2006).

1.3.3 LIMK- und ROCK-Inhibitoren: Struktur, Wirkung und Bedeutung

LIMK und ROCK stellen aufgrund ihrer Bedeutung als zentrale Regulatoren der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts attraktive pharmakologische Zielstrukturen in der Therapie zahlreicher Erkrankungen dar (Scott et al. 2007; Olson 2008; Manetti 2012; Guan et al. 2013).

ROCK-Inhibitoren können anhand ihrer chemischen Struktur unterteilt werden, wobei u.a. Derivate der Isochinoline (Fasudil (HA-1077), ARC-1083), Pyridine (Y-27632), Indazole (SR-1459, SR-899), Pyrazole und Pyrrolidine unterschieden werden (Guan et al. 2013).

Abbildung 18: Molekulare Leitstruktur wichtiger ROCK-Inhibitoren.



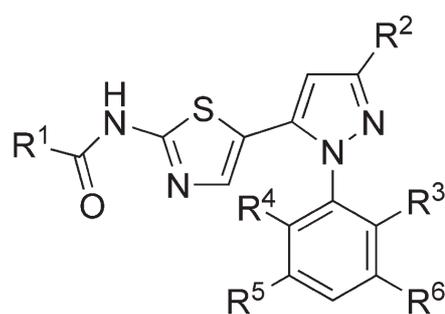
Neben der Aktivierung von LIMK induzieren die ROCK die Phosphorylierung von Myosin-Leicht-Ketten (MLC) und vermitteln dadurch u.a. eine Vasokonstriktion. Aufgrund ihrer vasodilatierenden Wirkung eignen sich ROCK-Inhibitoren daher zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen (koronare und zerebraler Vasospasmen, systemische und pulmonale Hypertonie) (Dong et al. 2010).

Neuere Studien dokumentieren nun einen Einfluss von ROCK-Inhibitoren auf die Proliferation, Invasion und Metastasierung maligner Tumoren, insbesondere von Gliomen. Fasudil hemmt sowohl die Migration und Invasion von Gliomzellen als auch die Tumorzell-vermittelte Angiogenese (Deng et al. 2010; Nakabayashi et al. 2011). Der Einfluss von Y-27632 auf Gliomzellen ist hingegen bislang umstritten, wobei sowohl pro- als auch anti-invasive Effekte beschrieben werden (Salhia et al. 2005; Zohrabian et al. 2009).

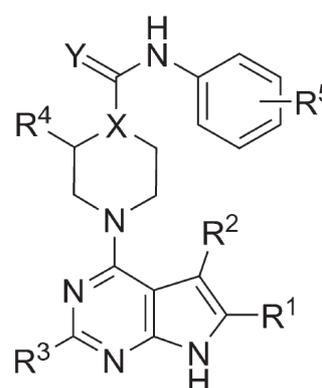
LIMK-Inhibitoren umfassen ebenfalls unterschiedliche chemische Verbindungen, wobei die ersten Wirkstoffe von *Bristol-Myers Squibb* (BMS-Verbindungen, Phenyl-Pyrazolyl-Thiazolyl-Amid-Derivate u.a. BMS-5) entwickelt wurden (Ross-Macdonald et al. 2008). Weitere Wirkstoffe kamen 2009 von *Lexicon Pharmaceuticals* (Lexicon-Verbindungen, Pyrrolopyrimidin-Derivate) dazu (Harrison et al. 2009). 2012 wurden schließlich die LIMK-Inhibitoren Pyr1 (Prudent et al. 2012) und T56-LIMKi (Mashiach-Farkash et al. 2012) identifiziert. Eine inhibitorische Wirkung haben außerdem vermutlich Aryl-Sulfonamide und verschiedene Peptide (Manetti 2012).

Abbildung 19: Molekulare Leitstruktur wichtiger LIMK-Inhibitoren. Zusammengestellt aus Manetti 2012, Prudent et al. 2012 und Mashiach-Farkash et al. 2012.

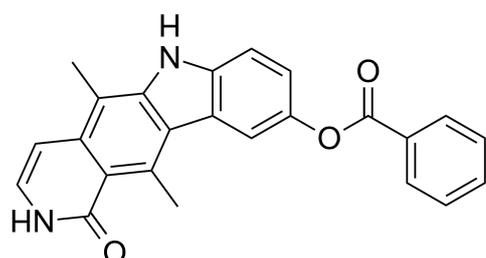
Phenyl-Pyrazolyl-Thiazolyl-Amid-Derivate



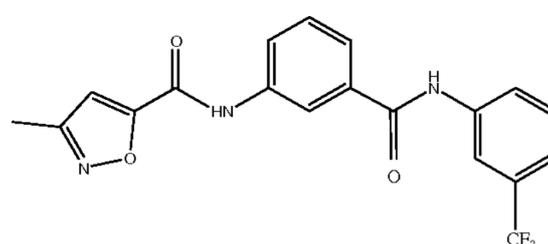
Pyrrolopyrimidin-Derivate



Pyr1



T56-LIMKi



Die LIMK sind ähnlich wie die ROCK an der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt (pulmonale Hypertonie, intrakranielle Aneurysmata) (Scott et al. 2007) und spielen zudem eine Rolle bei der Entstehung der okulären Hypertension (Harrison et al. 2009).

Darüber hinaus beeinflussen sie ebenfalls die Invasion und Metastasierung maligner Tumoren. Eine erhöhte Expression von LIMK-1 findet sich beispielsweise in Mamma-, Melanom- und Prostatakarzinomzellen und ist mit einer erhöhten Zellmotilität bzw. einem gesteigerten invasiven Potential assoziiert (Davila et al. 2003; Okamoto et al. 2005; Bagheri-Yarmand et al. 2006). Erste Versuche mit LIMK-Inhibitoren an Mammakarzinomzellen wecken nun neue therapeutische Hoffnungen (Scott et al. 2010; Li et al. 2013).

Maligne Gliome weisen ebenfalls eine erhöhte Expression der LIM-Kinasen, insbesondere von LIMK-2, auf (Fedorchenko 2009; Schulze 2015; Schulze et al. 2015). Obwohl die LIM-Kinasen einen vielversprechenden neuen Angriffspunkt in der Therapie maligner Gliome darstellen, wurde der Einfluss von LIMK-Inhibitoren in Glioblastomen bislang nur in einer Studie untersucht (Park et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss des ROCK-Inhibitors Y-27632 (ROCKi) sowie des LIMK-Inhibitors BMS-5 (LIMKi) auf die Migration und Invasion maligner Gliomzellen untersucht. Eine Beschreibung ihrer Molekularstrukturen sowie ihrer potentiellen Wirkweisen findet sich unter 4.7.1.

2. ZIELE DER ARBEIT

Chronophin und LIM-Kinasen nehmen eine Schlüsselposition bei der Phosphoregulierung der Cofilin-Aktivität ein und beeinflussen damit maßgeblich die Architektur des Aktin-Zytoskeletts, deren Umstrukturierung die treibende Kraft für Zellmigration und -invasion darstellt.

Chronophin katalysiert die Dephosphorylierung und Reaktivierung von Cofilin (Gohla et al. 2005). Gliomzellen weisen eine deutlich verminderte Expression von Chronophin auf und die Reexpression der Phosphatase führt zu einer verringerten Migration und Invasion von U-87MG Glioblastomzellen (Fedorchenko 2009; Schulze 2015; Schulze et al. 2015). Die molekularen Mechanismen, die dem Verlust von Chronophin in Gliomen zugrunde liegen, wurden jedoch bislang nicht untersucht.

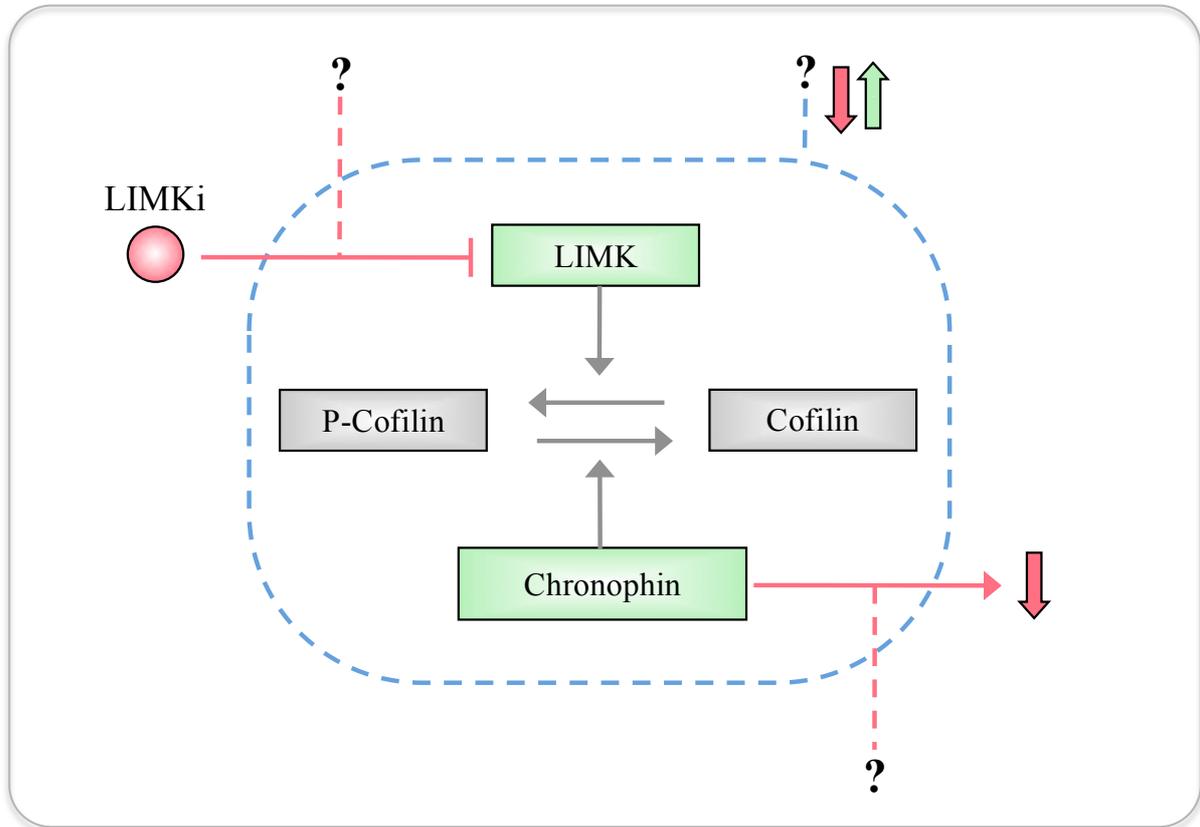
Als gemeinsames Zielprotein der Rho-GTPasen vermitteln die LIM-Kinasen die Phosphorylierung und Inaktivierung von Cofilin (Arber et al. 1998; Yang et al. 1998). Eine erhöhte Expression der LIMK findet sich in verschiedenen Tumorentitäten, insbesondere in Glioblastomen, und ist mit einer erhöhten Zellmotilität bzw. einem gesteigerten invasiven Potential assoziiert (Scott et al. 2007; Fedorchenko 2009; Schulze 2015; Schulze et al. 2015). Neu entwickelte LIMK-Inhibitoren ermöglichen nun ihre pharmakologische Inaktivierung.

Die vorliegende Arbeit widmet sich daher (s. Abb. 20):

- der Untersuchung von Cofilin, Chronophin und LIMK in Glioblastom-Zelllinien und Gewebeproben astrozytärer Gliome im Rahmen von Western Blot- bzw. immunhistochemischen Analysen
- der Aufdeckung der molekularen Ursachen, die zum Verlust von Chronophin in Glioblastomen führen, im Rahmen von Sequenzierungs- und epigenetischen Analysen sowie einer Vorstudie zur LOH-Analyse des Chronophin-Locus
- der Charakterisierung des Einflusses von LIMK-Inhibitoren auf Glioblastomzellen im Rahmen von Zellviabilitäts-, Western Blot- und immunzytochemischen Analysen sowie 2D-Migrations- und 3D-Invasionsassays

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen zu einem verbesserten Verständnis der Migration und Invasion von Gliomzellen beitragen sowie neue pharmakologische Angriffspunkte in der Therapie maligner Gliome aufzeigen.

Abbildung 20: Ziele der Arbeit. Graphische Veranschaulichung der zentralen Fragestellungen: „Welche Expressionmuster von Cofilin, Chronophin und LIMK weisen astrozytäre Gliome auf ?“, „Welche Ursachen führen zum Verlust von Chronophin in Glioblastomen ?“ und „Welchen Einfluss haben LIMK-Inhibitoren auf Glioblastomzellen ?“.



3. MATERIALIEN

3.1 Hersteller- und Händlerliste

- (1) A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg, Deutschland
- (2) Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
- (3) AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- (4) ATCC, Manassas/VA, USA
- (5) B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- (6) BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
- (7) BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
- (8) BioChain Institute Inc., Newark/CA, USA
- (9) Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- (10) BioRad, München, Deutschland
- (11) Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- (12) Cell Signaling Technology, Danvers/MA, USA
- (13) Cytoskeleton Inc., Denver/CO, USA
- (14) Epitomics, Burlingame/CA, USA
- (15) Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- (16) Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
- (17) GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
- (18) GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
- (19) GK Sondermaschinenbau GmbH Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland
- (20) Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
- (21) Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
- (22) Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
- (23) ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
- (24) Idea Scientific, Minneapolis/MN, USA
- (25) IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
- (26) Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
- (27) Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
- (28) Leitz, Wetzlar, Deutschland

- (29) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
- (30) Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland
- (31) MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster, Deutschland
- (32) Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Deutschland
- (33) Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- (34) New England BioLabs Inc., Ipswich/MA, USA
- (35) Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
- (36) PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
- (37) Pathology Products Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
- (38) Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
- (39) PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
- (40) PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
- (41) Prior Scientific Instruments GmbH, Jena, Deutschland
- (42) Prof. SS Tony To, Department of Health Technology and Informatics,
The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, China
- (43) Promega, Heidelberg, Deutschland
- (44) QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
- (45) Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
- (46) Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
- (47) SCHOTT Instruments GmbH, Mainz, Deutschland
- (48) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- (49) SouthernBiotech, Birmingham/AL, USA
- (50) SYMANSIS NZ LTD, Timaru, Neuseeland
- (51) Thermo Fisher Scientific, Rockford/IL, USA
- (52) VECTOR LABORATORIES INC., Burlingame/CA, USA
- (53) Wako Chemicals, Neuss, Deutschland

3.2 Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	(3)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	(48)
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid (X-Gal)	(48)
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 30 % (29:1)	(11)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	(30)
Ampicillin Natriumsalz	(11)
Aprotinin	(48)
Beta-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol)	(48)
Borsäure (H_3BO_3)	(33)
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	(3)
Bromphenolblau	(48)
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	(3)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	(34)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(3)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	(3)
Essigsäure 100 %	(30)
Ethanol 100 %; 96 %	(11)
Ethanol 70 %	(48)
Ethidiumbromid (10 mg/mL)	(48)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	(48)
Fluoromount G	(49)
Glucose	(3)
Glycerol, wasserfrei	(3)
Glycin	(11)
Hefeextrakt	(3)
Isopropanol	(48)
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	(3)
Kaliumacetat	(3)
Kaliumchlorid (KCl)	(30)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	(30)
LB-Agar	(3)
LB-Medium	(11)

Leupeptin	(11)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	(3)
Magnesiumsulfat-heptahydrat (MgSO ₄)	(33)
Mangan(II)-chlorid (MnCl ₂)	(3)
Methanol	(48)
Milchpulver	(3)
Natriumazid (NaN ₃)	(30)
Natrium-beta-glycerophosphat (Na-β-glycerophosphat)	(48)
Natriumchlorid (NaCl)	(11)
Natrium-desoxycholat (NaC ₂₄ H ₃₉ O ₄)	(3)
Natriumhydroxid (NaOH)	(3)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	(11)
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	(3)
Normal goat serum (NGS)	(36)
Nonylphenoxypolyethoxyethanol (NP-40)	(48)
OrangeG	(11)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	(48)
Phosphataseinhibitor Cocktail 1/3	(48)
Phosphataseinhibitor Cocktail 2	(48)
Phos-tag™ AAL-107	(53)
Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	(3)
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween-20)	(48)
Ponceau S	(48)
RNase A	(48)
Salzsäure (HCl)	(48)
Saponin (1:10 in dH ₂ O)	(33)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	(11)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	(11)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	(11)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	(3)
Triton X-100	(33)
Trypton	(3)
Wasser, Nuklease-frei	(11)
Xylol, Isomerengemisch für die Histologie	(3)

3.3 Zellkultur

3.3.1 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in der Arbeit verwendet:

DBTRG-05MG	(26)
GBM2603	(42)
GBM6840	(42)
U-87MG	(4)
U-138MG	(26)
U-343MG	(42)

3.3.2 Zellkulturmedien, Zusätze und Materialien

BM Cyclin	(45)
DMEM Zellkulturmedium (4,5 g/L Glucose)	(36)
D-PBS	(36)
FCS, Herkunft: EU-zertifiziert (Nr. S 0115)	(9)
Kryoeinfriergerät (Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container)	(1)
Kryoröhrchen (Nalgene® cryogenic vials)	(48)
L-Glutamin	(36)
Neubauer-Zählkammer (0,1 mm · 0,0025 mm ² pro Kleinstquadrat)	(38)
Penicillin / Streptomycin (10.000 U/mL / 10.000 µg/mL)	(36)
Trypsin/EDTA (0,5/0,2 %, 10× Lösung in PBS)	(36)
Zellkulturschalen 10 cm	(51)

3.4 Western Blot Analyse

96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc™ Edge 96-Well Plate)	(51)
BCA Protein Assay Kit	(51)
Gelgießkammer (Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Module)	(10)
Gelkassetten und -kämme (Criterion Empty Cassettes)	(10)
Goat anti-mouse IgG Fc Secondary Antibody, HRP conjugate (Nr. 31437)	(51)

Goat anti-rabbit IgG F(ab') ₂ Secondary Antibody, HRP conjugate (Nr. 31461)	(51)
Nitrozellulosemembran	(17)
Omnifix®-F Spritzen und Nadeln	(5)
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	(10)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat	(51)
Whatman GF/B Papier	(1)
Zellkulturschalen 3 cm	(51)
Zellschaber	(20)

3.5 Immunhistochemie

ABC-Reagenz	(52)
Biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (Nr. BA-1000)	(52)
DAB	(52)
Dako Pen	(37)
Entellan®	(33)
Eosin G (1 % Lösung)	(11)
Färbesystem (feuchte Kammer)	(1)
Hämalaunlösung, sauer nach Mayer	(11)
Kaninchen-Immunglobuline (Rabbit IgG, Whole Molecule Control) (Nr. 31235)	(51)
Roti®-Histol	(11)
SuperFrost Ultra Plus® Objektträger	(11)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	(3)

3.6 Sequenzierung des Chronophin-Locus

100bp- und 1kb- DNA Ladders	(34)
Agarose GTQ Roti®garose	(11)
Bunsen- Laborbrenner	(1)
DNeasy® Blood & Tissue Kit	(44)
E.coli DH5α-Zellen	(29)
Impföse	(1)
QIAquick Gel Extraction Kit	(44)

3.7 Analyse des Promotor-Methylierungsstatus von Chronophin

384-Well-Mikrotiterplatte (Hard Shell® 384-Well 480 PCR Plate)	(10)
DNA aus Normalhirnproben (Genomic DNA Human Adult Normal Tissue) Frontallappen (Lot A705160) Temporallappen (Lot B302142)	(8)
DNeasy® Blood & Tissue Kit	(44)
EpiTect® Methyl II DNA Restriction Kit (Nr. 335452)	(44)
Kontroll-DNA, methyliert / unmethyliert (Cells-to-CpG™ Methylated & Unmethylated gDNA Control Kit) (Lot 1206264/5)	(29)
Microseal® 'B' Adhesive Seals	(10)
RT ² qPCR Primer Assay for Human PDXP: PPH60089A (Nr. PPH60089A-200 / EPHS109821-1A) (Lot 20121211003) (CpG Island ID 109821, Location 22: 38054403-38055450)	(44)
RT ² SYBR® Green qPCR Mastermix (Nr. 330500)	(44)

3.8 Loss of heterozygosity-Analyse

100bp- und 1kb- DNA Ladders	(34)
DNeasy® Blood & Tissue Kit	(44)

3.9 Inhibitor-Versuche

3.9.1 Verwendete Inhibitoren

BMS-5 (LIMKi) (Lot PYB189-016-3) (50)

Y-27632 (ROCKi) (Lot 071M4714V) (48)

3.9.2 Neutralrot-Test

96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc™ Edge 96-Well Plate) (51)

Neutralrot (33)

Staurosporin (48)

3.9.3 Immunzytochemie

Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Nr. A-11001) (29)

Alexa Fluor® 546 Phalloidin (Nr. A22283) (29)

Dako Pen (37)

Deckgläser, rund (11)

Färbesystem (feuchte Kammer) (1)

Paraformaldehyd (PFA) 4 % (11)

3.9.4 2D-Zellmigrations-Versuch

8-Well-Mikrotiterplatte (μ -Slide 8 well) (23)

Kollagen IV, human (48)

3.9.5 3D-Zellinvasions-Versuch

BD BioCoat™ BD Matrigel™ Invasions-Kammern (6)

Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), human (48)

Objektträger (1)

Wattestäbchen, medizinisch (1)

3.10 Enzyme und Vektoren

DreamTaq DNA Polymerase, 10× DreamTaq Buffer	(51)
EcoRI, EcoRI Buffer	(34)
pGEM®-T Easy Vector System	(43)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Phusion GC Buffer	(34)
Platinum® Pfx DNA Polymerase , PCRx Enhancer Solution	(29)
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, Q5® High GC Enhancer	(34)
T4-DNA-Ligase, 2× Rapid Ligation Buffer	(43)

3.11 Primer

Versuch	Bezeichnung	Sequenz	
Mykoplasmen- detektion	GPO-1	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'	(16)
	MGSO	5'-CTCCAATTGTCTCACTGTCTAC CACGT-3'	
Sequenzierung des Chronophin- Locus	PrimerEx1For	5'-CTTCGCTCCTCTCCCAGACT-3'	(16)
	PrimerEx1Rev	5'-CACTCTCCTGTTCCCCACCT-3'	
	PrimerEx2For	5'-CCCTGGACTTCCAGTTTCAG-3'	(16)
	PrimerEx2Rev	5'-TAGCCTTTGGATTGGTCCAC-3'	
Analyse des Promotor- Methylierungs- status	RT ² qPCR Primer Assay for Human PDXP: PPH60089A (Nr. PPH60089A-200 / EPHS109821-1A) (Lot 20121211003) (CpG Island ID 109821, Location 22: 38054403-38055450)		(44)
Loss of heterozygosity- Analyse	Mikrosatelliten- marker Chronophin	5'-ACAGCTTGATGCAGCTTTCA-3' 5'-ATGCAAATATCTCACCCCA-3'	(16)

3.12 Primärantikörperliste

Gerichtet gegen: Antigen / Abkürzung	Klon/Nr.	Antikörper-Typ	
Westernblot:			
Aktin	C4/MAB1501	Maus, monoklonal	(33)
Chronophin	C85E3/4686	Kaninchen, monoklonal	(12)
Cofilin-1 / CFL1	-/3312	Kaninchen, polyklonal	(12)
Glycerolaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase / GAPDH	14C10/2118	Kaninchen, monoklonal	(12)
Phospho-Myosin Light Chain 2 / P-MLC (Ser19)	-/3675	Maus, monoklonal	(12)
Immunzytochemie:			
α 4a-Tubulin / TUBA4A	DM1A/T9026	Maus, monoklonal	(48)
Immunhistochemie:			
Chronophin	C85E3/4686	Kaninchen, monoklonal	(12)
Cofilin-1 / CFL1	-/ACFL02	Kaninchen, polyklonal	(13)
Lim domain Kinase 2 / LIMK-2	EP969Y/1795-1	Kaninchen, monoklonal	(14)
Phospho-Cofilin (Ser3)	77G2/3313	Kaninchen, monoklonal	(12)

3.13 Andere Materialien

Deckgläser, quadratisch	(11)
Einmal-Pasteurpipetten	(1)
Einmal-Skalpelle	(1)
Greiner-Röhrchen (Falcon TM -Tubes) 15 mL, 50 mL	(6)
Mikroliterpipetten, Gilson Pipetman® G	(1)

Objektträger	(1)
Pasteurpipetten, 230 mm	(11)
PCR-Tubes	(1)
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1.000 µL	(15)
Pipetus®	(22)
Plastik-Pipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	(20)
Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	(15)

3.14 Geräte

3.14.1 Zellkultur

BBD 6220 CO ₂ Inkubator	(51)
Inkubations- / Inaktivierungsbad 1004	(18)
Laminar-Flow Werkbank	(7)

3.14.2 Western Blot Analyse

GENIE®-Blotter	(24)
ImageQuant™ LAS 4000	(17)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	(10)
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	(10)

3.14.3 Photometer

2104 EnVision® Multilabel Reader	(40)
Eppendorf BioPhotometer®	(15)
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	(39)

3.14.4 Thermocycler

C1000™ Thermal Cycler	(10)
CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System	(10)

3.14.5 Immunhistochemie

Kühlplatte	(31)
Leica RM2165 Rotary Microtome	(27)
Paraffinschrank	(32)
Paraffinstreckbad	(31)
Trockentisch	(31)

3.14.6 Waagen

Analysenwaage Kern ACJ 120-4M	(1)
Analysenwaage Scaletec SBA 52	(46)

3.14.7 Zentrifugen

Eppendorf Zentrifugen 5424 / 5424 R / 5415 D	(15)
Rotilabo®-mini-centrifuge / with butterfly-rotor	(11)
Universal 16R Zentrifuge	(2)

3.14.8 Mikroskope

Leica DM4000 B Mikroskop	(27)
Leica TCS SP5 II Confocal Laser Scanning Microscope	(27)
Leitz Labovert inverses Phasenkontrastmikroskop	(28)
Lumen 200PRO Fluorescence Illumination System	(41)
Motorized Stage Incubator System	(41)
Nikon Eclipse Ti Inverted Mikroskop	(35)

3.14.9 Sonstiges

Magnetrührer MR Hei-Mix L	(21)
Membran-Vakuumpumpe KNF	(1)
pH-Meter Lab 850	(47)
Plattformschüttler Unimax 1010	(21)
Rollenmischer RM5	(1)
Thermomixer comfort 1,5 mL	(15)
UV-Transilluminator ECX	(1)
Vortex VF2	(25)
Wasserbad WB6	(19)
Wide Mini-Sub® Cell GT System	(10)

3.15 Software und Datenbanken

EpiTect® Methyl II PCR Array Microsoft Excel based data analysis	www.sabiosciences.com/dna_methylation_data_analysis.php
GENTle 1.9.4	http://gentle.magnusmanske.de/
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., La Jolla/CA, USA
ImageJ 1.47	http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html
Image Pro-Plus 7.0	Media Cybernatics, Bethesda/MD, USA
Leica LAS AF Software	http://www.leica-microsystems.com/
NCBI BLAST® Basic Local Alignment Search Tool	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
NCBI Epigenomics Database	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/epigenomics
NCBI GeneMap'99	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99/
NCBI Nucleotide Database	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore
Primer3 v. 0.4.0 (Rozen and Skaletsky 2000)	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
Tandem repeats finder (Benson 1999)	http://tandem.bu.edu/trf/trf.html
UCSC Cancer Genomic Browser	https://genome-cancer.soe.ucsc.edu

3.16 Lösungen und Puffer

3.16.1 Zellkultur

Kulturmedium	1×	DMEM
(für Zellkultur und Inhibitor-Versuche)	10 % (v/v)	FCS
	100 U/mL	Penicillin
	100 µg/mL	Streptomycin
	5 mM	L-Glutamin
Einfriermedium	70 % (v/v)	DMEM
(für Kryokonservierung)	20 % (v/v)	FCS
	10 % (v/v)	DMSO

3.16.2 (Mn²⁺-Phos-tag™)-SDS-PAGE zur Proteinauftrennung

Ladepuffer (4× Laemmlipuffer)	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	20 %	Glycerol
	4 %	SDS
	10 %	β-Mercaptoethanol
	0,05 %	Bromphenolblau
Laufpuffer (4×), pH 8,8	1,5 M	Tris-Base
	0,4 %	SDS
Trenngel (12 % (v/v) Acrylamid-Lösung)	25 %	Laufpuffer (4×), pH 8,8
	35 %	dH ₂ O
	40 %	Acrylamid (30 %)
	0,2 mM	TEMED (4 %)
	6,5 mM	APS (10 %)

Mn ²⁺ -Phos-tag™-Trenngel (15 % (v/v) Acrylamid-Lösung)	25 %	Laufpuffer (4×), pH 8,8
	23 %	dH ₂ O
	50 %	Acrylamid (30 %)
	1 %	Phos-tag™ E-Lösung
	1 %	MnCl ₂ -Lösung (10 mM)
	0,2 mM	TEMED (4 %)
	6,5 mM	APS (10 %)
Phos-tag™ E-Lösung	5 mM	Phos-tag™ AAL-107
	3 % (v/v)	Methanol
Sammelgelpuffer (4×), pH 6,8	0,5 M	Tris-Base
	0,4 %	SDS
Sammelgel (4 % (v/v) Acrylamid-Lösung)	25 %	Sammelgelpuffer (4×), pH 6,8
	61,7 %	dH ₂ O
	13,3 %	Acrylamid (30 %)
	0,3 mM	TEMED (4 %)
	4,3 mM	APS (10 %)

3.16.3 Western Blot

Kathodenpuffer	25 mM	Tris-Base
	40 mM	Glycin
	10 %	Methanol
Anodenpuffer I	0,3 M	Tris-Base
	40 %	Methanol
Anodenpuffer II	25 mM	Tris-Base
	40 %	Methanol

Towbin-Puffer (für Mn ²⁺ -Phos-tag TM -SDS-PAGE-Gele)	25 mM 192 mM 10 % (v/v)	Tris-Base Glycin Methanol
EDTA-Lösung, pH 8,0 (für Mn ²⁺ -Phos-tag TM -SDS-PAGE-Gele)	0,5 M	EDTA
Ponceau-Lösung (0,1 % (w/v) in 5 % Eisessig)	0,1 g 5 mL 95 mL	Ponceau S Essigsäure (100 %) dH ₂ O
BLOTTO-Puffer (für Western Blot und Stripping von Western Blot Membranen)	5 % 50 mM 80 mM 2 mM 0,2 %	Milchpulver Tris-HCl, pH 8,0 NaCl CaCl ₂ NP-40
Antikörper-Diluent	1 % 10 mM 0,5 M 0,02 % 0,2 %	BSA HEPES NaCl NaN ₃ Tween-20
Stripping-Puffer (für Stripping von Western Blot Membranen)	62,5 mM 2 % 100 mM	Tris-HCl, pH 6,7 SDS β-Mercaptoethanol
TBS-T, pH 7,6 (für Stripping von Western Blot Membranen)	50 mM 150 mM 0,05 %	Tris-Base NaCl Tween-20

RIPA-Puffer (für Proteinlysate aus Zellkultur)	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1 % (v/v)	Triton X-100
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,5 % (w/v)	Natrium-desoxycholat
	1×	Phosphataseinhibitor Cocktail 1/3
	1×	Phosphataseinhibitor Cocktail 2
	5 µg/µL	Aprotinin
	1 µg/µL	Leupeptin
	1 mM	Na-β-glycerophosphat
	1 mM	PMSF
	2,5 mM	Na ₄ P ₂ O ₇

3.16.4 Immunhistochemie

TBS, pH 7,6	50 mM	Tris-Base
	150 mM	NaCl
Citrat-Puffer, pH 6,0	10 mM	Tri-Natriumcitrat- Dihydrat
	0,05 %	Tween-20
Tris-EDTA-Puffer, pH 9,0	10 mM	Tris-Base
	1 mM	EDTA
	0,05 %	Tween-20
Blocking-Puffer	1×	TBS
	10 % (v/v)	NGS
	0,3 % (w/v)	Saponin

Antikörper-Diluent	1×	TBS
	1 %	NGS
	0,3 %	Saponin

3.16.5 Agarose-Gelelektrophorese

TAE (10×)	0,4 M	Tris-Base
	0,2 M	Essigsäure (100 %)
	10 mM	EDTA (0,5 M), pH 8,0
DNA-Ladepuffer (5× OrangeG)	10 µM	EDTA
	65 %	Glycerol
	0,2 %	OrangeG
	50 µM	Tris-Base

3.16.6 Herstellung kompetenter Zellen, Transformation und Selektionsstrategien

SOB-Medium	2 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
SOC-Medium	1×	SOB-Medium
	20 mM	Glucose
TB-Medium, pH 6,7	10 mM	PIPES
	15 mM	CaCl ₂
	250 mM	KCl
	55 mM	MnCl ₂

LB-Agar	40 g 1 L	LB-Agar dH ₂ O
LB-/Ampicillin-/IPTG-/X-Gal-Agar	1× 100 µg/mL 0,5 mM 80 µg/mL	LB-Agar Ampicillin IPTG X-Gal
LB-Medium	25 g 1 L	LB-Medium dH ₂ O

3.16.7 Präparation von Plasmid-DNA

S1-Puffer	50 mM 10 mM 100 µg/mL	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA RNase A
S2-Lyse-Puffer	200 mM 1 %	NaOH SDS
S3-Neutralisations-Puffer, pH 5,2	3 M	Kaliumacetat

3.16.8 *Loss of heterozygosity*-Analyse

Polyacrylamid-Gel (15 % (v/v) Acrylamid-Lösung)	20 % 30 % 50 % 0,2 mM 14,5 mM	TBE (5×) dH ₂ O Acrylamid (30 %) TEMED (4 %) APS (10 %)
TBE-Puffer (5×)	445 mM 445 mM 10 mM	Tris-Base H ₃ BO ₃ EDTA

DNA-Ladepuffer (5× OrangeG)	10 µM	EDTA
	65 %	Glycerol
	0,2 %	OrangeG
	50 µM	Tris-Base

3.16.9 Inhibitor-Versuche

Hunger-Medium	1×	DMEM
	100 U/mL	Penicillin
	100 µg/mL	Streptomycin
	5 mM	L-Glutamin
Neutralrot-Stammlösung (4 mg/mL) (für Neutralrot-Test)	40 mg	Neutralrot
	10 mL	PBS
Entfärbe-Lösung (für Neutralrot-Test)	50 % (v/v)	Ethanol (96 %)
	49 % (v/v)	dH ₂ O
	1 % (v/v)	Essigsäure
Blocking-Puffer (für Immunzytochemie)	1×	PBS
	5 %	NGS
	0,3 %	Saponin
Antikörper-Diluent (für Immunzytochemie)	1×	TBS
	1 %	NGS
	0,3 %	Saponin

3.16.10 Sonstiges

PBS, pH 7,4 (für Western Blot, Aufreinigung von genomischer DNA und Inhibitor-Versuche)	2,7 mM	KCl
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	137 mM	NaCl

4. METHODEN

Standardmethoden der Molekularbiologie, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden gemäß den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (Green et al. 2012) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel 2013) durchgeführt.

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zelllinien

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um humane Glioblastom-Zelllinien. Jede Zelllinie ist durch unterschiedliche Eigenschaften wie Morphologie, Karyotyp, Wachstumsrate, Tumorigenität und Telomeraseaktivität charakterisiert. Die folgende Einteilung berücksichtigt Ursprung, Klassifikation und WHO-Grad der jeweiligen Zelllinie.

Tabelle 1: Charakterisierung der ausgewählten Glioblastom-Zelllinien. Zusammengestellt aus Clark et al. 2010, Di Tomaso et al. 2000, Kruse et al. 1992, Luk et al. 2012, Ponten et al. 1968 und Ichimura et al. 2009.

Zelllinie	Abkürzung	Alter/Geschlecht	Klassifikation	Tumorgrad nach WHO
DBTRG-05MG	DBTRG	59/weiblich	sekundär*	Grad IV
GBM6840	GBM6840	17/weiblich	primär pädiatrisch	Grad IV
GBM2603	GBM2603	-/-	primär pädiatrisch	Grad IV
U-87MG	U87	44/männlich	primär adult	Grad IV
U-138MG	U138	47/männlich	primär adult	Grad IV
U-343MG	U343	60/männlich	primär adult	Grad IV

*Einteilung entspricht der klinisch-epidemiologischen Klassifikation und beruht auf Angaben von Kruse et al. (s. 5.1). Molekulargenetische Ergebnisse, die diese Einteilung unterstützen, fehlen nach unserem Kenntnisstand bislang.

Im Folgenden wird die in Tabelle 1 angegebene Abkürzung für die jeweilige Zelllinie verwendet; zur Vereinfachung werden die Zelllinien unter Berücksichtigung ihres Ursprungs als primäre (U87, U138, U343), pädiatrische (GBM6840, GBM2603) und sekundäre (DBTRG) Glioblastom-Zelllinien bezeichnet.

4.1.2 Kultivierung von Monolayerkulturen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer *Laminar-Flow*-Werkbank durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien wurden bei 5 % CO₂ und 37 °C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Zellkulturinkubator kultiviert. Als Kulturmedium diente DMEM mit 4,5 g/L Glucose, dem 10 % FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 5 mM L-Glutamin zugesetzt wurde. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

4.1.3 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte entsprechend alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:10. Dazu wurden die Zellen zunächst mit calcium- und magnesiumfreiem D-PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA für 5 min bei 37 °C inkubiert. EDTA als Calcium-Chelator löst dabei vor allem die Zell-Zell-Verbindung, während Trypsin die Zell-Matrix-Verbindungen angreift. Um die Zellausbeute zu erhöhen, wurde die Unterseite der Kulturschale beklopft. Danach wurde der Trypsinisierungsprozess durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Durch wiederholtes Pipettieren wurde eine Einzelzellsuspension erzeugt, die je nach Zelldichte auf neue Kulturschalen verteilt wurde. Die Kulturschalen wurden abschließend mit frischem Medium aufgefüllt.

4.1.4 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

Die Zellen wurden wie in 4.1.3 beschrieben trypsiniert und die Einzelzellsuspension in ein Greiner-Röhrchen überführt. 10 µL der Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und je vier Großquadrate (Volumen 0,1 µL = 0,1 mm³ = 0,1 mm · 1 mm²) unter einem *Leitz Labovert* Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Der Mittelwert wurde mit dem Faktor 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu ermitteln.

4.1.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie unter 4.1.3 beschrieben trypsiniert und in 5 mL Kulturmedium aufgenommen. Danach wurde die Suspension in ein Greiner-Röhrchen überführt und 5 min bei 600 · g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (70 % DMEM, 20 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden in einem Kryoeinfriergerät mit Isopropanol platziert und über Nacht bei -80 °C abgekühlt. Schließlich wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen in 5 mL Kulturmedium überführt, 5 min bei 600 · g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 3 mL Kulturmedium resuspendiert und die Suspension auf Kulturschalen verteilt. Der Mediumswechsel fand nach 6 h statt.

4.1.6 Mykoplasmandetektion mittels PCR

Alle Zelllinien wurden vor der Verwendung auf Kontamination durch Mykoplasmen überprüft. Grundlage ist die Detektion von Mykoplasmen-spezifischen 16S rRNA-Molekülen (Nikfarjam and Farzaneh 2012). Dazu wurde 1 mL Zellkulturüberstand 6 min bei 15.000 · g zentrifugiert, in D-PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in 200 µL D-PBS resuspendiert. Die Suspension wurde 5 min bei 95 °C denaturiert und danach kurz zentrifugiert. Für die PCR wurden 2,5 µL des Überstands entnommen und in folgenden Reaktionsansatz (25 µL) eingebracht:

Tabelle 2: Reaktionsansatz für die Amplifikation der Mykoplasmen-16S rRNA Gensequenz.

Reagenz	Menge in µl
10× DreamTaq Buffer	2,5
dNTP-Mix (10 mM each)	0,5
Primermix (10 µM each)	2,5
Template DNA	2,5
DreamTaq DNA Polymerase	0,3
dH ₂ O	16,7

Als Primer wurden verwendet: GPO-1 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3', MGSO 3'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-5' (720bp). Für die Positivkontrolle wurde 2,5 µL genomische Mykoplasmen-DNA-Lösung, für die Negativkontrolle 2,5 µL dH₂O verwendet. Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll im *C1000TM Thermal Cycler*:

Tabelle 3: Temperatur-Zeit-Programm.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	} 30
Annealing	60 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

Der Nachweis Mykoplasmen-spezifischer Amplifikate erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 4.4.4)

Kontaminierte Zelllinien wurden mit BM Cyclin behandelt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, frisches Medium mit BM Cyclin 1 (10 µg/mL) zugegeben und die Zellen für drei Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen passagiert (siehe 4.1.3) und mit BM Cyclin 2-haltigem Medium (5 µg/mL) für vier Tage inkubiert. Der Zyklus wurde zweimal wiederholt.

4.2 Western Blot Analyse

4.2.1 Proteinlysate aus Zellkultur

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden 48 h zuvor jeweils 200.000 Zellen auf 3cm-Kulturschalen ausgesät (s. 4.1.4).

Für die Inhibitor-Versuche (s. 4.7.4) wurde das Kulturmedium nach 24 h durch Hunger-Medium mit 0,1 % BSA ersetzt und die Zellen am nächsten Tag für 2 h mit 0,1 % DMSO, LIMKi (100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 25 μ M) oder ROCKi (10 μ M) behandelt.

Das Medium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und schließlich mit 150 μ L RIPA-Puffer versetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale gelöst und die Lysate mittels Pipette in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate für die Bestimmung von Phospho-Proteinen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Zellysate wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* bestimmt. Die BCA-Reaktion ermöglicht die kolorimetrische Quantifizierung einer Proteinkonzentration. Grundlage ist die Reduktion von Cu^{2+} durch Proteine bei alkalischem pH zu Cu^+ (Biuretreaktion). Cu^+ wird dann durch Bicinchoninsäure kolorimetrisch detektiert (Smith et al. 1985). Zwei BCA-Moleküle bilden mit einem Cu^+ einen wasserlöslichen, violetten Komplex mit einer maximalen Absorption bei 562 nm.

Die BCA-Lösung wurde nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Je nach Anzahl der zu bestimmenden Proben wurden 145 μ L PBS in die Wells einer *96-Well*-Mikrotiterplatte vorgelegt. Danach wurden 5 μ L der Probe und 150 μ L der BCA-Lösung zugegeben. Die Proben wurden für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Gleichzeitig wurde eine BSA-Standardkurve mit 10, 8, 4, 2 und 0 μ g BSA erstellt. In einem Well wurde zusätzlich die Absorption des RIPA-Puffers ermittelt und der Standard entsprechend korrigiert. Die Absorption der Proben wurde in einem *2104 EnVision® Multilabel Reader* bei 492 nm bestimmt.

4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Mn²⁺-Phos-tagTM-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Proteinauftrennung

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen wurde die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Das stark negativ geladene SDS bindet stöchiometrisch an Proteine und überdeckt deren Eigenladung, sodass die Trennung der Proteine nach deren Molekularmasse erfolgt (Laemmli 1970). Man spricht von diskontinuierlicher Elektrophorese aufgrund der unterschiedlichen pH-Werte der Puffer sowie der unterschiedlichen Porengröße von Trenn- und Sammelgel.

Anhand der BCA-Messung (s. 4.2.2) wurden die Lysate auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt (0,5 µg/µL in RIPA-Puffer) und danach zusammen mit SDS-haltigem Ladepuffer für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Lysate wurden kurz zentrifugiert und anschließend auf das Gel geladen.

Für die klassische SDS-PAGE wurden die Proteine zunächst für 30 min bei 80 V in einem Sammelgel (4 % (v/v) Acrylamid-Lösung) konzentriert und dann für 60 min bei 120 V in einem Trenngel (12 % (v/v) Acrylamid-Lösung) separiert.

Zur Analyse von Phospho-Proteinen wurden Mn²⁺-Phos-tagTM-Trenngele (15 % (v/v) Acrylamid-Lösung) verwendet, die die Auftrennung von phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinen erlauben (Kinoshita et al. 2009; Kinoshita et al. 2012). Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke (30 mA) in Laufpuffer.

SDS-PAGE und Mn²⁺-Phos-tagTM-SDS-PAGE wurden in einer *Mini-PROTEAN Tetra Cell* Apparatur durchgeführt. Der *Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard* diente als Molekulargewichtsmarker.

4.2.4 Western Blot

Der Western Blot dient der Identifikation und semiquantitativen Analyse spezifischer Proteine in Proteinlysaten (Renart et al. 1979). Grundlage ist der Elektrotransfer von zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen (s. 4.2.3) auf Nitrozellulosemembranen (Towbin et al. 1979). Die auf der Membran immobilisierten Proteine werden dann durch spezifische Primärantikörper detektiert. An diese binden Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper (Immunkonjugat). Nach Zugabe geeigneter Substrate erfolgt die Visualisierung der Zielantigene durch Chemilumineszenz.

Der Proteintransfer von den SDS-PAGE-Gelen auf die Nitrozellulosemembranen wurde in einem *Semidry-Blotting*-System durchgeführt (der Transfer von P-MLC erfolgte in einem *Tank-Blotting*-System, siehe unten). Das SDS-PAGE-Gel wurde 5 min in Kathodenpuffer gewaschen. Für das Blotting-Sandwich wurden zwei Whatman-Papiere in Anodenpuffer I, ein Whatman-Papier und die Nitrozellulosemembran in Anodenpuffer II und drei Whatman-Papiere in Kathodenpuffer equilibriert. Der Blot-Vorgang erfolgte bei 70 mA für 30 min.

Mn²⁺-Phos-tagTM-SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese für 10 min in Towbin-Puffer mit 10 mM EDTA gewaschen. Dadurch wird Mn²⁺, das die Effizienz des Elektrotransfers reduzieren kann, komplexiert (Kinoshita et al. 2009). Nach dreimaligem Waschen für 5 min in reinem Towbin-Puffer wurde das Blotting-Sandwich vorbereitet. Dazu wurden zwei Whatman-Papiere, zwei Blotting-Schwämme und die Nitrozellulosemembran in Towbin-Puffer equilibriert. Der Proteintransfer wurde bei konstanter Spannung (12 V, 1 h) in einem *Tank-Blotting*-System durchgeführt (Klapper et al. 1992).

Zur Überprüfung eines homogenen Proteintransfers wurden die Nitrozellulosemembranen mit Ponceau-Lösung für 2 min gefärbt, 2 min mit dH₂O gewaschen und schließlich zur Dokumentation eingescannt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Blots bei -20 °C gelagert.

Für die Immundetektion wurden die Membranen zunächst für 30 min in BLOTTO-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Primärantikörper (s. 3.12) wurden 1:1.000 (Chronophin, Cofilin-1, GAPDH, P-MLC) bzw. 1:10.000 (Aktin) in Antikörper-Diluent verdünnt und die Blots darin bei 4 °C über Nacht eingelegt. Die Membranen wurden gewaschen und für 1,5 h in HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert, der zuvor 1:10.000 in BLOTTO-Puffer verdünnt wurde. Die Detektion erfolgte mit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat* im *ImageQuantTM LAS 4000* Kamerasystem. Die Expositionszeit richtete sich nach der Intensität der Chemilumineszenz (1-5 min). Die Auswertung erfolgte densitometrisch mit ImageJ.

4.2.5 Stripping von Western Blot Membranen

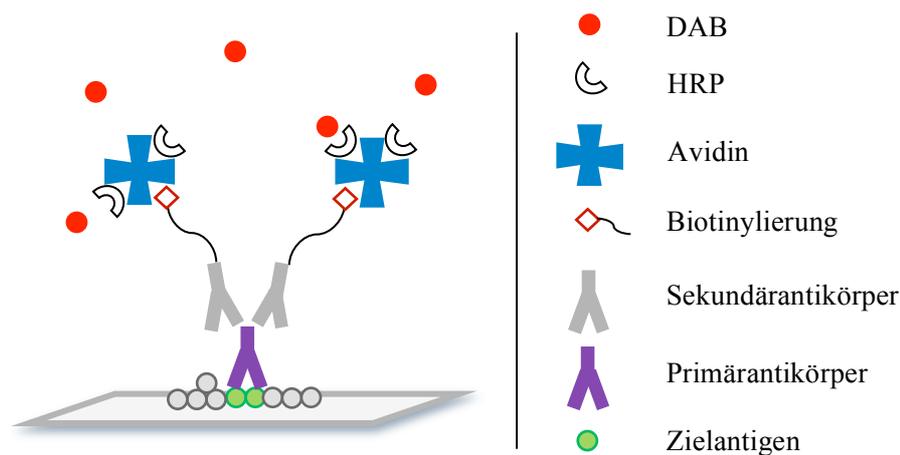
Beim Stripping werden bereits gebundene Antikörper entfernt, sodass Western Blot Membranen für die Analyse verschiedener Antigene verwendet werden können (Harlow et al. 2006). Die Nitrozellulosemembranen wurden für 30 min bei 60 °C mit Stripping-Puffer inkubiert, in TBS-T gewaschen und erneut für 30 min in BLOTTO-Puffer geblockt. Die Detektion weiterer Antigene erfolgte, wie unter 4.2.4 beschrieben, durch Entwicklung mit anderen Primärantikörpern.

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 Methode

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis von Zielantigenen in Geweben durch spezifische Antikörper. Die Methode ermöglicht die Lokalisation von Proteinen auf morphologischer Ebene und gibt dadurch Hinweise auf deren physiologische Funktion. Die Visualisierung des Antigen-Antikörperkomplexes erfolgt durch die *Labeled-Avidin-Biotin*-Methode (Guesdon et al. 1979) (s. Abb. 21). Dabei wird der Primärantikörper durch einen biotinylierten Sekundärantikörper gebunden. Dieser wird in der ABC-Reaktion durch HRP-konjugiertes Avidin detektiert und der Komplex durch Zugabe von HRP-Substraten wie DAB visualisiert.

Abbildung 21: Darstellung der Molekularinteraktion der Labeled-Avidin-Biotin-Methode. Modifiziert nach www.piercenet.com.



4.3.2 Auswahl und Vorbereitung der Präparate

Die Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE-) Tumorproben wurden vom Institut für Pathologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Bei der Auswahl der verwendeten Proben wurde auf Homogenität in Bezug auf Tumorgenese, Lokalisation und Patientenalter geachtet (s. Tab. 4). Es wurden 2 µm-Schnitte angefertigt, auf *SuperFrost Ultra Plus*® Objektträger aufgebracht und für 12 h bei 50 °C getrocknet. Die Proben wurden in *Roti*®-Histol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100 %, 95 %, 75 %, 50 %) sowie in dH₂O und TBS rehydriert. Um die Schnitte vor Austrocknung zu schützen, erfolgten alle folgenden Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer.

4.3.3 Reevaluation der Tumorproben

Zunächst wurde von allen Präparaten eine Hämatoxylin-Eosin Färbung angefertigt. Dazu wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert (s. 4.3.2) und danach 10 min in Mayers Hämalaunlösung gefärbt. Es erfolgten Bläuen in Leitungswasser (10 min), Gegenfärben in 1 % Eosin-Lösung (2 min) und Spülen in dH₂O. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und *Roti®-Histol* dehydriert und mit *Entellan®* eingedeckt.

Die HE-Färbung diente als histologische Übersichtsfärbung zur Auswahl geeigneter Proben. Die Präparate wurden nach folgenden Ausschlusskriterien pathologisch reevaluiert: Nachweis von zu wenig Tumorgewebe und Zuordnung zu anderen Tumorarten (z.B. Gliosarkomen). Einen Überblick über die verwendeten Präparate gibt die folgende Tabelle:

Tabelle 4: Übersicht über Art, Anzahl, Lokalisation und Subklassifikation der verwendeten FFPE-Proben.

Gewebe		Lokalisation	Subklassifikation Genese/Alter	Anzahl
Pilozytisches Astrozytom	(Grad I)	zerebellär	-/pädiatrisch	7
Diffuses Astrozytom	(Grad II)	-	-/-	7
Anaplastisches Astrozytom	(Grad III)	-	-/-	7
Glioblastoma multiforme	(Grad IV)	supratentoriell	primär/adult	9

4.3.4 Optimierung der Färbeprotokolle

Die Spezifität aller verwendeten Antikörper wurde zunächst mittels Immunfluoreszenzanalyse von Glioblastomzellen, die das entsprechende Antigen exprimieren oder zuvor transfiziert wurden, überprüft. Die Experimente zur Validierung der Antikörper wurden von Herrn Dr. Markus Schulze (Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg) durchgeführt.

Jeder Antikörper wurde zunächst mit verschiedenen Antigen-Demaskierungs-Methoden (keine Antigen-Demaskierung, hitzeinduzierte Demaskierung in Citrat-Puffer bzw. in Tris-EDTA-Puffer), sowie in verschiedenen Konzentrationen (Antikörperverdünnung 1:50, 1:100, 1:200, 1:400) ausgetestet, um die ideale Färbemethode zu bestimmen (s. Tab. 5). Zum Ausschluss unspezifischer Anfärbung bzw. Hintergrundfärbung wurde bei jeder Färbung eine Negativkontrolle mitgeführt.

Tabelle 5: Optimierte Färbeprotokolle.

Primärantikörper	Verdünnung	Antigen-Demaskierung
Chronophin	1:400	Citrat-Puffer
Cofilin / CFL1	1:400	Citrat-Puffer
Phospho-Cofilin (Ser3)	1:200	Citrat-Puffer
Lim domain Kinase 2 / LIMK-2	1:50	Tris-EDTA-Puffer

4.3.5 Durchführung der Immunfärbung

Nachdem die Präparate entparaffiniert und rehydriert wurden (s. 4.3.2), erfolgte die Antigen-Demaskierung durch Aufkochen in Citrat- bzw. Tris-EDTA-Puffer. Die Schnitte wurden in TBS gewaschen und anschließend für 1 h in Blocking-Puffer equilibriert, um ein unspezifisches Binden von Primärantikörpern zu verhindern. Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS wurden die Proben mit *Dako Pen* umrandet und bei 4 °C über Nacht mit in Antikörper-Diluent verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen in TBS mit 0,3 % Saponin entfernt. Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung erfolgte ein Peroxidase-Block (15 min Inkubation in TBS mit 0,3 % H₂O₂, Waschen in TBS). Der biotinylierte Sekundärantikörper wurde 1:200 in TBS mit 1 % BSA verdünnt und für 1 h auf die Präparate gegeben. Die Schnitte wurden gewaschen, für 30 min in ABC-Reagenz inkubiert, erneut gewaschen und 10 min mit DAB entwickelt. Die Reaktion wurde in Leitungswasser gestoppt. Es erfolgten Gegenfärben in Hämalaunlösung und Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe und *Roti®-Histol*. Abschließend wurden die Schnitte mit *Entellan®* eingedeckt.

Bei jeder Färbung wurden Negativkontrollen mitgeführt, um die Qualität der Immunfärbung zu evaluieren (Verschleppung von Antikörpern, ineffiziente Waschschriffe) und unspezifische, antikörperunabhängige Färbungen zu identifizieren. Dafür wurden anstelle des Primärantikörpers Kaninchen-Immunglobulinen verwendet, die nicht spezifisch an humane Epitope binden können.

4.3.6 Histologische Auswertung

Die histologischen Präparate wurden zusammen mit Frau Dr. Camelia-Maria Monoranu, Abteilung für Neuropathologie des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg, beurteilt. Die Begutachtung erfolgte zunächst ohne Kenntnis des genauen Tumorgrades, um eine Beeinflussung der Ergebnisse zu vermeiden. Zuerst wurde das Normalgewebe, anschließend das korrespondierende Tumorgewebe untersucht. Bei der Auswertung wurden folgende Kriterien berücksichtigt: Qualitatives Färbeergebnis, Spezifität der Färbung, Zuordnung angefärbter Zellen (anhand von histomorphologischen Merkmalen, HE-, GFAP- und CD3-Kofärbung) und zelluläre Lokalisation der Färbung. Danach wurde für Chronophin, Cofilin und Phospho-Cofilin ein Screening-Verfahren erarbeitet, um die Verteilung der Antigene innerhalb der verschiedenen Tumorgrade zu quantifizieren. Für jedes Präparat wurden je fünf zufällig ausgewählte Tumorbereiche mit einem 20× Objektiv am *Leica DM4000 B* Mikroskop fotografiert. Anschließend wurden die Zellen in einem definierten Bereich von 250×200 µm mit Image Pro-Plus 7.0 auf Färbung analysiert (schwache/keine vs. starke Färbung).

Für LIMK-2, die keine Expressionsveränderung in Abhängigkeit vom Tumorgrad aufwies, wurden repräsentative Ausschnitte zum Vergleich von Normal- und Tumorgewebe ausgewählt.

4.4 Sequenzierung des Chronophin-Locus

4.4.1 Verwendete Proben

Für die Analyse wurde genomische DNA aus Glioblastom-Zelllinien (s. 4.1.1) und kryokonservierten Gewebeproben (Glioblastoma multiforme (Grad IV); Neurochirurgische Klinik, Universitätsklinikum Würzburg) verwendet.

4.4.2 Aufreinigung von genomischer DNA aus Zellkulturen und kryokonservierten Gewebeproben

Für die Isolation von genomischer DNA aus Zellkulturen wurden 48 h zuvor 400.000 Zellen in eine 10cm-Kulturschale ausgesät (s. 4.1.4). Die Zellen wurden trypsiniert, die Zellsuspension in ein Greiner-Röhrchen überführt und 5 min bei $300 \cdot g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen, erneut 5 min bei $300 \cdot g$ zentrifugiert und schließlich in 200 μ L PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Es wurde ein RNase-Verdau durchgeführt.

Für die DNA-Extraktion aus kryokonservierten Gewebeproben wurden die Proben zunächst mit einer Analysenwaage auf 25 mg eingestellt und das Tumorgewebe anschließend mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Es wurde ein RNase-Verdau durchgeführt.

Die Konzentration der genomischen DNA wurde photometrisch im *NanoDrop 2000c* Spectrophotometer bei 260 nm bestimmt, wobei für doppelsträngige DNA eine optische Dichte von 1 einer Konzentration von 50 μ g/mL entspricht. Die Reinheit der DNA wurde anhand des Quotienten OD 260/280 ermittelt, der für reine DNA bei 1,8 liegen sollte.

4.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

4.4.3.1 Methode

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die exponentielle Amplifikation eines definierten DNA-Abschnitts *in vitro* (Saiki et al. 1985; Mullis et al. 1987). Benötigt werden eine thermostabile DNA-Polymerase, Oligonukleotid-Primer, Template-DNA, Desoxyribonukleosidtriphosphate und Puffer. Die Methode basiert auf der Synthese eines neuen, komplementären DNA-Strangs an die von Primern flankierte, einzelsträngige Template-DNA. Die neu entstandene doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen erneut zu Einzelsträngen denaturiert, die nach Anlagerung der Primer als Matrize für die DNA-Polymerase dienen. Ein typischer PCR-Zyklus, der somit aus einem Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritt besteht, führt durch jede Wiederholung zu einer Verdopplung der Zielsequenz.

4.4.3.2 Primer-Design

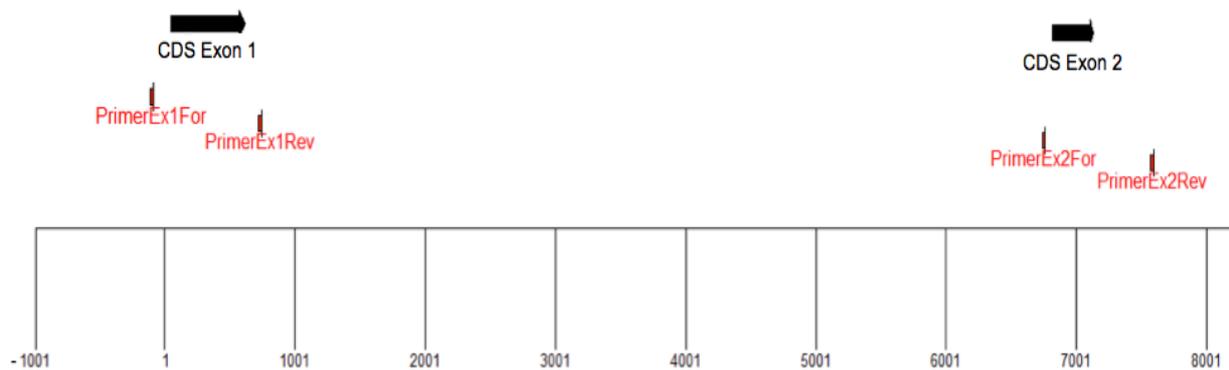
Die Auswahl geeigneter Primerpaare zur Synthese genspezifischer PCR-Produkte erfolgte mit Primer3 (Rozen et al. 2000). Die dabei berücksichtigten Kriterien orientieren sich an den Hinweisen von Mülhardt (2009):

- vollständige Synthese des jeweiligen Exons mit Hilfe eines Primerpaars
- die Primersequenz darf nur einmal in der Template-DNA vorkommen
- die Primer dürfen keine internen Sekundärstrukturen bilden (selbstkomplementäre Sequenzen ≤ 4 bp)
- die Primer dürfen keine Homo- bzw. Heterodimere am 3'-Ende bilden
- die Primer haben eine Größe von $20 \text{ bp} \pm 2 \text{ bp}$
- die Primer haben einen GC-Gehalt von 40-60 %
- die Primer flankieren das jeweilige Exon im Abstand von mindestens 30 bp
- die Schmelztemperaturen der Primerpaare sollen sich nicht mehr als $5 \text{ }^\circ\text{C}$ unterscheiden

Tabelle 6: Überblick über die verwendeten Primer.

Bezeichnung	Sequenz	Position im Chronophin-Locus	Produktgröße
PrimerEx1For	5'-CTTCGCTCCTCTCCC AGACT-3'	-115 bis -96	861bp
PrimerEx1Rev	5'-CACTCTCCTGTTCCC CACCT-3'	727 bis 746	
PrimerEx2For	5'-CCCTGGACTTCCAGT TTCAG-3'	6751 bis 6770	850bp
PrimerEx2Rev	5'-TAGCCTTTGGATTGG TCCAC -3'	7581 bis 7600	

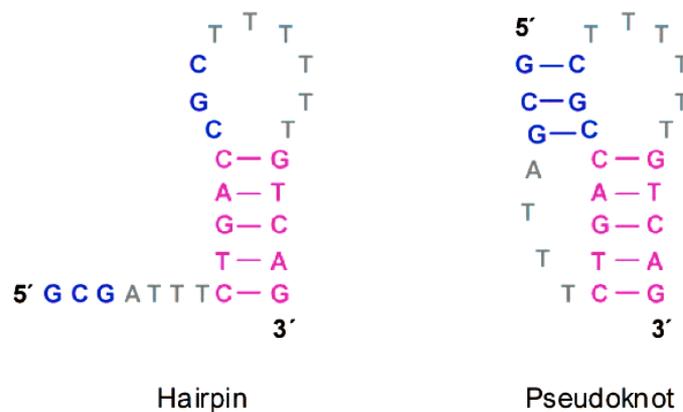
Abbildung 22: Übersicht über Chronophin-Locus und Primer-Lokalisation. Erstellt mit GENTle. Gezeigt wird die relative Lage der verwendeten Primer sowie der kodierenden DNA-Sequenz (CDS) in Bezug auf den Transkriptionsstart (1) des Chronophin-Locus.



4.4.3.3 Optimierung der Polymerase-Kettenreaktion

Eine entscheidende Rolle für die Amplifikation einer DNA-Region spielt deren Gehalt an Guanin- und Cytosin-Basen. Beide Zielsequenzen wiesen einen hohen GC-Gehalt von 76 % (Exon1) bzw. 62 % (Exon2) auf, der die PCR erschwerte. GC-reiche DNA-Regionen können einerseits stabile Sekundärstrukturen bilden (s. Abb. 23), DNA-Denaturierung und Primer-Annealing behindern und zum vorzeitigen Abbruch der DNA-Polymerase führen (McDowell et al. 1998).

Abbildung 23: Häufige sekundäre DNA-Strukturen. Aus Baker et al. 2009.



Andererseits bedingt eine GC-reiche Zielsequenz auch einen hohen GC-Gehalt der Primerpaare. Da aufeinanderfolgende GC-Regionen aufgrund von Stapelwechselwirkung thermodynamisch stabiler als AT-Regionen sind, erfordern GC-reiche Primer hohe Annealing-Temperaturen (Yakovchuk et al. 2006). Hohe Annealing-Temperaturen erhöhen zwar die Spezifität der PCR, reduzieren aber auch deren Effektivität und führen zu unzureichenden Produktmengen (Rychlik et al. 1990). Darüber hinaus binden solche Primer häufiger an unspezifische DNA-Sequenzen, da sich GC-reiche Regionen stärker ähneln, woraus unspezifische Amplifikate resultieren.

Um geeignete PCR-Protokolle für die GC-reichen Zielsequenzen zu entwickeln, wurden verschiedene DNA-Polymerasen, PCR-Additive und Annealing-Temperaturen ausgetestet:

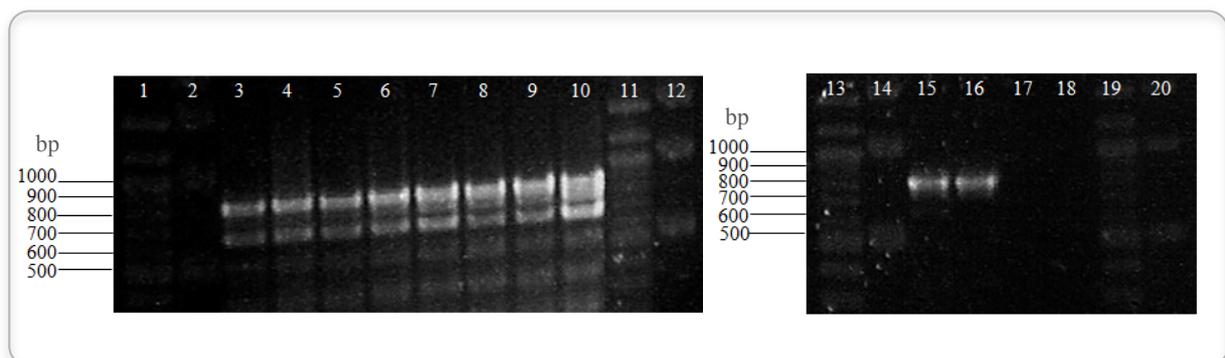
Es wurden sowohl Standard- als auch Hotstart-DNA-Polymerasen vergleichend untersucht (Hube et al. 2005). Alle Polymerasen besaßen 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, um eine

fehlerfreie Amplifikation zu gewährleisten. Verwendet wurden: *Platinum® Pfx* DNA Polymerase; *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase; *Q5 Hot Start High-Fidelity* DNA Polymerase.

PCR-Additive wie DMSO oder Betaine können die Ausbildung von sekundären DNA-Strukturen verhindern. Die verwendeten Polymerase-Kits enthielten Additive, deren Verwendung für GC-reiche DNA-Sequenzen empfohlen wurde (*PCRx Enhancer Solution*, *Phusion GC Buffer*, *Q5® High GC Enhancer*). Zur Optimierung wurden daher Reaktionen mit und ohne Zusatz von Additiven durchgeführt (Strien et al. 2013).

Die Annealing-Temperatur (T_a) richtet sich nach der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer, die wiederum von deren Länge und Zusammensetzung abhängt. Die T_m kann nach Thein und Wallace (1986) mit folgender Formel näherungsweise berechnet werden: $T_m = 4 \cdot (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \cdot (\text{Anzahl A bzw. T})$. Die T_m ist dabei die Temperatur, bei der nur noch die Hälfte der Primer an das Template binden. Die T_a sollte deshalb 5-10 °C unterhalb der T_m liegen, um eine ideale Primerbindung zu ermöglichen (Mülhardt 2009). Genauere Berechnungen der Annealing-Temperatur sind über Programme der jeweiligen Hersteller der Polymerasen möglich. Für Exon1 ergeben sich theoretische Annealing-Temperaturen von 65-70 °C, für Exon2 von 64-66 °C. Die Annealing-Temperatur wurde schließlich mit Hilfe eines Temperaturgradienten adaptiert (s. Abb. 24).

Abbildung 24: Ermittlung der Annealing-Temperatur für Exon1 mittels Temperaturgradient. Spur 1, 11, 13, 19 100bp-Leiter; Spur 2, 12, 14, 20 1kb-Leiter; Spur 3-10 Temperaturgradient 56-64 °C; Spur 15-18 Temperaturgradient 65-71 °C. Spezifisches PCR-Produkt bei 861bp. Unspezifisches PCR-Produkt bei ca. 650bp. Spur 3-10 zunehmende Effektivität der PCR, jedoch viel unspezifisches Produkt. Spur 15, 65 °C, geringere Effektivität der PCR im Vergleich zu Spur 3-10, aber deutlich weniger unspezifisches Produkt. Spur 16, 67 °C, ausschließlich spezifisches PCR-Produkt. Spur 17-18 PCR ineffektiv.



Einen Überblick über die experimentell optimierten PCR-Protokolle gibt die folgende Tabelle:

Tabelle 7: Überblick über die verwendeten PCR-Bedingungen.

DNA-Sequenz	Polymerase	PCR-Additiv	Annealing-Temperatur
Exon1	Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	Q5® High GC Enhancer	67 °C
Exon2	Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	Q5® High GC Enhancer	57 °C

4.4.3.4 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Für die PCR wurde die genomische DNA aus Glioblastom-Zelllinien und kryokonservierten Gewebeproben (s. 4.4.1) aufgetaut, kurz zentrifugiert und in folgende Reaktion (50 µL) eingebracht:

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion.

Reagenz	Menge in µl
5× Q5 Reaction Buffer	10,0
dNTP-Mix (10 mM each)	1,0
Primermix* (10 µM each)	2,5
Template DNA	2,0
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	1,0
5× Q5 High GC Enhancer	10,0
dH ₂ O	23,5

*s. Tab. 6

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll im *C1000TM Thermal Cycler* durchgeführt:

Tabelle 9: Temperatur-Zeit-Programm.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	1
Denaturierung	98 °C	30 sec	} 40
Annealing	*	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	1 min	1

* s. Tab. 7

Der Nachweis spezifischer Amplifikate erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 4.4.4).

4.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Methode ermöglicht die größenabhängige Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten, deren Ethidiumbromid-basierte Visualisierung unter UV-Licht und ihre Identifikation mittels definierter Kontrollbanden (Aaij et al. 1972; Sharp et al. 1973).

Für den Nachweis von PCR-Produkten wurden 1 bis 3 %-ige (w/v) Agarose-Gele verwendet, die zuvor durch Erhitzen von Agarose in 1×TAE hergestellt wurden. Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte in 1×TAE bei konstanter Spannung von 85 V für 70 min in einem *Wide Mini-Sub® Cell GT System*. *100bp-* und *1kb- DNA Ladders* dienten als Größenmarker. Die Gele wurden anschließend für 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/mL) gefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Für die Sequenzierung wurden die entsprechenden DNA-Banden ausgeschnitten und in Greiner-Röhrchen überführt.

4.4.5 Gelelution von Nukleinsäuren

Die Isolation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit*. Die zuvor ausgeschnittenen Gelstücke wurden gewogen, mit der dreifachen Menge QG-Puffer versetzt und für 10 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde die entstandene Lösung schrittweise auf die DNA-Säule gegeben, die Säule kurz zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Abschließend erfolgten ein Waschschrift mit PE-Puffer und die Elution mit 50 µL dH₂O. Qualität und Quantität der aufgereinigten DNA-Fragmente wurden durch erneute Gelelektrophorese evaluiert.

4.4.6 3'-Adenylierung von PCR-Produkten

Die verwendete *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* erzeugt aufgrund ihrer Exonuklease-Aktivität nur DNA-Fragmente mit glatten Enden (*blunt ends*). Für die Klonierung in den *pGEM®-T Easy Vector* (s. 4.4.7) sind jedoch PCR-Produkte mit Adenin-Überhang am 3'-Ende nötig (s. Abb. 25). Für die Generierung dieser Überhänge (*sticky ends*) wurde die *DreamTaq DNA Polymerase* verwendet, die unabhängig von der DNA-Matrize Adenin-Nukleotide an die Enden des DNA-Strangs anfügen kann (Clark 1988). Der folgende Ansatz (50 µL) wurde 20 min bei 72 °C im *C1000™ Thermal Cycler* inkubiert:

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die 3'-Adenylierung.

Reagenz	Menge in µl
10× DreamTaq Buffer	5,0
dNTP-Mix (10 mM each)	0,5
PCR-Produkt	44,0
DreamTaq DNA Polymerase	0,5

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* aufgereinigt. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 300 µL QG-Puffer vermischt und wie unter 4.4.5 beschrieben behandelt. Vor der Klonierung wurden die DNA-Fragmente durch erneute Gelelektrophorese überprüft.

4.4.7 Ligation der PCR-Produkte

Die Verknüpfung zweier Nukleinsäure-Fragmente mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase bezeichnet man als Ligation. Die Methode ermöglicht die Fusion eines definierten DNA-Abschnitts mit einem Plasmidvektor, der später in Bakterien vervielfältigt werden kann. Die komplementären einzelsträngigen Enden (*sticky ends*) der DNA-Fragmente lagern sich zunächst über Wasserstoffbrückenbindungen aneinander. Die DNA-Ligase verknüpft schließlich die freien 5'-Phosphatgruppen des Vektors mit den 3'-Hydroxygruppen des PCR-Produkts kovalent über Phosphodiesterbindungen. Der zuvor linearisierte Vektor wird dadurch rezirkularisiert (s. Abb. 25).

Der Vektor ist so konzipiert, dass eine Rezirkularisierung ohne Insert aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe des Didesoxythimidin-Überhangs instabil ist (keine Phosphodiesterbindung möglich) und somit deutlich seltener auftritt (Holton et al. 1991).

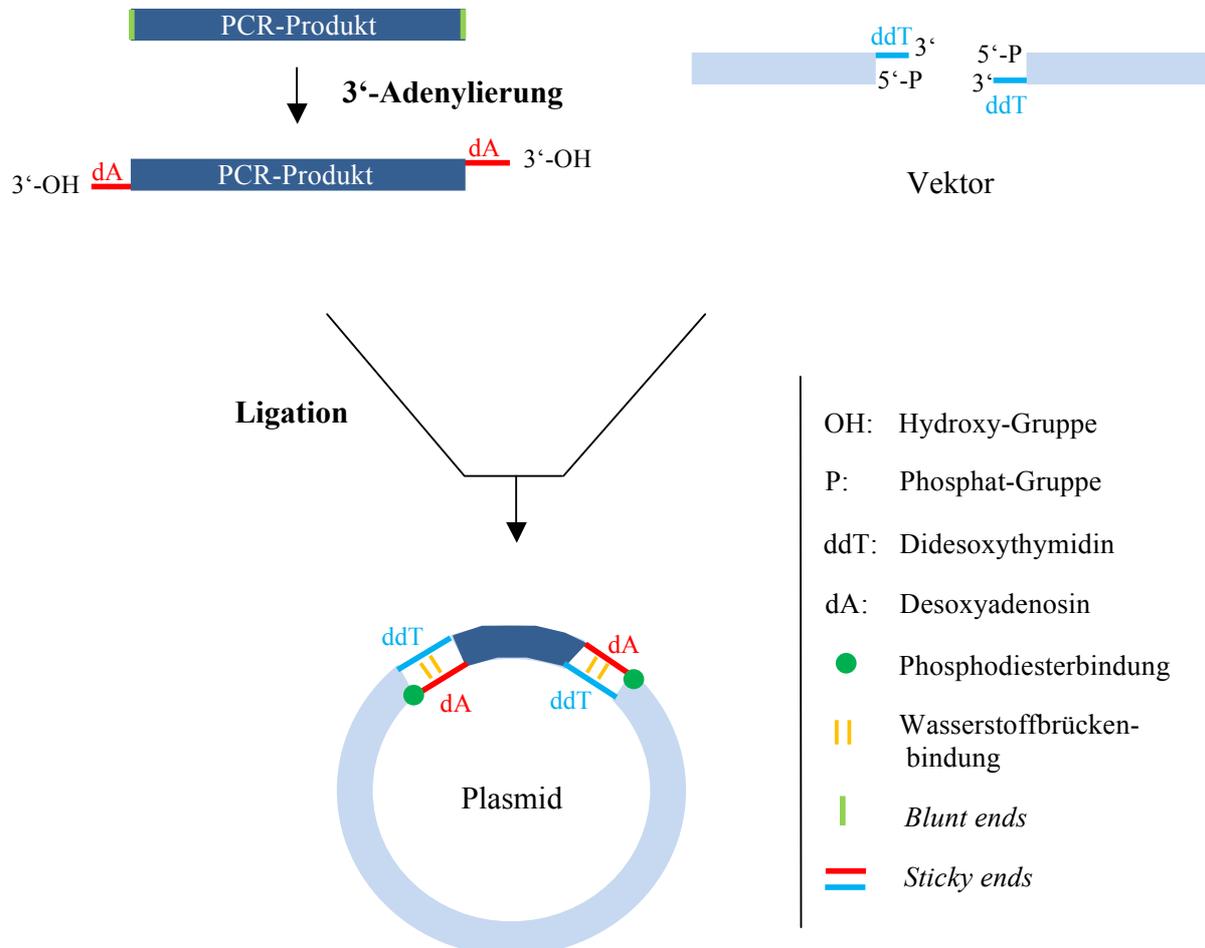
Die Insertion der PCR-Produkte in den *pGEM®-T Easy Vector* erfolgte mit der T4-DNA-Ligase (Weiss et al. 1968). Einen Überblick über den Reaktionsansatz (10 µL) gibt die folgende Tabelle:

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die Ligation.

Reagenz	Menge in µl
T4-DNA-Ligase	1,0
2× Rapid Ligation Buffer	5,0
PCR-Produkt	3,0
pGEM®-T Easy Vector	1,0

Der Ansatz wurde für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für die Transformation von kompetenten Zellen verwendet.

Abbildung 25: 3'-Adenylierung und Ligation. Vor der Klonierung muss das PCR-Produkt mit einem Adenin-Überhang am 3'-Ende versehen werden (*sticky ends*). Im Rahmen der Ligation entstehen zunächst wenig stabile Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären einzelsträngigen Enden von Vektor und PCR-Produkt. Die DNA-Ligase erzeugt schließlich stabile Phosphodiesterbindungen zwischen den freien 5'-Phosphatgruppen des Vektors und den 3'-Hydroxygruppen des PCR-Produkts.



4.4.8 Herstellung kompetenter Zellen

Voraussetzung für die Transformation von Bakterien ist deren Fähigkeit zur Aufnahme freier DNA. *E.coli*-Zellen besitzen allerdings keine natürliche Kompetenz zur DNA-Aufnahme, sondern müssen zunächst mit Calciumchlorid-Lösung vorbehandelt werden (Dagert et al. 1979). Dies führt einerseits zur Induktion von Porinen in der äußeren Membran der Bakterien (Aich et al. 2012) und ermöglicht andererseits die Neutralisation der Interaktionen zwischen negativ-geladener DNA und Zelloberfläche. Es wurden DH5 α -Zellen verwendet, die sich

durch hohe Quantität und Qualität der produzierten Plasmid-DNA auszeichnen (Taylor et al. 1993).

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurden zunächst LB-Agarplatten mit DH5 α -Zellen beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Kolonie wurde isoliert und in 150 mL SOB-Medium bei 24,4 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Es folgten Inkubation für 10 min auf Eis und Zentrifugieren für 10 min bei 400 · g und 4 °C. Anschließend wurden die Zellen in 50 mL kaltem TB-Medium resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 4 mL TB-Medium mit 7 % (v/v) DMSO resuspendiert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.4.9 Transformation und Selektionsstrategien

Das direkte Einbringen freier DNA in Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. Die Methode ermöglicht den horizontalen Gentransfer rekombinanter Plasmide und resultiert in der gezielten genetischen Veränderung des Bakteriums. Innerhalb der bakteriellen Zelle erfolgt nun die schnelle Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz unabhängig vom bakteriellen Chromosom über den Replikationsursprung des Vektors.

Für die Transformation wurden zunächst 100 μ L kompetente DH5 α -Zellen 10 min auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden mit 8 μ L des Ligationsprodukts versetzt und danach für weitere 45 min auf Eis gegeben. Die anschließende Inkubation für 45 sec bei 42 °C im Wasserbad begünstigt die Aufnahme der Plasmid-DNA. Der Hitzeschock führt zur Ausbildung von Membranporen durch die Freisetzung von Lipiden in der äußeren Membran und gleichzeitig zur Erniedrigung des Membranpotentials der inneren Membran der gramnegativen Bakterien (Panja et al. 2008). Nach erneuter Inkubation für 5 min auf Eis erfolgte die Zugabe von 600 μ L SOC-Medium, um die Transformationseffizienz zu verbessern (Hanahan 1983). Es folgten Schütteln für 1,5 h bei 37 °C und Zentrifugieren für 5 min bei 600 · g. Abschließend wurde der Überstand dekantiert, das Pellet im Rückfluss resuspendiert und die Suspension auf Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Um sicherzustellen, dass später nur Bakterien isoliert werden, die das rekombinante Plasmid enthalten, wurden verschiedene Selektionsstrategien verwendet:

Der Vektor enthält einerseits ein Ampicillin-Resistenzgen (*Amp^r*), sodass nur erfolgreich transformierte Bakterien auf den verwendeten Nährböden wachsen können.

Darüber hinaus exprimiert der Vektor das α -Peptid des *lacZ*-Gens, das die Unterscheidung zwischen Bakterien mit rekombinantem Plasmid und solchen, die nur den „leeren“ Vektor aufgenommen haben, ermöglicht. Grundlage ist die Umwandlung des im Nährmedium enthaltenen, farblosen Stoffs X-Gal in einen blauen Indigo-Farbstoff durch das Enzym β -Galaktosidase (Blau-Weiß-Screening, s. Abb. 26) (Horwitz et al. 1964). Das im Medium enthaltene IPTG induziert in den verwendeten *E.coli*-Zellen die Bildung eines inaktiven Enzyms. Das durch den Vektor gebildete α -Peptid kann die β -Galaktosidase reaktivieren, sodass blaue Kolonien entstehen. Der Vektor ist jedoch so konzipiert, dass das Vorhandensein eines Inserts in der Polylinkerregion (*multiple cloning site*) zur Unterbrechung des *lacZ*-Gens führt. Vektoren mit Insert können kein α -Peptid bilden, die Kolonien bleiben weiß (s. Abb. 27).

Für die Herstellung der LB-/Ampicillin-/IPTG-/X-Gal-Agarplatten wurde LB-Agar aufgekocht und unter Rühren auf 50 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 100 μ g/mL Ampicillin, 0,5 mM IPTG und 80 μ g/mL X-Gal wurde die Lösung auf Kulturschalen verteilt.

Abbildung 26: Reaktionsmechanismus der β -Galaktosidase. Adaptiert nach Cai et al. 2012. Das Enzym β -Galaktosidase wandelt den farblosen Stoff X-Gal in einen blauen Indigo-Farbstoff um.

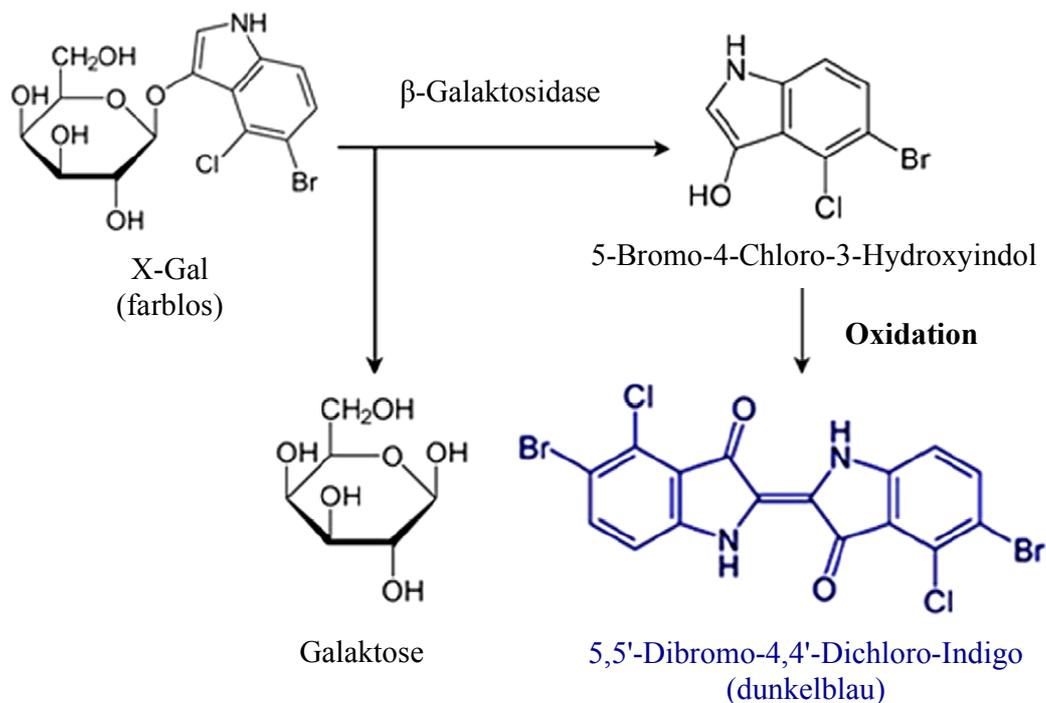
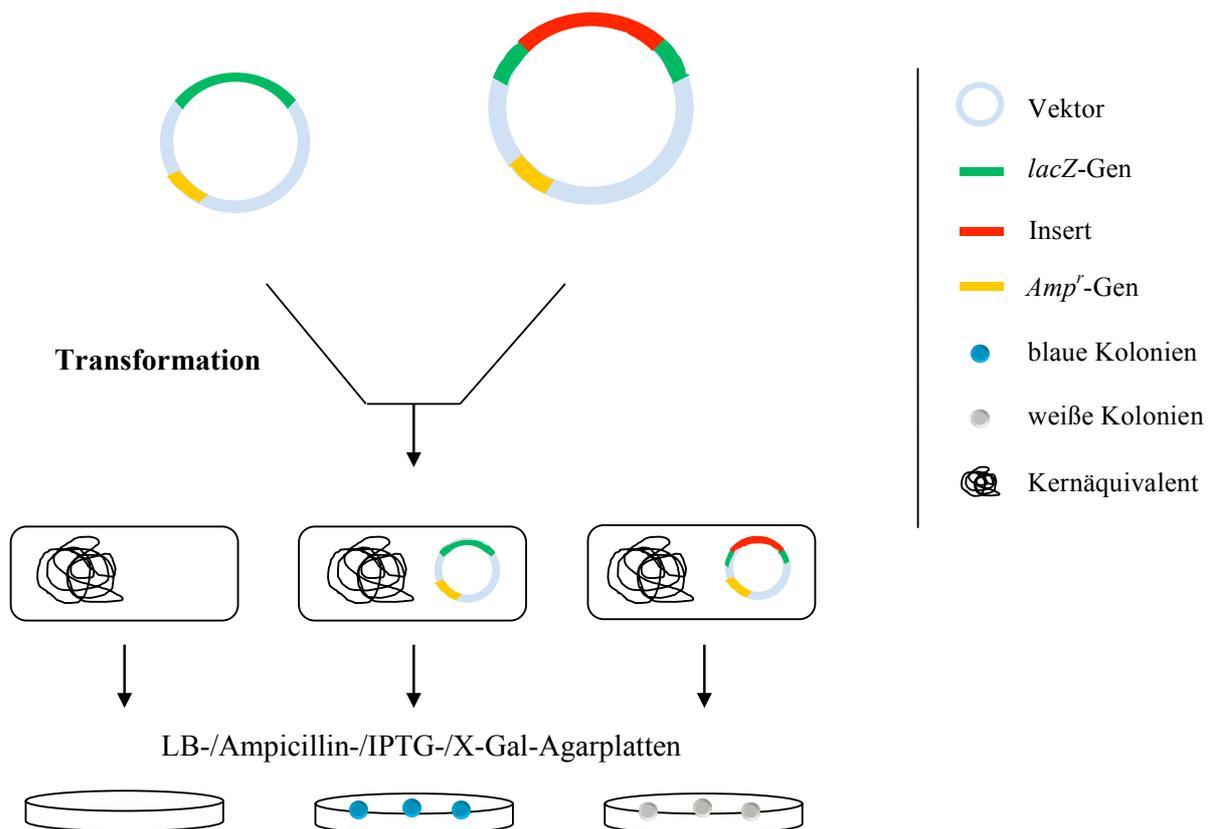


Abbildung 27: Identifikation rekombinanter Klone. Bakterien, die keinen Vektor aufgenommen haben, fehlt das Ampicillin-Resistenzgen; es entstehen daher keine Kolonien. Das im Medium enthaltene IPTG inaktiviert das von den Bakterien gebildete Enzym β -Galaktosidase. Bakterien, die den „leeren“ Vektor aufgenommen haben, können die β -Galaktosidase durch das α -Peptid des *lacZ*-Gens reaktivieren; es entstehen blaue Kolonien. Bakterien, die dagegen einen Vektor mit Insert aufgenommen haben, können kein α -Peptid bilden; das Insert unterbricht das *lacZ*-Gen; es entstehen weiße Kolonien.



Um homogene Zellpopulationen zu erhalten, die ausschließlich das gewünschte Plasmid exprimieren, wurden nach 24 h einzelne Bakterienkolonien anhand der Selektionsmarker isoliert und bei 37 °C über Nacht in 3 mL LB-Medium mit 50 μ g/mL Ampicillin geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 2 mL der Kultur für die Plasmid-Präparation verwendet.

4.4.10 Präparation von Plasmid-DNA

Die Methode ermöglicht die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen. Grundlage ist die selektive alkalische Denaturierung hochmolekularer, chromosomaler DNA durch SDS und Natriumhydroxid (Birnboim et al. 1979). Nach Neutralisation mit Kaliumacetat aggregiert die chromosomale DNA und fällt als unlösliches Produkt aus, während die niedermolekulare Plasmid-DNA im Überstand gelöst bleibt. Diese kann später durch Präzipitation mit Isopropanol konzentriert werden, das der DNA die Hydrathülle entzieht.

Für die Plasmid-Präparation wurden 2 mL der Schüttelkultur für 5 min bei $5.000 \cdot g$ zentrifugiert und das Pellet in 300 μ L RNase-haltigem S1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 μ L S2-Lyse-Puffer wurde die Lösung durch wiederholtes Invertieren gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten Zugabe von 300 μ L S3-Neutralisations-Puffer, erneutes Invertieren und Inkubation für 30 min auf Eis. Die Lösung wurde für 10 min bei $20.000 \cdot g$ zentrifugiert und der plasmidhaltige Überstand abgenommen. Nach Zugabe von 700 μ L Isopropanol und Zentrifugieren für 20 min bei $20.000 \cdot g$ erfolgten ein Waschschriff mit 70 % (v/v) Ethanol und Zentrifugieren für 10 min bei $20.000 \cdot g$. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für 5 min getrocknet und schließlich in 30 μ L dH₂O gelöst. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde im *NanoDrop 2000c* Spectrophotometer bestimmt und die Probe anschließend durch Verdau mit Restriktionsenzymen analysiert.

4.4.11 Restriktionsanalyse mit EcoRI

Für die Präparation der Plasmid-DNA wurden Klone verwendet, die anhand des Blau-Weiß-Screenings identifiziert wurden. Weiße Kolonien können jedoch auch durch Verunreinigung des für die Ligation verwendeten PCR-Produkts, unzureichende Oxidation von 5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindol sowie durch Fehler bei der Herstellung der Selektionsplatten entstehen. Zur Überprüfung der isolierten Plasmide auf das Vorhandensein des Inserts wurde daher ein Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Der *pGEM®-T Easy Vector* ist so konzipiert, dass das Insert von zwei Erkennungssequenzen des Enzyms EcoRI flankiert wird (s. Abb. 28). Durch Verdau mit EcoRI entstehen DNA-Fragmente mit definierter Länge, die mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert werden können (s. Abb. 29).

Für die Restriktionsanalyse wurden 10 µL der Plasmid-DNA in folgenden Reaktionsansatz (50 µL) eingebracht:

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die Restriktionsanalyse mit EcoRI.

Reagenz	Menge in µl
EcoRI Buffer	5,0
EcoRI	0,5
Plasmid-DNA	10,0
dH ₂ O	40,5

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Gelelektrophorese überprüft. Erfolgreich ligierte Vektoren wurden für die Sequenzierung vorbereitet.

Abbildung 28: Vektormappe mit Insert und EcoRI-Verdau. Erstellt mit GENTle. Der *pGEM®-T Easy Vector* mit Thymidin-Überhang umfasst 3016bp, das Insert Exon1 mit Adenin-Überhang 862bp. Nach EcoRI-Verdau ergeben sich Restriktionsfragmente von 2997bp und 881bp Länge.

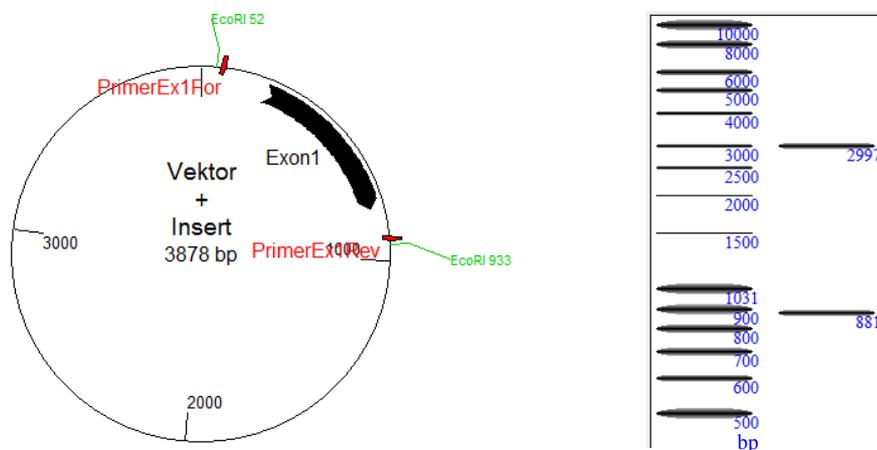
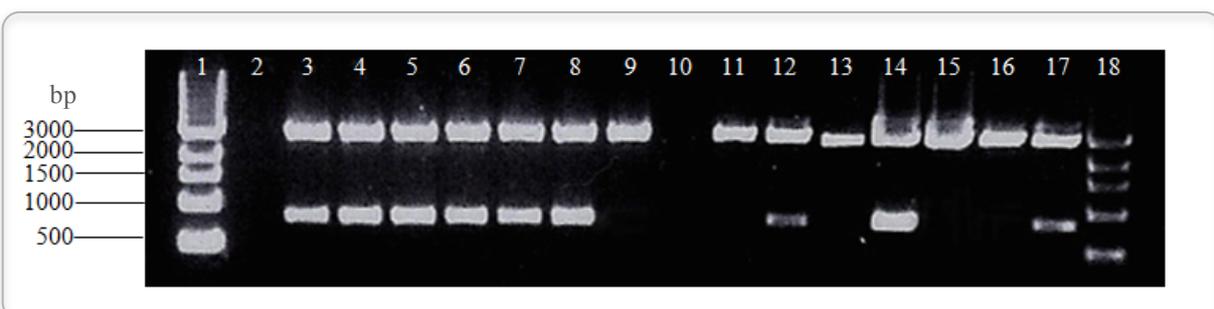


Abbildung 29: Restriktionsfragment-Muster nach EcoRI-Verdau. Spur 1, 18 kb-Leiter; Spur 2, 10 leer; Spur 3-9, 11-17 EcoRI-Verdau. Vektorbande bei 2997bp. Insertbande Exon1 bei 881bp. Rekombinante Klone in Spur 3-8, 12, 14, 17.



4.4.12 DNA-Sequenzierung

Rekombinante Plasmide wurden verdünnt (Probenvolumen 15 μL , Konzentration 200 ng/ μL) und für die Sequenzierung an *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg, Deutschland) versendet. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Nukleotid-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* verglichen und auf Mutationen analysiert.

4.5 Analyse des Promotor-Methylierungsstatus von Chronophin

4.5.1 Verwendete Proben

Für die Analyse wurde genomische DNA aus Glioblastom-Zelllinien (s. 4.1.1) und FFPE-Proben (primäre, adulte Glioblastome (s. Tab. 4); Institut für Pathologie, Universität Würzburg) verwendet. Zusätzlich wurde DNA aus Normalhirnproben untersucht, die entsprechend der häufigsten Lokalisation von Glioblastomen aus Frontal- und Temporallappen stammte (Larjavaara et al. 2007).

4.5.2 Aufreinigung von genomischer DNA aus Zellkulturen und FFPE-Proben

Die Isolation von genomischer DNA aus Zellkulturen erfolgte wie unter 4.4.2 beschrieben. Es wurde ein RNase-Verdau durchgeführt.

Für die DNA-Extraktion aus FFPE-Proben wurden die Proben zunächst durch wiederholtes Spülen mit Xylol und 100 % Ethanol entparaffiniert. Ethanol-Reste wurden durch 30-minütige Inkubation bei 37 °C entfernt. Die getrockneten Proben wurden mit einer Analysenwaage auf 25 mg eingestellt und das Tumorgewebe anschließend mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Es wurde ein RNase-Verdau durchgeführt.

Die Konzentration der genomischen DNA wurde im *NanoDrop 2000c* Spectrophotometer bestimmt (s. 4.4.2).

4.5.3 Grundlagen der DNA-Methylierungsanalyse

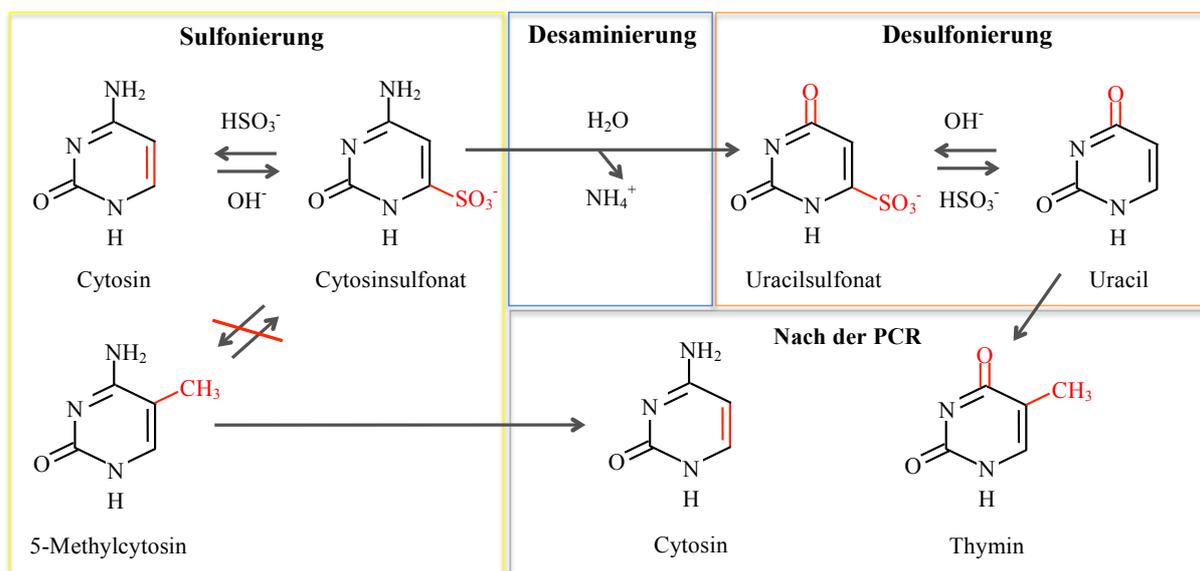
Die verschiedenen etablierten Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Verfahren zur Locus-spezifischen Untersuchung einzelner CpG-Dinukleotide (*Typing*) und Verfahren zur genomweiten Bestimmung des Methylierungsstatus (*Profiling*) (Huang et al. 2010b).

Im Rahmen herkömmlicher molekularbiologischer Klonierungs- bzw. Amplifikationsverfahren geht jedoch das spezifische Methylierungsmuster der DNA aufgrund des Fehlens von DNA-Methyltransferasen verloren und Hybridisierungs-basierte Methoden können nicht zwischen unmethylierten Cytosinen und 5-Methylcytosinen unterscheiden (Laird 2010).

Aus diesem Grund beruhen nahezu alle gängigen Analysen auf einer methylierungsabhängigen Vorbehandlung der DNA, wobei drei verschiedene Ansätze unterschieden werden (Ammerpohl et al. 2009; Laird 2010; Malzkorn et al. 2011):

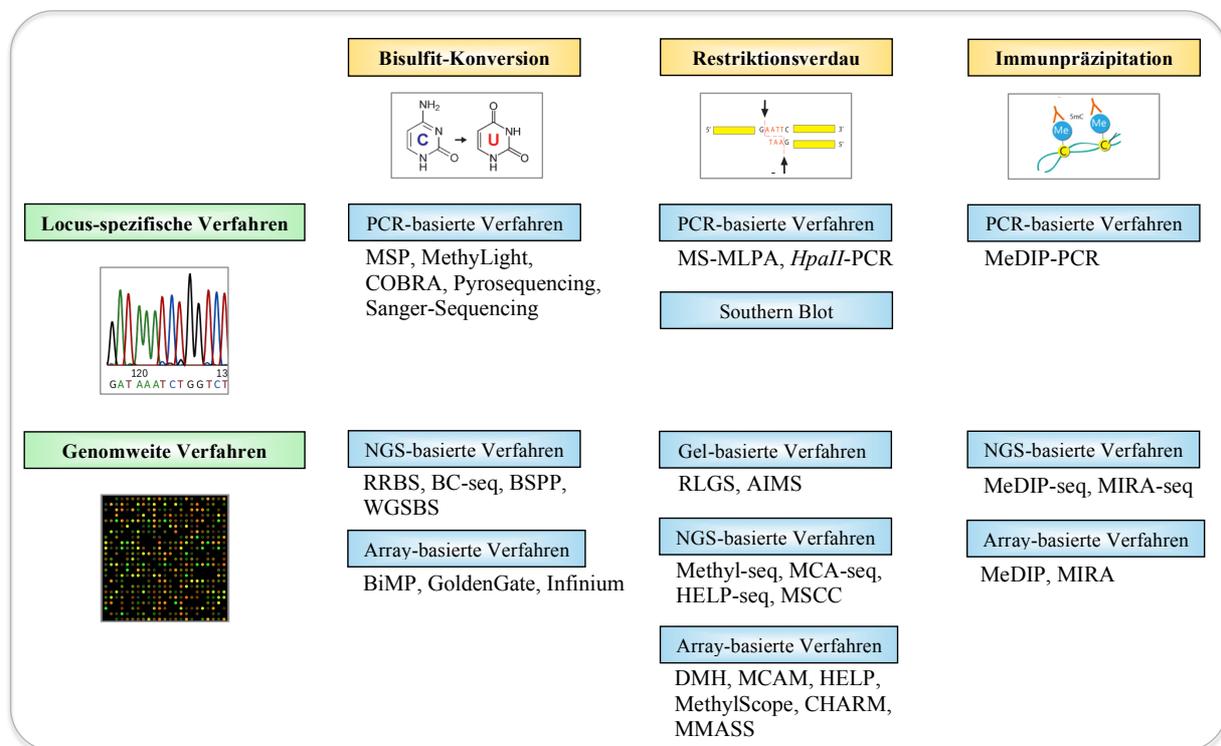
- 1) Die Natriumhydrogensulfit-basierte Konversion von unmethylierten Cytosinen zu Uracil (Bisulfit-Konversion) (s. Abb. 30)
- 2) Die Verwendung von methylierungssensitiven isoschizomeren Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau) (s. 4.5.4.1)
- 3) Die Immunpräzipitation von methylierter DNA durch 5-Methylcytosin-spezifische Antikörper bzw. durch Affinitätschromatographie mit MBDs (*Affinity enrichment*)

Abbildung 30: Grundlagen der Bisulfit-Konversion. Zusammengestellt aus Hayatsu 2008 und Huang et al. 2010a. Natriumhydrogensulfit (Bisulfit) induziert die Sulfonierung von Cytosinen, wobei 5-Methylcytosin aufgrund der geringeren Reaktivität gegenüber Bisulfit deutlich langsamer umgesetzt wird, als unmethyliertes Cytosin. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen werden daher nahezu ausschließlich unmethylierte Cytosine sulfoniert und in zwei weiteren Schritten zu Uracil umgewandelt. 5-Methylcytosin bleibt hingegen unverändert. Im Rahmen eines finalen PCR-Schritts entsteht Thymin aus Uracil, die Methylierung von 5-Methylcytosin geht verloren. Die Bisulfit-Konversion überführt daher das spezifische epigenetische Muster der DNA in detektierbare Veränderungen der DNA-Sequenz (alle noch vorhandenen Cytosine stehen nun für 5-Methylcytosine).



Nach entsprechender Vorbehandlung kann das DNA-Methylierungsmuster im Rahmen zahlreicher Analysemethoden bestimmt werden. Einen Überblick über die häufigsten Verfahren gibt Abbildung 31.

Abbildung 31: Überblick über häufige Methoden zur DNA-Methylierungsanalyse. Zusammengestellt aus Laird 2010 und Malzkorn et al. 2011. AIMS = *amplification of intermethylated sites*; BC = *bisulphite conversion*; BiMP = *bisulphite methylation profiling*; BSPP = *bisulphite padlock probes*; CHARM = *comprehensive high-throughput arrays for relative methylation*; COBRA = *combined bisulfite restriction analysis*; DMH = *differential methylation hybridization*; HELP = *HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR*; MCA/M = *methylated CpG island amplification / and microarray*; MeDIP = *methylated DNA immunoprecipitation*; MIRA = *methylated CpG island recovery assay*; Mmass = *microarray-based methylation assessment of single samples*; MS-MLPA = *methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*; MSCC = *methylation-sensitive cut counting*; MSP = *methylation-specific PCR*; NGS = *next-generation sequencing*; RLGS = *restriction landmark genomic scanning*; RRBS = *reduced representation bisulfite sequencing*; WGSBS = *whole genome shotgun bisulfite sequencing*; -seq = anschließende Sequenzierung.



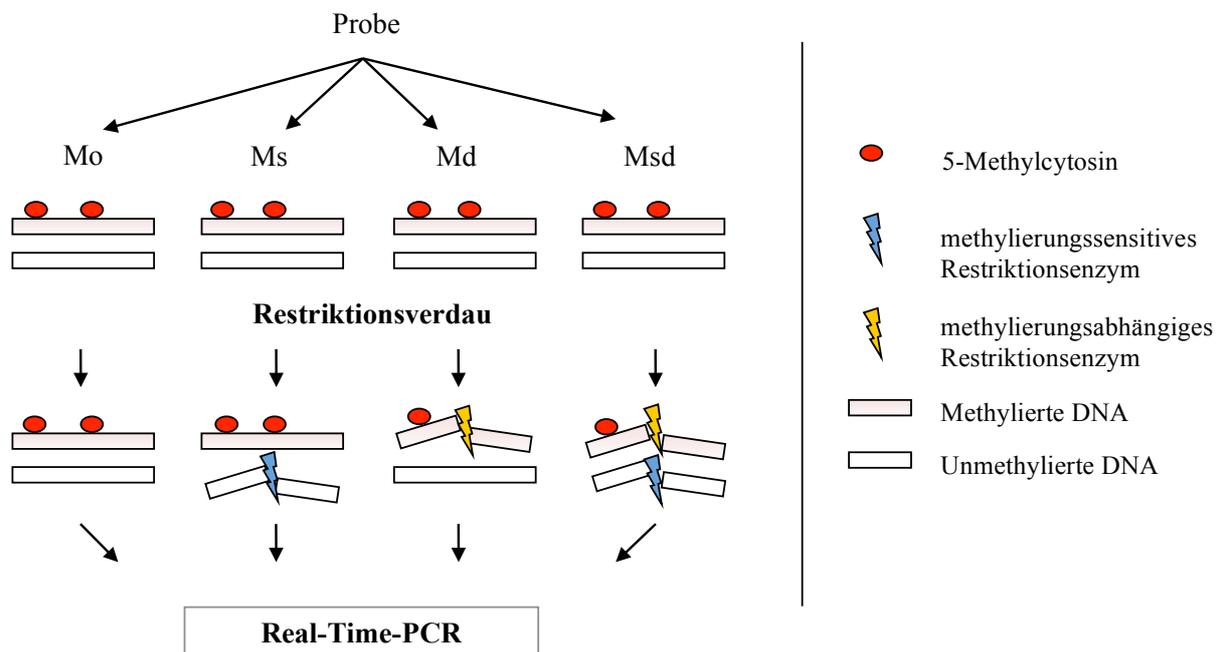
4.5.4 Methylierungsabhängiger Restriktionsverdau

4.5.4.1 Methode

Die Methode dient der Vorbereitung von genomischer DNA für die Analyse des Methylierungsstatus von CpG-Inseln im Promotor von Zielgenen mittels Real-Time-PCR. Grundlage ist die Verwendung von Restriktionsenzymen, die die gleiche Erkennungssequenz besitzen und diese auf die gleiche Weise zerschneiden (Isoschizomere), deren Aktivität jedoch durch DNA-Methylierung auf unterschiedliche Weise beeinflusst wird. Während das methylierungssensitive Restriktionsenzym methylierte DNA nicht spaltet, zerschneidet das methylierungsabhängige Restriktionsenzym ausschließlich diese (Holemon et al. 2007; Ammerpohl et al. 2009). Die zu analysierende Probe wird auf vier Ansätze verteilt:

- Mo: Ansatz ohne Restriktionsenzyme. Das Reaktionsprodukt enthält die gesamte Ausgangs-DNA.
- Ms: Ansatz mit methylierungssensitivem Restriktionsenzym, das methylierte DNA nicht zerschneidet. Das Reaktionsprodukt enthält daher ausschließlich methylierte DNA.
- Md: Ansatz mit methylierungsabhängigem Restriktionsenzym, das methylierte DNA spaltet. Das Reaktionsprodukt enthält daher ausschließlich unmethylierte DNA.
- Msd: Ansatz, der beide Restriktionsenzyme enthält. Er erfasst den Hintergrund und den Erfolg der beiden Verdaue.

Abbildung 32: Überblick über die Reaktionsansätze. Einzelheiten siehe Text.



Im Anschluss werden die Ansätze mittels Real-Time-PCR analysiert und verglichen, wodurch die Bestimmung des Methylierungsstatus möglich wird (s. 4.5.5).

4.5.4.2 Durchführung

Aus jeder Probe wurde 1 µg genomische DNA mit dem *EpiTect® Methyl II DNA Restriction Kit* nach Angaben des Herstellers behandelt. Die Reaktionsansätze (Mo, Ms, Md, Msd) wurden über Nacht bei 37 °C in einem *C1000™ Thermal Cycler* inkubiert und danach durch 20-minütiges Erhitzen bei 65 °C inaktiviert. Die Ansätze wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Validierung des Versuchs und zur genaueren Bestimmung des Methylierungsstatus wurde vollständig methylierte bzw. unmethylierte Kontroll-DNA (s. 3.7) verwendet. Durch Mischung der Kontroll-DNA wurden Proben mit unterschiedlich hohem Methylierungsgrad (100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 0 %) hergestellt, anhand derer später eine Eichgerade erstellt wurde.

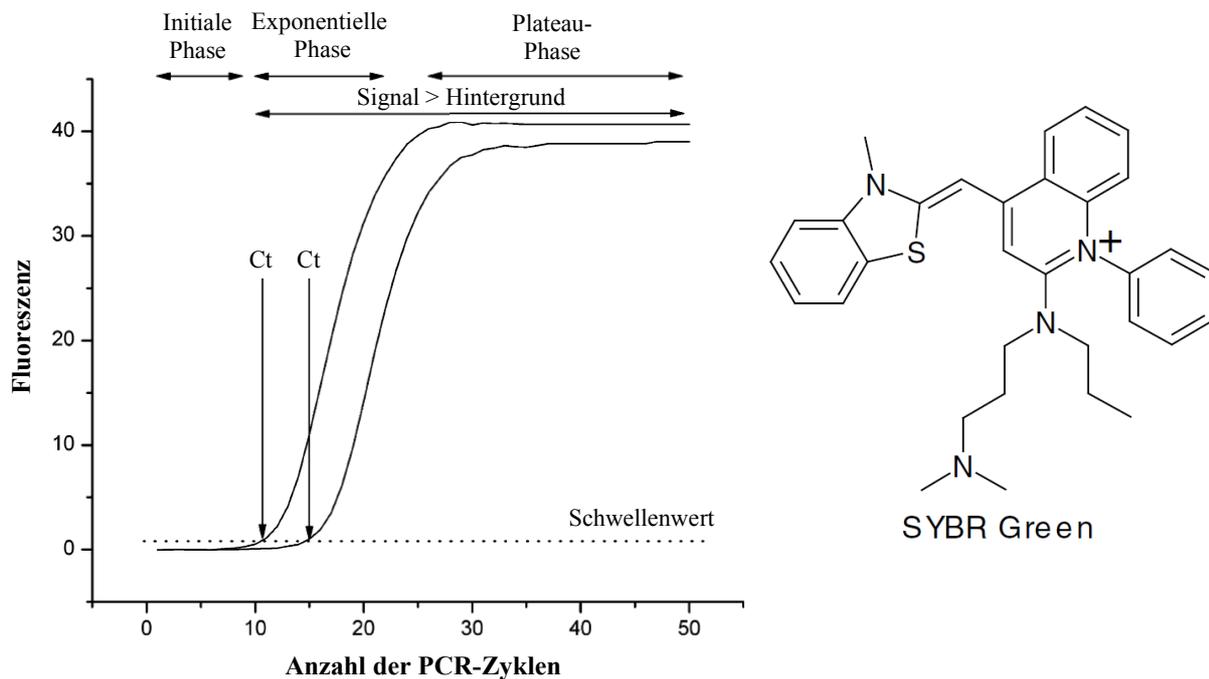
4.5.5 Quantitative Real-Time-PCR

4.5.5.1 Methode

Die Methode dient der Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels Detektion von Fluoreszenzsignalen während eines PCR-Zyklus (Higuchi et al. 1992). Sie basiert auf der Polymerase-Kettenreaktion unter zusätzlicher Verwendung interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe oder FRET-Sonden. Die Signaldetektion erfolgt während der exponentiellen Phase der PCR, da hier die Fluoreszenzzunahme proportional zur Menge des gebildeten Amplifikats ist. Zur Bestimmung der initialen DNA-Menge wird nun die Anzahl der Zyklen (Ct-Wert) verglichen, die nötig ist, um einen bestimmten Fluoreszenz-Schwellenwert zu erreichen (Kubista et al. 2006) (s. Abb. 33). Darüber hinaus eignet sich die Methode zur Untersuchung von Proben, die zwar gleiche DNA-Mengen enthalten, deren Integrität sich jedoch unterscheidet. Die Analyse der Reaktionsprodukte aus dem Restriktionsverdau (s. 4.5.4) beruht nun auf der Tatsache, dass nur intakte DNA amplifiziert wird. Aus den Ct-Werten können schließlich Rückschlüsse auf die Effektivität der Restriktionsenzyme und damit auf den Methylierungsgrad der DNA gezogen werden (Oakes et al. 2006).

In der Arbeit wurde der asymmetrische Cyanin-Farbstoff *SYBR Green I* verwendet, der zusammen mit doppelsträngiger DNA einen Fluoreszenz-Komplex bildet (Schneeberger et al. 1995).

Abbildung 33: Grundlagen der quantitativen Real-Time-PCR und Struktur von SYBR Green I. Modifiziert nach Kubista et al. 2006. Zu Beginn ist das Fluoreszenzsignal schwach und kann nicht vom Hintergrundsignal unterschieden werden (Initiale Phase). Schließlich übertrifft das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal (Schwellenwert), steigt exponentiell an (Exponentielle Phase) und erreicht schließlich ein Plateau (Plateau-Phase). Die Anzahl der Zyklen bis zum Erreichen des Schwellenwerts definieren den Ct-Wert.



4.5.5.2 Durchführung und Auswertung

Für die Real-Time-PCR wurden die Ansätze (Mo, Ms, Md, Msd) (s. 4.5.4.1) aufgetaut, kurz zentrifugiert und in folgende Reaktion (40 µL) eingebracht:

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die quantitative Real-Time-PCR.

Reagenz	Menge in µl
PCR-Mastermix	20,0
PCR-Primermix	1,6
Reaktionsansatz (Mo, Ms, Md oder Msd)	8,0
dH ₂ O	10,4

Als Primermix wurde der *RT² qPCR Primer Assay for Human PDXP* verwendet, der den Promotor von Chronophin flankiert (150bp). Das Primer-Design muss dabei die Erkennungssequenzen beider Restriktionsenzyme berücksichtigen. Als Mastermix diente der *RT² SYBR® Green qPCR Mastermix*.

Triplikate (je 10 µL) des Reaktionsansatzes wurden in eine 384-Well-Mikrotiterplatte gegeben.

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll im *CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System* durchgeführt:

Tabelle 14: Temperatur-Zeit-Programm.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	99 °C	30 sec	3
Annealing/Elongation	72 °C	1 min	
Denaturierung	97 °C	15 sec	40
Annealing/Elongation	72 °C	1 min *	
Schmelzkurve	65-95 °C Inkrement 0,5 °C	5 sec *	1

* Signaldetektion

Jede Reaktion wurde durch Analyse der Schmelzkurve auf unspezifische Amplifikate wie z.B. Primerdimere überprüft.

Die Mittelwerte der Ct-Werte wurden mit der *EpiTect® Methyl II PCR Array Microsoft Excel based data analysis*-Vorlage analysiert und der Methylierungsgrad anhand der Eichgerade korrigiert.

4.6 *Loss of heterozygosity*-Analyse

4.6.1 Verwendete Proben

Für die Identifikation eines geeigneten Mikrosatellitenmarkers wurde genomische DNA aus Blutproben verwendet. Die für den Nachweis eines *Loss of heterozygosity* erforderlichen korrespondierenden Blut- und Tumorproben standen leider nicht zur Verfügung.

4.6.2 Aufreinigung von genomischer DNA aus Blutproben

Für die DNA-Extraktion wurden jeweils 100 µL Blut mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Es wurde ein RNase-Verdau durchgeführt. Menschliche Erythrozyten und Thrombozyten enthalten keinen Zellkern. Die aufgereinigte DNA stammt daher nur aus den kernhaltigen Leukozyten.

Die Konzentration der genomischen DNA wurde im *NanoDrop 2000c* Spectrophotometer bestimmt (s. 4.4.2).

4.6.3 PCR-basierte Mikrosatellitenanalyse

4.6.3.1 Methode

Grundlage der *Loss of heterozygosity*-Analyse ist die Untersuchung polymorpher DNA-Elemente wie *short tandem repeats* (STR oder Mikrosatelliten) oder *single-nucleotide polymorphisms* (SNP) (Koreth et al. 1996; Zheng et al. 2005). Mikrosatelliten sind kurze repetitive DNA-Sequenzen (Di- bis Hexanukleotide, meist CA- oder GT-Repeats) in nicht-kodierenden Bereichen des Genoms, die in ihrer Länge variieren können. Unterscheiden sich die elterlichen Allele in ihrer Repeat-Anzahl, d.h. bei Heterozygotie, kann durch den intraindividuellen Vergleich von DNA aus Blut- und Tumorzellen eine Deletion (Verlust der Heterozygotie) detektiert werden. Dafür wird der Mikrosatelliten-Locus der korrespondierenden Proben mittels PCR amplifiziert und durch Gelelektrophorese ausgewertet (s. 4.4.4). Liegt der verwendete Mikrosatellitenmarker in der Nähe eines zu untersuchenden Zielgens, indiziert der Verlust der Markerregion eine Deletion des Zielgens (potentielles Tumorsuppressorgen).

4.6.3.2 Identifikation eines Mikrosatellitenmarkers

Die Auswahl eines geeigneten Mikrosatellitenmarkers in der Nähe des Chronophin-Locus erfolgte mit *Tandem repeats finder* (Benson 1999). Der identifizierte Mikrosatellit lag im Chronophin-Intron und stellte ein Pentanukleotid der Sequenz GTGTG dar (s. Abb. 68). Primer wurden so gewählt, dass sie den Mikrosatelliten möglichst eng flankierten, um kurze, leicht amplifizierbare PCR-Fragmente zu erzeugen (Primer3; Rozen and Skaletsky 2000) (s. Tab. 15).

Tabelle 15: Überblick über den verwendeten Mikrosatellitenmarker.

Bezeichnung	Primersequenz	Marker-lokalisierung	Produktgröße
Mikrosatellitenmarker Chronophin	5'-ACAGCTTGATGCAGC TTTCA-3' 5'-ATGCAAATATCTCAC CCCCA-3'	Homo sapiens chromosome 22, GRCh37.p10 Primary Assembly NC_000022.10 38057315-38057443	~129bp*

*abhängig von Repeat-Anzahl

4.6.3.3 Amplifikation des Mikrosatellitenmarkers mittels PCR

Für die Vervielfältigung des Mikrosatellitenmarkers mittels PCR (s. 4.4.3) wurde die genomische DNA aus Blutproben (s. 4.6.2) aufgetaut, kurz zentrifugiert und in folgende Reaktion (25 µL) eingebracht:

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die Amplifikation des Mikrosatellitenmarkers.

Reagenz	Menge in µl
5× Q5 Reaction Buffer	5,0
dNTP-Mix (10 mM each)	0,5
Primermix* (10 µM each)	1,25
Template DNA (25 ng/µL)	2,0
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	0,5
dH ₂ O	15,75

*s. Tab. 15

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll im *C1000TM Thermal Cycler* durchgeführt:

Tabelle 17: Temperatur-Zeit-Programm.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	1
Denaturierung	98 °C	30 sec	} 40
Annealing	52 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	1 min	1

Der Nachweis spezifischer Amplifikate erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

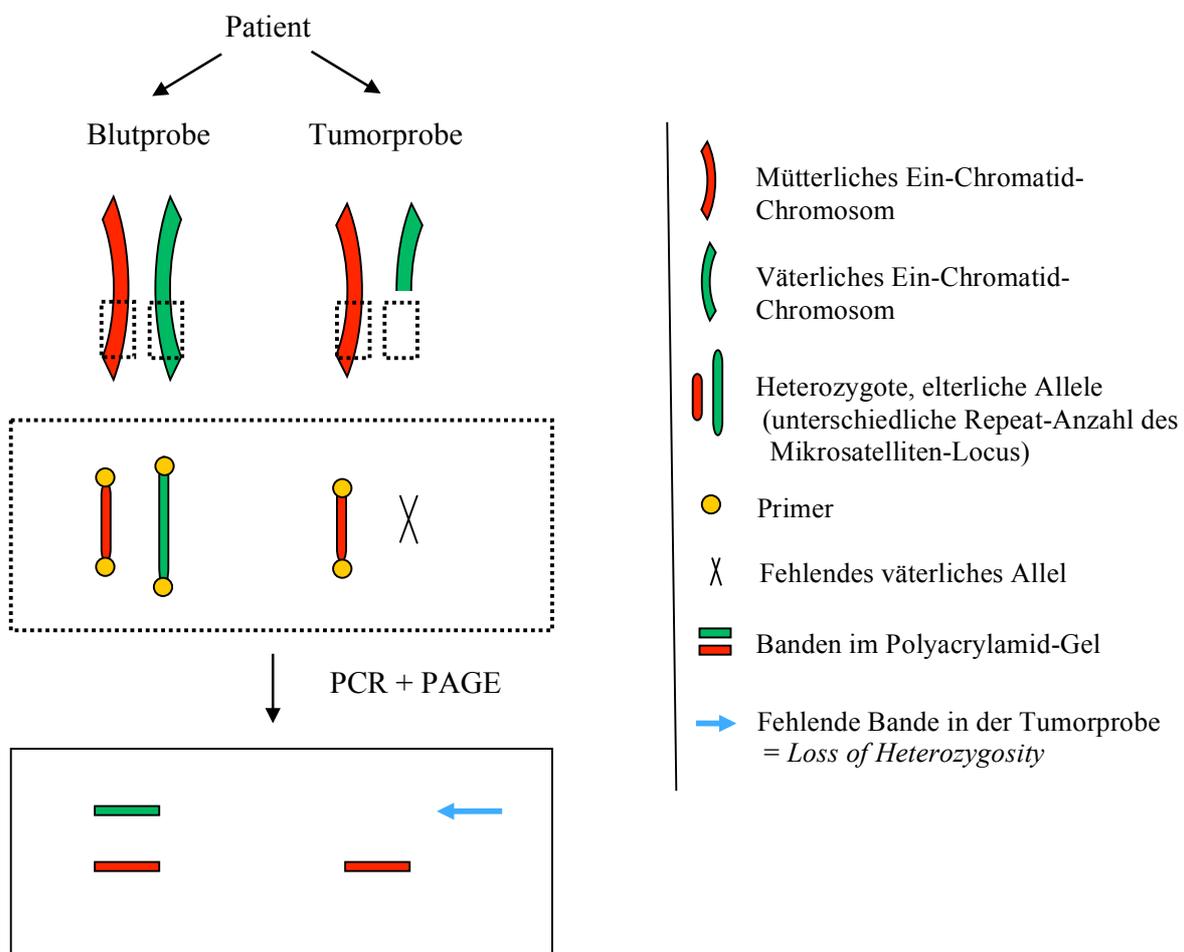
4.6.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die Detektion und Auswertung der Mikrosatelliten-Regionen erfolgte durch nicht-denaturierende, kontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-basierter Visualisierung (Bethwaite et al. 1995). Die Herstellung der Polyacrylamid-Gele und Pufferlösungen orientierte sich am Protokoll von Lonza (<http://bio.lonza.com>). Polyacrylamid-Gele können DNA mit einem Längenunterschied von 0,2 % auftrennen und eignen sich daher zur Analyse von sich nur geringfügig unterscheidenden Mikrosatelliten-Regionen.

Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf 15 %-ige (v/v) Polyacrylamid-Gele geladen. Die Elektrophorese erfolgte in 1×TBE-Puffer bei konstanter Spannung von 60 V für 160 min in einer *Mini-PROTEAN Tetra Cell* Apparatur. *100bp-* und *1kb- DNA Ladders* dienten als Größenmarker. Die Gele wurden anschließend für 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/mL) gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

Heterozygote, elterliche Mikrosatellitenmarker in der Blutprobe werden durch zwei verschiedene Banden dargestellt (informative Probe). Intensitätsminderung oder Verschwinden von Banden in der korrespondierenden Tumorprobe kennzeichnen dabei einen Marker-Verlust (s. Abb. 34). Homozygote Marker im Blut stellen sich als singuläre Bande dar und eignen sich daher nicht für den Nachweis eines Mikrosatelliten-Verlusts (nicht-informative Probe).

Abbildung 34: Überblick über die Mikrosatellitenanalyse. Notwendige Voraussetzung der Analyse ist die Heterozygotie der Markerregion (unterschiedliche Repeat-Anzahl des Mikrosatelliten-Locus). Die Markerregion wird mittels geeigneter Primer amplifiziert. Heterozygote Marker stellen sich durch zwei Banden in der hochauflösenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dar. Durch Vergleich von Blut- und Tumorprobe des Patienten kann der Verlust einer Markerregion detektiert werden (LOH).

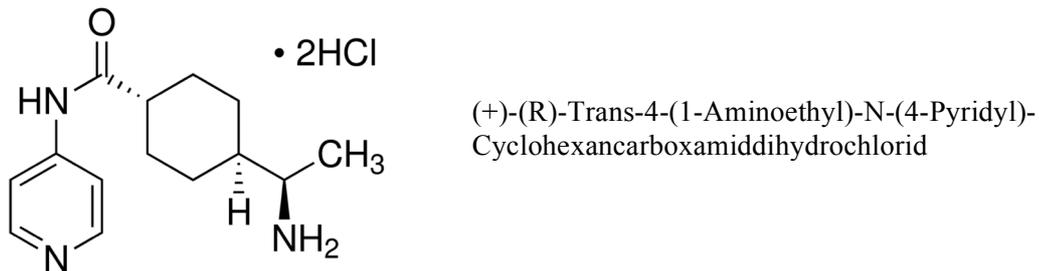


4.7 Inhibitor-Versuche

4.7.1 Verwendete Inhibitoren

Y-27632 (ROCKi) ist ein hochpotenter, reversibler und selektiver Inhibitor der Rho-Effektorkinasen ROCK-1 (Ki 0,22 μM) und ROCK-2 (Ki 0,30 μM). Die Inhibition basiert auf der Konkurrenz mit ATP um die katalytische Domäne der Enzyme. Die Passage der Zellmembran erfolgt durch Carrier-vermittelte erleichterte Diffusion. Y-27632 wurde ursprünglich als Muskelrelaxans entwickelt. Gezeigt wurde die Relaxation glatter Muskulatur in Schweine-Koronararterien, die auf einer verringerten Phosphorylierung von Myosin-Leichtketten beruht. Darüber hinaus inhibiert es die Ausbildung von Stressfasern in Lysophosphatidsäure-stimulierten Swiss 3T3-Zellen (Ishizaki et al. 2000; Narumiya et al. 2000).

Abbildung 35: Molekularstruktur ROCKi. Von www.sigmaldrich.com.



BMS-5 (LIMKi) ist ein hochpotenter, selektiver Inhibitor der LIM-Kinasen LIMK-1 und LIMK-2 (IC₅₀ 7 bzw. 8 nM, Inhibition der Phosphorylierung von Destrin) und weist keine Zytotoxizität auf (Ross-Macdonald et al. 2008) (Molekül 3). In MDA-MB-231 und 4T1.2 Zellen verhindert er konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von Cofilin (IC₅₀ ~ 1 μM , keine Unterscheidung zwischen LIMK-1 bzw. -2) (Scott et al. 2010; Li et al. 2013).

Abbildung 36: Molekularstruktur LIMKi. Von www.symansis.com.

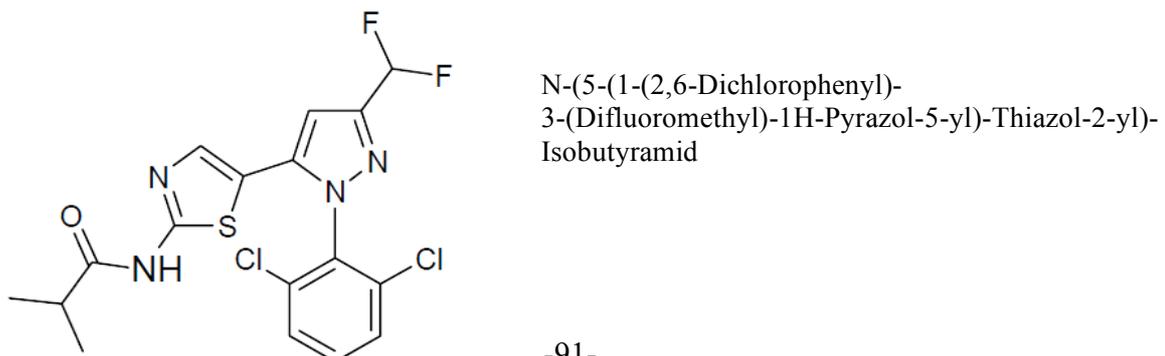
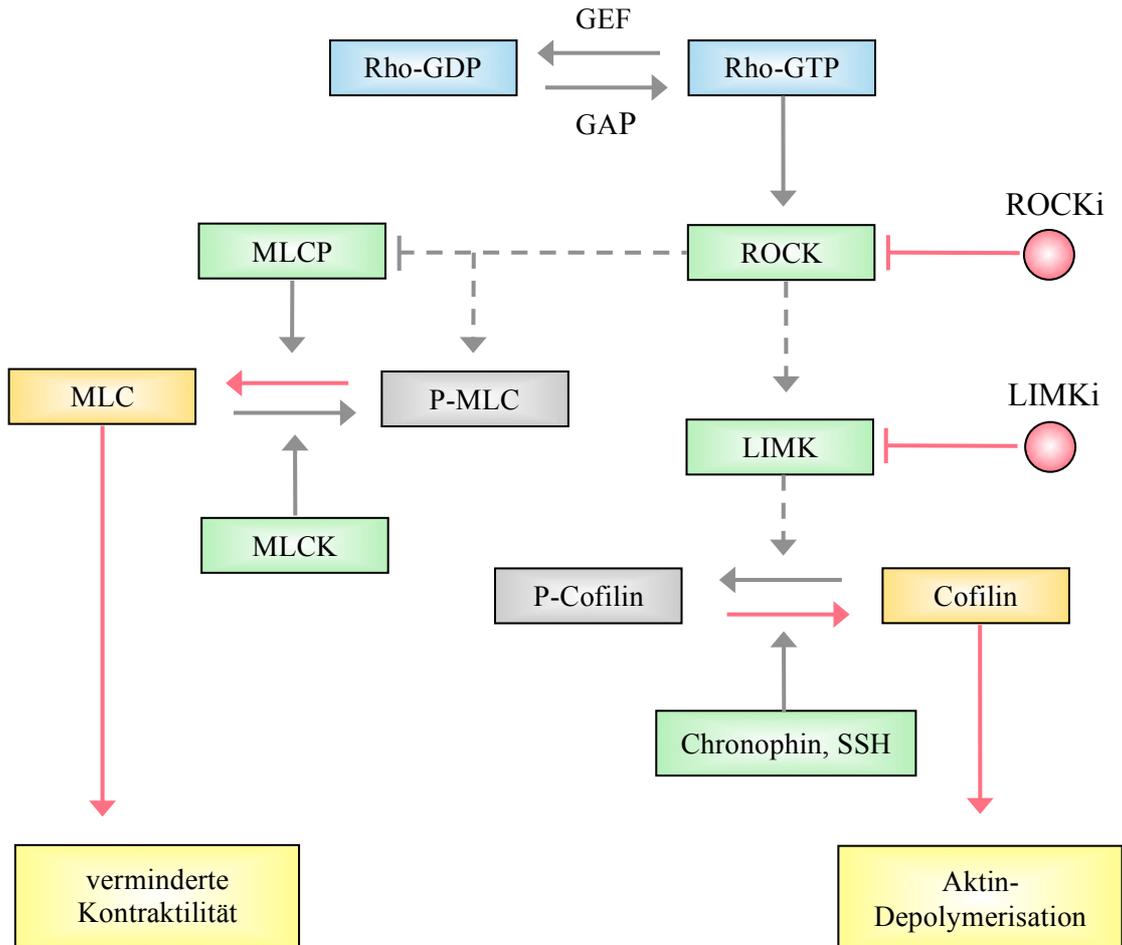


Abbildung 37: Vereinfachtes Wirkschema von ROCKi bzw. LIMKi. Zusammengestellt aus Bernstein et al. 2010, Maekawa et al. 1999 und Narumiya et al. 2000. Gezeigt werden Angriffspunkte und Effekte von ROCKi bzw. LIMKi (rot). Unter ROCKi ist die Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (MLCP) verstärkt aktiv und katalysiert die Dephosphorylierung von Myosin-Leicht-Ketten (MLC). Folge ist eine verminderte zelluläre Kontraktilität. Zusätzlich sinkt die Aktivität der LIM-Kinase (LIMK), sodass weniger Phospho-Cofilin (P-Cofilin) entsteht. Folge ist die Depolymerisation von F-Aktin. Unter LIMKi soll es ausschließlich zu einer verminderten LIMK-Aktivität kommen, die Phosphorylierung von MLC wird vermutlich nicht beeinflusst. Parallele Signalwege, über die die beschriebenen Effekte möglicherweise umgangen werden können, werden nicht dargestellt.



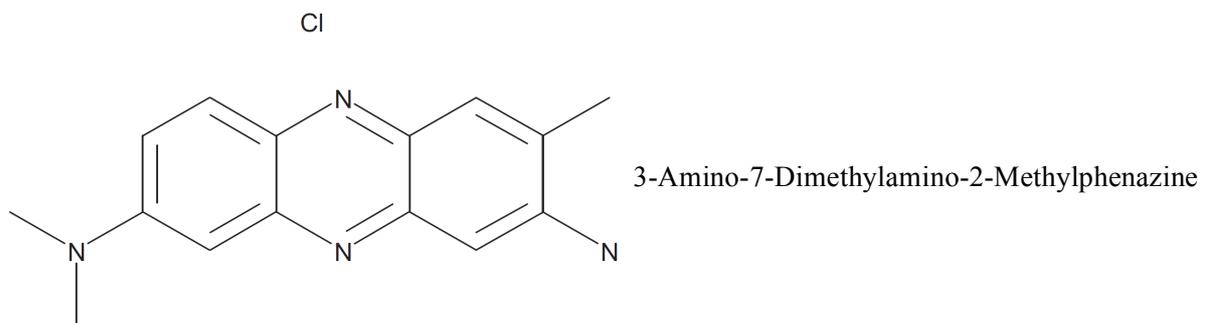
4.7.2 Vorbereitung der Inhibitoren

Alle Inhibitoren wurden in sterilem DMSO gelöst, aliquotiert und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Stammlösungen wurden 1:100 in Kulturmedium bzw. in Hunger-Medium verdünnt und anschließend im Verhältnis 1:10 in den jeweiligen Versuch eingebracht. Bei allen Versuchen wurde eine DMSO-Kontrolle mitgeführt, um Effekte des Lösungsmittels auszuschließen. Die folgenden Inhibitor-Konzentrationen wurden bei den Versuchen verwendet: LIMKi $25\text{ }\mu\text{M}$, $10\text{ }\mu\text{M}$, $1\text{ }\mu\text{M}$, 100 nM , 10 nM , 1 nM ; ROCKi $10\text{ }\mu\text{M}$.

4.7.3 Neutralrot-Test

Der Neutralrot-Test eignet sich zur Bestimmung der Zellviabilität bzw. der Zytotoxizität von Viren, Immunzellen und chemischen Substanzen (z.B. Medikamente, Toxine). Er basiert auf der Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot in die Lysosomen vitaler Zellen (Nemes et al. 1979; Borenfreund et al. 1984). Bei physiologischem pH ist Neutralrot ungeladen und kann daher die Zellmembran penetrieren. Im sauren Milieu der Lysosomen wird Neutralrot ionisiert und so an der Passage der lysosomalen Membran gehindert (Ionenfalle). Der pH-Gradient innerhalb der Lysosomen ist an die Produktion von ATP geknüpft. Abgestorbene bzw. geschädigte Zellen können daher Neutralrot nicht binden und bleiben ungefärbt.

Abbildung 38: Molekularstruktur von Neutralrot. Aus Guerard et al. 2012.



Der Neutralrot-Test erfolgte in Anlehnung an die Methode von Repetto et al. 2008. Zunächst wurden je 50.000 Zellen in die Wells einer *96-Well*-Mikrotiterplatte ausgesät (s. 4.1.4) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium verworfen und die Zellen wurden in Triplikaten nach folgendem Schema behandelt: 0,1 % DMSO, Staurosporin (1 µM), LIMKi (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 25 µM) oder ROCKi (10 µM). Zur Bestimmung der Hintergrund-Absorption wurden 200 µL Medium in drei Wells der Platte gegeben. Für die Herstellung des Neutralrot-Mediums (40 µg/mL) wurde die Neutralrot-Stammlösung 1:100 mit Kulturmedium verdünnt und zusammen mit der Mikrotiterplatte für 24 h bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Neutralrot-Medium für 10 min bei 600 · g zentrifugiert und anschließend dekantiert, um Präzipitate zu entfernen. Es erfolgten Abnahme des Kulturmediums, Zugabe von je 100 µL Neutralrot-Medium und Inkubation für 1 h bei 37 °C. Danach wurde das Neutralrot-Medium entfernt und die Platte mit 150 µL PBS gewaschen. Jedes Well wurde mit 150 µL Entfärbelösung befüllt und die Platte für 10 min geschüttelt. Die Bestimmung der OD erfolgte bei 562 nm in einem *2104 EnVision® Multilabel Reader*.

4.7.4 Western Blot nach Inhibitorbehandlung

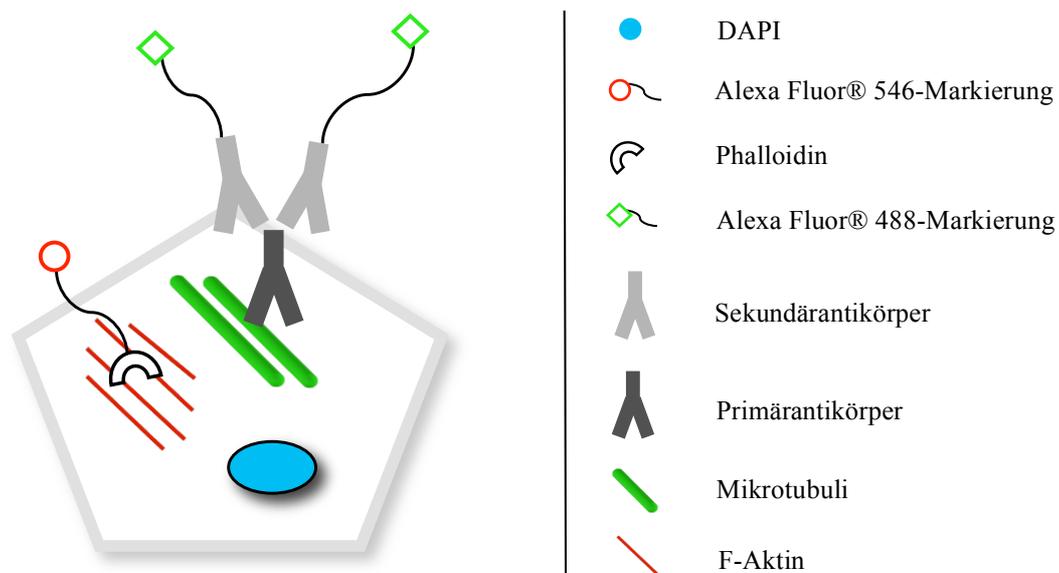
siehe 4.2

4.7.5 Immunzytochemie

4.7.5.1 Methode

Die Immunzytochemie ermöglicht die Visualisierung und Quantifizierung zellulärer Antigene mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Grundlage ist die mikroskopische Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen. Um mehrere Antigene gleichzeitig zu visualisieren, wurde eine Kombination aus direkter und indirekter Immunfluoreszenz verwendet (Buchwalow et al. 2005) (s. Abb. 39). Polymerisiertes F-Aktin wurde direkt mit Fluoreszenz-markiertem Phalloidin, einem Cyclopeptid aus *Amanita phalloides*, gefärbt (Wulf et al. 1979). α -Tubulin wurde durch einen spezifischen Primärantikörper gebunden, der seinerseits durch einen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper indirekt detektiert wurde. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt, das in die DNA-Doppelhelix interkaliert (Kapusinski 1995).

Abbildung 39: Multicolor-Fluorescence-Immunostaining Technik. Einzelheiten siehe Text.



4.7.5.2 Durchführung und Auswertung

Zunächst wurden je 80.000 Zellen auf runde Deckgläser ausgesät (s. 4.1.4) und über Nacht mit Kulturmedium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 2 h mit LIMKi (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 25 μ M), ROCKi (10 μ M) oder 0,1 % DMSO inkubiert und anschließend für 15 min mit 4 % PFA fixiert. Um die Präparate vor Austrocknung und Licht zu schützen, wurden alle folgenden Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach einem Waschschrift in PBS wurden die Zellen für 1 h in Blocking-Puffer permeabilisiert und geblockt. Es erfolgte Waschen in PBS mit 0,3 % Saponin, Umranden mit Dako-Pen und Inkubation über Nacht bei 4 °C mit α 4a-Tubulin-Antikörper (1:1.000 in Antikörper-Diluent). Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen in PBS mit 0,3 % Saponin entfernt. *Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG* und *Alexa Fluor® 546 Phalloidin* wurden 1:200 bzw. 1:100 in Antikörper-Diluent verdünnt und für 2 h auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden in PBS mit 0,3 % Saponin gewaschen, für 5 min mit DAPI (2 μ g/mL in PBS) gegengefärbt und erneut mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Präparate mit *Fluoromount G* eingedeckt.

Übersichtsaufnahmen wurden unter definierten Bedingungen mit einem 20 \times Objektiv am *Nikon Eclipse Ti Inverted* Mikroskop erstellt. Für die Auswertung von Fläche, Rundheit und mittlerer F-Aktin-Fluoreszenz-Intensität wurden für jede Bedingung mindestens 100 Phalloidin-gefärbte Zellen mit Image Pro-Plus 7.0 analysiert. Die Fläche wurde dabei anhand der Anzahl der Pixel innerhalb des markierten Objekts bestimmt. Die Rundheit (P2A) errechnete sich aus $\text{Umfang}^2 / 4 \cdot \pi \cdot \text{Fläche}$, wobei ein Wert von 1 die größte Rundheit indiziert.

Die Bestimmung des Anteils an Zellen mit *stellate cell*-Phänotyp orientierte sich am Protokoll von Abe et al. (Abe et al. 1998). Dafür wurde die Morphologie von mindestens 150 Zellen analysiert (polygonale vs. *stellate cell* (Zelle mit mindestens drei F-Aktin-reichen Membranprotrusionen)).

Detailansichten wurden mit einem 63 \times Öl-Immersion-Objektiv am *Leica TCS SP5 II Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktionen (*maximum projection*) wurden aus mindestens 30 Schnittbildern (z-Achse, Dicke 0,7 μ m) mit der Leica LAS AF Software erstellt.

4.7.6 2D-Zellmigrations-Versuch

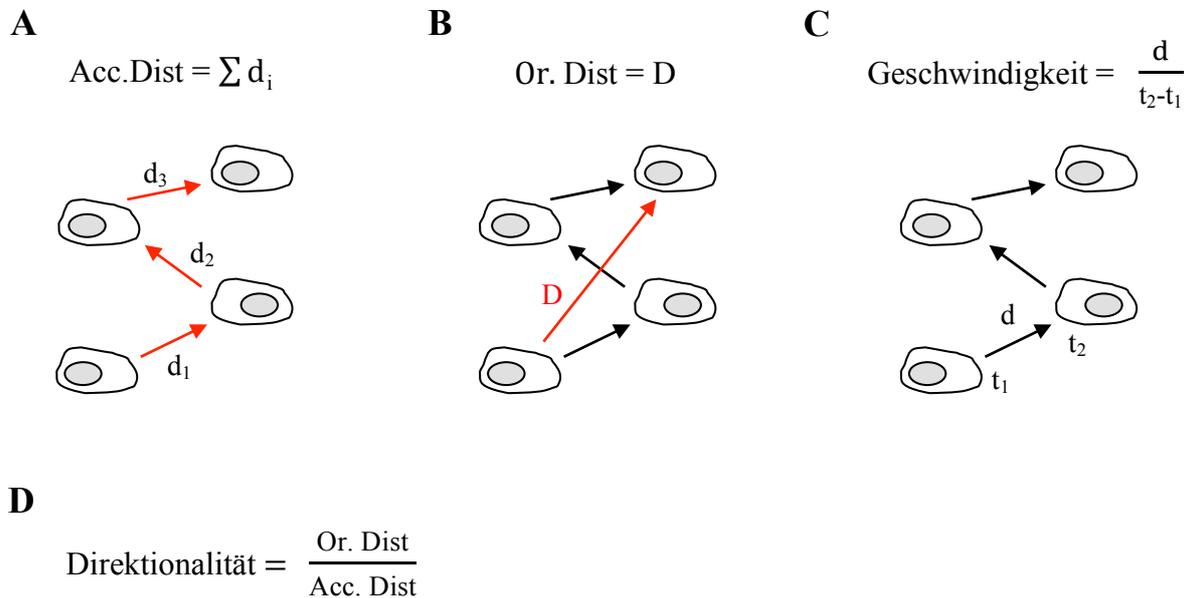
4.7.6.1 Methode

Der 2D-Zellmigrations-Versuch ermöglicht die Analyse und Quantifizierung der Zellmotilität über einen längeren Zeitraum (*Live Cell Imaging*) und liefert dadurch Informationen zu bewegungsabhängigen Prozessen, die z.B. Immun- und Entzündungsreaktionen oder Tumorprogression und -metastasierung zugrunde liegen. Darüber hinaus lassen sich Aussagen zur Wirkung von Medikamenten auf die Zellmigration treffen (Decaestecker et al. 2007). Grundlage ist die Erfassung von Einzelzellbewegungen durch ein automatisiertes Kamerasystem, das über mehrere Stunden Differentialinterferenzkontrast-Aufnahmen erstellt. Mit Hilfe einer Software werden die Bilder prozessiert und schließlich Videosequenzen rekonstruiert (De Hauwer et al. 1999).

4.7.6.2 Durchführung und Auswertung

Für den Versuch wurde eine 8-Well-Mikrotiterplatte mit Kollagen IV (10 µg/mL in 0,05 M HCl) beschichtet und mit 0,1 % BSA geblockt. Je 6.000 Zellen wurden auf die Wells verteilt und in Hunger-Medium mit 0,1 % BSA für 6 h bei 37 °C kultiviert. Es erfolgte eine 30-minütige Vorinkubation mit 0,1 % DMSO, LIMKi (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 25 µM) oder ROCKi (10 µM). Anschließend wurde die Mikrotiterplatte bei kontrollierter Temperatur, Luftfeuchtigkeit und CO₂-Sättigung für 12 h in einem *Motorized Stage Incubator System* kultiviert. Dabei wurden Migrationsvideos mit Hilfe eines *Nikon Eclipse Ti Inverted* Mikroskops erstellt. Für jede Bedingung wurden mindestens 65 Zellen mit Image Pro-Plus 7.0 ausgewertet. Die Zelldynamik wurde anhand folgender Parameter analysiert: zurückgelegte Distanz (*Accumulated traveled distance*, Acc.Dist.), Distanz zwischen Anfangs- und Endposition (*Distance from origin*, Or.Dist), Geschwindigkeit sowie Direktionalität (s. Abb. 40). Immobile bzw. wenig-motile Zellen (Acc.Dist. kleiner als ein Zelldurchmesser) und Zellen, die während des Beobachtungszeitraumes eine Zellteilung durchliefen, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Abbildung 40: Berechnung der Zelldynamik. Gezeigt werden die Berechnungsgrundlagen von (A) zurückgelegter Distanz (Acc.Dist.), (B) Distanz zwischen Anfangs- und Endposition (Or.Dist), (C) Geschwindigkeit und (D) Direktionalität. d entspricht einer bestimmten Strecke, t einem bestimmten Zeitpunkt.



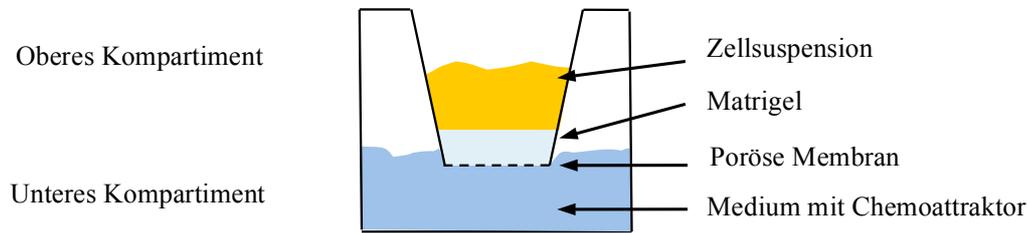
4.7.7 3D-Zellinvasions-Versuch

4.7.7.1 Methode

Der Versuch dient der Untersuchung von Zellbewegungen in dreidimensionaler Umgebung und liefert dadurch Erkenntnisse zu Chemotaxis und Chemoinvasion sowie zu deren Beeinflussung durch Medikamente. Dabei werden Transwell-Kammern (modifizierte Boyden-Kammern) verwendet, die Matrigel-beschichtete, poröse Membranen enthalten (Albini et al. 1987) (s. Abb. 41). Matrigel besteht aus einer Mischung verschiedener extrazellulärer Strukturproteine wie Laminin, Entactin und Kollagen IV und stellt eine Art künstliche Basalmembran dar (Hughes et al. 2010). Es verschließt die poröse Membran und hindert dadurch nicht-invasive Zellen an der Membranpassage.

Der Versuch basiert auf der Applikation von Zellen in das obere Kompartiment und eines Chemoattraktors ins untere Kompartiment der Transwell-Kammer. Das Erreichen des unteren Kompartiments erfordert erstens die Degradation des Matrigels und zweitens die Transmigration durch die Membranporen. Zur Bestimmung der Invasionsrate werden die Zellen an der Oberseite der Membran entfernt und die transmigrierten, an der Unterseite haftenden Zellen gefärbt und ausgezählt.

Abbildung 41: Aufbau der Transwell-Kammer. Modifiziert nach Albini et al. 1987. Einzelheiten siehe Text.



4.7.7.2 Durchführung und Auswertung

Der Versuch orientierte sich am Protokoll von Albini et al. (2007) und wurde in Duplikaten durchgeführt. Es wurden *BD BioCoat™ BD Matrigel™* Invasions-Kammern mit 8 µm Porengröße verwendet. Die Kammern wurden zunächst für 20 min bei Raumtemperatur aufgetaut und für 3 h bei 37 °C in Hunger-Medium ohne BSA equilibriert. 50.000 Zellen wurden ausgezählt (s. 4.1.4), in Hunger-Medium mit 0,1 % BSA resuspendiert und mit 0,1 % DMSO, LIMKi oder ROCKi behandelt. Hunger-Medium mit 0,1 % BSA und 100 ng/mL EGF als Chemoattraktor wurde in das untere Kompartiment, die vorbehandelten Zellen wurden ins obere Kompartiment der Kammer gegeben. Die Transwell-Kammern wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden nicht-invasive Zellen und übriges Matrigel mit einem Wattestäbchen von der Oberseite der Membran entfernt. Zellen an der Membranunterseite wurden für 15 min mit Methanol fixiert und anschließend für 15 min mit DAPI (1 µg/mL) gefärbt. Die Membranen wurden ausgeschnitten, auf Objektträger aufgebracht, mit Fluoromount G eingedeckt und das Membranzentrum (~ 3,45 mm² ± 38 % der Membran-Gesamtfläche) mit einem 4× Objektiv am *Nikon Eclipse Ti Inverted* Mikroskop fotografiert. DAPI gefärbte Zellkerne wurden automatisiert mit Image Pro-Plus 7.0 erfasst und so wurde die Anzahl der transmigrierten Zellen bestimmt.

4.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6. Graphiken zeigen das arithmetische Mittel der Einzelwerte sowie den Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.). Die Anzahl an Replikaten wird mit „n“ gekennzeichnet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *Student's t-test* (gepaart, zweiseitig) ermittelt. Das Signifikanzniveau wird in allen Graphiken mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) bzw. „ns“ (nicht signifikant) angegeben.

5. ERGEBNISSE

5.1 Chronophin-Expression und Cofilin-Phosphorylierung in humanen Glioblastom-Zelllinien

Cofilin ist ein zentraler Regulator der dynamischen Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Die Aktivität von Cofilin wird durch Phosphorylierung eines Serin-Rests (Ser3) kontrolliert (Mizuno 2013). Die Überführung in die inaktive Phospho-Form wird einerseits durch Kinasen katalysiert, ist jedoch auch durch Aktivitätsminderung antagonistischer Phosphatasen wie Chronophin möglich. Die Inaktivierung von Cofilin ist mit der gesteigerten Invasion von Gliomen assoziiert (Guo et al. 2009; Ma et al. 2011), wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch ungeklärt sind.

Die Expression von Chronophin und die Phosphorylierung von Cofilin wurden daher in verschiedenen humanen Glioblastom-Zelllinien (s. 4.1.1) mittels Western Blot Analyse untersucht (s. Abb. 42). Zur Auftrennung von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem Cofilin wurden Mn^{2+} -Phos-tagTM-SDS-Gele verwendet, die die Wanderung von Phospho-Proteinen verzögern (Kinoshita et al. 2009; Kinoshita et al. 2012). Die Detektion erfolgte mit einem panspezifischen Cofilin-Antikörper.

Ziel war einerseits die Charakterisierung verschiedener Glioblastom-Zelllinien und Identifikation geeigneter Zelllinien für die Inhibitor-Versuche, sowie andererseits die Analyse der Assoziation zwischen Chronophin-Expression und Cofilin-Phosphorylierung.

Die Glioblastom-Zelllinien U87 und U138 (Ponten et al. 1968) weisen keine für sekundäre Glioblastome typische IDH1-Mutation auf (Ichimura et al. 2009) und werden wie die Zelllinie U343 (Luk et al. 2012) als primäre Glioblastom-Zelllinien klassifiziert. Alle drei Zelllinien exprimieren deutlich weniger Chronophin als normale Maus-Astrozyten (NMA), die als Referenzzellen dienten (U343 ~49 %; U138 ~39 %; U87 ~17 % der Chronophin-Expression von NMA). Interessanterweise führt die Abnahme der Expression von Chronophin zu einer linearen Zunahme der Cofilin-Phosphorylierung in den drei Zelllinien (U343 ~10 %; U138 ~24 %; U87 ~55 % Phospho-Cofilin Anteil am Gesamt-Cofilin) (s. Abb. 43). Die Zelllinie U87, die eine niedrige Chronophin-Expression und eine hohe Cofilin-Phosphorylierung aufweist, wurde für spätere Inhibitor-Versuche ausgewählt (s. 5.4).

Pädiatrische Glioblastome unterscheiden sich in ihrer Häufigkeit, anatomischen Lokalisation sowie in ihrer Histopathologie von den Tumoren Erwachsener und sind durch eigene molekulargenetische Veränderungen charakterisiert (Paugh et al. 2010; Schwartzenuber et al. 2012). Die Zelllinien GBM6840 und GBM2603, die aus pädiatrischen Glioblastomen isoliert wurden (Di Tomaso et al. 2000; Luk et al. 2012), zeigen eine ähnlich hohe Chronophin-Expression und Cofilin-Phosphorylierung wie NMA. Die Ergebnisse stimmen mit der Karyotypisierung von GBM6840 überein, bei der keine strukturellen Veränderungen von Chromosom 22 nachgewiesen werden konnten (Di Tomaso et al. 2000).

Die Zelllinie DBTRG wurde von einem sekundären Glioblastom abgeleitet, das aus niedrig-malignen Gliomen hervorgeht. Initial wurde bei der Patientin ein anaplastisches Astrozytom (Grad III), im Rahmen einer späteren Kraniotomie ein Glioblastoma multiforme (Grad IV) diagnostiziert (Kruse et al. 1992). Vor der Isolation der Zellen hatte die Patientin zunächst eine kombinierte Chemo- und Strahlentherapie, später eine Polychemotherapie erhalten (Kruse et al. 1992).

DBTRG nimmt damit innerhalb der verglichenen Glioblastom-Zelllinien eine Sonderstellung ein. Die Chronophin-Expression der Zellen ist mit der Expression von NMA vergleichbar. DBTRG weist wie GBM6840 keine karyotypischen Veränderungen von Chromosom 22 auf (Kruse et al. 1992). Trotz hoher Chronophin-Expression in DBTRG ist der Anteil an Phospho-Cofilin hoch.

Auffällig ist zudem, dass die Chronophin- und GAPDH-Banden der murinen Probe im Gel etwas weiter wandern als die Banden der humanen Proben. Ursächlich ist vermutlich die geringere molekulare Masse von murinem Chronophin (murin 292, human 296 Aminosäuren) bzw. die Expression einer murinen GAPDH-Isoform, die eine geringere molekulare Masse als die exprimierte humane Isoform aufweist (fünf murine GAPDH-Isoformen, 333-393 Aminosäuren; zwei humane Isoformen, 293 und 335 Aminosäuren).

Abbildung 42: Chronophin-Expression und Cofilin-Phosphorylierung in verschiedenen humanen Glioblastom-Zelllinien.

(A) Repräsentativer Western Blot zur Expressionsanalyse von Chronophin in verschiedenen Glioblastom-Zelllinien. Normale Maus-Astrozyten (NMA) wurden als Referenz verwendet. GAPDH-Level dienen als Ladekontrolle.

(B) Densitometrische Quantifizierung der Chronophin-Expression (n = 3). Das Chronophin-Signal wurde auf GAPDH normalisiert.

(C) Repräsentativer Western Blot zur Bestimmung des Phosphorylierungs-Levels von Cofilin. Detektion mittels panspezifischen Cofilin-Antikörpers nach Auftrennung in Phospho-Cofilin und Cofilin durch Phos-tag™-SDS-PAGE.

(D) Densitometrische Quantifizierung des Phospho-Cofilin Anteils am Gesamt-Cofilin (n = 3).

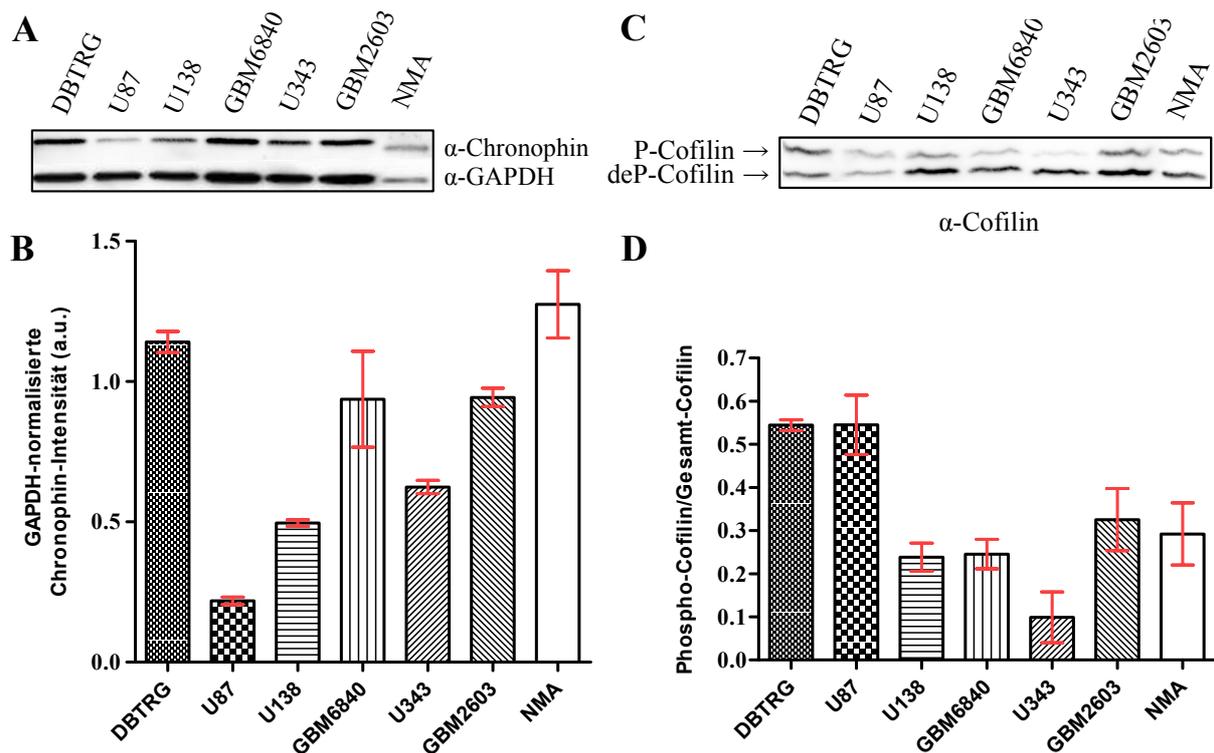
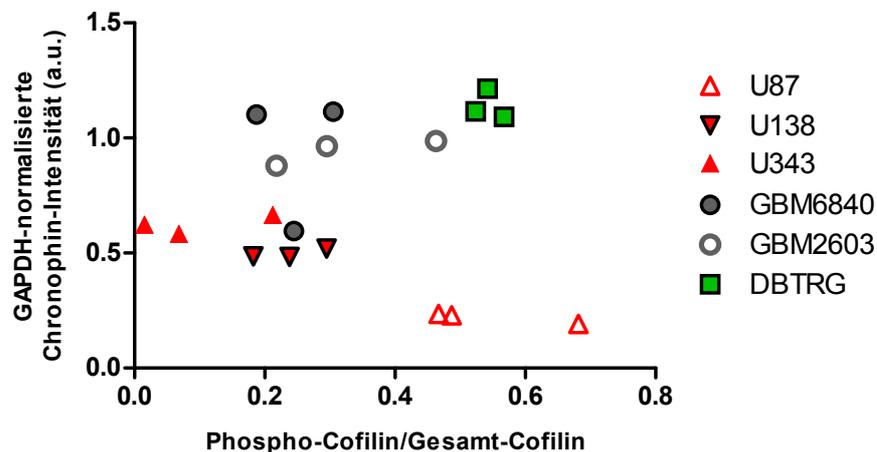


Abbildung 43: Korrelation zwischen Chronophin-Expression und Cofilin-Phosphorylierung.

Subklassifizierung humaner Glioblastom-Zelllinien in primäre Glioblastome (U87, U138, U343; rot), pädiatrische Glioblastome (GBM6840, GBM2603; grau) und ein sekundäres Glioblastom (DBTRG; grün). Primäre Glioblastom-Zelllinien zeigen eine invers lineare Korrelation zwischen Chronophin-Expression und Cofilin-Phosphorylierung.



5.2 Expression von Cofilin, Chronophin und LIMK-2 in Glioblastom-Gewebeproben

Die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen wird durch die Dysregulation zahlreicher motilitätsbeeinflussender Proteine bedingt. Veränderungen in der Signalkaskade des Cofilin-Signalweges sind dabei für verschiedene Tumorentitäten bedeutend (Unwin et al. 2003; Ding et al. 2004; Keshamouni et al. 2006; Turhani et al. 2006).

Expressionsanalysen von Cofilin und seiner Regulatorproteine in astrozytären Gliomen (Fedorchenko 2009) sowie *in silico*-Analysen des *REMBRANDT data portal* (Schulze 2015; Schulze et al. 2015) haben deutlich veränderte Expressionsmuster und damit eine Dysregulation des Cofilin-Signalweges in Gliomen aufgezeigt. Einerseits wurde eine verminderte Expression von Chronophin, andererseits eine deutlich gesteigerte Expression von PAK-4, ROCK-1 und LIMK-2 beschrieben.

Entscheidend für das Verständnis von Tumorinvasion und -metastasierung ist neben der Untersuchung einzelner dysregulierter Gene vor allem die komplexe Analyse gesamter Signalkaskaden (Wang et al. 2007).

Die Expression von Cofilin und seiner Regulatorproteine wurde daher im Rahmen einer umfassenden immunhistochemischen Analyse humaner astrozytärer Gliome unterschiedlichen Malignitätsgrades untersucht. Dabei wurden sowohl die Expression von Chronophin und LIMK-2, als auch die Phosphorylierung von Cofilin und damit dessen Aktivitätsstatus ermittelt.

Analogien zwischen Tumorzell- und Leukozytenmigration legten parallele Expressionsanalysen in perivaskulären T-Lymphozyten nahe (s. 5.2.3).

5.2.1 Lokalisation und Verteilung der Antigene in Normal- und Tumorgewebe

Zu Beginn der histologischen Auswertung erfolgte die Beurteilung der Antigenverteilung und -lokalisation in Normal- und Tumorgewebe. Entsprechend der Lokalisation der verwendeten Präparate (s. Tab. 4) wurden Kleinhirn- und Großhirnareale in Proben untersucht, die neben Tumor- auch Normalgewebe enthielten. Die Zuordnung verschiedener Zelltypen im Normalgewebe erfolgte anhand von histomorphologischen Merkmalen im HE-Schnitt. Astrozyten wurden mittels GFAP-Färbung identifiziert (s. Abb. 44B und Abb. 45B).

Die deskriptive Analyse des Tumorgewebes umfasste pilozytische Astrozytome (Grad I) und Glioblastome (Grad IV).

Abbildung 44: Überblicksdarstellung von Kleinhirn und pilozytischem Astrozytom (Grad I).

(A) Repräsentative HE-Färbung der Grenzregion zwischen Kleinhirn und pilozytischem Astrozytom (Grad I). (1) 1,25× Objektiv. (2) Vergrößerung der markierten Region aus (1), 5× Objektiv. (3) Vergrößerung der markierten Region aus (2), der rote Pfeil markiert eine Purkinje-Zelle, 20× Objektiv. Cer: Cerebellum. M: Marklager. R: Rinde. Kö: Körnerzellschicht. P: Purkinje-Zellschicht. Mol: Molekularschicht. AZ I: pilozytisches Astrozytom (Grad I).

(B) GFAP-Färbung. Die blauen Pfeile markieren Bergmann-Stützzellen sowie Astrozyten der Molekularschicht. (1) korrespondierende GFAP-Färbung zur markierten Region in (A2), 10× Objektiv. (2) Vergrößerung der markierten Region aus (1), 40× Objektiv.

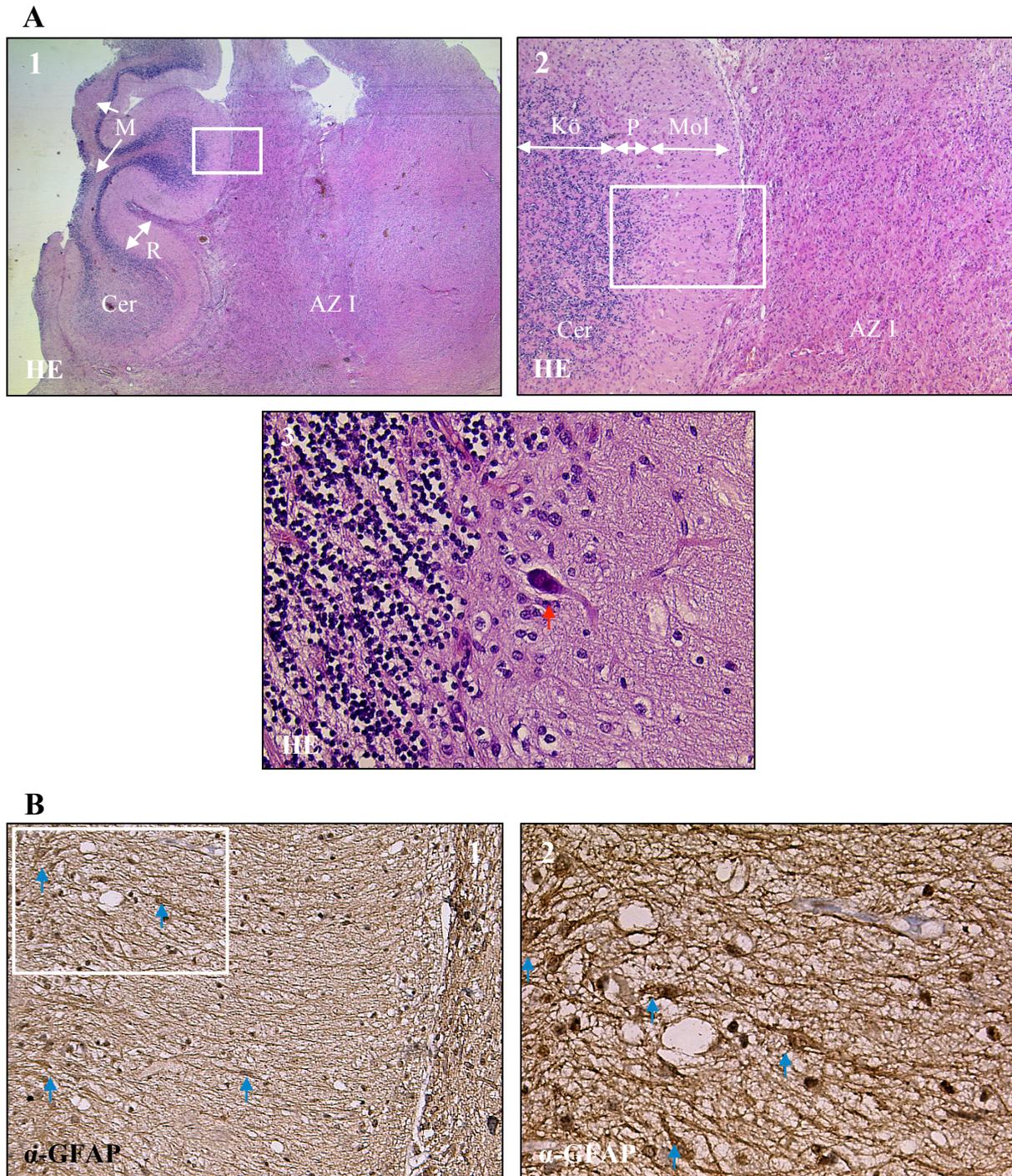
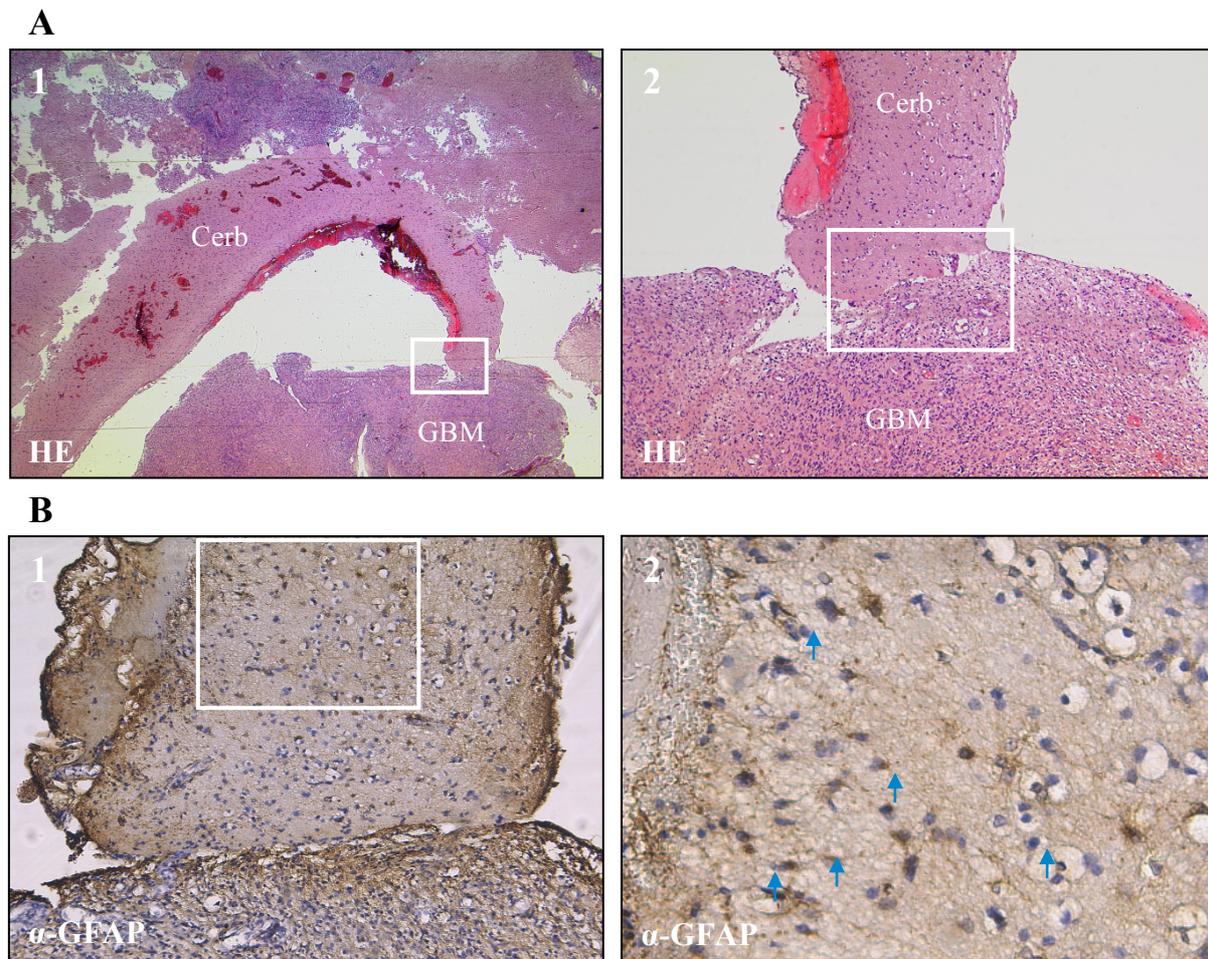


Abbildung 45: Überblicksdarstellung von Großhirn und Glioblastoma multiforme (Grad IV).

(A) Repräsentative HE-Färbung von Großhirn und Glioblastoma multiforme (Grad IV). (1) 1,25× Objektiv. (2) Vergrößerung der markierten Region aus (1), 5× Objektiv. Cerb: Cerebrum. GBM: Glioblastoma multiforme (Grad IV).

(B) GFAP-Färbung. Die blauen Pfeile markieren Astrozyten. (1) korrespondierende GFAP-Färbung zur markierten Region in (A2), 10× Objektiv. (2) Vergrößerung der markierten Region aus (1), 20× Objektiv.



5.2.1.1 Chronophin

Chronophin wird in nahezu allen menschlichen Geweben exprimiert. Den höchsten Gehalt weisen das zentrale Nervensystem sowie Leber-, Nieren- und Hodengewebe auf (Jang et al. 2003; Gohla et al. 2005). Die verschiedenen Regionen des ZNS zeigen mit Ausnahme der Medulla spinalis eine ähnlich starke Expression. In Ratten- und Mäusegehirnen wurde eine besonders hohe Chronophin-Expression für den Hippocampus beschrieben (Kim et al. 2008; Fedorchenko 2009). Analysen auf zellulärer Ebene ergaben eine Färbung von Astrozyten und Mikroglia (Boe et al. 2004) bzw. von Neuronen und Gliazellen (Kim et al. 2008; Fedorchenko 2009).

Normalgewebe

Auffällig ist zunächst die Färbedivergenz zwischen Normalhirn- und Tumorarealen, die vermutlich durch eine verstärkte Färbung des Neuropils im Normalgewebe verursacht wird (s. Abb. 46A).

Im Kleinhirn (s. Abb. 46B2) zeigen sowohl die Bergmann-Stützzellen, eine Sonderform der Astroglia, die zwischen den Perikaryen der Purkinje-Zellen lokalisiert sind, als auch die übrigen, locker eingestreuten Astrozyten der Molekularschicht eine kräftige Kernfärbung (blaue Pfeile). Die Purkinje-Zellen sind dagegen durch eine deutlich schwächere Färbung charakterisiert, die jedoch auch im Zytoplasma nachzuweisen ist (rote Pfeile). Oligodendrozyten, die sich durch kompakte, kleine Kerne mit perinukleärem Halo auszeichnen, bleiben ungefärbt (grüne Pfeile).

Die Zellen der Körnerzellschicht weisen schließlich eine ausgeprägte Kernfärbung auf (s. Abb. 46B1).

Im Großhirn (s. Abb. 47B) zeigen sowohl Neuronen als auch Astrozyten eine deutliche Färbung von Kern und Zytoplasma (rote und blaue Pfeile). Oligodendrozyten sind wie im Kleinhirn ungefärbt (grüne Pfeile). Endothelzellen weisen ebenfalls keine Färbung auf.

Tumorgewebe

Pilozytische Astrozytome sind durch ein biphasisches Wachstumsmuster charakterisiert. Faserreiche, kompakte Areale zeigen dabei eine schwächere Färbung als mikrozystische Anteile, die durch zahlreiche, kräftig nukleär gefärbte Tumorzellen auffallen (s. Abb. 46C und Abb. 48).

Glioblastome weisen dagegen nur noch einige wenige Tumorzellen mit nukleärer Färbung auf (s. Abb. 47C). Tumoren mit Riesenzellen fallen durch einen höheren Anteil positiver Zellen auf, die eine überwiegend im Zytoplasma lokalisierte Färbung zeigen (s. Abb. 52C).

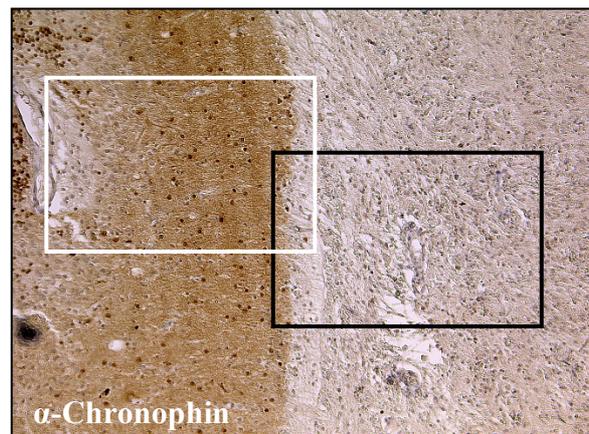
Abbildung 46: Expression von Chronophin in Kleinhirn und pilozytischem Astrozytom (Grad I).

(A) Übersicht der Grenzregion zwischen Kleinhirn und pilozytischem Astrozytom (Grad I) korrespondierend zu Abb. 44A2, 10× Objektiv.

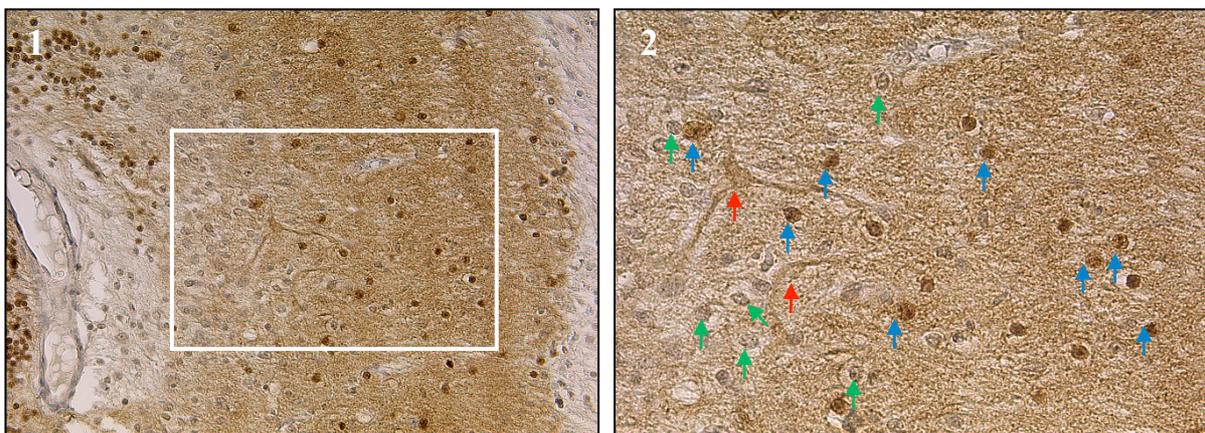
(B) Chronophin-Expression im Kleinhirn. Die Pfeile markieren die verschiedenen Zelltypen: Astrozyten (blau), Purkinje-Zellen (rot), Oligodendrozyten (grün). (1) Vergrößerung der weiß markierten Region aus (A), 20× Objektiv. (2) Vergrößerung der markierten Region aus (1), 40× Objektiv.

(C) Chronophin-Expression im pilozytischen Astrozytom (Grad I). Die blauen Pfeile markieren positive Tumorzellen. (1) Vergrößerung der schwarz markierten Region aus (A), 20× Objektiv. (2) Vergrößerung der markierten Region aus (1), 40× Objektiv.

A



B



C

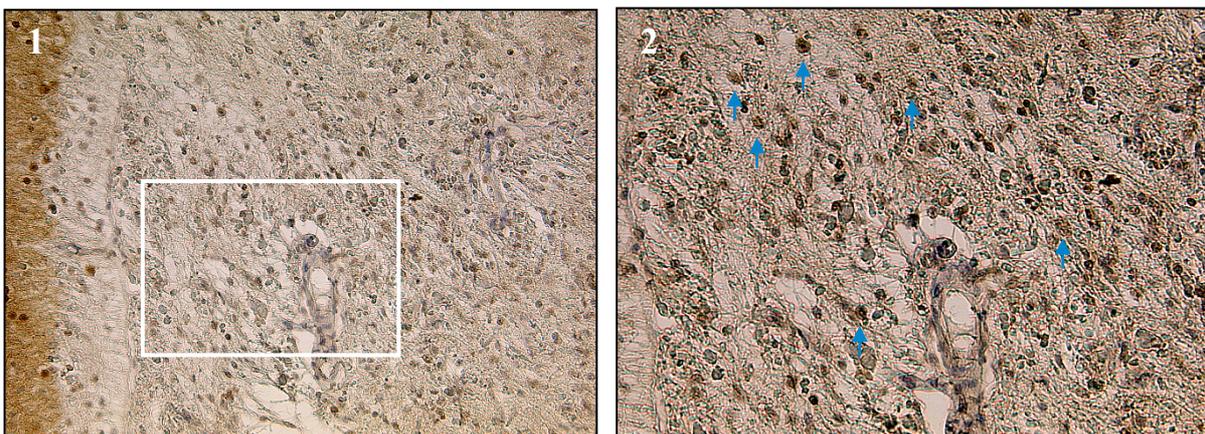


Abbildung 47: Expression von Chronophin in Großhirn und Glioblastoma multiforme (Grad IV).

(A) Übersicht Großhirn und Glioblastoma multiforme (Grad IV) korrespondierend zu Abb. 45A2, 10× Objektiv.

(B) Chronophin-Expression im Großhirn. Die Pfeile markieren die verschiedenen Zelltypen: Astrozyten (blau), Purkinje-Zellen (rot), Oligodendrozyten (grün). Vergrößerung der weiß markierten Region aus (A), 20× Objektiv.

(C) Chronophin-Expression im Glioblastoma multiforme (Grad IV). Die blauen Pfeile markieren positive Tumorzellen. **(1)** Vergrößerung der schwarz markierten Region aus (A), 20× Objektiv. **(2)** Vergrößerung der markierten Region aus (1), 40× Objektiv.

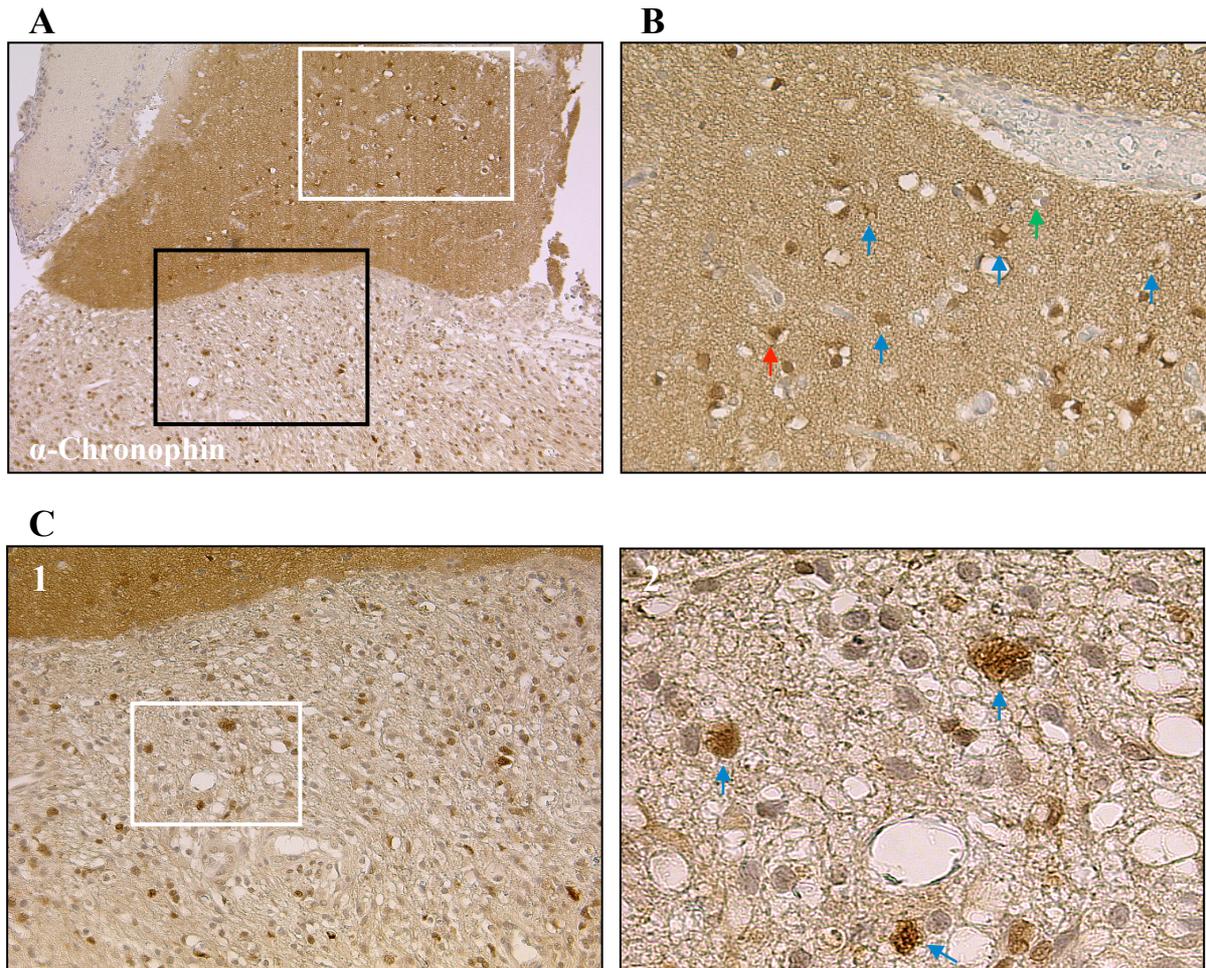
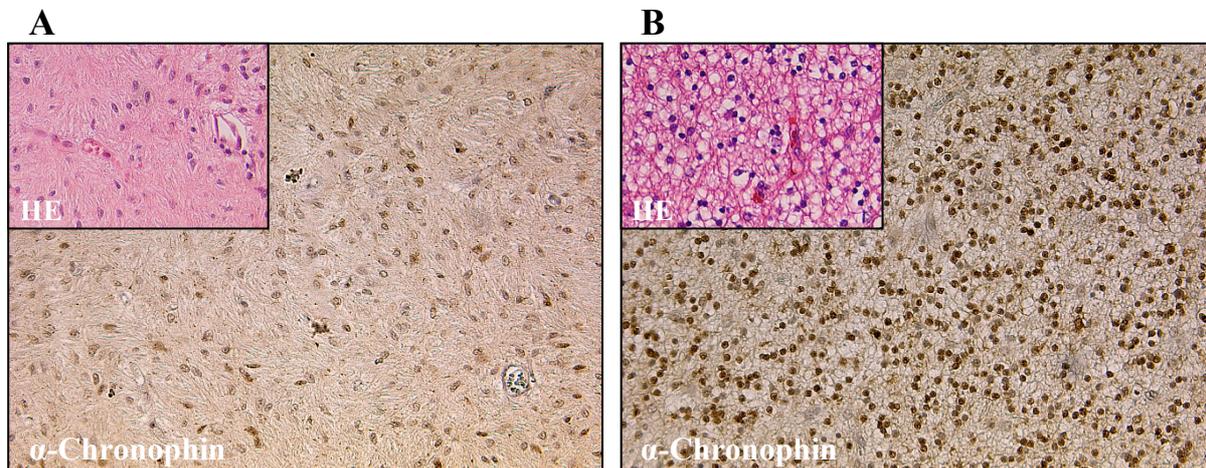


Abbildung 48: Expression von Chronophin in den unterschiedlichen Regionen pilozytischer Astrozytome (Grad I).

(A) Faserreiche, kompakte Areale eines pilozytischen Astrozytoms (Grad I) mit einigen positiven Tumorzellen. Das Inset zeigt einen Ausschnitt der korrespondierenden HE-Färbung. 20× Objektiv.
 (B) Mikrozystische Areale eines pilozytischen Astrozytoms (Grad I) mit zahlreichen positiven Tumorzellen. Das Inset zeigt einen Ausschnitt der korrespondierenden HE-Färbung. 20× Objektiv.



5.2.1.2 Cofilin-1

Die Familie der humanen Cofilin-Proteine untergliedert sich in drei Isoformen, Cofilin-1, Cofilin-2 und ADF, die als Schlüsselenzyme der dynamischen Umstrukturierung von Aktinfilamenten in zahlreichen Geweben exprimiert werden (Vartiainen et al. 2002) (s. 1.1.4). Im zentralen Nervensystem sind v.a. Cofilin-1 und ADF von entscheidender Bedeutung, wobei in einigen Studien Cofilin-1 (Minamide et al. 2000; Bellenchi et al. 2007), in anderen dagegen ADF (Bamburg 1999; Devineni et al. 1999) eine stärkere Expression zugeordnet wird. Beide werden verstärkt in Großhirn und Hippocampus, weniger stark in Zerebellum und Striatum exprimiert (Bellenchi et al. 2007). Auf zellulärer Ebene konnten Färbungen in Neuronen (Meberg 2000) und Astrozyten (Kim et al. 2010) nachgewiesen werden. Untersuchungen humaner Glioblastom-Zelllinien zeigten vor allem eine starke Expression von Cofilin-1 auf (Schulze 2015), das daher im Folgenden näher untersucht wird.

Normalgewebe

Im Kleinhirn (s. Abb. 49A) fallen Purkinje-Zellen auf, die durch eine intensive Färbung von Kern und Zytoplasma charakterisiert sind. Die übrigen Zellen von Körnerzell- und Molekularschicht sind dagegen nicht oder nur schwach gefärbt.

Neuronen und Astrozyten des Großhirns (s. Abb. 49D) weisen eine deutliche nukleäre Färbung auf, während die Kerne der Oligodendrozyten ungefärbt bleiben. Endothelzellen färben sich an.

Während Cofilin im Zytoplasma zahlreiche Funktionen zugeordnet werden, ist die Bedeutung von Cofilin innerhalb des Zellkerns noch weitgehend ungeklärt. Möglicherweise ist Cofilin für den nukleären Transport von G-Aktin verantwortlich, das dort an zahlreichen Prozessen wie Chromatin-Remodeling, DNA-Replikation und Transkription beteiligt ist (Rando et al. 2000; Castano et al. 2010).

Tumorgewebe

Auffallend ist eine deutliche Zunahme von Färbeintensität und Anzahl gefärbter Tumorzellen in höhergradigen Gliomen. Während sich im pilozytischen Astrozytom nur wenige Zellen mit einer schwachen Färbung von Kern und Zytoplasma finden (s. Abb. 49B), weist das Glioblastom nahezu ausschließlich intensiv gefärbte Tumorzellen auf (s. Abb. 49E). Die Riesenzellareale zeigen ein inhomogenes Muster (s. Abb. 52E).

Abbildung 49: Expression von Cofilin-1 in Tumor- und Normalgewebe.

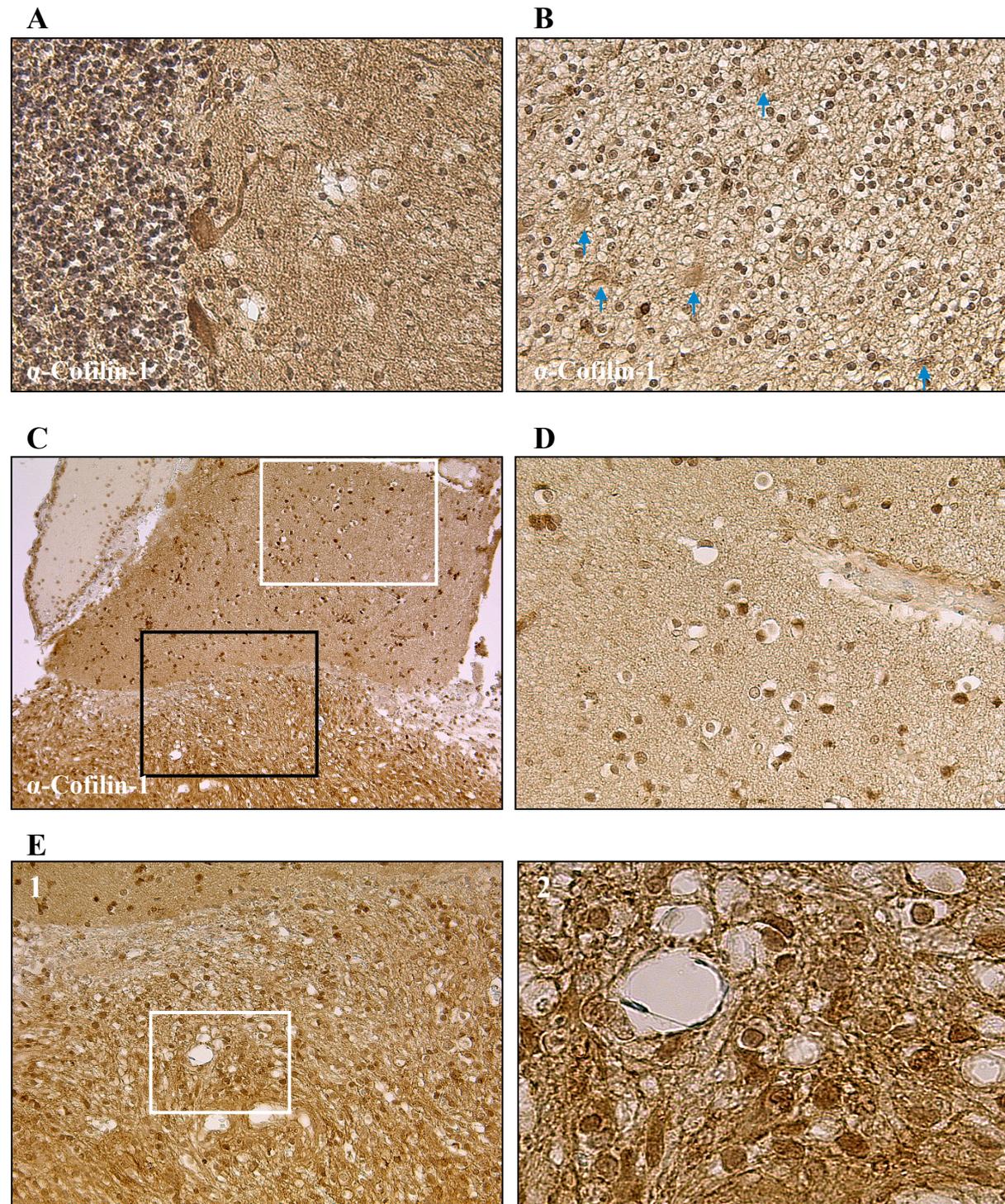
(A) Cofilin-Expression im Kleinhirn korrespondierend zu Abb. 44A3, 20× Objektiv.

(B) Cofilin-Expression im pilozytischen Astrozytom (Grad I). Die blauen Pfeile markieren positive Tumorzellen. 20× Objektiv.

(C) Übersicht Großhirn und Glioblastoma multiforme (Grad IV) korrespondierend zu Abb. 45A2, 10× Objektiv.

(D) Cofilin-Expression im Großhirn. Vergrößerung der weiß markierten Region aus (C), 20× Objektiv.

(E) Cofilin-Expression im Glioblastoma multiforme (Grad IV). (1) Vergrößerung der schwarz markierten Region aus (C), 20× Objektiv. (2) Vergrößerung der markierten Region aus (1), 40× Objektiv.



5.2.1.3 Phospho-Cofilin

Normalgewebe

Purkinje-Zellen zeigen eine schwache, v.a. zytoplasmatische Färbung, während die übrigen zerebellären Zellen keine Färbung aufweisen (s. Abb. 50A).

Die Zellen des Großhirns bleiben vollkommen ungefärbt (s. Abb. 50D).

Tumorgewebe

Bemerkenswert sind die vollständig ungefärbten Tumorzellen des pilozytischen Astrozytoms (s. Abb. 50B), die einer bedeutsamen Anzahl intensiv nukleär gefärbter Zellen des Glioblastoms gegenüberstehen (s. Abb. 50E). Riesenzellareale sind durch zahlreiche positive Zellen mit teils schwächerer, teils stärkerer Färbung von Kern und Zytoplasma gekennzeichnet (s. Abb. 52F).

Über den Einfluss des Phosphorylierungsstatus auf die zelluläre Lokalisation von Cofilin existieren widersprüchliche Daten. Einerseits wird die Dephosphorylierung von Cofilin mit der nukleären Akkumulation des unphosphorylierten Proteins assoziiert (Nebl et al. 1996). Andererseits wird ein vom Phosphorylierungsstatus unabhängiger, nukleärer Transport von Cofilin postuliert (Abe et al. 1993; Saito et al. 1994).

In den immunhistochemischen Untersuchungen konnte Phospho-Cofilin sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch detektiert werden, sodass die Ergebnisse eher mit letzterer These korrelieren.

Abbildung 50: Expression von Phospho-Cofilin in Tumor- und Normalgewebe.

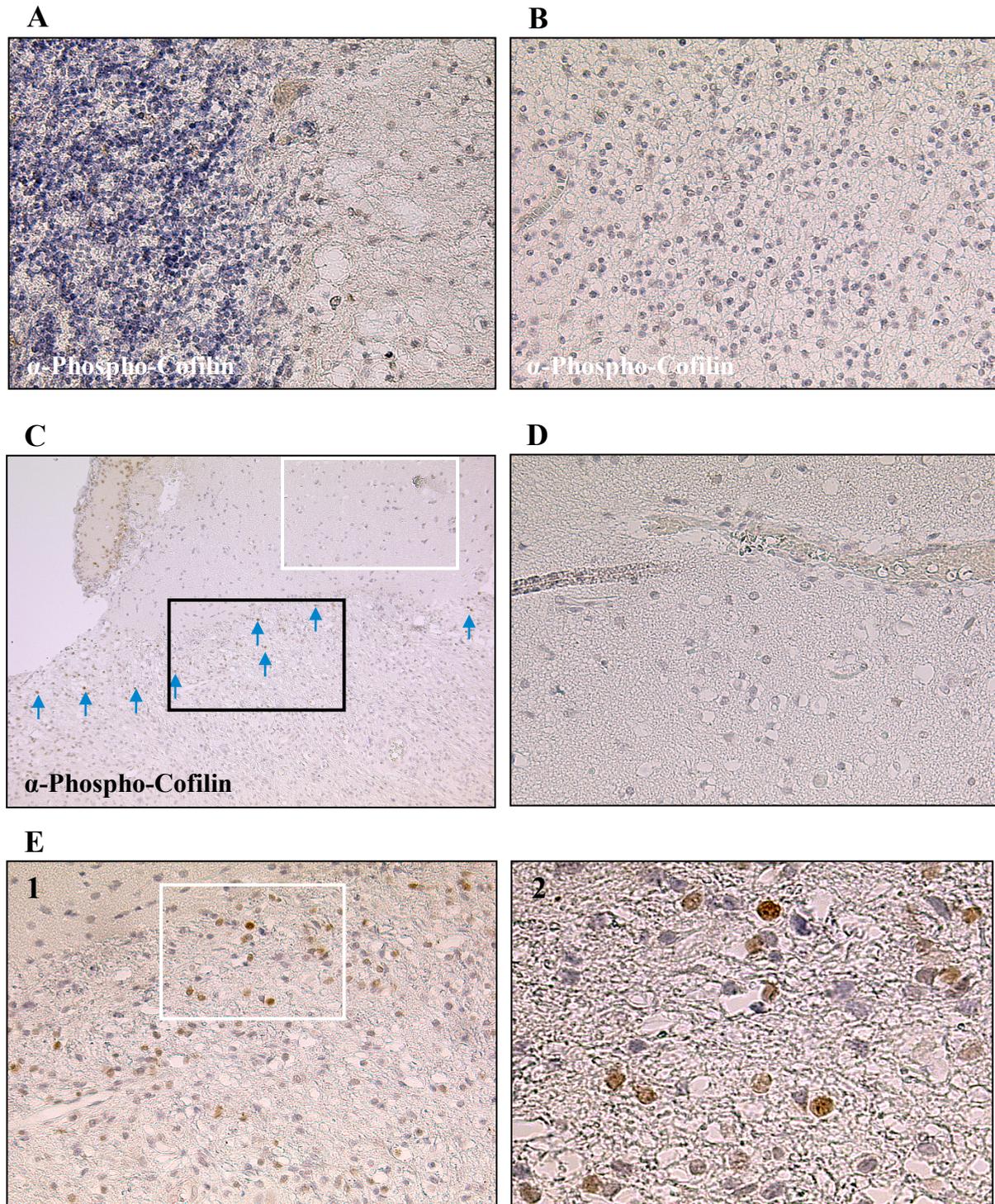
(A) Phospho-Cofilin-Expression im Kleinhirn korrespondierend zu Abb. 44A3, 20× Objektiv.

(B) Phospho-Cofilin-Expression im pilozytischen Astrozytom (Grad I), 20× Objektiv.

(C) Übersicht Großhirn und Glioblastoma multiforme (Grad IV) korrespondierend zu Abb. 45A2. Die blauen Pfeile markieren positive Tumorzellen. 10× Objektiv.

(D) Phospho-Cofilin-Expression im Großhirn. Vergrößerung der weiß markierten Region aus (C), 20× Objektiv.

(E) Phospho-Cofilin-Expression im Glioblastoma multiforme (Grad IV). (1) Vergrößerung der schwarz markierten Region aus (C), 20× Objektiv. (2) Vergrößerung der markierten Region aus (1), 40× Objektiv.



5.2.1.4 LIM-Kinase-2

Die Familie der LIM-Kinasen umfasst zwei Enzyme, LIMK-1 und LIMK-2 (Bernard 2007). Beide phosphorylieren und inaktivieren Cofilin und werden als wichtige Regulatoren des Aktinzytoskeletts in nahezu allen Geweben gebildet (Foletta et al. 2004; Acevedo et al. 2006). Im ZNS findet sich die höchste Expression in den Pyramidenzellen des Hippocampus und des Isokortex sowie in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns. In Gliazellen konnte die Expression von LIMK-1, nicht aber von LIMK-2 nachgewiesen werden. Beide Enzyme sind sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert, wobei eine Assoziation mit perinukleären Vesikeln des Golgi-Apparats beschrieben wurde. Für LIMK-1 wurde zusätzlich eine Kolokalisation mit Fokalkontakten und F-Aktin gezeigt. Expressionsanalysen astrozytärer Gliome konnten insbesondere eine gesteigerte Expression von LIMK-2 feststellen (Fedorchenko 2009; Schulze 2015; Schulze et al. 2015), das daher im Folgenden näher untersucht wird.

Normalgewebe

Im Kleinhirn (s. Abb. 51A) weisen v.a. die Purkinje-Zellen eine deutliche Färbung von Kern und Zytoplasma auf. In der Körnerzellschicht zeigen vereinzelte Zellen eine nukleäre Färbung.

Neuronen und Gliazellen des Großhirns bleiben ungefärbt (s. Abb. 51D). Auffallend sind braun-schwarze, paranukleäre Lipofuszingranula, Aggregate aus oxidierten, quervernetzten Protein- und Lipidbestandteilen.

Tumorgewebe

Auffallend ist eine gegenüber dem Normalgewebe deutliche Zunahme nukleär und zytoplasmatisch gefärbter Zellen, die bereits in pilozytischen Astrozytomen evident wird (s. Abb. 51B).

Glioblastome sind schließlich durch zahlreiche Zellen charakterisiert, die eine intensive Färbung von Kern und Zytoplasma aufweisen (s. Abb. 51E und Abb. 52D).

Abbildung 51: Expression von LIMK-2 in Tumor- und Normalgewebe.

(A) LIMK-2-Expression im Kleinhirn korrespondierend zu Abb. 44A3, 20× Objektiv.

(B) LIMK-2-Expression im pilozytischen Astrozytom (Grad I). Die blauen Pfeile markieren positive Tumorzellen. 20× Objektiv.

(C) Übersicht Großhirn und Glioblastoma multiforme (Grad IV) korrespondierend zu Abb. 45A2. 10× Objektiv.

(D) LIMK-2-Expression im Großhirn. Die schwarzen Pfeile markieren Lipofuszingranula. Vergrößerung der weiß markierten Region aus (C), 20× Objektiv.

(E) LIMK-2-Expression im Glioblastoma multiforme (Grad IV). (1) Vergrößerung der schwarz markierten Region aus (C), 20× Objektiv. (2) Vergrößerung der markierten Region aus (1), 40× Objektiv.

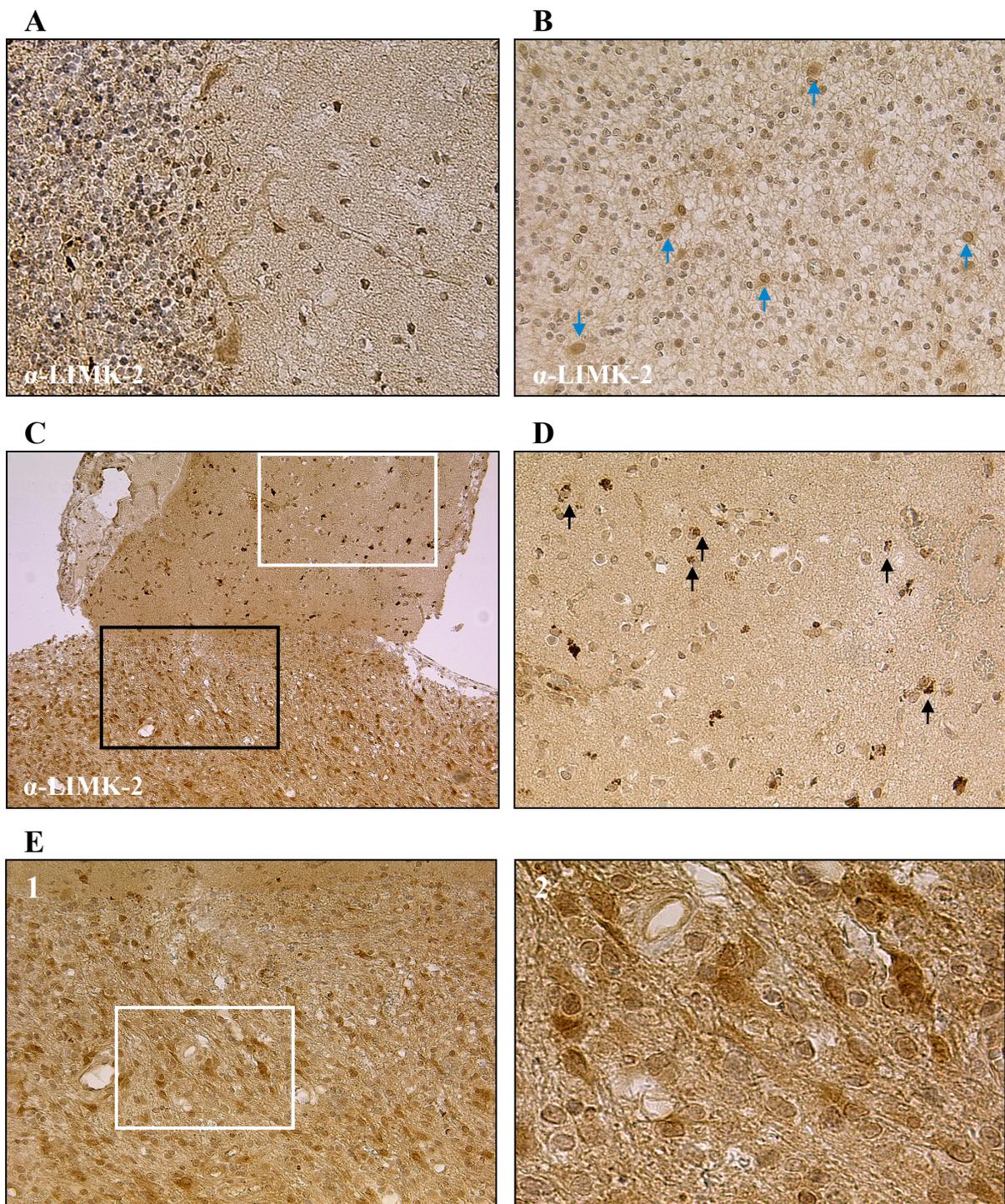


Abbildung 52: Analyse der Riesenzellanteile im Glioblastoma multiforme (Grad IV).

(A) Repräsentative HE-Färbung der Riesenzellkomponente im Glioblastoma multiforme (Grad IV) mit bizarren, mehrkernigen Tumorroiesenzellen. 20× Objektiv.

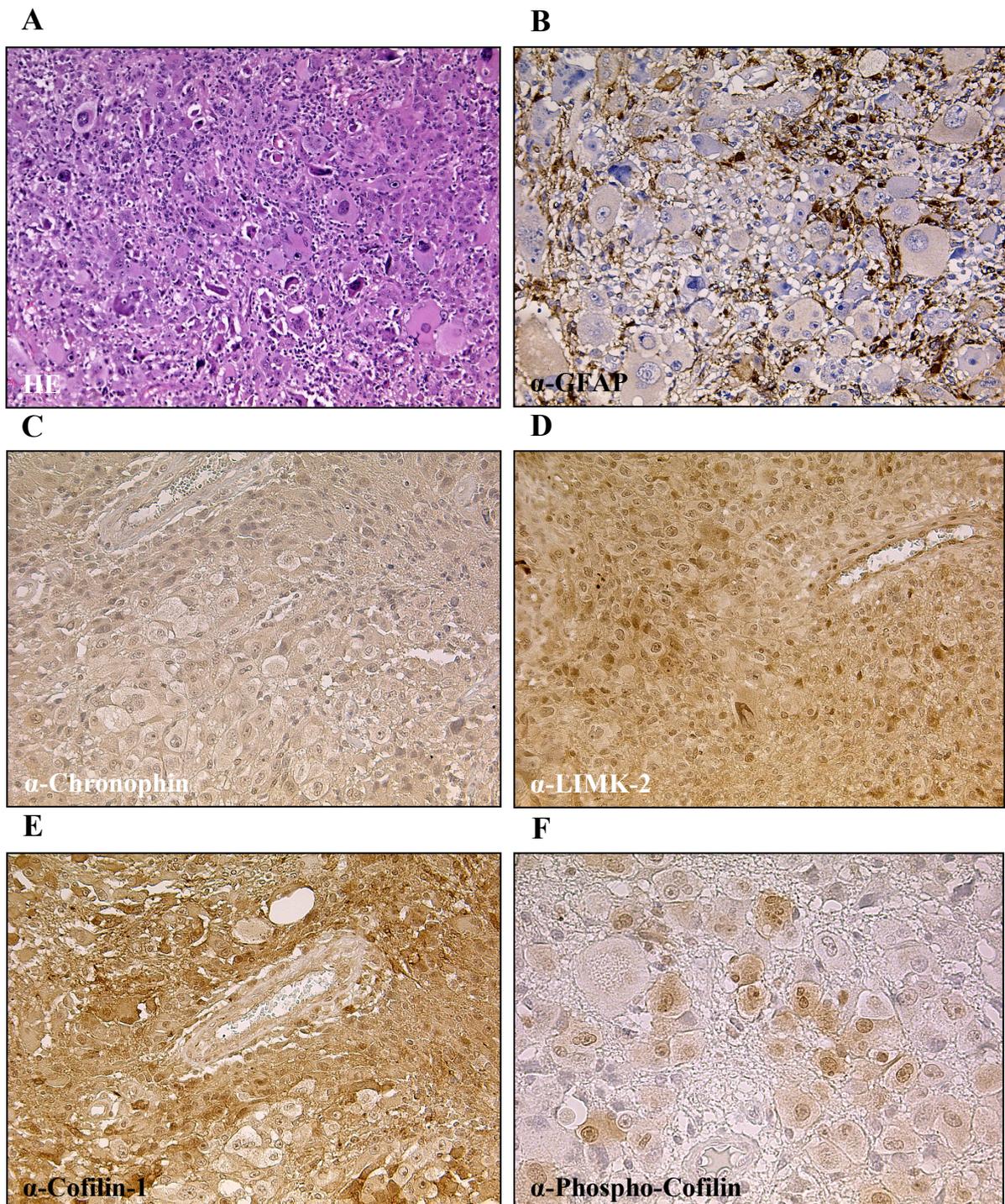
(B) GFAP-Färbung mit nur vereinzelt positiven Zellen. 20× Objektiv.

(C) Chronophin-Färbung. Die roten Pfeile markieren positive, zytoplasmatisch und nukleär gefärbte Zellen. 20× Objektiv.

(D) LIMK-2-Färbung. Zahlreiche intensiv nukleär und zytoplasmatisch gefärbte Zellen. 20× Objektiv.

(E) Cofilin-Färbung. Inhomogenes Muster von intensiv nukleär und zytoplasmatisch gefärbten Zellen neben völlig ungefärbten Zellen. 20× Objektiv.

(F) Phospho-Cofilin-Färbung. Zahlreiche positive Zellen mit teils schwächerer, teils stärkerer Färbung von Kern und Zytoplasma. 20× Objektiv.



5.2.2 Semi-quantitative Expressionsanalyse

Humane astrozytäre Gliome wurden im Rahmen einer semi-quantitativen Analyse auf die Expression von Chronophin, LIMK-2, Cofilin und Phospho-Cofilin untersucht. Dafür wurde das Antigenmuster 30 verschiedener Tumorproben unterschiedlichen Malignitätsgrades (jeweils sieben Astrozytome Grad I-III sowie neun Glioblastome Grad IV) immunhistochemisch detektiert (s. Tab. 4). Die Immunfärbungen wurden anhand entsprechender Kontrollfärbungen validiert. Die Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Neuropathologie des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg.

Analysen der Chronophin-Expression zeigen einen progressiven Expressionsabfall mit zunehmendem Malignitätsgrad der Gliome auf. Dabei lässt sich zwischen pilozytischen Astrozytomen (Grad I) und Glioblastomen (Grad IV) ein Abfall von $75,9 \pm 4,5 \%$ auf $5,2 \pm 0,9 \%$ verzeichnen (s. Abb. 53). Die Ergebnisse sind konsistent mit den Erkenntnissen früherer Studien, die einerseits einen Verlust von Chronophin in höhergradigen Tumoren dokumentieren (Fedorchenko 2009; Schulze 2015), sowie andererseits eine Assoziation zwischen dem ansteigenden Malignitätsgrad von Gliomen und dem zunehmenden Verlust von Chromosom 22q, dem Chronophin-Locus, belegen (Laigle-Donadey et al. 2006).

Die Expression von Cofilin und Phospho-Cofilin nimmt dagegen mit steigendem Tumorgrad zu (s. Abb. 54 und Abb. 55). Zwischen Grad I- und Grad IV-Tumoren zeigt sich dabei ein Expressionsanstieg von $33,4 \pm 5,5 \%$ auf $72,0 \pm 7,1 \%$ bzw. von $1,1 \pm 0,4 \%$ auf $47,2 \pm 7,4 \%$. Die Ergebnisse werden durch frühere Studien untermauert, die bereits für verschiedene Tumorzellen eine Cofilin-Überexpression auf Transkriptions- (Gunnarsen et al. 2000; Martoglio et al. 2000; Wang et al. 2004) bzw. Protein-Ebene (Sinha et al. 1999; Unwin et al. 2003; Keshamouni et al. 2006; Turhani et al. 2006; Nagai et al. 2011) nachweisen konnten.

Wichtige Erkenntnisse liefert die Analyse des Phospho-Cofilin / Gesamt-Cofilin Quotienten, die eine Aussage über den Aktivitätsstatus von Cofilin zulässt. Die Cofilin-Phosphorylierung verändert sich dabei signifikant zwischen Grad I und Grad II-Gliomen (Anstieg von $4,9 \pm 2,1 \%$ auf $83,9 \pm 27,4 \%$) (s. Abb. 57). Interessanterweise lässt sich zwischen diesen Tumorgraden der größte absolute Abfall der Chronophin-Expression nachweisen (Mittelwert-Differenz $38,7 \pm 9,4 \%$) (s. Abb. 53). Eine weitere Verminderung der Chronophin-Expression

in höhergradigen Gliomen beeinflusst die Cofilin-Phosphorylierung hingegen nicht weiter (Grad III $84,7 \pm 28,0$ %; Grad IV $78,8 \pm 26,0$ %) (s. Abb. 57).

Die primäre Auswertung der LIMK-2-Expression zeigte eine deutliche Expressionszunahme in Tumorzellen gegenüber dem Normalgewebe (s. 5.2.1.4). Vergleiche von Tumoren verschiedenen Malignitätsgrades zeigten dagegen ein weitgehend einheitliches Expressionsmuster (s. Abb. 56). Auf eine semiquantitative Analyse wurde daher verzichtet.

Abbildung 53: Expression von Chronophin in humanen astrozytären Gliomen.

Der Expressionsabfall von Chronophin korreliert mit dem ansteigenden Malignitätsgrad der Gliome.

(A) Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der Chronophin-Expression von 30 verschiedenen Tumorproben (7 AZ I, 7 AZ II, 7 AZ III, 9 GBM).

(B) Repräsentative Negativfärbung eines pilozytischen Astrozytoms korrespondierend zu (C1). Anstelle des Primärantikörpers wurden Kaninchen-Immunglobuline verwendet. 20× Objektiv.

(C) Repräsentative Immunfärbungen für Chronophin in Gliomen verschiedenen Malignitätsgrades: (1) AZ I, (2) AZ II, (3) AZ III und (4) GBM. 20× Objektiv.

AZ I, AZ II, AZ III: Astrozytom Grad I-III; GBM: Glioblastoma multiforme Grad IV.

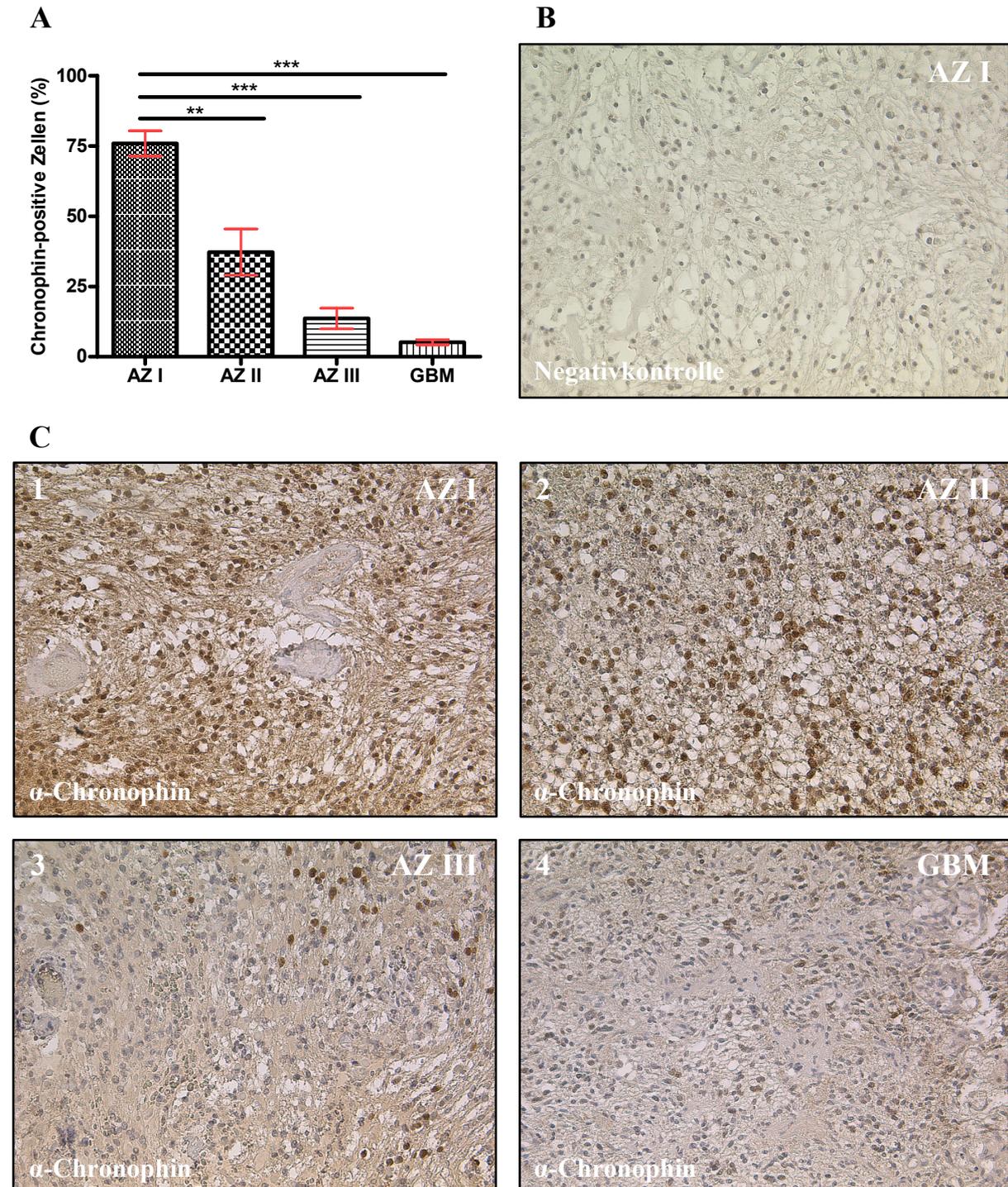


Abbildung 54: Expression von Cofilin-1 in humanen astrozytären Gliomen.

Auffällig ist eine deutliche Zunahme der Cofilin-Expression mit ansteigendem Tumorgrad.

(A) Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der Cofilin-Expression von 30 verschiedenen Tumorproben (7 AZ I, 7 AZ II, 7 AZ III, 9 GBM).

(B) Repräsentative Negativfärbung eines Glioblastoms korrespondierend zu (C4). Anstelle des Primärantikörpers wurden Kaninchen-Immunglobuline verwendet. 20× Objektiv.

(C) Repräsentative Immunfärbungen für Cofilin in Gliomen verschiedenen Malignitätsgrades: (1) AZ I, (2) AZ II, (3) AZ III und (4) GBM. 20× Objektiv.

AZ I, AZ II, AZ III: Astrozytom Grad I-III; GBM: Glioblastoma multiforme Grad IV.

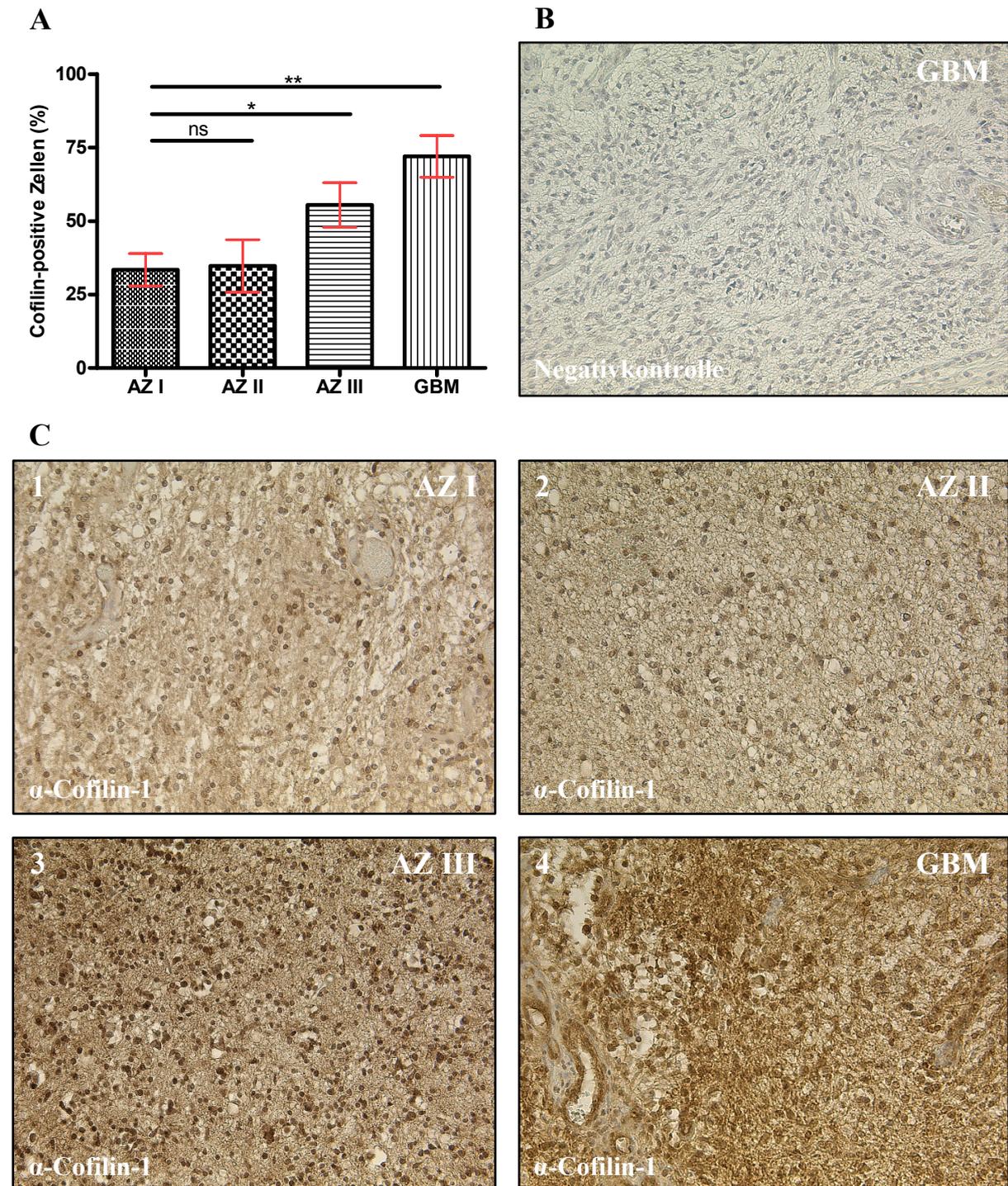


Abbildung 55: Expression von Phospho-Cofilin in humanen astrozytären Gliomen.

Höhergradige Gliome weisen eine signifikant gesteigerte Expression von Phospho-Cofilin auf.

(A) Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der Phospho-Cofilin-Expression von 30 verschiedenen Tumorproben (7 AZ I, 7 AZ II, 7 AZ III, 9 GBM).

(B) Repräsentative Negativfärbung eines Glioblastoms korrespondierend zu (C4). Anstelle des Primärantikörpers wurden Kaninchen-Immunglobuline verwendet. 20× Objektiv.

(C) Repräsentative Immunfärbungen für Phospho-Cofilin in Gliomen verschiedenen Malignitätsgrades: (1) AZ I, (2) AZ II, (3) AZ III und (4) GBM. 20× Objektiv.

AZ I, AZ II, AZ III: Astrozytom Grad I-III; GBM: Glioblastoma multiforme Grad IV.

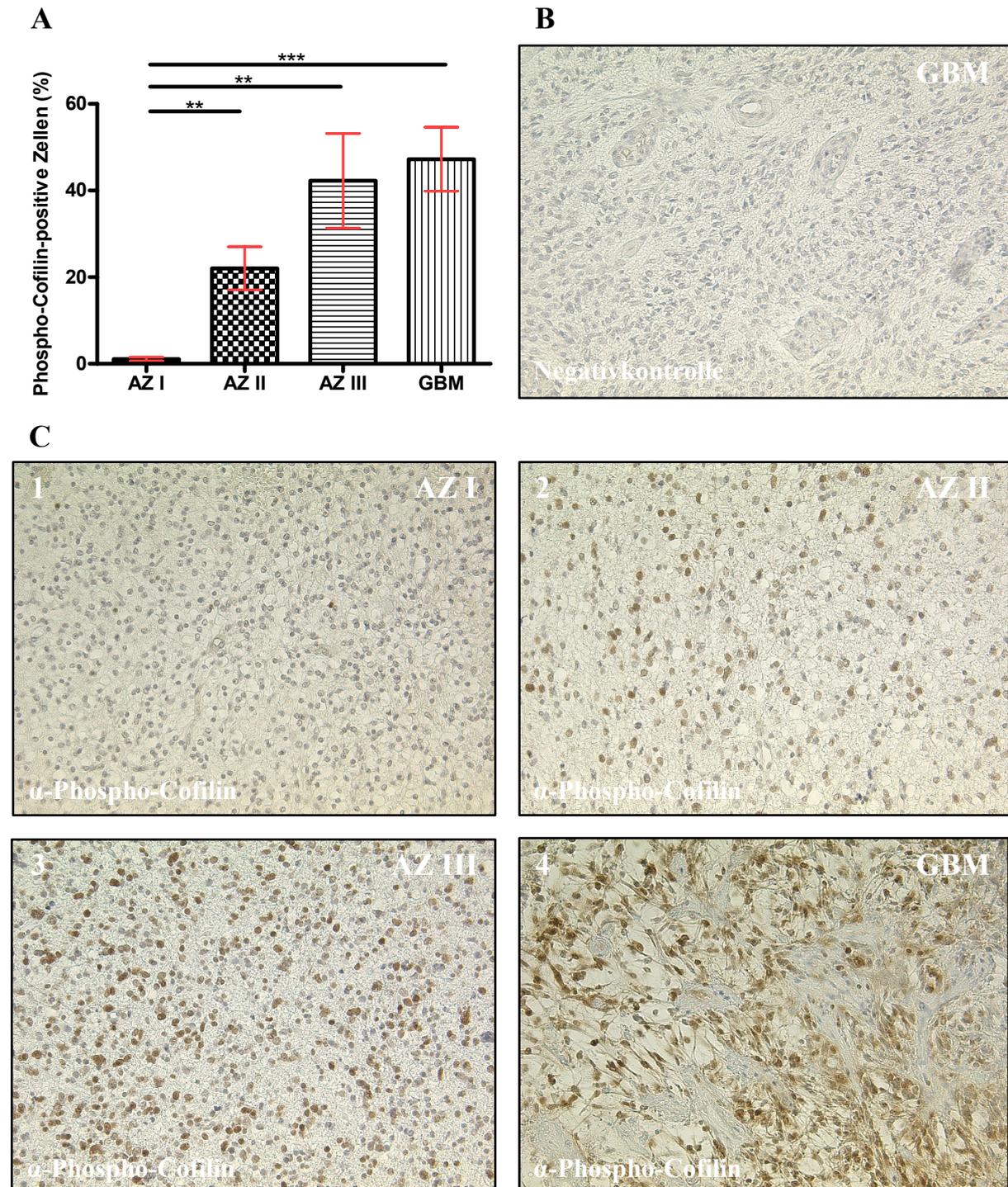


Abbildung 56: Expression von LIMK-2 in pilozytischen Astrozytomen (Grad I) und Glioblastomen (Grad IV).

Tumoren niedrigen und hohen Malignitätsgrades weisen ein relativ einheitliches LIMK-2-Expressionsmuster auf.

(A) Repräsentative LIMK-2-Färbung eines pilozytischen Astrozytoms (Grad I) mit zahlreichen positiven Tumorzellen. 20× Objektiv.

(B) Repräsentative LIMK-2-Färbung eines Glioblastoma multiforme (Grad IV) mit zahlreichen intensiv gefärbten Tumorzellen. 20× Objektiv.

AZ I: Astrozytom Grad I; GBM: Glioblastoma multiforme Grad IV.

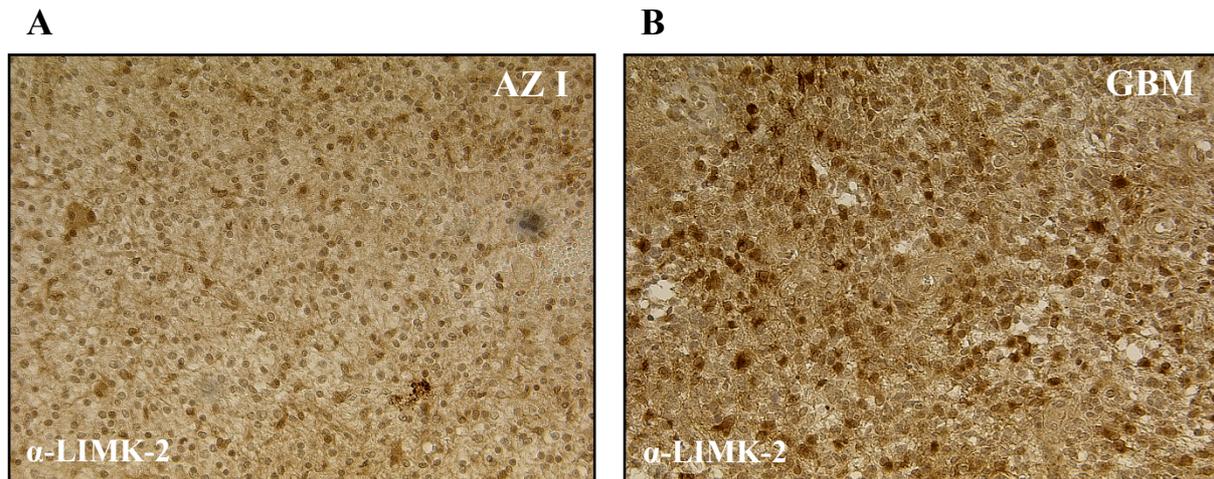
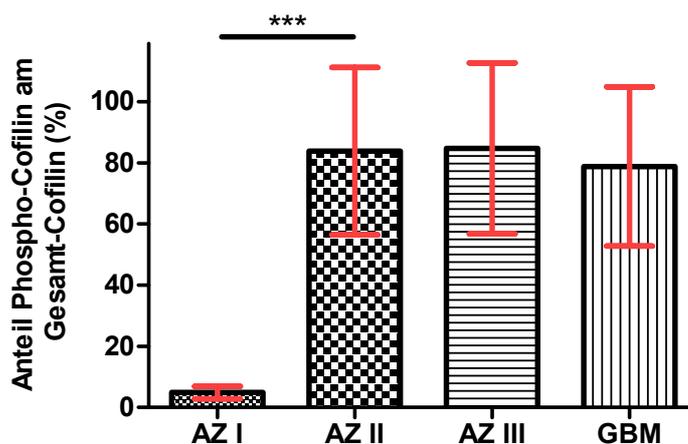


Abbildung 57: Analyse des Phospho-Cofilin/Gesamt-Cofilin Quotienten. Gezeigt wird der relative Anteil von Phospho-Cofilin am Gesamt-Cofilin (7 AZ I, 7 AZ II, 7 AZ III, 9 GBM). Der Phosphorylierungsstatus von Cofilin verändert sich vor allem zwischen Grad I- und Grad II-Gliomen.



Humane astrozytäre Gliome weisen ein verändertes Expressionsmuster der Proteine des Cofilin-Signalweges auf. Zusammenfassend lassen sich dabei folgende Erkenntnisse festhalten:

- Die Expression von Chronophin verhält sich invers zum Malignitätsgrad astrozytärer Gliome.
- Die Expression von LIMK-2 nimmt im Vergleich zum Normalgewebe stark zu, astrozytäre Gliome weisen jedoch ein relativ einheitliches Expressionsmuster auf.
- Die Expression von Phospho-Cofilin und Cofilin steigt zwischen niedrig- und hochmalignen Gliomen stark an.
- Die Phosphorylierung von Cofilin verändert sich am stärksten zwischen Grad I- und Grad II-Gliomen korrespondierend zum größten absoluten Abfall der Chronophin-Expression zwischen diesen Tumorgraden.
- Grad II- bis IV-Gliome weisen einen stabilen Phospho-Cofilin / Gesamt-Cofilin Quotienten von $\sim 0,6$ auf.

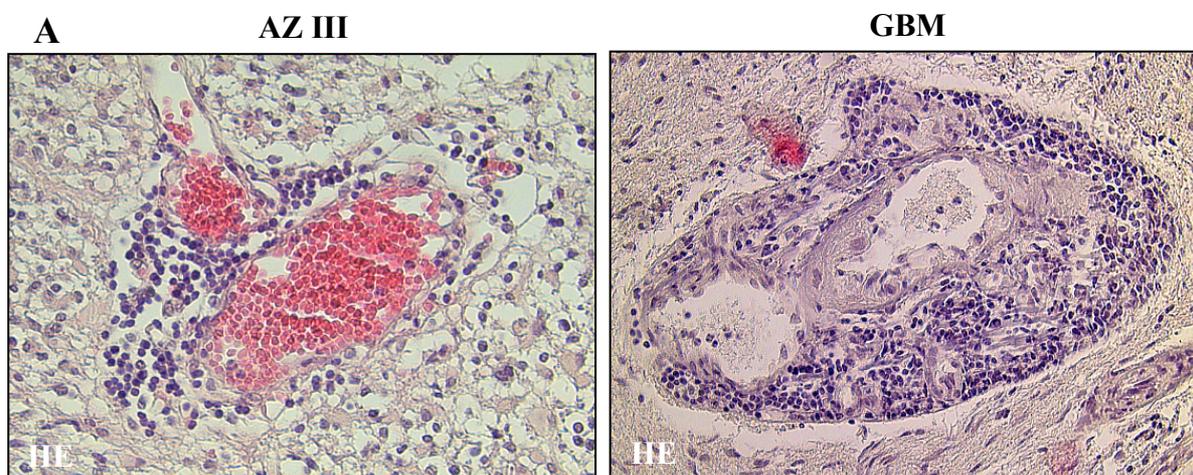
5.2.3 Cofilin, Chronophin und LIMK-2 in perivaskulären, Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten

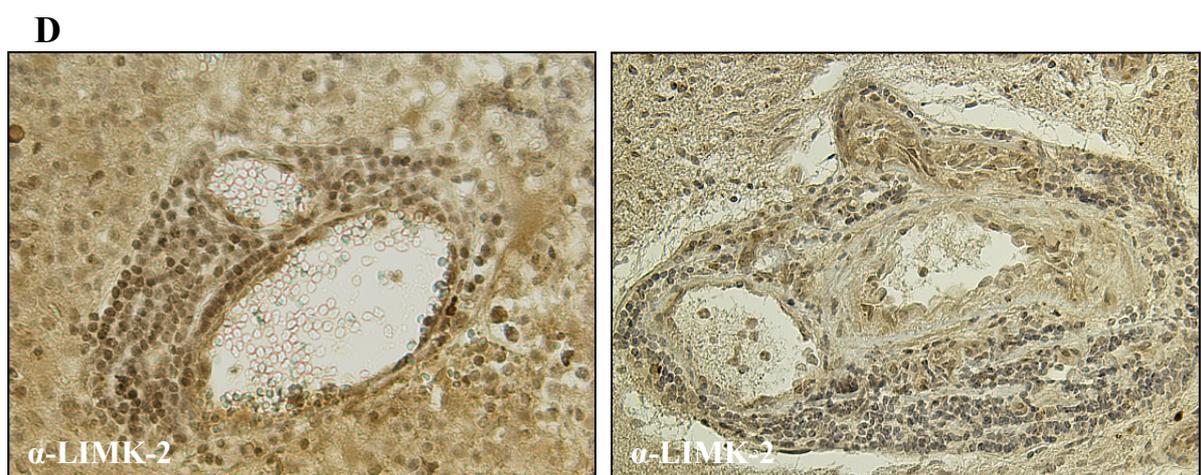
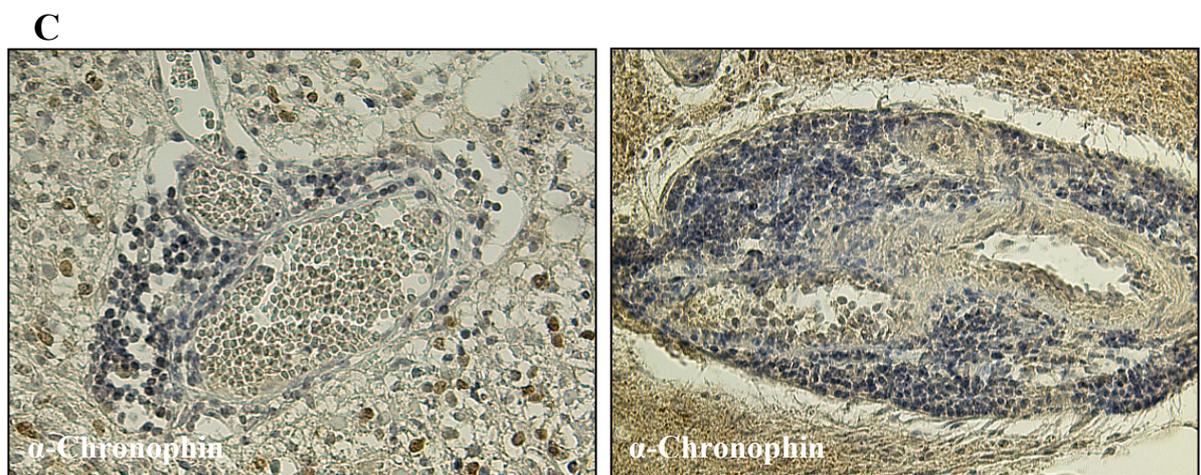
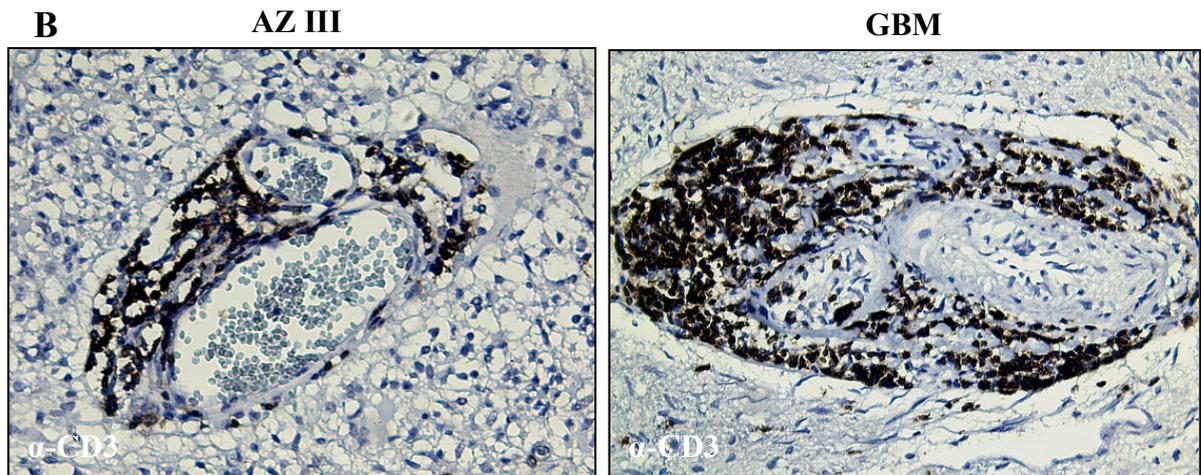
Entscheidende Schritte bei der Metastasierung maligner Tumoren sind die Passage der endothelialen Barriere bei der Intra- und Extravasation von Tumorzellen und die Invasion in umliegende Gewebe (van Zijl et al. 2011; Reymond et al. 2013). Im Rahmen der Immunantwort infiltrieren Lymphozyten entzündete oder tumoröse Gewebe und passieren dabei analog zu Tumorzellen das Endothel. Rho-GTPasen und ihre nachgeschalteten Effektormoleküle wie Cofilin sind an beiden Prozessen entscheidend beteiligt (Tybulewicz et al. 2009; Alon et al. 2011; Rougerie et al. 2012). Die Parallelen zwischen Tumorzell- und Leukozytenmigration legen ähnliche Aktivitätsmuster der beteiligten Signalkaskaden nahe (Strell et al. 2008). Erkenntnisse über Signalwege, die für die Extravasation und Infiltration von Leukozyten von Bedeutung sind, könnten einen Beitrag für das Verständnis von Tumorzellmetastasierung liefern und helfen, antimetastatische Therapien zu entwickeln.

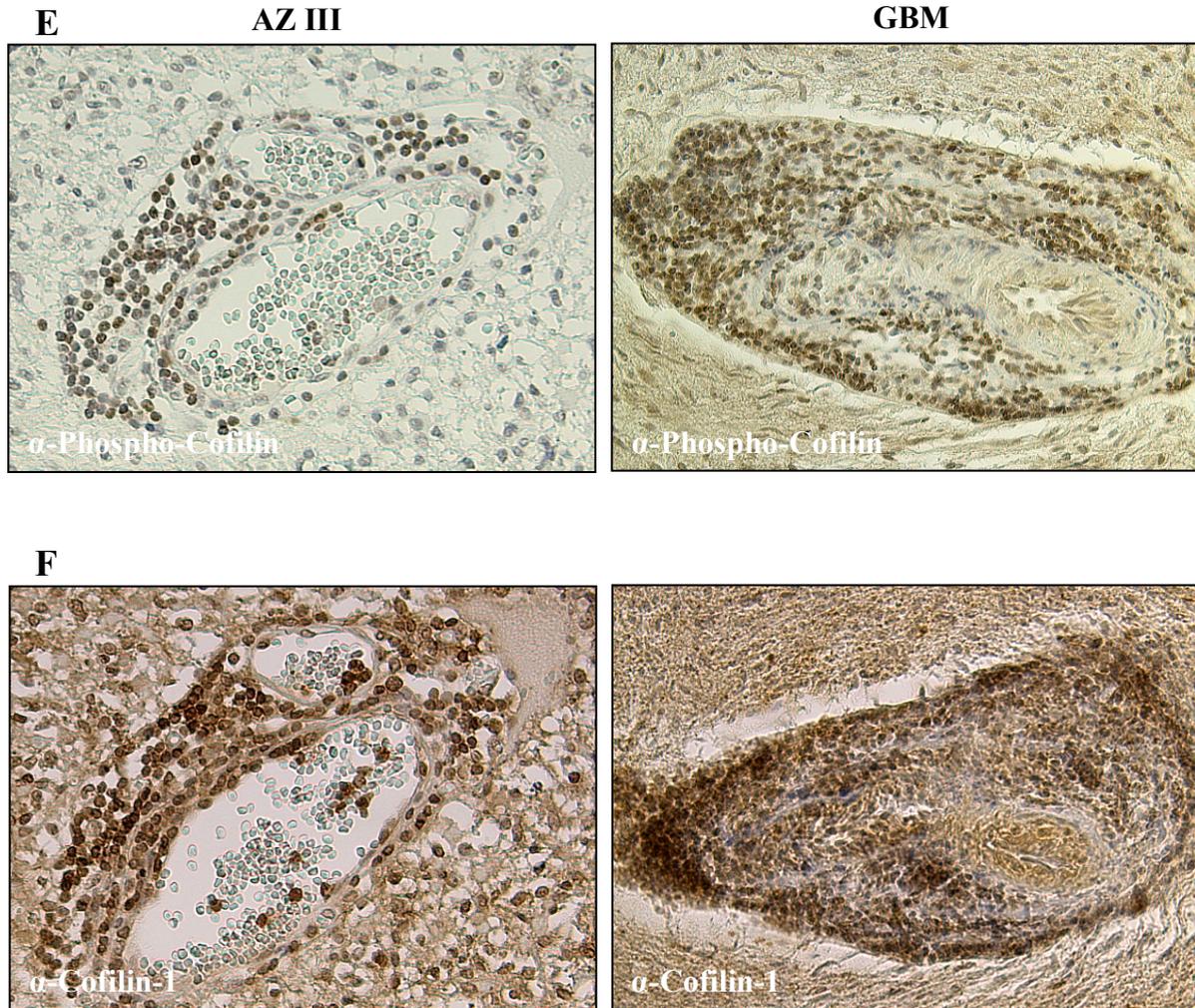
In anaplastischen Astrozytomen (Grad III) und Glioblastomen (Grad IV) wurden daher auch perivaskuläre, Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten (TIL) auf die Expression von Cofilin und seiner Regulatorproteine untersucht (s. Abb. 58). Die Identifikation von T-Lymphozyten erfolgte mittels CD3-Antikörper.

Abbildung 58: Analyse von Cofilin und seiner Regulatorproteine in perivaskulären, Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten.

Repräsentative Färbung perivaskulärer TIL in einem anaplastischen Astrozytom (Grad III) (**links**) und einem Glioblastom (Grad IV) (**rechts**). **(A)** HE-, **(B)** CD3-, **(C)** Chronophin-, **(D)** LIMK-2-, **(E)** Phospho-Cofilin-, **(F)** Cofilin-Färbung. 20× Objektiv.







Sowohl anaplastische Astrozytome als auch Glioblastome sind, konsistent mit den Erkenntnissen früherer Studien, durch zahlreiche perivaskuläre Akkumulate von T-Lymphozyten gekennzeichnet, ein Phänomen, das als *Cuffing* bezeichnet wird (Takeuchi et al. 1976; Rossi et al. 1989).

Interessanterweise weisen die hier untersuchten perivaskulären TIL ein homogenes, mit Glioblastomzellen vergleichbares Expressionsmuster mit hohem Anteil an Phospho-Cofilin bei gleichzeitig niedriger Chronophin- und hoher LIMK-2-Expression auf.

5.3 Ursachen für den Verlust von Chronophin in Glioblastomen

Genetische Veränderungen der Nukleotidsequenz in Form von numerischen oder strukturellen Chromosomenaberrationen sowie Mutationen einzelner Genabschnitte können ursächlich für das veränderte Expressionsmuster eines Proteins sein und nehmen somit eine Schlüsselfunktion für die Initiation und Progression von Tumoren ein (Hanahan et al. 2011). Darüber hinaus spielen epigenetische Ereignisse wie DNA-Methylierung, Histon-Modifikation und microRNA-Regulation eine entscheidende Rolle für die Expression tumorassoziierter Gene (Jenuwein et al. 2001; Jones et al. 2007; Berdasco et al. 2010). Neuere Studien postulieren in Übereinstimmung mit der *two-hit hypothesis* von Knudson, dass eine Kombination genetischer und epigenetischer Aberrationen für die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und damit für die Genese verschiedener Tumoren verantwortlich ist (Knudson 2001; Jones et al. 2002; Herman et al. 2003). Um mögliche Inaktivierungsursachen zu entschlüsseln, sollten daher genetische und epigenetische Analysemethoden kombiniert werden (Brena et al. 2007).

Immunohistochemische Untersuchungen humaner Glioblastom-Proben (s. 5.2) haben eine signifikante Verminderung der Chronophin-Expression in dieser Tumorentität gegenüber Normalgewebe aufgezeigt. Western Blot Analysen primärer Glioblastom-Zelllinien (s. 5.1) weisen im Vergleich zu sekundären bzw. pädiatrischen Glioblastom-Zelllinien ebenfalls eine verminderte Chronophin-Expression auf. Über die zugrundeliegenden Mechanismen des Expressionsverlustes ist jedoch bislang nur wenig bekannt.

Im Folgenden wurde der Chronophin-Locus mit Hilfe von Gensequenzierungs- und Methylierungsanalysen untersucht, um mögliche Ursachen für den Verlust von Chronophin in humanen Glioblastomen zu identifizieren. Zusätzlich erfolgte eine Vorstudie zur *Loss of heterozygosity*-Analyse des Chronophin-Locus, die neue Erkenntnisse zur Assoziation zwischen dem für Glioblastome typischen Verlust von Chromosom 22q und der verminderten Chronophin-Expression liefern könnte.

5.3.1 Sequenzierung des Chronophin-Locus in humanen Glioblastom-Zelllinien und -Gewebeproben

Die Akkumulation genetischer Alterationen spielt auch für die Genese und Progression humaner Gliome eine entscheidende Rolle. Die Identifikation von Mutationen im Bereich wichtiger Signalkaskaden wie im p53-, pRb1- und RTK/Ras/PI3K-Signalweg leistete einen entscheidenden Beitrag zur Charakterisierung dieser Tumorentität und lieferte neue pharmakologische Angriffspunkte (Riemenschneider et al. 2010; Bai et al. 2011).

Um zu untersuchen, ob Mutationen im Chronophin-Locus eine Ursache für den Expressionsverlust von Chronophin in Glioblastomen darstellen, wurde eine Sequenzierungsanalyse durchgeführt. Dafür erfolgte zunächst die Isolation genomischer DNA aus humanen Glioblastom-Zelllinien sowie aus kryokonservierten Glioblastom-Gewebeproben, gefolgt von Amplifikation mittels PCR, Integration in geeignete Vektoren und schließlich Transformation in kompetente Zellen. Im Anschluss wurden rekombinante Plasmide isoliert und zur Sequenzierung versandt (s. 4.4). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Nukleotid-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* verglichen und auf Mutationen analysiert.

Die nachstehenden Abbildungen geben einen Überblick über den Aufbau des Chronophin-Locus (s. Abb. 59) und die Ergebnisse der Sequenzierung (s. Abb. 60):

Abbildung 59: Aufbau des Chronophin-Locus. Erstellt anhand *Homo sapiens chromosome 22, GRCh38.p2 Primary Assembly NC_000022.11*. Der humane Chronophin-Locus ist auf Chromosom 22q12.3 lokalisiert, umfasst 8203 Basenpaare (bp) und besitzt zwei Exons (Exon1 Position 1-627, 627bp; Exon2 Position 6826-8203, 1378bp). Das Intron (Position 628-6825, 6198bp) wird durch die Dinukleotide GT und AG begrenzt und folgt damit der GT-AG Regel, die die Exon/Intron-Übergänge bzw. die Spleißstellen charakterisiert (Breathnach et al. 1981; Jang et al. 2003). Die kodierende DNA-Sequenz (CDS), die schließlich in die Aminosäure-Sequenz (296 Aminosäuren) translatiert wird, besitzt 891bp (Position 54-627 und 6826-7142). Der offene Leserahmen (ORF) wird von der 5' bzw. 3' *untranslated region* (UTR) umgeben und durch das Start-Codon ATG bzw. das Stopp-Codon TGA begrenzt. Außerdem wird die Lokalisation der CpG-Insel im Bereich der Promotorregion angegeben (Position -600-835, 1435bp). Die Positionsangaben beziehen sich auf den Transkriptionsstart.

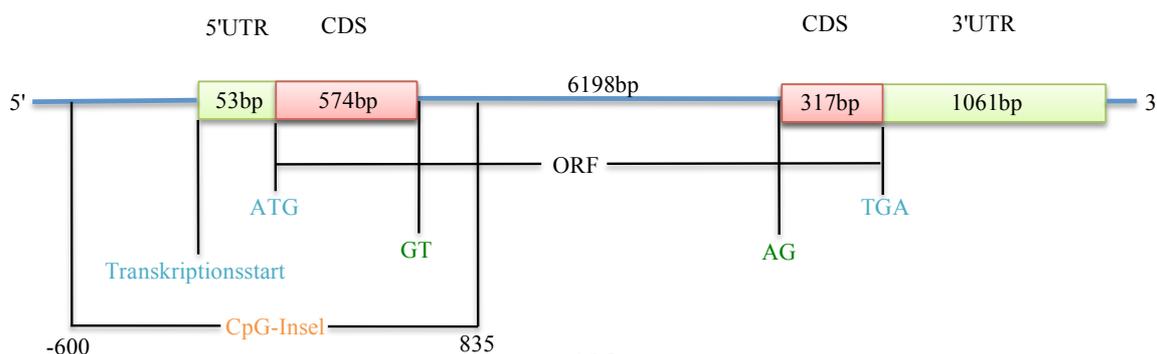
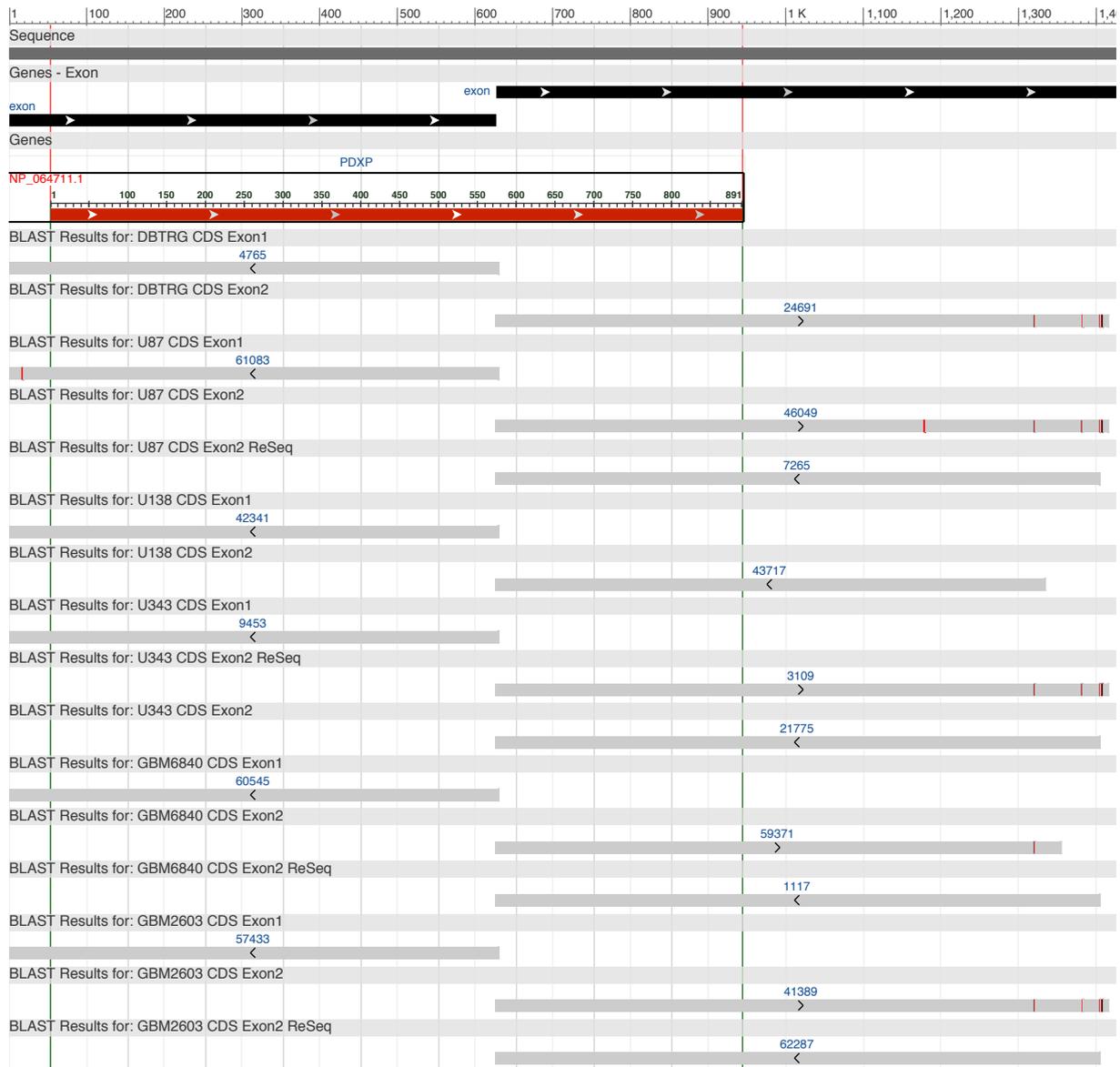


Abbildung 60: Vergleich der Sequenzierungs-Ergebnisse mit der NCBI-Nukleotid-Datenbank. (A) Sequenzen der Glioblastom-Zelllinien. (B) Sequenzen der Glioblastom-Gewebeproben. Chronophin-Locus nach *GRCh38.p2 Primary Assembly NC_000022.11*: Exon1 (Position 1-627) und Exon2 (Position 628-2005) schwarz, CDS (Position 54-944, 891bp) rot sowie rot/grün flankiert, Intron (6198bp) wird nicht dargestellt. Sequenzierungs-Ergebnisse dunkelgrau; Punktmutationen sind durch farbige Balken markiert: Deletion dunkelrot, Substitution hellrot, Insertion schwarz. Erstellt mit *NCBI Nucleotide Database*.

A



B

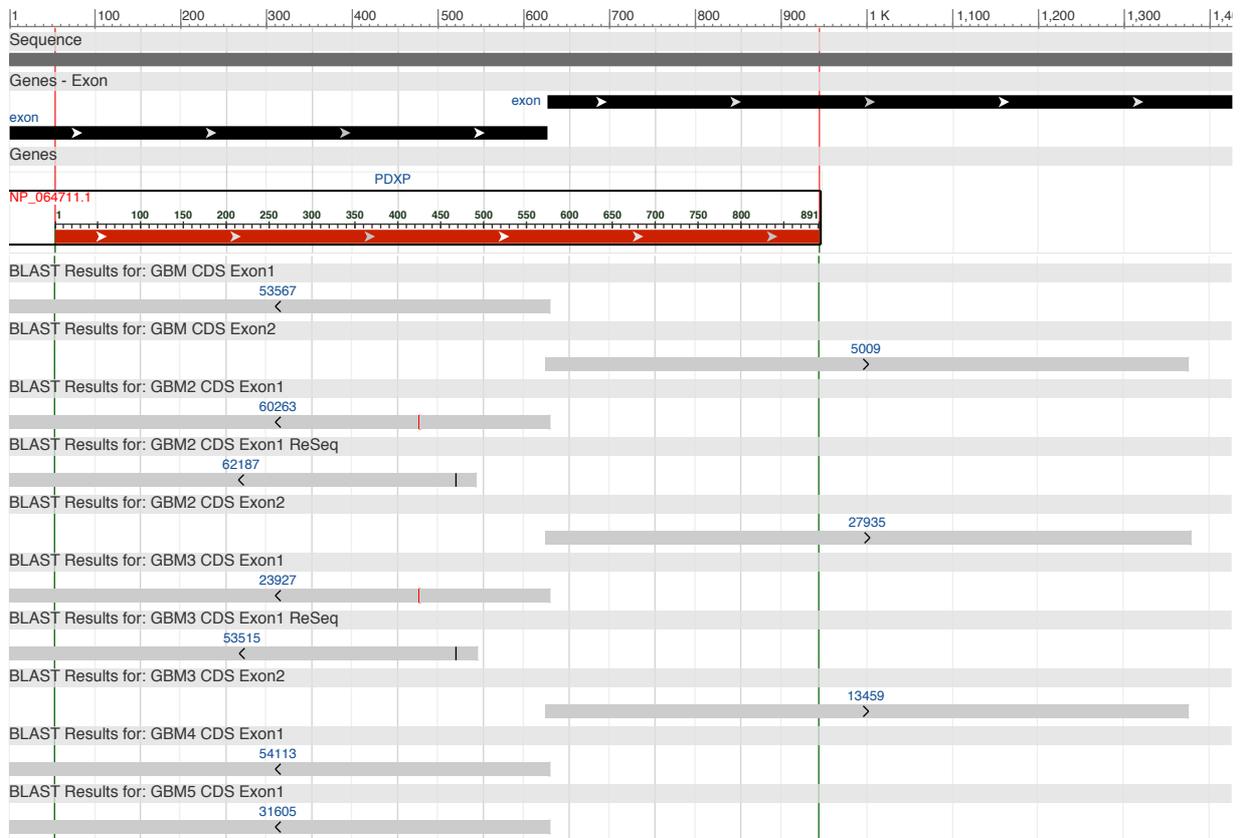


Abbildung 61: Reevaluation der Aberrationen im Bereich der kodierenden DNA-Sequenz. Verglichen werden die Ergebnisse der initialen und erneuten Sequenzierung der Glioblastom-Gewebeproben (GBM2 und GBM3).

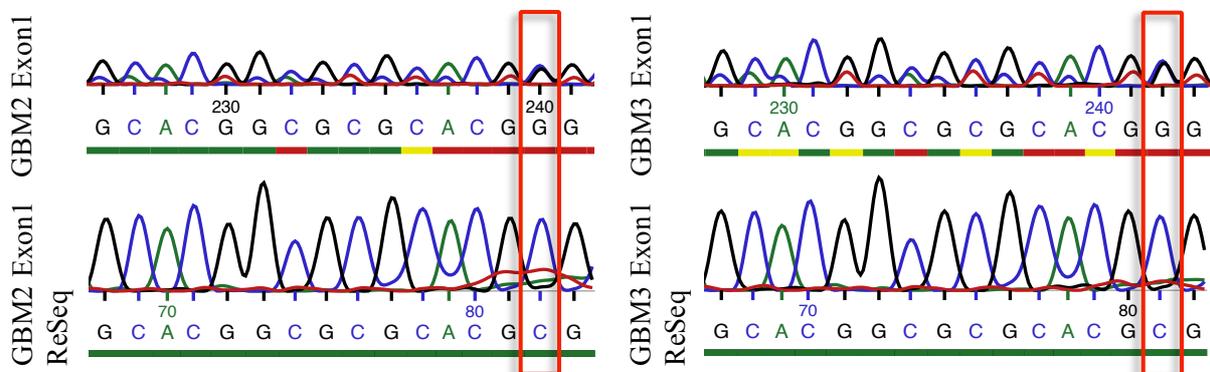


Tabelle 18: Zusammenstellung und Bewertung der detektierten Aberrationen im Chronophin-Locus.

Sequenz	Mutationsanalyse		
	Position im Chronophin-Locus	Aberration	Resequenzierung /Bestätigung
DBTRG CDS Exon2	3'UTR 7518	Deletion G	-/-
	3'UTR 7580	Substitution G→T	-/-
	3'UTR 7602	Substitution G→A	-/-
	3'UTR 7604	Substitution G→C	-/-
	3'UTR 7605/06	Insertion C	-/-
U87 CDS Exon1	5'UTR 18	Substitution G→T	-/-
U87 CDS Exon2	3'UTR 7376	Substitution C→G	+/-
	3'UTR 7518	Deletion G	+/-
	3'UTR 7579	Deletion G	+/-
	3'UTR 7602	Substitution G→A	+/-
	3'UTR 7604	Substitution G→C	+/-
	3'UTR 7605/6	Insertion C	+/-
U343 CDS Exon2	3'UTR 7518	Deletion G	+/-
	3'UTR 7579	Deletion G	+/-
	3'UTR 7602	Substitution G→A	+/-
	3'UTR 7604	Substitution G→C	+/-
	3'UTR 7605/06	Insertion C	+/-
GBM6840 CDS Exon2	3'UTR 7518	Deletion G	+/-
GBM2603 CDS Exon2	3'UTR 7518	Deletion G	+/-
	3'UTR 7580	Substitution G→T	+/-
	3'UTR 7602	Substitution G→A	+/-
	3'UTR 7604	Substitution G→C	+/-
	3'UTR 7605/06	Insertion C	+/-
GBM2 CDS Exon1	CDS 478	Substitution G→C	+/-
	ReSeq CDS 521/522		Insertion T
GBM3 CDS Exon1	CDS 478	Substitution G→C	+/-
	ReSeq CDS 521/522		Insertion T

Bei der Auswertung der erhaltenen Sequenzen fielen bei einigen Glioblastom-Zelllinien zunächst Veränderungen der Nukleotid-Sequenz im Bereich der 5' bzw. 3'UTR des Chronophin-Locus auf (s. Abb. 60A und Tab. 18). 5' bzw. 3'UTR sind entscheidend an Regulation und Kontrolle der Translation beteiligt und Mutationen in diesen Bereichen beeinflussen Entstehung und Verlauf von Tumorerkrankungen, u.a. von Glioblastomen (Mazumder et al. 2003; Bhowmick et al. 2004; Pickering et al. 2005). Vor diesem Hintergrund wurden auffällige Genabschnitte der jeweiligen Zelllinie resequenziert, wobei die detektierten Veränderungen nicht bestätigt und somit als artifiziell eingestuft wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen der Genomsequenzierung von U87 überein, bei der keine Aberrationen im Bereich des Chronophin-Locus aufgezeigt werden konnten (Clark et al. 2010).

Zwei von fünf untersuchten Glioblastom-Gewebeproben wiesen bei der primären Sequenzierung eine isolierte Nukleotid-Substitution im Bereich der kodierenden DNA-Sequenz des Exon1 auf (s. Abb. 60B und Tab. 18), die jedoch ebenfalls durch Reevaluation der Proben nicht bestätigt werden konnte (s. Abb. 61). Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen genomweiter Sequenzierungsprojekte überein, die weder Mutationen noch SNPs im Bereich der kodierenden DNA-Sequenz des Chronophin-Locus identifizieren konnten (Cancer Genome Atlas Research 2008; Parsons et al. 2008; Brennan et al. 2013; Frattini et al. 2013).

Zusammenfassend ließen sich weder in humanen Glioblastom-Zelllinien noch in Glioblastom-Gewebeproben Mutationen im Bereich der kodierenden DNA-Sequenz des Chronophin-Locus nachweisen.

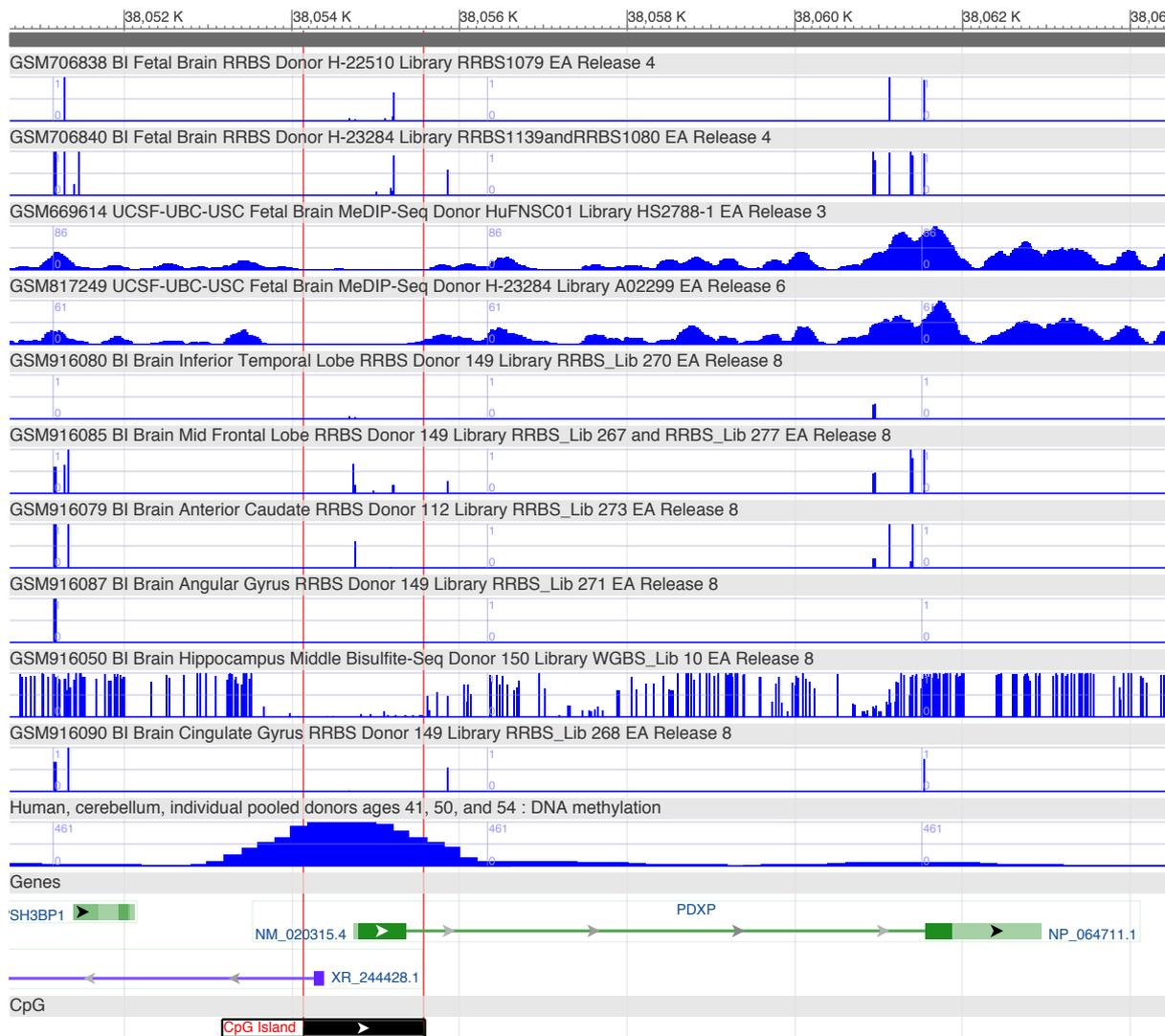
5.3.2 Analyse des Promotor-Methylierungsstatus von Chronophin in humanen Glioblastom-Zelllinien und -Gewebeproben

Die epigenetisch-vermittelte Inaktivierung von Genen, die keine Mutationen im Bereich ihrer kodierenden Sequenz aufweisen, ist ein zweiter verbreiteter Mechanismus in der Pathogenese maligner Tumoren, insbesondere von Glioblastomen (Martinez et al. 2010). Dabei können die Transkription und damit Expression eines Gens sowohl durch Hyper- als auch durch Hypomethylierung von CpG-Inseln im Bereich von Promotorsequenzen entscheidend beeinflusst werden (Ehrlich 2002). So konnte für Gliome die epigenetische Regulation zahlreicher Gene aufgezeigt werden, die u.a. an Zellmigration und -invasion beteiligt sind (Malzkorn et al. 2011).

Die epigenetische Beeinflussung von Chronophin als mögliche Ursache des Expressionsverlustes in Glioblastomen wurde im Folgenden durch eine Locus-spezifische Methylierungsanalyse untersucht.

Im Vorfeld erfolgte eine *in silico*-Analyse zum Methylierungsstatus des Chronophin-Locus in verschiedenen Hirnarealen von Spendern ohne zerebrale Erkrankungen mit Hilfe der *NCBI Epigenomics Database* (Fingerman et al. 2011). Glioblastome sind v.a. im Temporal- und Frontallappen des Großhirns lokalisiert (Larjavaara et al. 2007), sodass die Analyse dieser Regionen in Gewebeproben gesunder Spender Aufschluss über den epigenetischen Grundzustand der Promotorregion des Chronophin-Locus gibt. Untersuchungen fetaler Ganzhirnproben sowie unterschiedlicher Großhirnregionen adulter Spender konnten keine epigenetischen Auffälligkeiten im Bereich der Promotorregion von Chronophin dokumentieren (s. Abb. 62). Auffällige Methylierungsmuster zeigte hingegen die Analyse der Kleinhirnregion verschiedener Spender auf, allerdings wurden zerebrale Erkrankungen der Spender in der Beschreibung dieser Probe nicht sicher ausgeschlossen. Die Ergebnisse der *in silico*-Analyse liefern somit keine Hinweise auf die epigenetische Inaktivierung von Chronophin im Bereich des Großhirns, dem häufigsten Manifestationsort von Glioblastomen, in einem Patientenkollektiv ohne zerebrale Grunderkrankung.

Abbildung 62: *In silico*-Analyse epigenetischer Veränderungen im Bereich der Promotorregion von Chronophin. Chronophin-Locus nach *GRCh38.p2 Primary Assembly NC_000022.11*: Chronophin grün, CpG-Insel im Bereich der Promotorregion schwarz sowie rot flankiert. Ergebnisse epigenetischer Analysen blau: Spur 1-4 fetale Ganzhirnproben, Spur 5-10 Großhirnareale, Spur 11 Kleinhirnproben. Erstellt mit *NCBI Epigenomics Database*.



Im Anschluss wurden humane Glioblastom-Zelllinien sowie FFPE-Proben primärer Glioblastome epigenetisch analysiert.

Die initial durchgeführte *Methylation-specific PCR* (MSP) (s. Abb. 31) lieferte, trotz Variation der Protokolle, keine validen Ergebnisse unter Verwendung der Kontroll-DNA, möglicherweise aufgrund von DNA-Degradation oder unvollständiger Konversion unmethylierter Cytosine im Rahmen der Bisulfit-Behandlung (Riemenschneider et al. 2010; Krueger et al. 2012).

Aus diesem Grund erfolgte die Umstellung des Versuchs auf eine Bisulfit-unabhängige Analysemethode auf Grundlage eines methylierungsabhängigen Restriktionsverdaues (s. 4.5.4). Nach Amplifikation der Verdaue mittels Real-Time-PCR erfolgte die Auswertung des Methylierungsstatus der Proben anhand der erhaltenen Ct-Werte (s. Tab. 19). Zur Validierung des Versuchs wurde Kontroll-DNA mit bekanntem Methylierungsgehalt verwendet (s. Abb. 63 und Tab. 19). Als Referenz dienten Normalhirnproben, die entsprechend der häufigsten Lokalisation von Glioblastomen aus Frontal- und Temporallappen stammten (s. 3.7 und 4.5.1).

Abbildung 63: Validierung der Analyse mit Hilfe von Kontroll-DNA bekannten Methylierungsgrades. (A) Auswertung der Kontroll-DNA. (B) Eichgerade $y = 0,0084 \cdot x$. Einzelheiten siehe Text.

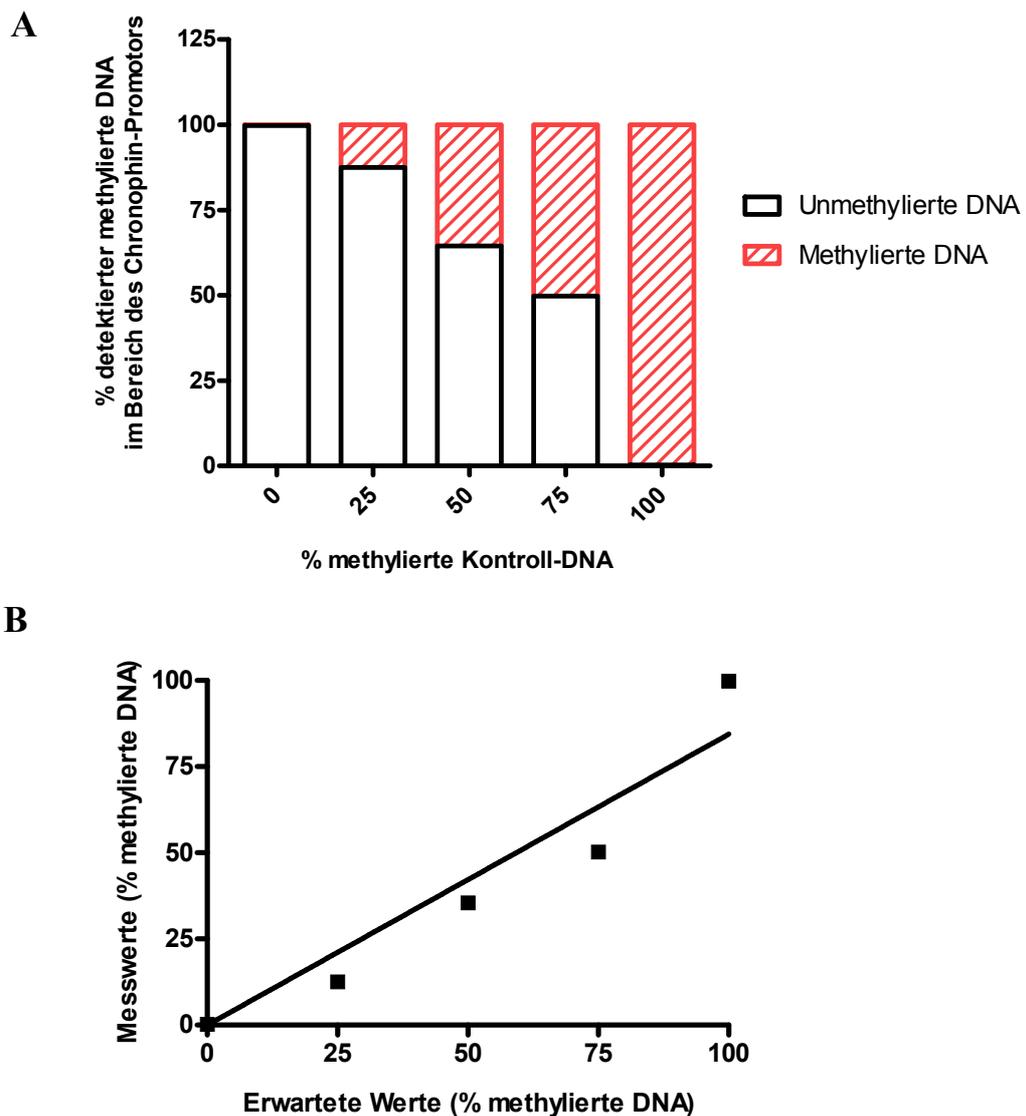


Tabelle 19: Zusammenstellung von Ct-Werten und Methylierungsstatus der analysierten Proben. Mo Ansatz ohne Enzyme, Ms methylierungssensitives Enzym, Md methylierungsabhängiges Enzym, Msd Ansatz mit beiden Enzymen. UM unmethylierte DNA, M methylierte DNA.

	C _t Mo	C _t Ms	C _t Md	C _t Msd	Primäre Werte %			
					UM	M		
Kontroll-DNA								
100 UM	18,33	27,00	19,00	27,67	99,75	0,25		
75/25 UM/M	19,00	22,00	19,00	28,00	87,48	12,52		
50/50 UM/M	19,50	21,00	20,00	27,67	64,52	35,48		
25/75 UM/M	20,00	21,00	21,01	28,67	49,78	50,22		
100 M	20,00	20,00	28,67	29,00	0,25	99,75		
							Korrigierte Werte %	
							UM	M
Zelllinien								
DBTRG	23,50	36,50	23,00	39,67	99,99	0,01	99,99	0,01
GBM6840	23,00	32,67	23,00	40,00	99,88	0,12	99,85	0,15
GBM2603	21,00	38,33	21,00	33,67	100,00	0,00	100,00	0,00
U87	24,00	40,00	24,00	38,00	100,00	0,00	100,00	0,00
U138	22,00	37,33	22,00	40,00	100,00	0,00	100,00	0,00
U343	22,00	36,00	22,00	35,00	99,99	0,01	99,99	0,01
Patientenproben								
1	25,00	28,00	25,00	28,00	85,71	14,29	82,99	17,01
2	27,00	30,00	27,33	30,01	85,73	14,27	83,01	16,99
3	25,00	28,00	25,00	28,00	85,71	14,29	82,99	17,01
4	26,00	29,00	26,00	29,00	85,71	14,29	82,99	17,01
5	26,33	29,33	26,67	29,67	86,13	13,87	83,49	16,51
6	25,00	29,00	25,00	29,00	93,33	6,67	92,06	7,94
Normalhirnproben								
Frontal	20,00	33,50	20,00	34,00	99,99	0,01	99,99	0,01
Temporal	21,00	34,00	21,00	34,00	99,99	0,01	99,99	0,01

Die zunächst durchgeführte Validierung des Versuchs ergab eine etwas schlechtere Amplifikation methylierter DNA im Vergleich zu unmethylierter DNA in der Real-Time-PCR, möglicherweise verursacht durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen oder die Assoziation DNA-bindender Proteine im Bereich der methylierten DNA (Shen et al. 2007; Kiselev et al. 2014) (s. Abb. 63A). Aufgrund dessen erfolgte die Korrektur primärer Methylierungswerte anhand einer erstellten Eichgerade (s. Abb. 63B und Tab. 19). Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse veranschaulicht Abbildung 64. Normalhirnproben aus Temporal- und Frontallappen wiesen, übereinstimmend mit den Ergebnissen der *in silico*-Analyse (s. Abb. 62), keine Methylierung der CpG-Inseln im Promotorbereich des Chronophin-Locus auf. Darüber hinaus konnte auch in den humanen Glioblastom-Zelllinien keine Methylierung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ließ sich interessanterweise in allen FFPE-Proben eine Methylierung der Promotorregion feststellen ($15,41 \pm 1,5 \%$).

Auffällig war zudem die geringere Methylierung einer FFPE-Probe im Vergleich zu den anderen Patientenproben (s. Tab. 19, Patientenprobe 6). In der immunhistochemischen Untersuchung wies diese Probe einen hohen Anteil an Riesenzellen auf (s. Abb. 65), die verglichen mit den klassischen Tumorzellen durch eine etwas stärkere Expression von Chronophin charakterisiert sind (s. 5.2.1.1).

Abbildung 64: Analyse des Methylierungsstatus der Promotorregion des Chronophin-Locus. Untersucht wurden zwei Normalhirnproben aus Temporal- bzw. Frontallappen, sechs verschiedene Glioblastom-Zelllinien sowie sechs FFPE-Gewebeproben primärer Glioblastome (s. 4.5.1). Dargestellt wird der Anteil methylierter DNA im Bereich der analysierten Promotorregion pro Probe.

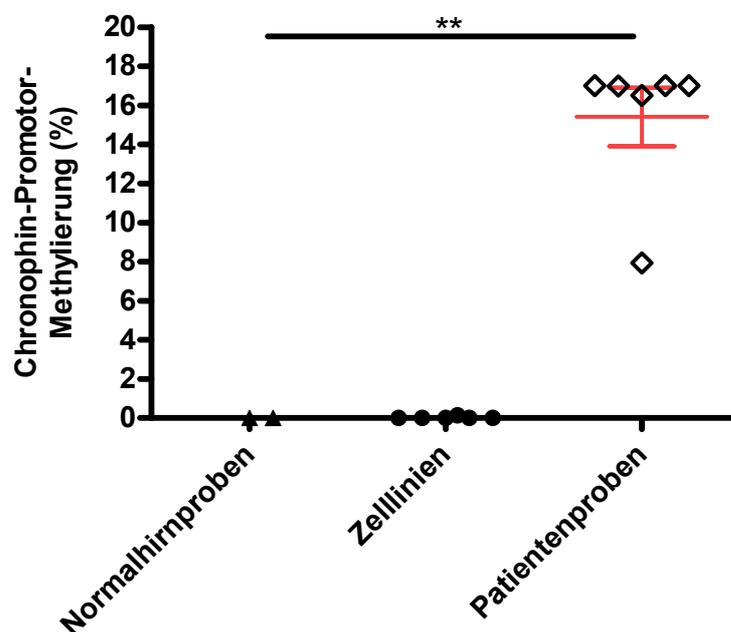
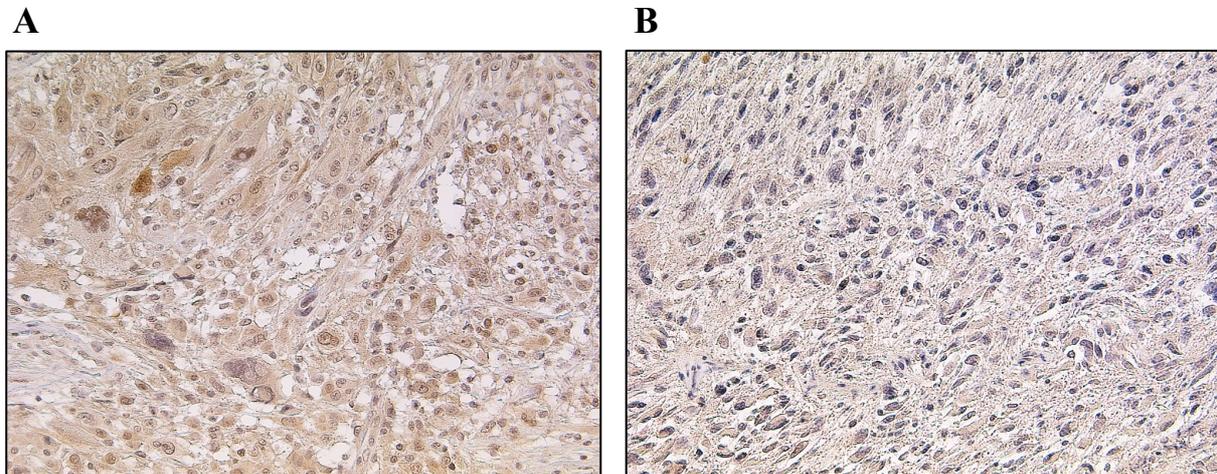


Abbildung 65: Expression von Chronophin in Patientenproben mit unterschiedlichem Methylierungsstatus der Promotorregion (s. Tab. 19).

(A) Riesenzell-Glioblastom mit vereinzelt positiven Zellen, Methylierungsstatus 7,94 % (Probe 6).

(B) Glioblastoma multiforme mit vollständig ungefärbten Zellen, Methylierungsstatus 17,01 % (Probe 3).



Expression und Methylierung von Chronophin wurden darüber hinaus mit Hilfe des *UCSC Cancer Genomic Browser* anhand von Daten des *TCGA Data Portals* analysiert (s. Abb. 66).

Die *in silico*-Analyse erfolgte unter Berücksichtigung der molekularen Subklassifikation von Glioblastomen (s. 1.1.3) (Theeler et al. 2012; Huse et al. 2013).

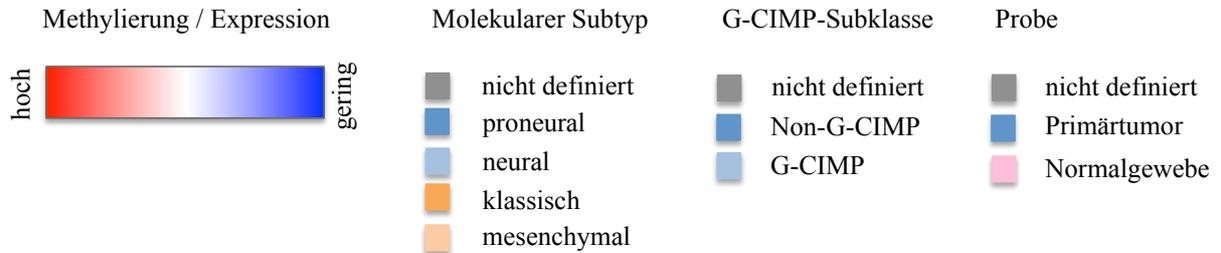
Die Analyse zeigt im Vergleich der molekularen Glioblastom-Subtypen sowohl einen Expressionsverlust von Chronophin v.a. im klassischen und mesenchymalen Subtyp auf, als auch eine verstärkte DNA-Methylierung, die v.a. im klassischen Subtyp nachgewiesen werden kann. Dagegen exprimieren der proneurale und neurale Typ höhere Level von Chronophin und weisen eine geringere Methylierung auf. Die zusätzliche Subklassifikation des proneuralen Typs in G-CIMP/non-G-CIMP scheint keinen weiteren Einfluss auf Expression oder Methylierungsstatus zu haben.

Darüber hinaus zeigt die *in silico*-Analyse eine verminderte Expression von Chronophin in allen Glioblastom-Subtypen im Vergleich zum Normalgewebe auf und bestätigt damit die bisherigen Expressionsanalysen (s. 5.2.2).

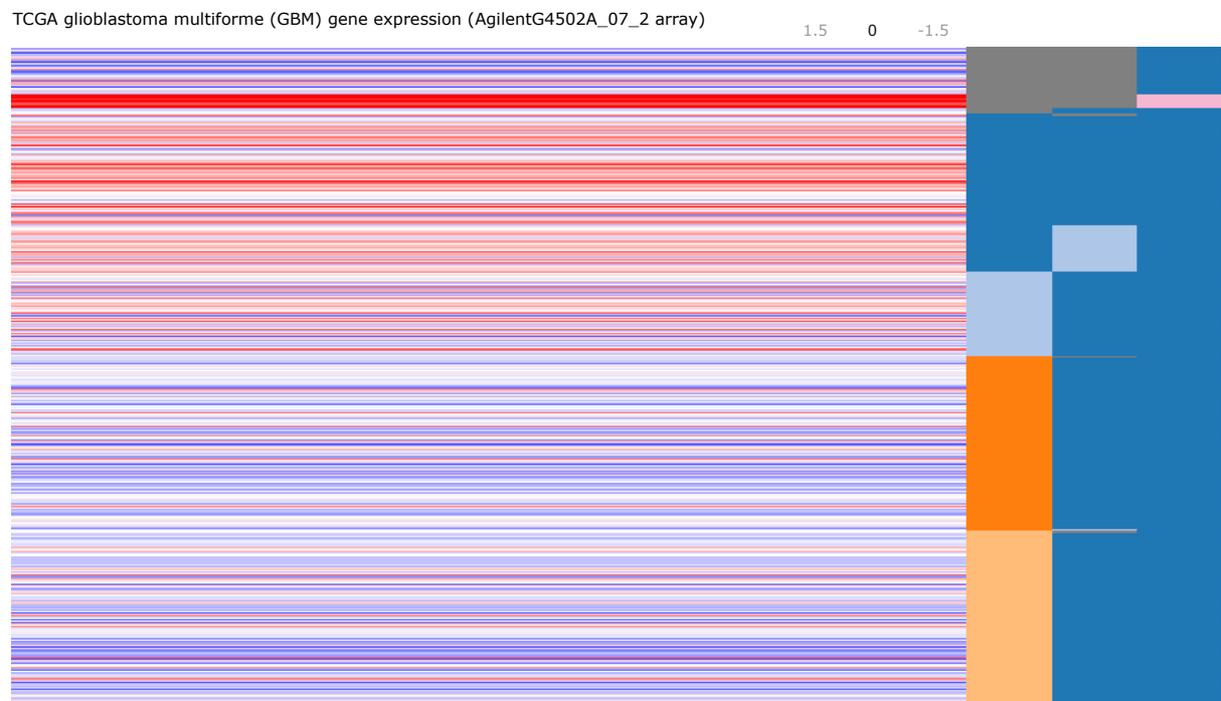
Abbildung 66: Analyse der Expression und Methylierung von Chronophin in humanen Glioblastomen mit Hilfe des TCGA Data Portals. Die Heatmaps wurden normalisiert und farbadjustiert. Erstellt mit *UCSC Cancer Genomic Browser*.

(A) Heatmap zur Chronophin-Expression. TCGA GBM gene expression (AgilentG4502A_07_2, 22.08.2014), n = 483.

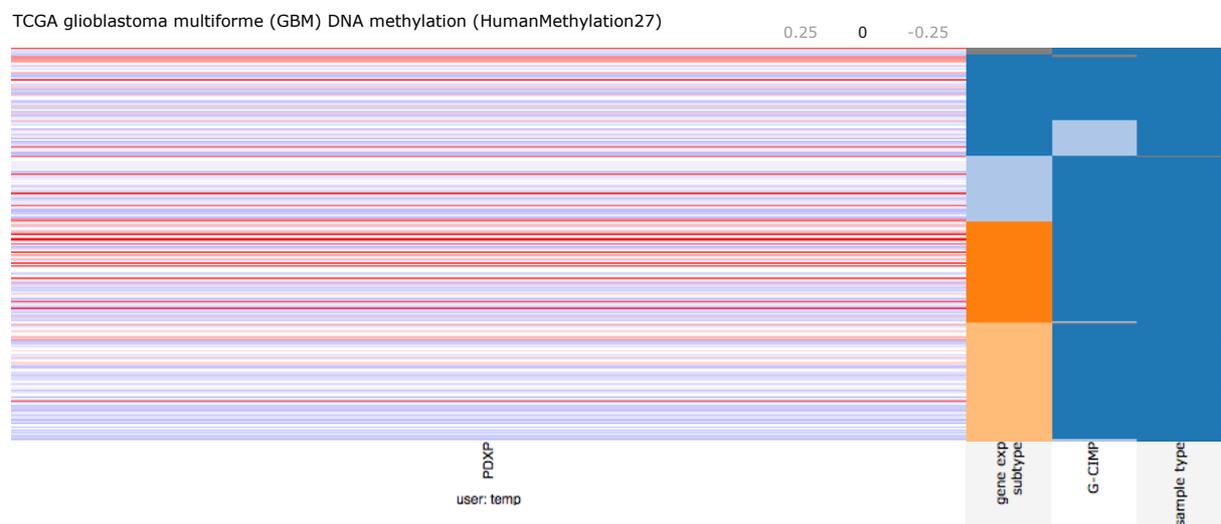
(B) Heatmap zur Chronophin-Methylierung. TCGA GBM DNA methylation (Methylation27k, 22.08.2014), n = 288. CpG Island Location 22: 36384083-36385517, NC_000022.9, Gene Expression Omnibus Platform GPL8490.



A



B



Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse festhalten:

- Normalgewebe aus Temporal- und Frontallappen weist keine Methylierung des Chronophin-Promotors auf.
- In humanen Glioblastom-Zelllinien lässt sich keine Methylierung der Promotorregion nachweisen.
- FFPE-Proben primärer Glioblastome sind durch Hypermethylierung der Promotorregion charakterisiert.
- Die molekularen Subtypen der Glioblastome weisen unterschiedliche Expressions- und Methylierungsmuster von Chronophin auf:
 - Der klassische Subtyp zeigt eine hohe Methylierung und gleichzeitig eine geringe Expression.
 - Proneuraler und neuraler Subtyp sind dagegen durch eine geringere Methylierung und höhere Expression gekennzeichnet.
 - Der mesenchymale Subtyp zeigt geringe Methylierungs- und Expressionslevel.
- Alle Subtypen weisen im Vergleich zum Normalgewebe eine geringere Expression von Chronophin auf.

5.3.3 Vorstudie zur *Loss of heterozygosity*-Analyse des Chronophin-Locus

Chronophin ist auf Chromosom 22q lokalisiert, einer Region, deren Verlust mit der Entstehung und Progression von Gliomen assoziiert ist (Ino et al. 1999; Nakamura et al. 2005; Laigle-Donadey et al. 2006). Nakamura et al. konnten drei *minimal common regions of deletion* MCRD auf Chromosom 22q identifizieren, wobei die Regionen 22q12.3-13.2 und 22q13.31 vermehrt in primären Glioblastomen und die Region 22q12.3 vermehrt in sekundären Glioblastomen deletiert waren. Sie charakterisierten TIMP-3 in der Region 22q12.3 als ein mögliches Tumorsuppressorgen in sekundären Glioblastomen, betonten jedoch die Notwendigkeit weiterer Analysen zur Identifikation von Tumorsuppressorgenen innerhalb der beschriebenen MCRD primärer Glioblastome.

Aufgrund der Bedeutung des Cofilin-Signalweges für Invasion und Metastasierung von Tumoren und der Lokalisation der Cofilin-Phosphatase Chronophin innerhalb einer MCRD, für die noch kein Tumorsuppressorgen beschrieben ist, erfolgte eine Vorstudie zur LOH-Analyse des Chronophin-Locus in Glioblastomen.

Dafür erfolgte zunächst die Identifikation eines geeigneten Mikrosatellitenmarkers (s. 4.6.3.2). Der identifizierte Mikrosatellit stellt ein Pentanukleotid der Sequenz GTGTG dar, liegt im Chronophin-Intron und ist daher bekannten Markern der *Généthon-Database*, die außerhalb des Chronophin-Locus lokalisiert sind, überlegen (s. Abb. 67 und Abb. 68). Die Insertion/Deletion-Polymorphismen des Mikrosatelliten sind bereits in der *db-SNP-Database* beschrieben (s. Abb. 68, orange Markierungen).

Die Häufigkeit der Heterozygotie eines Mikrosatellitenmarkers, der sogenannte Heterozygotie-Index, ist ein entscheidendes Analysekriterium, da nur bei Heterozygotie der Markerregion ein Allel-Verlust in entsprechenden Tumorproben detektiert werden kann (informative Probe). Zur Ermittlung des Heterozygotie-Index wurde daher der identifizierte Mikrosatellit in Blutproben verschiedener Individuen analysiert. Dafür erfolgte die Isolation genomischer DNA aus den Blutproben, Amplifikation der Mikrosatellitenmarker unter Verwendung geeigneter Primer mittels PCR sowie Auftrennung der PCR-Produkte mittels hochauflösender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 4.6.3.4). Heterozygote Mikrosatellitenmarker in der Blutprobe werden dabei durch zwei verschiedene Banden, homozygote Marker durch eine singuläre Bande dargestellt (s. Abb. 69). Die Analyse der Blutproben ergab einen

Heterozygotie-Index von 0,5 ($n = 6$), wobei jedoch die geringe Stichprobengröße bei der Beurteilung berücksichtigt werden muss. Zur Evaluation der Eignung des identifizierten Markers sind daher weitere Analysen mit einer größeren Stichprobe erforderlich. Die für die LOH-Analyse notwendigen korrespondierenden Blut- und Tumorproben standen leider nicht zur Verfügung.

Im Rahmen einer weiterführenden Studie könnte die LOH-Analyse neue Erkenntnisse zur Assoziation zwischen Chronophin und dem für Glioblastome typischen Verlust von Chromosom 22q liefern.

Abbildung 67: Lokalisation des identifizierten Mikrosatellitenmarkers und Einordnung gegenüber bekannten Markern der *Généthon-Database* (Dib et al. 1996). Position Chronophin blau, Mikrosatellitenmarker rot, bekannte *Généthon*-Marker grün markiert. Erstellt mit *NCBI GeneMap'99*.

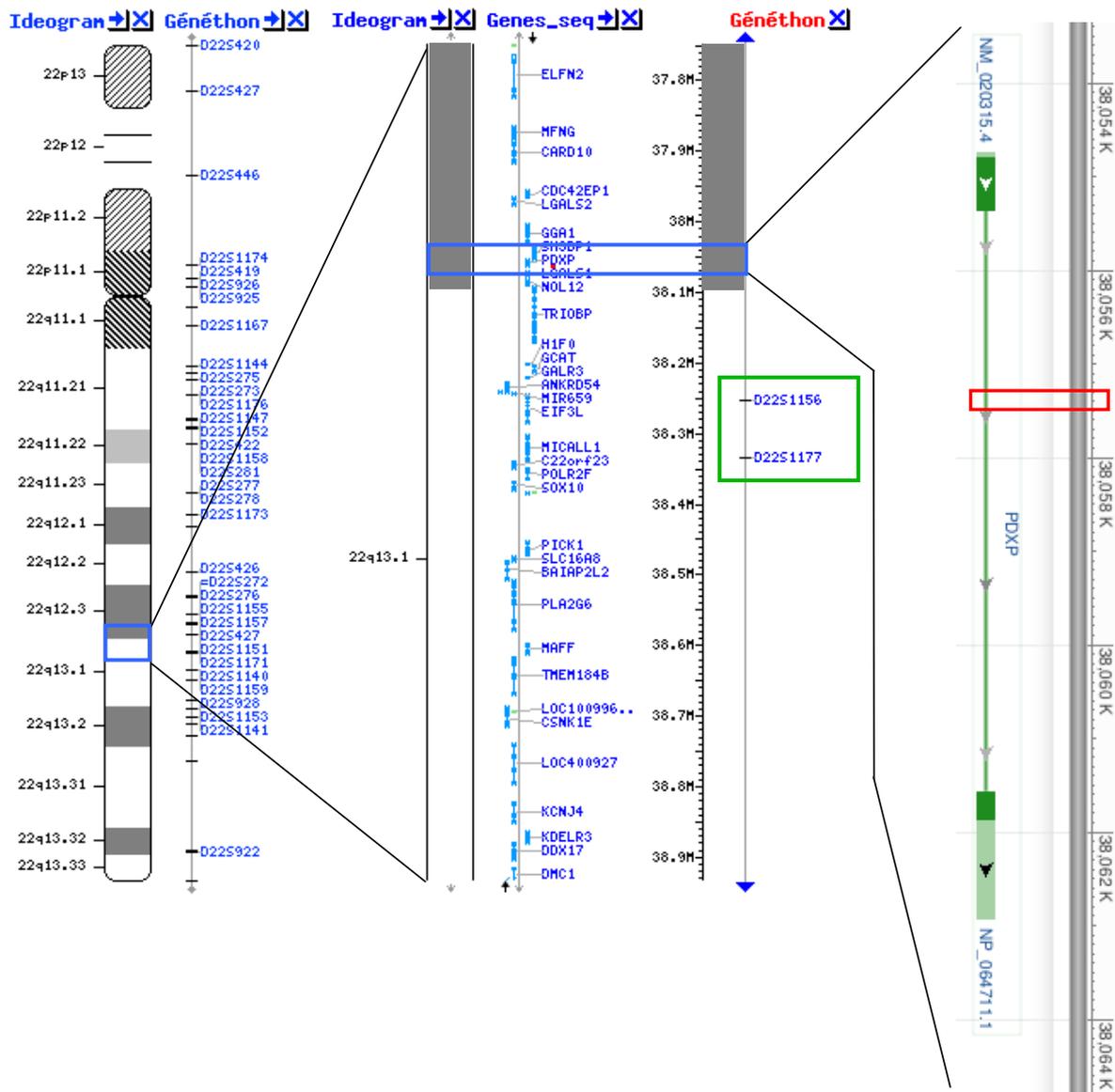


Abbildung 68: Lokalisation und Sequenz des Mikrosatellitenmarkers und der verwendeten Primer in Projektion auf den Chronophin-Locus. Chronophin grün, Position Mikrosatellitenmarker rot markiert (GTGTG; zwei Deletionen, orange markiert), Position Primer violett markiert. Bekannte genetische Variationen der *db-SNP-Database* werden wie folgt angezeigt: Deletion/Insertion-Polymorphismus blau, SNP rot. Erstellt mit *NCBI Nucleotide Database*.

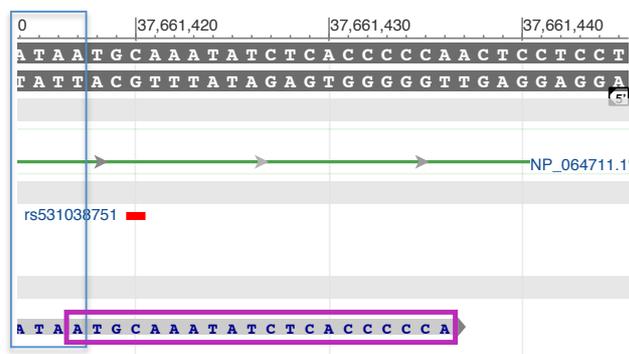
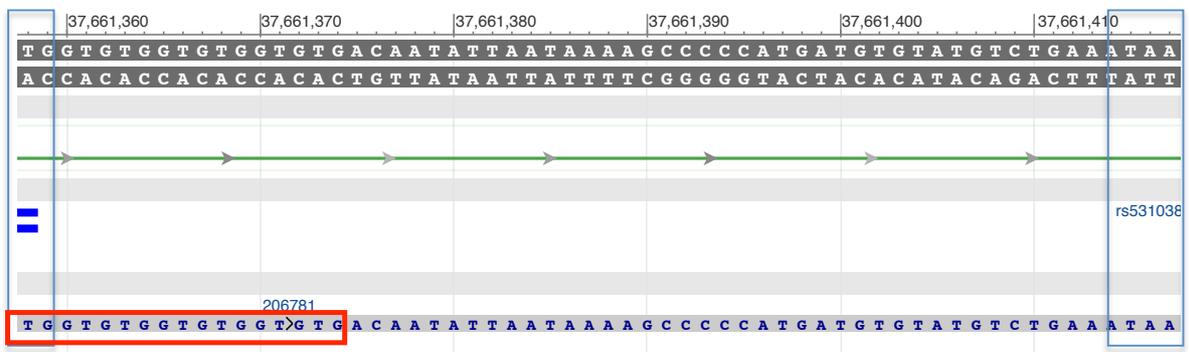
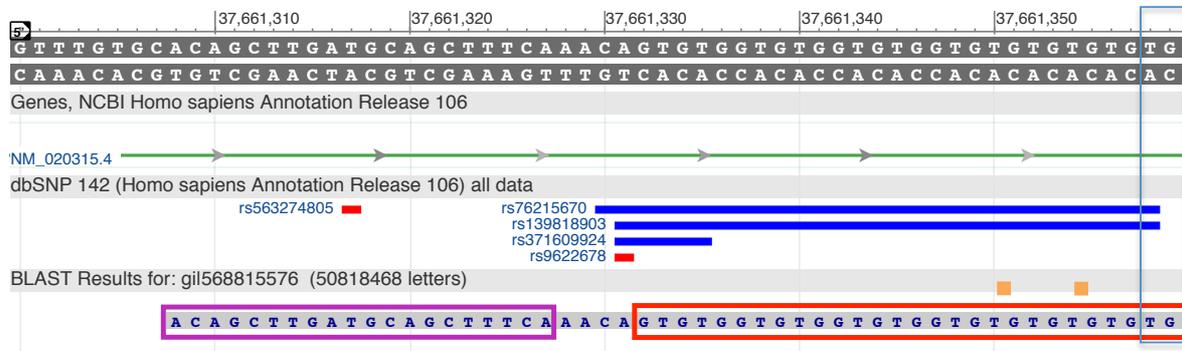
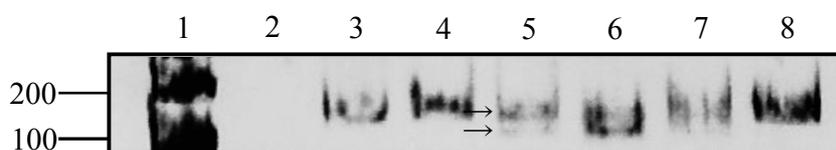


Abbildung 69: Mikrosatellitenanalyse verschiedener Blutproben. Auftrennung der PCR-Produkte mittels PAGE: Spur 1 100bp-Leiter; Spur 2 leer; Spur 3-8 Blutproben. In Spur 5-7 zeigt sich jeweils eine schwache zusätzliche Bande (informative Probe, siehe Pfeile). Einzelheiten siehe Text.



5.4 Einfluss von LIM-Kinase-Inhibitoren auf Glioblastomzellen

Die Rho-GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 sind wichtige Regulatoren der dynamischen Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts (Hall 2009; Hall 2012). Die Dysregulation dieser Signalkaskaden ist mit der Progression und Invasion verschiedener Tumorentitäten, insbesondere von Glioblastomen, assoziiert (Rathinam et al. 2011; Fortin Ensign et al. 2013). Die LIM-Kinasen 1 und 2, Effektormoleküle des RhoA/ROCK- bzw. Rac/PAK-Signalweges, nehmen eine Schlüsselposition innerhalb der Regulatorkaskade des Aktin-Zytoskeletts ein und bilden daher einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Inhibition der Rho-GTPase-vermittelten Tumorzellinvasion (Scott et al. 2007). LIMK katalysieren die Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Cofilin und bewirken dadurch die Stabilisierung von F-Aktin (Yang et al. 1998). Über die Bedeutung der LIMK für die Migration und Invasion von Tumorzellen existieren jedoch bislang widersprüchlich Studien (Yoshioka et al. 2003; Wang et al. 2006). Die Identifikation von LIMK-Inhibitoren und erste Versuche an Mammakarzinomzellen wecken nun neue therapeutische Hoffnungen (Ross-Macdonald et al. 2008; Scott et al. 2010; Li et al. 2013). Erste Erkenntnisse zum Einsatz von LIMK-Inhibitoren in Glioblastomen liefert eine aktuelle Studie (Park et al. 2014).

Im Folgenden wurde der Einfluss des LIMK-Inhibitors BMS-5 (LIMKi) sowie des ROCK-Inhibitors Y-27632 (ROCKi), zu dessen Wirkung auf maligne Gliome ebenfalls konträre Ergebnisse vorliegen (Salhia et al. 2005; Zohrabian et al. 2009), auf die Migration und Invasion von Glioblastomen untersucht.

5.4.1 Zellviabilität unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren

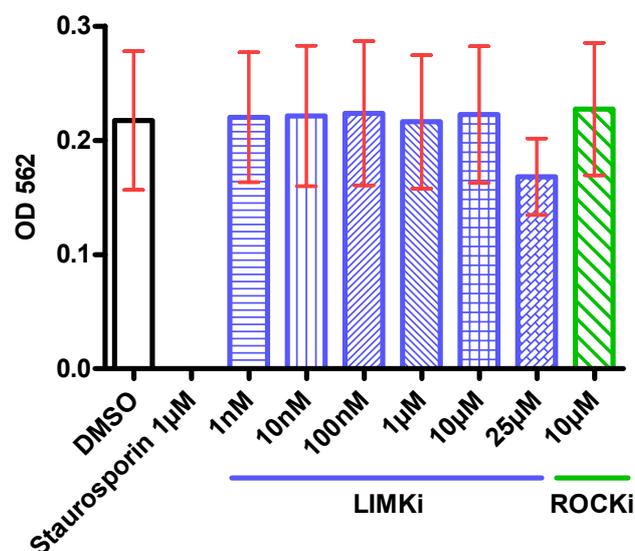
Die Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot in die Lysosomen ist an einen ATP-abhängigen pH-Gradienten geknüpft, den nur vitale Zellen aufrechterhalten können (s. 4.7.3). Der Neutralrot-Test eignet sich daher zur Bestimmung der Wirkung von ROCKi und LIMKi auf die Zellviabilität bzw. zum Nachweis zytotoxischer Eigenschaften der verwendeten Inhibitoren. Als Kontrolle wurde Staurosporin, ein Apoptose-induzierendes Alkaloid, verwendet (Chae et al. 2000). Darüber hinaus wurde eine DMSO-Kontrolle mitgeführt, um Effekte des Lösungsmittels auszuschließen. Die Ergebnisse des Zytotoxizitätsassay zeigt Abbildung 70. Während die mit Staurosporin behandelten Zellen kein Neutralrot aufnehmen, zeigen die mit LIMKi und ROCKi inkubierten Zellen eine ähnlich hohe Absorption wie die DMSO-Kontrolle. Interessanterweise zeigt sich ab einer LIMKi-Konzentration von 25 μ M ein

leichter zytotoxischer Effekt. Die Ergebnisse stimmen einerseits mit den Erkenntnissen von Park et al. überein, die bei LIMKi-Konzentration bis 20 μM keinen Einfluss auf die Zellviabilität von U87- und T98G-Glioblastomzellen innerhalb von 24 h nachweisen konnten (Park et al. 2014). Andererseits wird ein antiproliferativer Effekt von LIMKi (*Compound 3*) auf A549-Bronchialkarzinomzellen bei Konzentrationen über 10 μM beschrieben (Ross-Macdonald et al. 2008). Ross-Macdonald et al. führen diesen Effekt dabei auf die Destabilisation von Mikrotubuli und nicht auf die LIMK-Inhibition zurück.

Studien, die den Einfluss des ROCKi Y-27632 auf die Zellviabilität untersuchen, liefern ebenfalls widersprüchliche Erkenntnisse. Einerseits wird ein starker antiproliferativer bzw. Apoptose-induzierender Effekt des Inhibitors bei Konzentrationen zwischen 20 und 30 μM auf LN-18- bzw. T98G- und U251-Glioblastomzellen beschrieben (Zohrabian et al. 2009; Deng et al. 2010), andererseits wird bei Konzentrationen bis 25 μM kein Einfluss auf die Viabilität und Proliferation von U251-Glioblastomzellen nachgewiesen (Salhia et al. 2005).

Die Ergebnisse des Neutralrot-Tests dokumentieren, dass die in den weiteren Versuchen verwendeten Inhibitor-Konzentrationen bis 10 μM keinen Einfluss auf die Zellviabilität haben.

Abbildung 70: Analyse der Zytotoxizität von ROCKi und LIMKi mittels Neutralrot-Tests. Zellen der Glioblastom-Zelllinie U87 wurden für 24 h mit den angegebenen Inhibitoren oder der DMSO-Kontrolle vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit Neutralrot-Medium inkubiert, die Platte mit PBS gewaschen und schließlich für 10 min mit Entfärbe-Lösung geschüttelt. Es folgte die Bestimmung der OD bei 562 nm (Neutralrot-Absorption) (n = 3). Details siehe 4.7.3.



5.4.2 Phosphorylierung von Cofilin und Myosin-Leicht-Ketten unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren

Die Phosphorylierung und Inaktivierung von Cofilin wird durch die LIMK-1 und -2 katalysiert, ein Vorgang, der zur Stabilisierung von F-Aktin führt und sowohl durch Aktivierung des RhoA/ROCK- als auch des Rac/PAK-Signalweges in Gang gesetzt wird (Bernard 2007). Die regulatorischen Myosin-Leicht-Ketten (MLC) von Myosin II werden hingegen durch den RhoA-Effektor ROCK sowohl unmittelbar als auch durch Inaktivierung der Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (MLCP) phosphoryliert, während der Rac-Effektor PAK, der die Myosin-Leicht-Ketten-Kinase (MLCK) inhibiert, der Phosphorylierung von MLC entgegenwirkt (Sanders et al. 1999; Bokoch 2003; Riento et al. 2003). Die Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges fördert somit die Aktin-Myosin-vermittelte Zellkontraktilität, deren Ausmaß durch den antagonistischen Rac/PAK-Signalweg reguliert wird (Riento et al. 2003).

Im Folgenden wurde der Einfluss des LIMKi und ROCKi auf den Phosphorylierungsstatus von Cofilin und MLC in der humanen Glioblastom-Zelllinie U87 untersucht. U87 weist, wie bereits in Vorversuchen beschrieben (s. 5.1), einen hohen Anteil von Phospho-Cofilin am Gesamt-Cofilin auf und ist daher für die Analyse besonders geeignet.

Einen Überblick über die Ergebnisse geben Abbildung 71 und 72. Interessanterweise hat die Inhibition von ROCK mit 10 μ M nur geringen Einfluss auf die Phosphorylierung von Cofilin, möglicherweise durch eine reaktiv verstärkte Aktivierung des antagonistischen Rac/PAK-Signalweges (s. Abb. 71D) (Tsuji et al. 2002). Die direkte LIMK-Inhibition führt dagegen mit steigender Inhibitorkonzentration zu einer signifikanten Verminderung der Cofilin-Phosphorylierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Ergebnisse zur Beeinflussung von Cofilin stimmen mit den Ergebnissen von Park et al. 2014 überein, die eine verminderte Cofilin-Phosphorylierung in U87- und T98G-Glioblastomzellen bei 10 μ M BMS-5 belegen, weisen darüber hinaus jedoch bereits bei 1 μ M LIMKi signifikante Effekte auf U87 nach.

Die Phosphorylierung von MLC wird durch LIMK-Inhibition auch bei 25 μ M nicht beeinflusst, 10 μ M ROCKi vermindern hingegen die MLC-Phosphorylierung leicht. Übereinstimmend mit Scott et al. dokumentieren die Ergebnisse, dass die MLC-Phosphorylierung zwar durch ROCK, nicht jedoch durch die LIM-Kinasen katalysiert wird, die vermutlich keinen unmittelbaren Einfluss auf die Myosin-vermittelte, zelluläre Kontraktilität haben (Scott et al. 2010).

Abbildung 71: Analyse des Phosphorylierungsstatus von Cofilin in der Glioblastom-Zelllinie U87. (A) Repräsentativer Western Blot zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von Cofilin. Die Zellen wurden für 2 h mit den angegebenen Inhibitoren oder der DMSO-Kontrolle vorinkubiert. Detektion mittels panspezifischem Cofilin-Antikörper nach Auftrennung in Phospho-Cofilin und Cofilin durch Phos-tag™-SDS-PAGE. **(B)** Densitometrische Quantifizierung des Phosphorylierungsstatus von Cofilin nach Inhibitorbehandlung (n = 3). **(C)** Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Trendlinie: $y = 4,2935 \cdot \ln(x) + 73,805$. $EC_{50} \sim 0,4 \mu M$. **(D)** Wirkmechanismus von LIMKi bzw. ROCKi auf Cofilin. Mögliche Umgehungswege sind orange dargestellt.

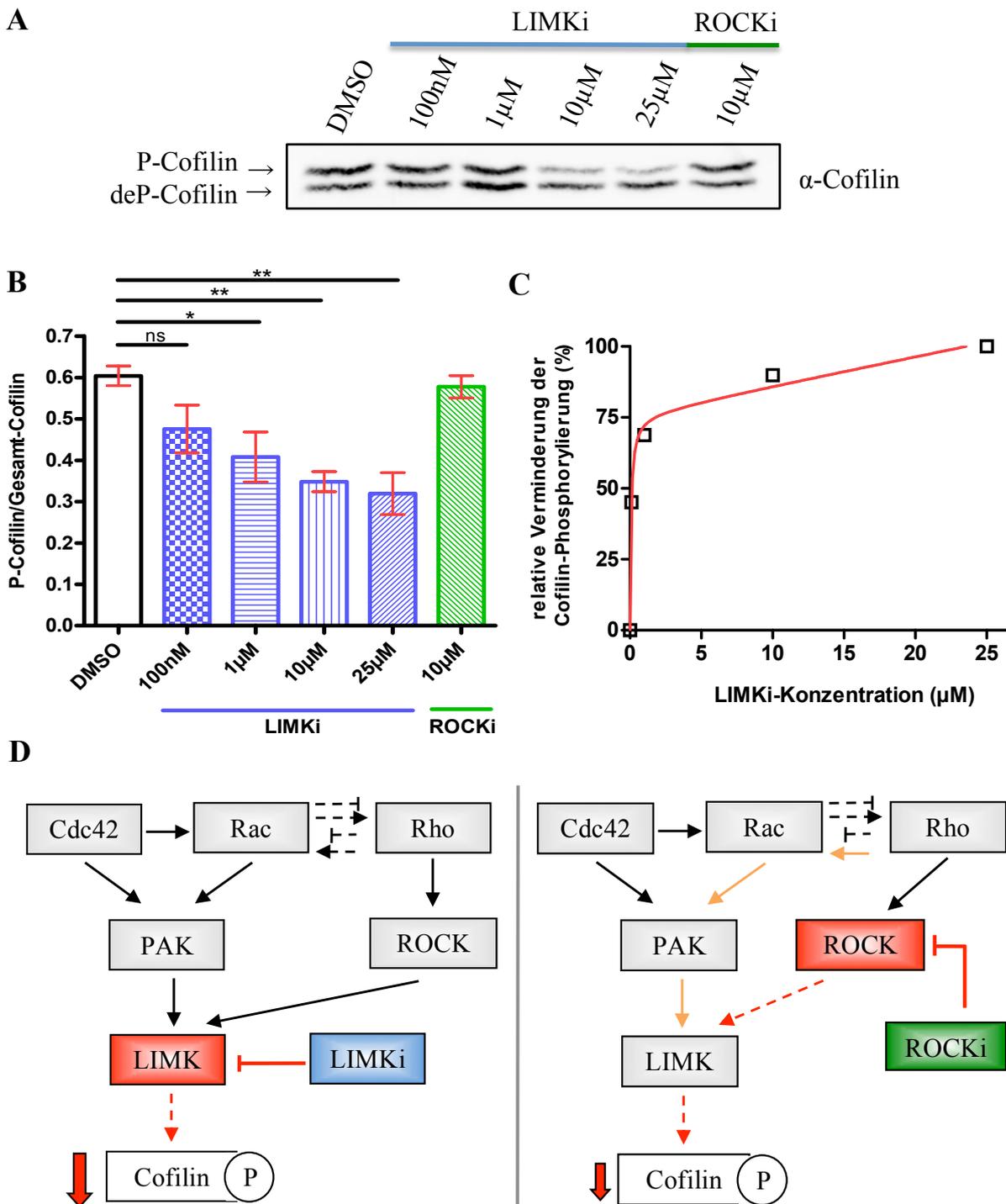
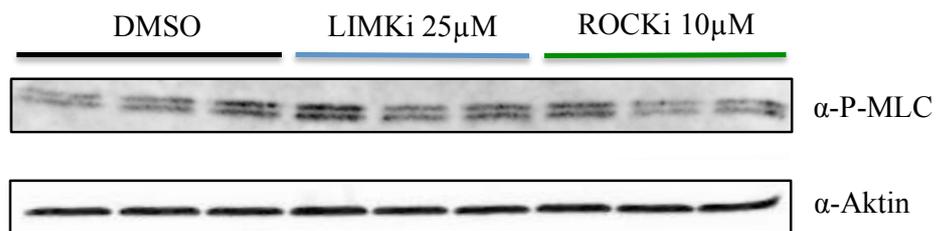
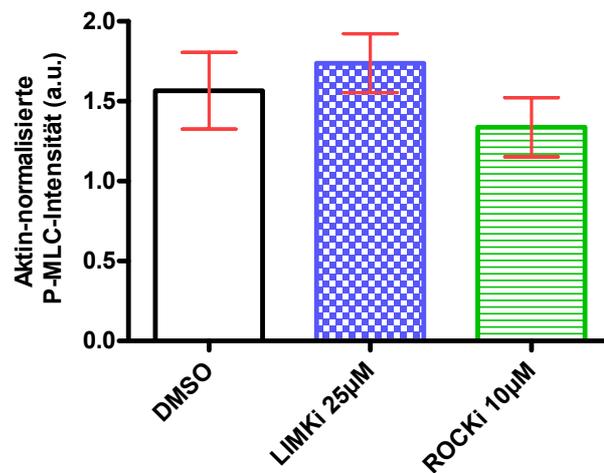


Abbildung 72: Analyse des Phosphorylierungsstatus von MLC in der Glioblastom-Zelllinie U87.
(A) Repräsentativer Western Blot zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von MLC. Die Zellen wurden für 2 h mit den angegebenen Inhibitoren oder der DMSO-Kontrolle vorinkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Phospho-MLC-Antikörper (Ser19). Aktin-Level wurden als Ladekontrolle verwendet.
(B) Densitometrische Quantifizierung des Phosphorylierungsstatus von MLC nach Inhibitorbehandlung (n = 3). Das P-MLC-Signal wurde auf Aktin normalisiert.
(C) Wirkmechanismus von LIMKi bzw. ROCKi auf MLC. Mögliche Umgehungswege sind orange dargestellt.

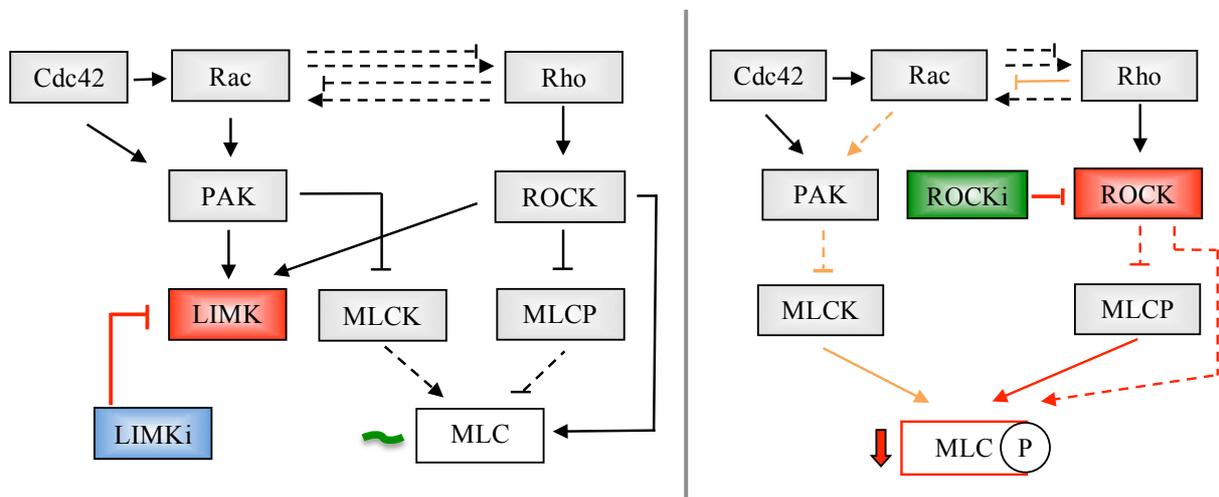
A



B



C



5.4.3 Zellmorphologie unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren

Die Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac regulieren sowohl die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts als auch die Aktomyosin-Kontraktilität und beeinflussen damit entscheidend die zelluläre Form, Struktur und Polarität (Hall 2005; Murali et al. 2014). Molekulare Dysbalancen im Bereich dieser Signalkaskaden gehen häufig mit morphologisch-fassbaren Veränderungen einher. So führt die Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges zur Zellabrundung und Formation von Stressfasern, die Aktivierung des Rac/PAK-Signalweges hingegen zur Zellelongation sowie zur Ausbildung von Pseudopodien (Ridley 2006; Sanz-Moreno et al. 2010). Darüber hinaus prägt die Mikrotubuli-Dynamik die Zellform: Acetylierte stabile Mikrotubuli sind mit einer elongierten, deacetylierte instabile Mikrotubuli mit einer runden Zellmorphologie assoziiert (Friedl et al. 2010).

Im Folgenden wurde der Einfluss des LIMKi und ROCKi auf die Morphologie von Gliomzellen untersucht. Dafür wurden die Tumorzellen für 2 h mit den entsprechenden Inhibitoren oder DMSO inkubiert und danach fixiert. Im Anschluss erfolgte die Darstellung von Aktinfilamenten, Mikrotubuli und DNA mittels Immunfluoreszenz (s. 4.7.5). Phalloidin-gefärbte Zellen wurden zunächst auf morphologische Veränderungen bezüglich Zellfläche, Rundheit und Fluoreszenz-Intensität untersucht. Darüber hinaus wurden Detailansichten zytoskelettaler Strukturen mittels CLS-Mikroskopie angefertigt.

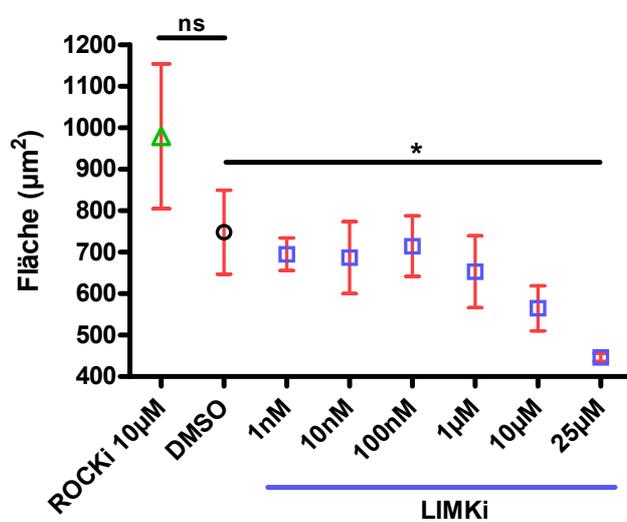
Mit ROCKi behandelte Zellen erscheinen elongiert und daher weniger rund und weisen signifikant weniger F-Aktin als die polygonalen Zellen der DMSO-Kontrolle auf (s. Abb. 73B und Abb. 74). Die Zellfläche bleibt hingegen bei 10 μ M ROCKi weitgehend unverändert (s. Abb. 73A). In der CLS-Mikroskopie zeigt sich ein Verlust an Stressfasern sowie eine geringe Ausbildung von Aktin-reichen Membranausstülpungen (s. Abb. 75C).

Unter LIMK-Inhibition zeigen sich vergleichbare, jedoch wesentlich stärker ausgeprägte Veränderungen der Zellmorphologie. In der CLS-Mikroskopie lassen sich bereits ab 10 nM ein Verlust an Stressfasern sowie eine Ablagerung von F-Aktin in den Spitzen der Protrusionen und im Zellkörper nachweisen (s. Abb. 75B und Abb. 76). Dieser *stellation*-Effekt nimmt mit steigender Inhibitorkonzentration zu (s. Abb. 76C) und erklärt im Sinne eines Umverteilungsprozesses möglicherweise die im Vergleich zu ROCKi fehlende Abnahme der F-Aktin-Fluoreszenz-Intensität unter LIMKi (s. Abb. 74). Darüber hinaus weisen die Zellen eine signifikante Abnahme ihrer Fläche sowie aufgrund ihrer Protrusionen

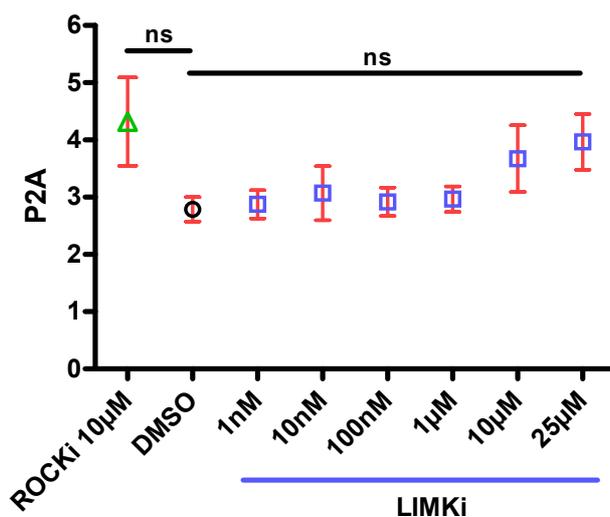
eine tendenziell, jedoch statistisch nicht signifikant geringere Rundheit auf (s. Abb. 73). Auffällig ist zudem der erhöhte Anteil an Mikrotubuli (s. Abb. 76).

Abbildung 73: Einfluss von LIMKi bzw. ROCKi auf Zellfläche und Rundheit. Für die quantitative Analyse von (A) Zellfläche und (B) Rundheit (P2A, Wert von 1 entspricht größter Rundheit) wurden mindestens 100 Zellen pro Bedingung untersucht (n = 3). Mit steigender Konzentration des LIMKi nehmen Zellfläche signifikant und Rundheit tendenziell ab. Unter 10 μM ROCKi weisen die Zellen eine mit der DMSO-Kontrolle vergleichbare Fläche auf, sind jedoch tendenziell weniger rund. (C) Repräsentative CLSM-Aufnahmen von U87-Zellen zur Veranschaulichung der morphologischen Veränderungen unter ROCK- bzw. LIMK-Inhibition.

A



B



C

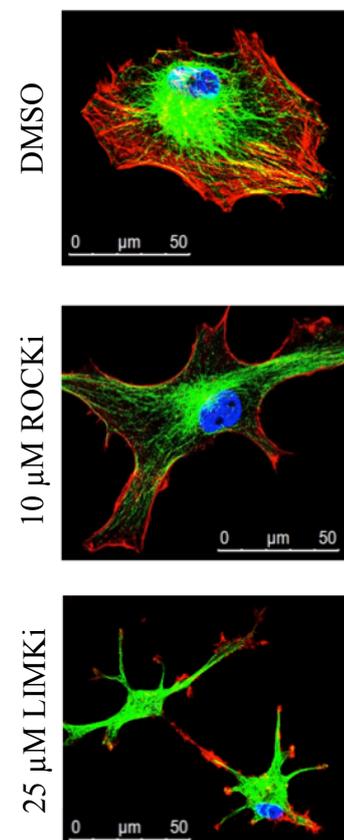


Abbildung 74: F-Aktin-Fluoreszenz-Intensität unter LIMK- bzw. ROCK-Inhibition. U87-Glioblastomzellen behandelt mit (A) DMSO, (B) 25 μ M LIMKi bzw. (C) 10 μ M ROCKi. Einstellungen am Epifluoreszenz-Mikroskop wurden konstant gehalten, um Unterschiede in der Fluoreszenz-Intensität zu detektieren. (D) Quantitative Analyse der mittleren F-Aktin-Fluoreszenz-Intensität von mindestens 100 Zellen pro Bedingung, n = 2. Unter LIMK-Inhibition zeigt sich ein mit der DMSO-Kontrolle vergleichbares Fluoreszenz-Signal, allerdings ergeben sich deutliche Unterschiede im Verteilungsmuster. Unter ROCKi zeigt sich ein signifikant schwächeres Fluoreszenz-Signal.

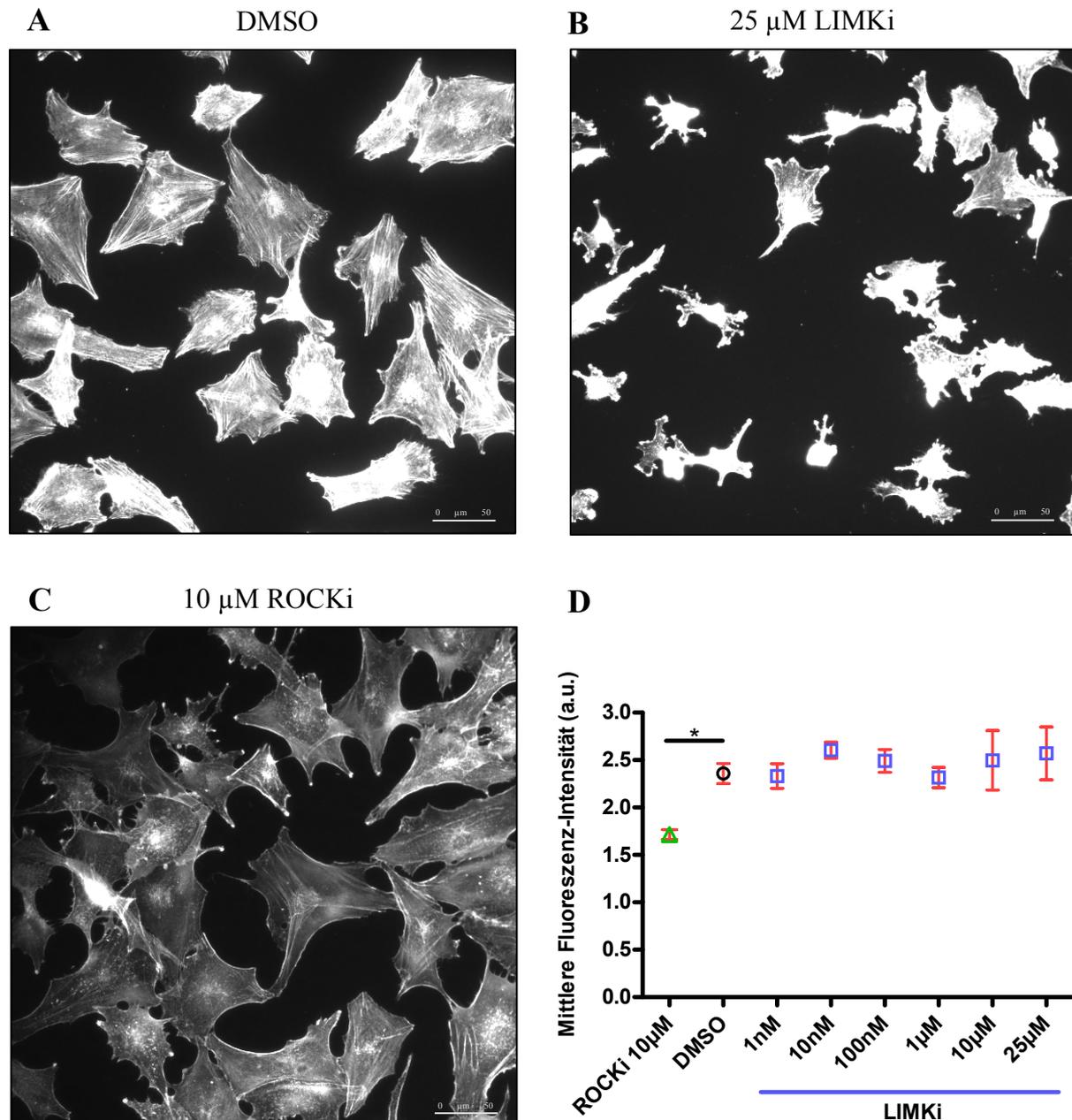


Abbildung 75: Repräsentative 3D-Rekonstruktionen von U87-Glioblastomzellen unter LIMK- bzw. ROCK-Inhibition. Aktin wurde mit *Alexa Fluor® 546 Phalloidin* (rot), Tubulin mit α 4a-Tubulin-Antikörper und *Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG* (grün) dargestellt. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

(A) Mit DMSO behandelte Zellen weisen eine polygonale Zellform und zahlreiche Aktin-Stressfasern auf. Die Mikrotubuli sind v.a. im Zellkörper lokalisiert.

(B) Unter 25 μ M LIMKi erscheinen die Zellen elongiert und verkleinert. Stressfasern fehlen. F-Aktin reichert sich an der Spitze der Membranprotrusionen sowie im Zellkörper an, die Intensität des Aktin-Fluoreszenz-Signales ist mit der DMSO-Kontrolle vergleichbar. Mikrotubuli sind in Zellkörper und Zellfortsätzen lokalisiert und liefern ein intensives Fluoreszenz-Signal.

(C) Unter 10 μ M ROCKi erscheinen die Zellen elongiert. Stressfasern fehlen. Ausbildung weniger F-Aktin-reicher Membranausstülpungen (weiße Pfeile). Das Aktin-Fluoreszenz-Signal ist im Vergleich zur DMSO-Kontrolle deutlich vermindert. Zellgröße und Mikrotubuli erscheinen dagegen weitgehend unverändert.

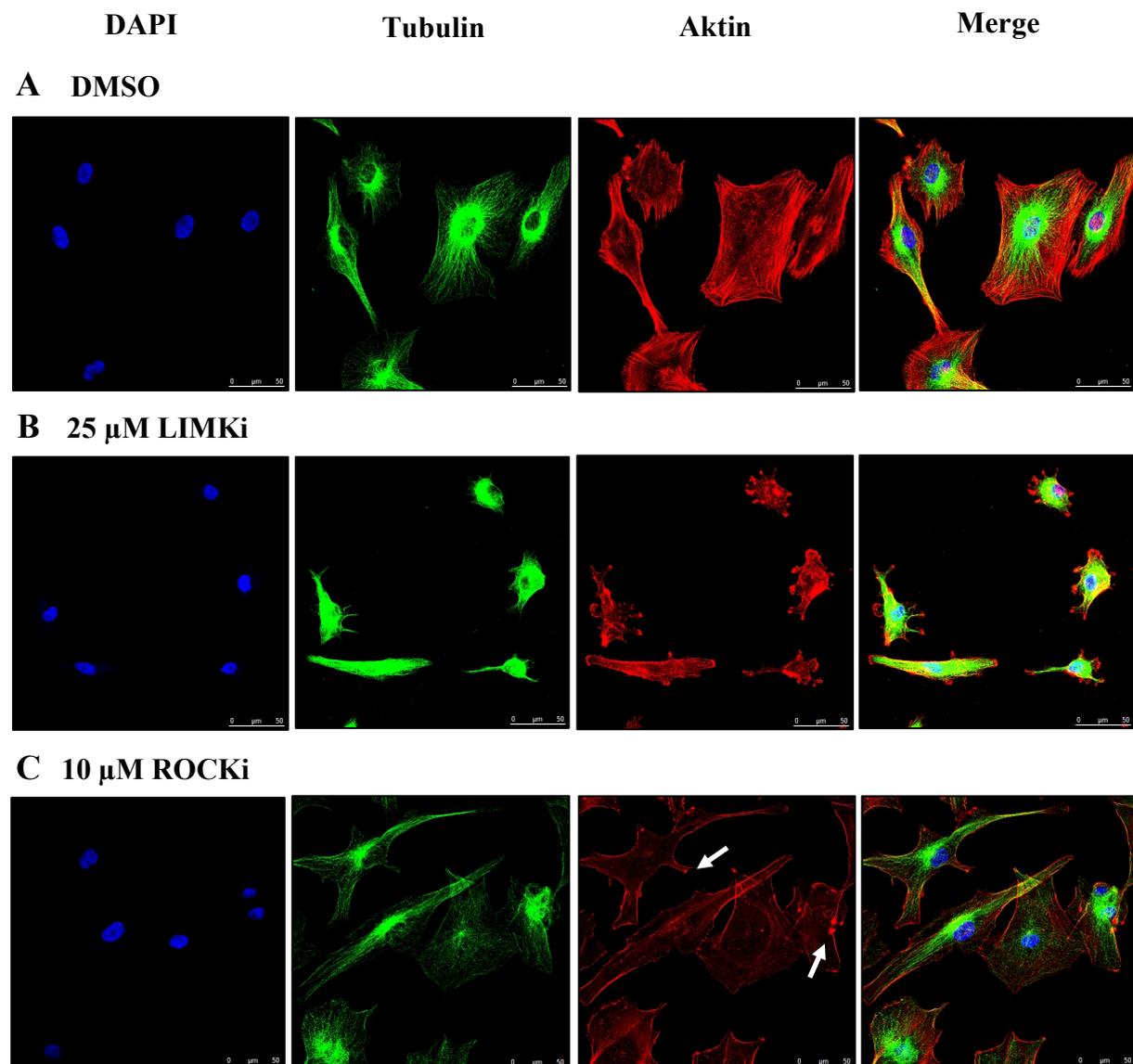
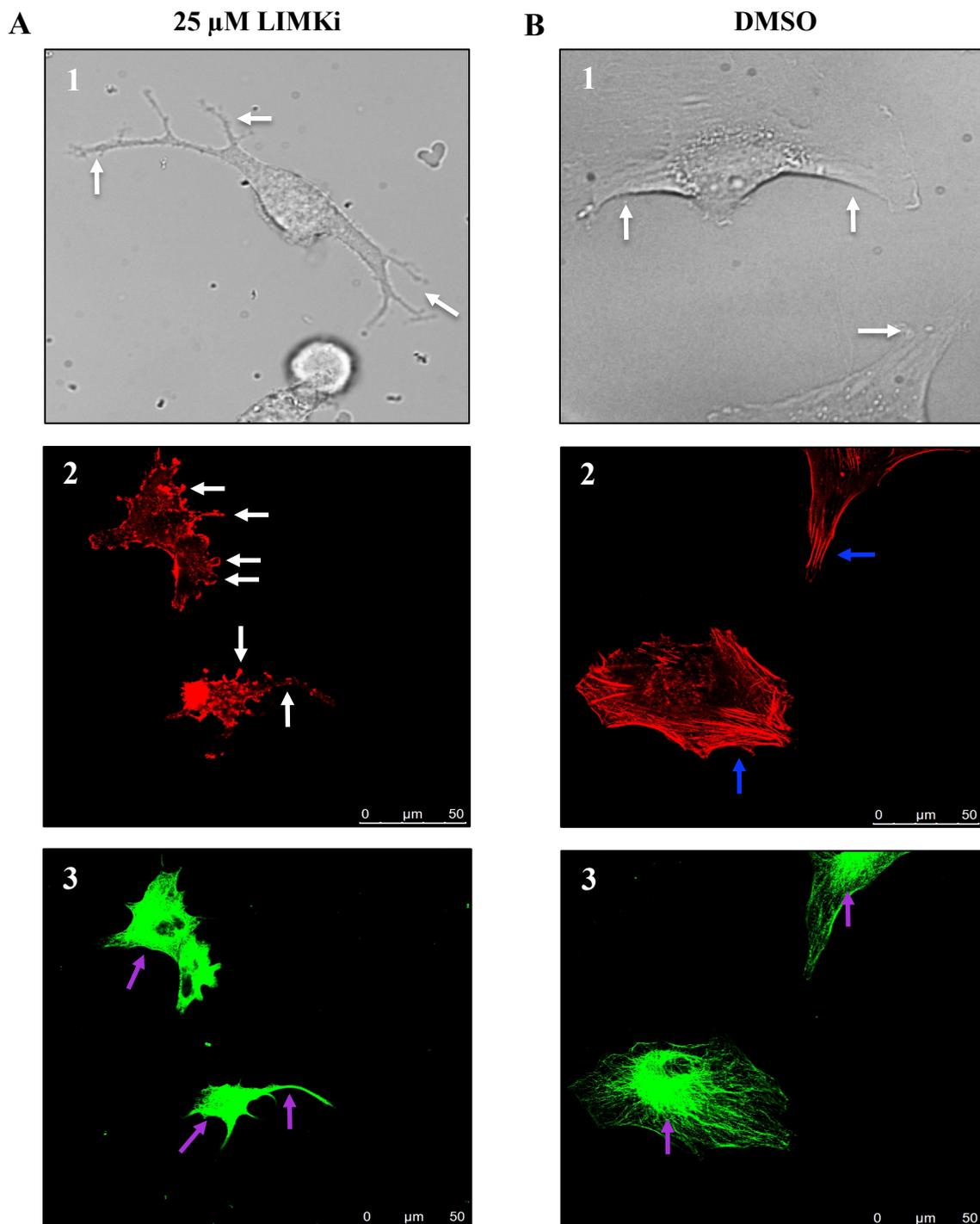


Abbildung 76: *Stellate cell*-Phänotyp unter LIMK-Inhibition. A1 bzw. B1 zeigen DIC-Aufnahmen, A2-3 bzw. B2-3 CLSM-Aufnahmen von U87-Glioblastomzellen. Die Darstellung von Aktin (rot) und Tubulin (grün) erfolgte wie in Abb. 75 beschrieben.

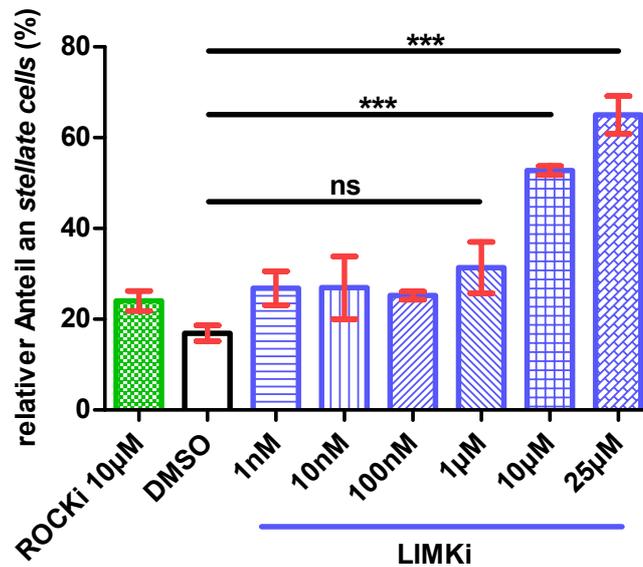
(A) Unter 25 μ M LIMKi weisen die Zellen einen Verlust an Aktin-Stressfasern, zahlreiche dünne F-Aktin-reiche Membranausstülpungen (weiße Pfeile), Zellkörper und -fortsätze ausfüllende Mikrotubuli (violette Pfeile) sowie eine verringerte Zellgröße auf.

(B) Mit DMSO behandelte Zellen weisen dagegen zahlreiche Stressfasern (blaue Pfeile), eine polygonale Zellform mit wenigen breiten Zellfortsätzen (weiße Pfeile) sowie v.a. im Zellkörper lokalisierte Mikrotubuli (violette Pfeile) auf. Zellfortsätze enthalten dagegen kaum Mikrotubuli.

(C) Quantitative Analyse des Anteils an *stellate cells*. Für jede Bedingung wurde die Morphologie von mindestens 150 Zellen analysiert (polygonale vs. *stellate cell*), n = 3.



C



LIMK- und ROCK-Inhibition führen beide zu charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie, die unter LIMK-Inhibition jedoch wesentlich stärker ausgeprägt sind. Insbesondere unter LIMKi kommt es zu einem *stellate cell*-Phänotyp, der durch den Verlust von Aktin-Stressfasern, die Retraktion der Zellmembran sowie die Ausbildung von Membranprotrusionen definiert ist (Rosso et al. 2007; Rodnight et al. 2013). Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein, die den Einfluss von Y-27632 auf die Zellmorphologie beschreiben (Manning et al. 2000; Abe et al. 2003; Salhia et al. 2005; Racchetti et al. 2012). Interessanterweise zeigen mit BMS-5 behandelte Zellen nun einen vergleichbaren Phänotyp. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse möglicherweise auf eine stabilisierende Wirkung von LIMKi auf das Mikrotubuli-Netzwerk hin (s. Abb. 75B und Abb. 76A3). Dieser Effekt wurde bereits von Prudent et al. beschrieben, die den LIMKi Pyr1 untersuchten (Prudent et al. 2012). Ross-Macdonald et al. und Scott et al. beschreiben dagegen, dass das Mikrotubuli-Netzwerk unter BMS-5 völlig unbeeinflusst bleibt (Ross-Macdonald et al. 2008; Scott et al. 2010). Mögliche molekulare Mechanismen, die den beschriebenen zellmorphologischen Veränderungen unter dem Einfluss der verschiedenen Inhibitoren zugrunde liegen, werden später diskutiert (s. 6.3).

5.4.4 Migration und Invasion unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren

Die Motilität von Tumorzellen unterliegt dem Einfluss der Rho-GTPasen: Die Dichotomie zwischen amöboider und mesenchymaler Motilität wird dabei durch die unterschiedliche Aktivität des RhoA/ROCK-Signalweges bzw. des Rac/PAK-Signalweges bedingt (Sahai et al. 2003; Sadok et al. 2014). Unter dem Einfluss bestimmter Umgebungsfaktoren können Tumorzellen ihr Bewegungsmuster wechseln (Sanz-Moreno et al. 2008; Parri et al. 2010), wobei über die Bedeutung der RhoA/ROCK-vermittelten amöboiden Motilität in Gliomzellen bislang nur wenig bekannt ist (Fortin Ensign et al. 2013). Glioblastome infiltrieren das umliegende Gewebe überwiegend in Form einzelner, mesenchymaler Zellen (Friedl et al. 2003), ein Vorgang, der vor allem durch den Rac/PAK-Signalweg vermittelt wird (Yamazaki et al. 2009). Die Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges ist dagegen wahrscheinlich mit einer verminderten Migration der Gliomzellen assoziiert (Fortin Ensign et al. 2013).

Im nächsten Schritt wurde nun der Einfluss von LIMKi und ROCKi auf das Migrations- bzw. Invasionsverhalten von Glioblastomzellen untersucht.

5.4.4.1 2D-Zellmigration unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren

Der Versuch ermöglicht die Analyse der Zellmotilität durch Erfassung von Einzelzellbewegungen und Rekonstruktion einer Migrationssequenz (s. 4.7.6). Dafür erfolgte die Kultivierung von U87-Glioblastomzellen in einer Mikrotiterplatte, die 30-minütige Vorinkubation mit LIMKi, ROCKi bzw. DMSO und schließlich die 12 h-Aufnahme von Zellbewegungen in kontinuierlicher Gegenwart der Inhibitoren bzw. von DMSO. Im Anschluss wurden die zurückgelegte Distanz (Acc.Dist.), die Distanz zwischen Anfangs- und Endposition (Or.Dist.), die Geschwindigkeit sowie die Direktionalität der Zellen quantifiziert und ausgewertet (s. Abb. 40).

Interessanterweise zeigen mit LIMKi behandelte Zellen ein völlig anderes Bewegungsmuster als die Zellen der DMSO-Kontrolle (s. Abb. 77). Es kommt zur raschen Aus- und Rückbildung von Membranprotrusionen, ein Vorgang, der mit den Ergebnissen der immunzytochemischen Analyse korrespondiert (s. 5.4.3). Trotz des veränderten Bewegungsmusters unter Inhibitorbehandlung zeigt sich jedoch weder unter ROCKi noch unter LIMKi ein Einfluss auf Acc./Or.Dist., Geschwindigkeit oder Direktionalität der Glioblastomzellen (s. Abb. 78 und Abb. 79).

Studien, die bereits den Einfluss von ROCKi und LIMKi auf die Motilität verschiedener Zellen untersucht haben, liefern bislang widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich eines pro-

bzw. antimigratorischen Effekts der Inhibitoren (Bhowmick et al. 2004; Salhia et al. 2005; Zohrabian et al. 2009; Deng et al. 2010; Scott et al. 2010; Park et al. 2014). Die Einordnung der Ergebnisse dieser Studie wird daher später diskutiert (s. 6.3).

Abbildung 77: Bewegungsmuster einer U87-Glioblastomzelle. Zwischen den DIC-Aufnahmen liegen jeweils 20 min. **(A)** Unter 25 μM LIMKi kommt es zur raschen Aus- und Rückbildung zahlreicher Membranprotrusionen. Man erkennt globuläre Auftreibungen an den Protrusionsspitzen (Pfeile). **(B)** Unter DMSO bildet die Zelle nur langsam wenige Zellfortsätze aus.

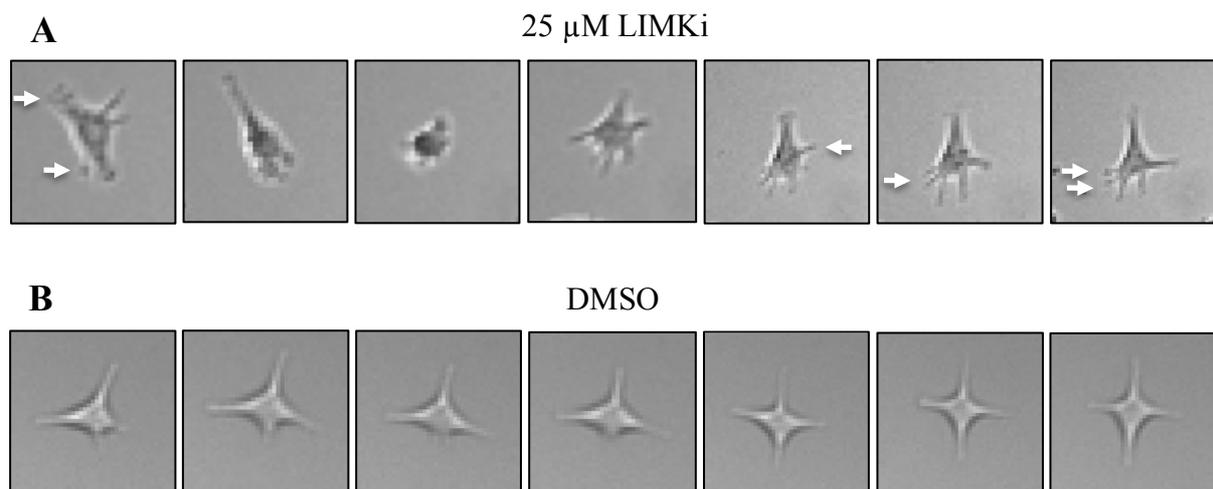


Abbildung 78: 2D-Migrationsverlauf von U87-Glioblastomzellen. Orientation (Rose) Plots zeigen den 2D-Migrationsverlauf (Bewegung entlang der x-/y-Achse) von 65 untersuchten Einzelzellen auf. **(A)** 25 μM LIMKi, **(B)** DMSO, **(C)** 10 μM ROCKi. Unter Inhibitorbehandlung zeigt sich ein mit der DMSO-Kontrolle vergleichbarer Bewegungsverlauf.

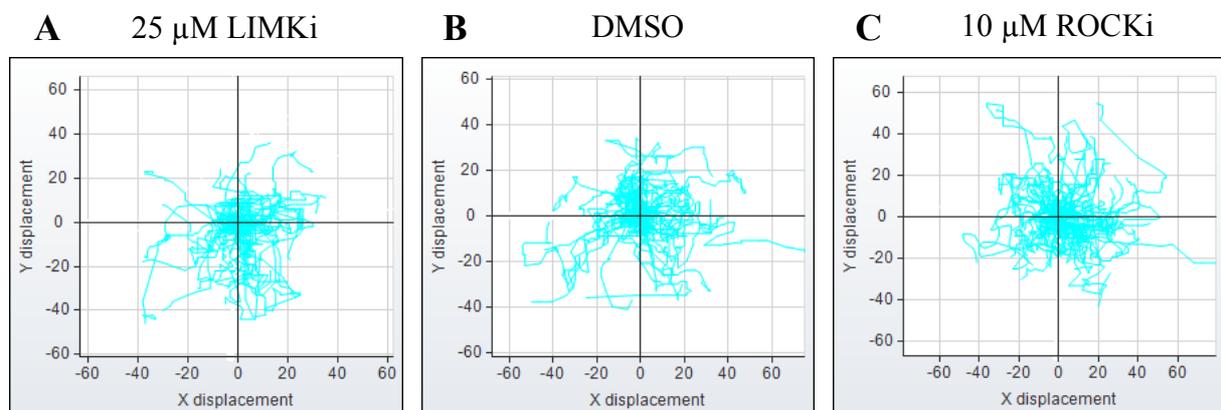
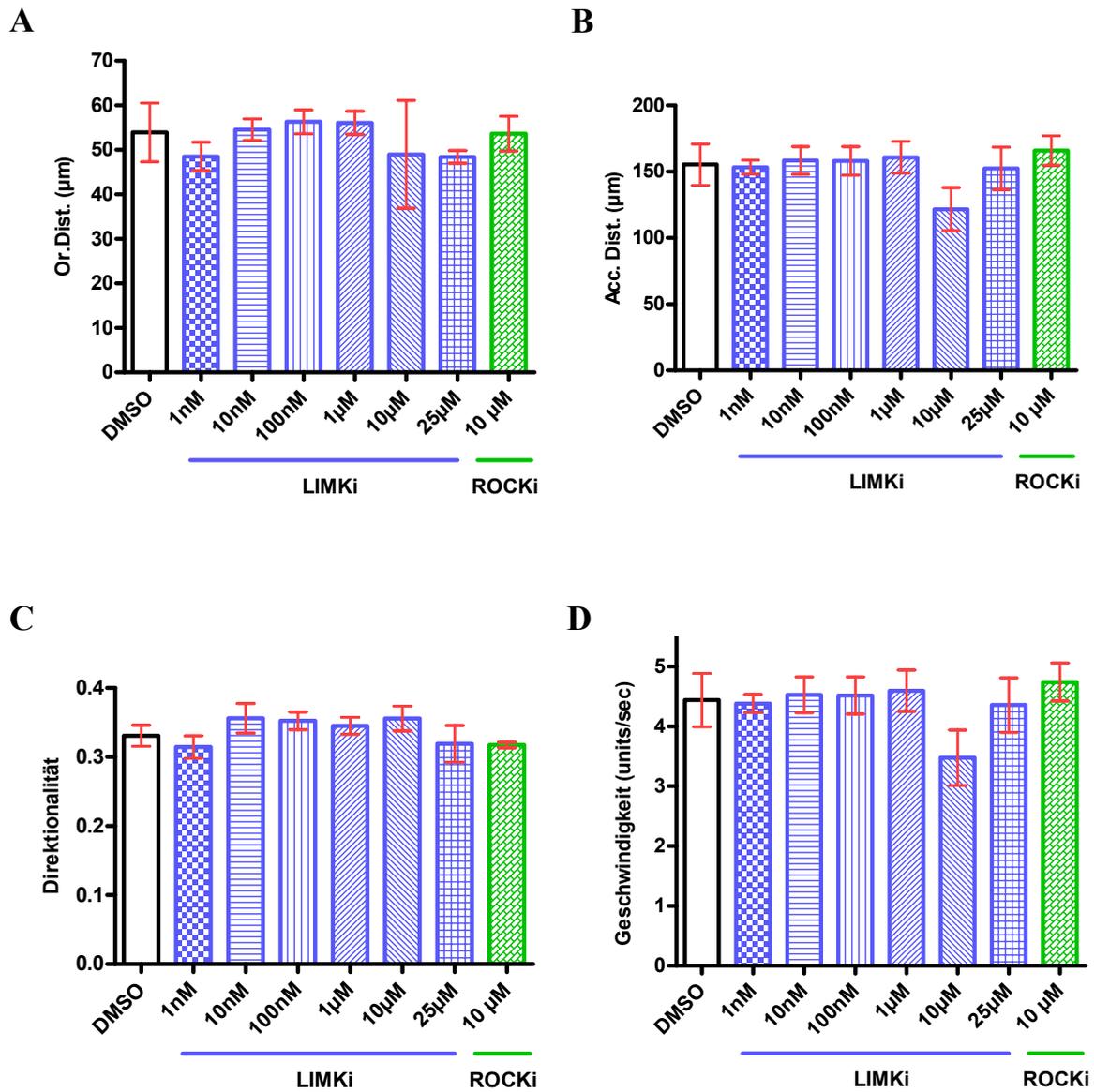


Abbildung 79: 2D-Migrationsanalyse von U87-Glioblastomzellen. Gezeigt werden (A) Or.Dist., (B) Acc.Dist., (C) Direktionalität und (D) Geschwindigkeit der Zellen unter LIMKi, ROCKi bzw. DMSO (n = 3). Zur Berechnung der verschiedenen Parameter siehe Abb. 40. Es ergeben sich keine Unterschiede zwischen Zellen, die mit LIMKi bzw. ROCKi behandelt wurden, und den Zellen der DMSO-Kontrolle.



5.4.4.2 3D-Zellinvasion unter ROCK- und LIMK-Inhibitoren

Unter LIMK- bzw. ROCK-Inhibition konnten starke Veränderungen der Zellmorphologie aufgezeigt werden, die überraschenderweise keinen Einfluss auf das 2D-Migrationsverhalten der Glioblastomzellen hatten. Da dreidimensionale Modelle stärker den Bedingungen *in vivo* entsprechen als vergleichbare 2D-Ansätze (Schmeichel et al. 2003; Kim 2005), wurde im nächsten Schritt die Beeinflussung der Zellmotilität in einer 3D-Matrigel™-Invasions-Kammer untersucht.

Für den Versuch wurden die Tumorzellen mit den verschiedenen Inhibitoren bzw. DMSO behandelt und anschließend in das obere Kompartiment der Invasions-Kammer überführt. Das Erreichen des unteren Kompartiments, das den Chemoattraktor EGF enthält, erfordert nun sowohl die Degradation des Matrigels als auch die Passage der Membranporen. Nach 24 h wurden nicht-invasive Zellen an der Membranoberseite entfernt und die transmigrierten Zellen an der Membranunterseite mit DAPI gefärbt und automatisiert gezählt (s. 4.7.7).

Interessanterweise zeigt sich sowohl unter 10 µM LIMKi als auch unter 10 µM ROCKi eine signifikante Zunahme der Anzahl an transmigrierten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Der Effekt von ROCKi fällt dabei im Vergleich zu LIMKi etwas schwächer aus und ist möglicherweise auf eine kompensatorische Aktivierung des Rac/PAK-Signalweges zurückzuführen (s. 5.4.2). Darüber hinaus lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Konzentration des LIMKi und der Anzahl an transmigrierten Zellen nachweisen. Bei 10 µM erreicht die Zellzahl ihr Maximum und fällt bei 25 µM wieder ab, ein Effekt, der möglicherweise auf das Erreichen eines optimalen Phospho-Cofilin/Cofilin-Verhältnisses bei 10 µM LIMKi zurückzuführen ist, das sich bei 25 µM wieder ungünstig verschiebt (s. Abb. 80).

Da die Ergebnisse einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Phospho-Cofilin/Cofilin-Verhältnis und dem Invasionsverhalten von Glioblastomzellen nahe legen (s. 6.3), wurde im Verlauf der Einfluss von ROCKi und LIMKi auf weitere Glioblastom-Zelllinien untersucht, die sich durch unterschiedliche Phospho-Cofilin/Cofilin-Verhältnisse auszeichnen (s. 5.1). Interessanterweise steigert die LIMK-Inhibition der Zelllinie DBTRG, die eine ähnlich starke Phosphorylierung von Cofilin wie U87 aufweist, ebenfalls das invasive Potential der Gliomzellen. Unter ROCKi zeigen sich keine signifikanten Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Die Glioblastom-Zelllinien GBM6840, GBM2603 und U343, die sich im Vergleich zu U87 und DBTRG durch eine deutlich geringere Phosphorylierung von Cofilin auszeichnen, zeigen

im Gegensatz dazu eine deutlich verminderte Invasion unter LIMKi. Darüber hinaus lässt sich auch unter ROCK-Inhibition ein anti-invasiver Effekt nachweisen, der jedoch im Vergleich zur LIMK-Inhibition etwas schwächer ausfällt.

Abbildung 80: 3D-Invasionsanalyse von U87-Glioblastomzellen. (A) Quantifizierung der Anzahl transmigrierter Zellen unter Inhibitor- bzw. DMSO-Behandlung (n = 2). Repräsentative DAPI gefärbte Membranen der Matrigel™-Invasions-Kammer nach Behandlung der Zellen mit (B) DMSO, (C) 10 µM ROCKi bzw. (D) ansteigenden Konzentrationen LIMKi. Einzelheiten siehe Text.

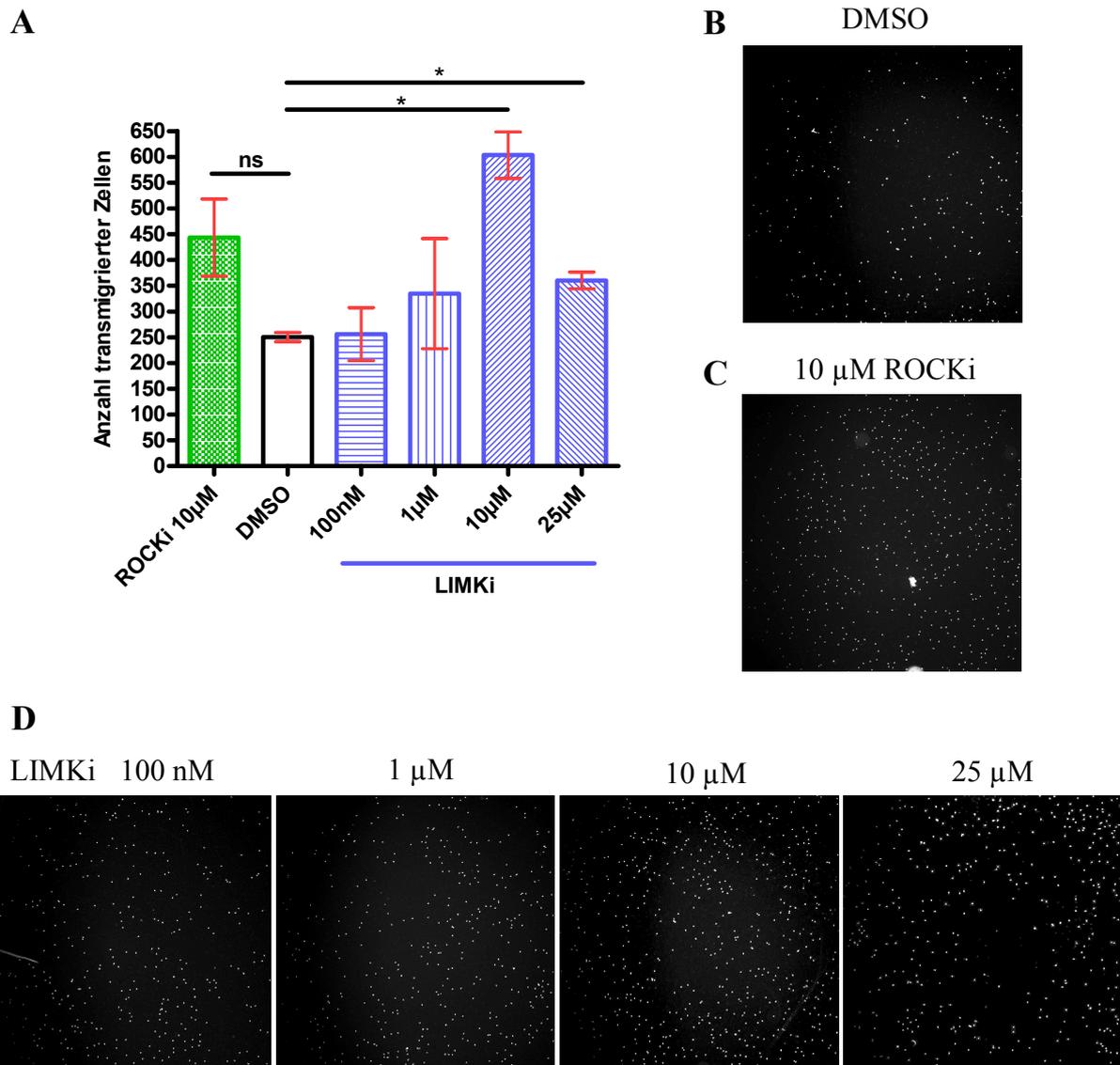
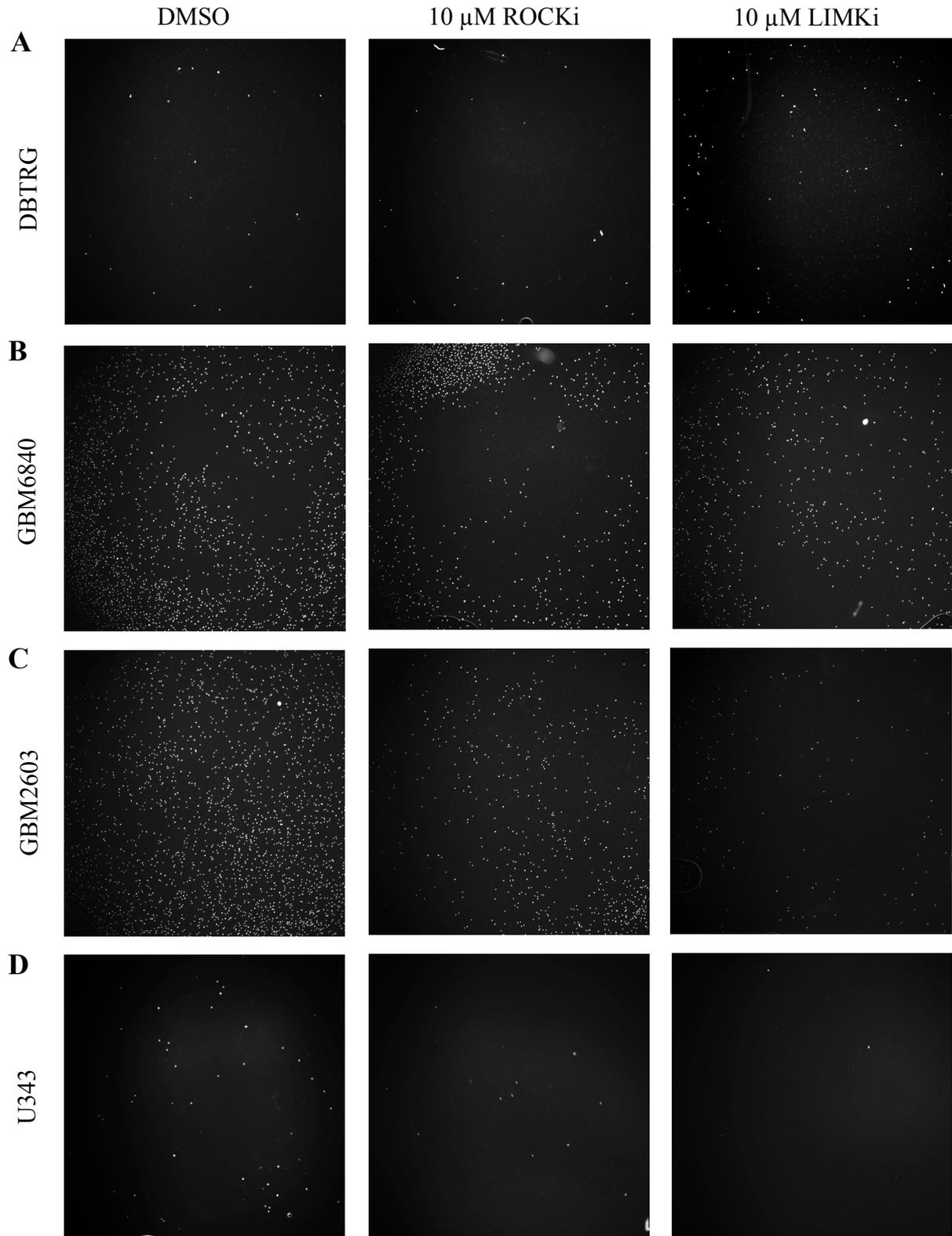


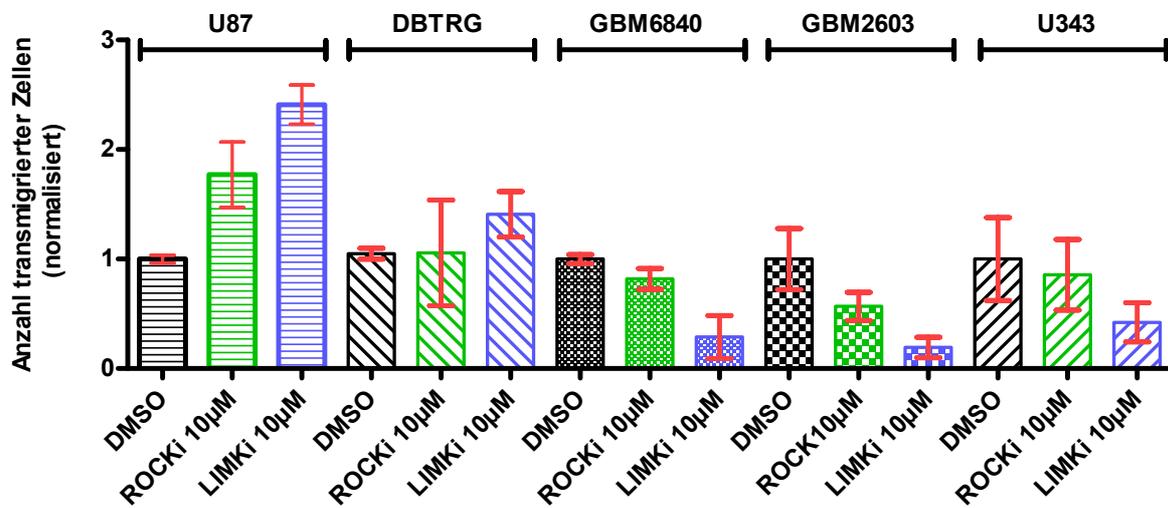
Abbildung 81: 3D-Invasionsanalyse verschiedener Glioblastom-Zelllinien.

(A)-(D) Repräsentative DAPI gefärbte Membranen der Matrigel™-Invasions-Kammer nach Behandlung der Zellen mit DMSO, 10 µM ROCKi bzw. 10 µM LIMKi. Die jeweilige Zelllinie ist angegeben.

(E) Quantifizierung der Anzahl transmigrierter Zellen unter Inhibitor- bzw. DMSO-Behandlung (n = 2). Um die Effekte besser vergleichen zu können, wurde die Zellzahl auf die jeweilige DMSO-Kontrolle normalisiert. ROCK- bzw. LIMK-Inhibition haben auf DBTRG eine proinvasive, auf GBM6840, GBM2603 sowie U343 eine anti-invasive Wirkung.



E



Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich die Auswirkungen der LIMK- bzw. ROCK-Inhibition je nach behandelter Glioblastom-Zelllinie unterscheiden: Während sich das invasive Potential von U87 und DBTRG unter Inhibitorbehandlung verstärkt, haben LIMKi und ROCKi eine anti-invasive Wirkung auf GBM6840-, GBM2603- und U343-Glioblastomzellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zum Einfluss von LIMK- und ROCK-Inhibitoren auf humane Glioblastom-Zelllinien werden vor dem Hintergrund der bisher widersprüchlichen Studienlage (Salhia et al. 2005; Zohrabian et al. 2009; Deng et al. 2010; Park et al. 2014) später diskutiert (s. 6.3).

5.4.5 Zusammenfassung: Einfluss von ROCK- und LIMK-Inhibitoren auf Glioblastomzellen

Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse zur Wirkung von LIMK- und ROCK-Inhibitoren auf maligne Gliomzellen festhalten:

- LIMK- und ROCK-Inhibitoren haben bis zu einer Konzentration von 10 μM keinen Einfluss auf die Viabilität von U87-Glioblastomzellen, ab 25 μM zeigt sich ein geringer zytotoxischer Effekt.
- BMS-5 führt zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der Cofilin-Phosphorylierung in U87, die Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leicht-Kette (MLC) von Myosin II beeinflusst es hingegen nicht.
- Der ROCK-Inhibitor Y-27632 hat bis 10 μM nur einen geringen Effekt auf die Phosphorylierung von Cofilin und MLC in U87, möglicherweise aufgrund von Rac-vermittelten antagonistischen Effekten.
- LIMK- und ROCK-Inhibition führen zu einer starken Veränderung der Zellmorphologie von U87: Es kommt zum Verlust von Aktin-Stressfasern sowie zur Ausbildung von Membranprotrusionen. Das Ausmaß der zellmorphologischen Veränderungen korreliert dabei mit der applizierten Inhibitor-Konzentration. Während dieser Effekt für Y-27632 bereits dokumentiert ist, beschreibt die vorliegende Studie nach unserem Kenntnisstand erstmalig die Induktion eines *stellate cell*-Phänotyps unter LIMK-Inhibition.
- Die 2D-Motilität von U87 wird durch LIMK- und ROCK-Inhibition nicht beeinflusst.
- LIMK- und ROCK-Inhibition haben dagegen einen bedeutenden Einfluss auf die 3D-Motilität verschiedener Glioblastomzellen: Je nach behandelter Glioblastom-Zelllinie zeigt sich eine pro- bzw. anti-invasive Wirkung unter BMS-5 und Y-27632. Dieser scheinbare Widerspruch kann möglicherweise durch das unterschiedliche Aktivitätsniveau von Cofilin in den verschiedenen Zelllinien erklärt werden: Während sich das invasive Potential von Zelllinien mit hohem Phospho-Cofilin-Anteil unter Inhibitorbehandlung verstärkt, haben LIMKi und ROCKi eine anti-invasive Wirkung auf Glioblastom-Zelllinien mit geringer Cofilin-Phosphorylierung.

6. DISKUSSION

6.1 Der Cofilin-Signalweg in astrozytären Gliomen

Im Rahmen von genomweiten Expressions- und Sequenzierungsprojekten konnten in den letzten Jahren verschiedene Alterationen von Schlüsselsignalwegen identifiziert werden, die mit der Genese und Progression maligner Gliome assoziiert sind (Cancer Genome Atlas Research 2008; Parsons et al. 2008; Brennan et al. 2013; Frattini et al. 2013). Eine entscheidende Rolle spielen u.a. Veränderungen des RTK/Ras/PI3K-Signalweges, die über die Rho-GTPasen einen unmittelbaren Einfluss auf die Zellmigration bzw. -invasion haben.

Die diffuse Dissemination von Gliomzellen in das umgebende Hirngewebe limitiert die therapeutischen Möglichkeiten und bedingt maßgeblich die schlechte Prognose dieser Erkrankung (Holland 2000; Giese et al. 2003). Die Entwicklung neuer anti-invasiver Therapieansätze erfordert daher ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Invasion maligner Gliomzellen zugrunde liegen.

Der Cofilin-Signalweg ist von zentraler Bedeutung für die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts (Bernstein et al. 2010; Mizuno 2013), wobei die Polymerisation von Aktin und die Aktin-Myosin-vermittelte Kontraktilität die treibende Kraft der Zellmotilität darstellen (Pollard et al. 2003; Bugyi et al. 2010; Wiggan et al. 2012).

Die Bedeutung von Cofilin und seiner Regulatorproteine, die die Phosphorylierung und damit die Aktivität von Cofilin bestimmen, wurde in malignen Gliomen bislang nur unzureichend untersucht. Erste Studien konnten eine gesteigerte Expression der Cofilin-Kinase LIMK-2 sowie einen Verlust der Cofilin-Phosphatase Chronophin in Glioblastomzellen nachweisen und damit eine Dysregulation des Cofilin-Signalweges in malignen Gliomen aufzeigen (Fedorchenko 2009; Schulze 2015).

Die molekularen Mechanismen, die dem Verlust von Chronophin in Glioblastomen zugrunde liegen, sowie der Einfluss von neu verfügbaren LIMK-Inhibitoren auf die Migration und Invasion maligner Gliomzellen wurden bislang nicht untersucht und bildeten die zentralen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.

Zunächst wurde die Expression von Chronophin sowie die Phosphorylierung von Cofilin in verschiedenen humanen Glioblastom-Zelllinien (s. 4.1.1) im Vergleich zu murinen Astrozyten (NMA) untersucht (s. 5.1). Interessanterweise ließ sich in allen untersuchten primären Glioblastom-Zelllinien (U87, U138, U343) eine deutlich verminderte Expression von

Chronophin nachweisen, die gleichzeitig mit einer linearen Zunahme der Cofilin-Phosphorylierung assoziiert war.

Im Gegensatz zu den primären Glioblastom-Zelllinien wiesen sowohl die untersuchten pädiatrischen Glioblastom-Zelllinien (GBM6840, GBM2603) als auch die sekundäre Glioblastom-Zelllinie DBTRG eine höhere Expression von Chronophin auf. Die detektierte Cofilin-Phosphorylierung reihte sich allerdings nicht in den invers linearen Zusammenhang der primären Glioblastom-Zelllinien ein, wobei insbesondere DBTRG trotz hoher Chronophin-Expression eine hohe Cofilin-Phosphorylierung aufwies.

Ursächlich könnte eine verstärkte Aktivität der Cofilin-Kinasen sein, die die Wirkung von Chronophin antagonisieren (s. 1.1.5). Untersuchungen von DBTRG nach shRNA-vermittelter Chronophin-Repression zeigen nur schwache Veränderungen der Cofilin-Phosphorylierung auf und unterstreichen damit den geringen Einfluss von Chronophin auf die Cofilin-Phosphorylierung dieser Zelllinie (Schulze 2015; Schulze et al. 2015).

Die Ergebnisse verdeutlichen die molekulare Heterogenität der verschiedenen Glioblastom-Subgruppen (s. 1.1.3) und lassen keine allgemeinen Rückschlüsse auf die Bedeutung von Chronophin für die Phosphorylierung von Cofilin in humanen Glioblastom-Zelllinien zu.

Im nächsten Schritt wurde die Expression von Cofilin, Chronophin und LIMK-2 im Rahmen einer umfassenden immunhistochemischen Analyse humaner astrozytärer Gliome unterschiedlichen Malignitätsgrades untersucht.

Interessanterweise konnte eine inverse Korrelation zwischen der Chronophin-Expression und dem Malignitätsgrad der Gliome aufgezeigt werden, wobei sich insbesondere in Glioblastom-Proben eine hochsignifikante Verminderung der Chronophin-Expression nachweisen ließ. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Erkenntnissen bisheriger Untersuchungen (Fedorchenko 2009; Schulze 2015) und zeigen einen Verlust von Chronophin in humanen Glioblastomen auf.

Im Gegensatz dazu nahm die Expression von Cofilin und Phospho-Cofilin mit steigendem Malignitätsgrad signifikant zu. Diese Ergebnisse stimmen mit den immunhistochemischen Untersuchungen von Nagai et al. überein, die ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der Expression von Cofilin und dem Malignitätsgrad astrozytärer Gliome nachweisen konnten (Nagai et al. 2011). Bei der Analyse der Cofilin-Expression muss allerdings die erhöhte Hintergrundfärbung (v.a. in AZ III und GBM) berücksichtigt werden, die die Validität der semiquantitativen Auswertung mindert.

Bedeutend sind darüber hinaus die Erkenntnisse, die die Untersuchung des Phospho-Cofilin/Cofilin-Quotienten aufzeigt, der einen genaueren Aufschluss über die Aktivität von Cofilin gibt. Interessanterweise verändert sich die Phosphorylierung von Cofilin nur zwischen Grad I- und Grad II-Tumoren und bleibt zwischen Grad II-IV-Tumoren trotz sinkender Chronophin-Expression nahezu unverändert. Möglicherweise markiert dieses Verhältnis zwischen aktivem und inaktivem Cofilin eine optimale Cofilin-Aktivität, die sowohl die Formation neuer Aktinfilamente für die Ausbildung invasiver Zellfortsätze zulässt, als auch den Aufbau kontraktile Kräfte über bereits vorhandene Aktinfilamente ermöglicht. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Erkenntnisse von Yap et al., wobei insbesondere Glioblastomzellen mit einer intermediären Cofilin-Expression eine maximale Beweglichkeit aufweisen (Yap et al. 2005).

Diese Überlegungen werden jedoch dadurch eingeschränkt, dass sowohl die Expression als auch die Phosphorylierung von Cofilin nur begrenzt Aufschluss über die tatsächliche Cofilin-Aktivität geben. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen könnte beispielsweise die Formation freier Aktin-Plusenden mit Hilfe von Fluoreszenz-markiertem G-Aktin bestimmt werden, die ein unmittelbares Maß für die Cofilin-Aktivität darstellt (Bravo-Cordero et al. 2013).

Die Ergebnisse werfen zusätzlich die Frage auf, weshalb die Phosphorylierung von Cofilin trotz sinkender Chronophin-Expression nicht noch weiter zunimmt. Denkbar wäre eine kompensatorisch verminderte Aktivität der Cofilin-Kinasen. In der immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich jedoch eine nahezu unverändert hohe Expression von LIMK-2 zwischen den verschiedenen Tumorgraden. Eine mögliche Erklärung liefern Untersuchungen auf mRNA-Ebene (Fedorchenko 2009) und *in silico*-Analysen der TCGA-Datenbank (Schulze et al. 2015), die eine Verminderung der Expression von LIMK-1 in astrozytären Gliomen Grad II-IV nachweisen konnten. Auch in diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass alleinige Analysen der LIMK-Expression nur bedingt die Aktivität der Kinasen widerspiegeln, die durch zahlreiche aktivierende und inhibitorische Faktoren reguliert wird (s. 1.3.2).

Daneben bleibt die Bedeutung einer weiteren Verminderung der Chronophin-Expression in höhergradigen Gliomen unklar, die die Phosphorylierung von Cofilin nicht zusätzlich beeinflusst. Eine mögliche Erklärung könnten Versuche mit Chronophin-depletierten

GBM6840-Zellen liefern, die eine verminderte Expression des Wachstumsfaktors VEGF aufzeigen (Schulze et al. 2015). VEGF fördert einerseits die Proliferation, inhibiert andererseits jedoch die Invasion von Tumorzellen (Jain et al. 2007; Lu et al. 2012). Ein weiterer Verlust von Chronophin trägt daher möglicherweise zu einem gesteigerten invasiven Potential höhergradiger Gliome bei.

Interessant sind zudem die Ergebnisse der Untersuchung perivaskulärer, Tumor-infiltrierender T-Lymphozyten (TIL) (s. 5.2.3), die ähnlich wie Glioblastomzellen einen hohen Anteil an Phospho-Cofilin, bei gleichzeitig niedriger Chronophin- und hoher LIMK-2-Expression aufwiesen. Expressionsanalysen von Cofilin und seiner Regulatorproteine in astrozytären Gliomen (s. 5.2.2) sowie 3D-Zellinvasions-Versuche von Glioblastom-Zelllinien (Schulze 2015; Schulze et al. 2015) legen eine Assoziation zwischen dem hohen invasiven Potential von Glioblastomzellen und dem für sie beschriebenen Aktivitätsmuster des Cofilin-Signalweges nahe. Möglicherweise sind ähnliche molekulare Aktivitätsmuster für die Extravasation und Infiltration von perivaskulären TIL verantwortlich. Diese Überlegungen werden durch verschiedene Studien unterstützt, die Parallelen zwischen der Tumorzell- und Leukozytenmigration aufzeigen (Entschladen et al. 2000; Strell et al. 2008).

Um die Bedeutung dieser Überlegungen für Tumorzell- und Lymphozytenmigration im Allgemeinen klären zu können, sind jedoch weiterführende Studien nötig. Einerseits müssten Lymphozyten im nicht-neoplastischen Gewebe untersucht werden, um mögliche Einflüsse des umgebenden Tumorgewebes auf die Lymphozyten auszuschließen. Andererseits wäre eine vergleichende Untersuchung von infiltrierenden und nicht-infiltrierenden Lymphozyten erforderlich, um Rückschlüsse unmittelbar auf den Prozess der Extravasation und Infiltration ziehen zu können.

6.2 Chronophin: Welche Ursachen führen zum Verlust in Glioblastomen ?

Western Blot und immunhistochemische Analysen haben insbesondere in primären Glioblastom-Zelllinien sowie in Glioblastom-Gewebeproben einen Verlust von Chronophin aufgezeigt.

Sequenzierungsanalysen des Chronophin-Locus (s. 5.3.1) und Analysen des Methylierungsstatus des Chronophin-Promotors (s. 5.3.2) sollten genetische und epigenetische Alterationen identifizieren, die möglicherweise dem Verlust von Chronophin zugrunde liegen.

Die pädiatrischen und sekundären Glioblastom-Zelllinien wiesen im Gegensatz zu den primären Glioblastom-Zelllinien keine verminderte Chronophin-Expression auf, sodass erwartungsgemäß weder Veränderungen der Nukleotidsequenz noch des epigenetischen Musters detektiert werden konnten. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Kruse et al. und Di Tomaso et al. überein, die im Rahmen der Karyotypisierung von DBTRG bzw. GBM6840 keine strukturellen Veränderungen von Chromosom 22 nachweisen konnten (Kruse et al. 1992; Di Tomaso et al. 2000). Sehr kleine Veränderungen der Nukleotidsequenz werden jedoch bei der Karyotypisierung, die nur große Duplikationen bzw. Deletionen im Bereich von 5 bis 10 Megabasen feststellen kann, leicht übersehen, sodass Punktmutationen erst nun durch die Sequenzierungsanalyse, die eine Basen-genaue Auflösung des Chronophin-Locus dieser Zelllinien ermöglicht, sicher ausgeschlossen werden können.

Methylierungs- und Sequenzierungsanalysen konnten jedoch auch in den primären Glioblastom-Zelllinien, die eine deutlich verminderte Chronophin-Expression aufwiesen, keine Alterationen nachweisen. Clark et al., die das Genom von U87 sequenzierten, konnten ebenfalls keine Mutationen im Bereich des Chronophin-Locus dieser Zelllinien detektieren (Clark et al. 2010). Möglicherweise sind andere Mechanismen wie die bereits erwähnte Translationsinhibition bzw. mRNA-Degradation durch microRNA (s. 1.2.3) für den Chronophin-Verlust der primären Glioblastom-Zelllinien verantwortlich.

Genetische und epigenetische Untersuchungen von Glioblastom-Gewebeproben, die durch eine hochsignifikante Verminderung der Chronophin-Expression gekennzeichnet waren, konnten jedoch einen möglichen Pathomechanismus aufzeigen: Während die Sequenzierungsanalyse keine Mutationen im Bereich des Chronophin-Locus identifizieren konnte, wiesen alle untersuchten Glioblastom-Proben eine signifikante Hypermethylierung des Chronophin-Promotors auf. Parallele Analysen von Normalhirnproben des Temporal- und

Frontallappens sowie *in silico*-Analysen verschiedener Großhirnareale von Spendern ohne neoplastische ZNS-Erkrankung konnten dagegen keine DNA-Methylierung im Bereich des Chronophin-Promotors detektieren (s. 5.3.2).

In silico-Analysen von 288 Glioblastom-Proben der TCGA-Datenbank deckten darüber hinaus den Methylierungsstatus der verschiedenen molekularen Glioblastom-Subtypen auf (s. 5.3.2). Dabei konnte vor allem im klassischen Subtyp, der sich durch eine tendenziell geringere Chronophin-Expression und eine schlechte Prognose auszeichnet, eine Hypermethylierung im Bereich des Chronophin-Promotors nachgewiesen werden.

Zahlreiche Studien der letzten Jahre unterstreichen die Bedeutung epigenetischer Alterationen für die Initiation und Progression maligner Gliome (s. 1.2.4). Die Hypermethylierung des Chronophin-Locus ist daher möglicherweise ein Schlüsselmechanismus, der den Verlust von Chronophin in malignen Gliomen erklären könnte. Berücksichtigt werden muss jedoch, dass bislang keine validen Cut-off-Werte existieren, unterhalb denen trotz DNA-Methylierung eine Transkription erfolgen kann (Riemenschneider et al. 2010). Darüber hinaus gibt die verwendete Methode keinen genauen Aufschluss über das Methylierungsmuster einzelner CpG-Dinukleotide, sondern erlaubt nur allgemeinere Aussagen über den Methylierungsstatus größerer DNA-Regionen (Malzkorn et al. 2011). Einzelne CpG-Dinukleotide könnten mit Hilfe von *Sanger*- oder *Pyrosequencing* analysiert werden (Malzkorn et al. 2011), die zwar ähnlich wie die initial durchgeführte *Methylation-specific PCR* (MSP) auch auf der vorherigen Bisulfit-Konversion beruhen, jedoch die Verwendung methylierungsunabhängiger Primer erlauben und daher möglicherweise einfacher durchzuführen sind.

Die Ergebnisse werfen zusätzlich die Frage auf, weshalb verschiedene Glioblastom-Zelllinien anders als Glioblastom-Gewebeproben keinen Verlust von Chronophin aufweisen. Eine mögliche Antwort liefern die Erkenntnisse der epigenetischen Analyse, wobei zwar in GBM-Gewebeproben nicht jedoch in GBM-Zelllinien eine Hypermethylierung des Chronophin-Promotors detektiert werden konnte.

Ähnliche Ergebnisse beschreiben Saferali et al., die unterschiedliche Methylierungsmuster zwischen primären Zellen und davon abgeleiteten, immortalisierten Zelllinien feststellen konnten. Die Methylierung bestimmter DNA-Abschnitte ging dabei in den Zelllinien verloren. Ursächlich könnte die Reaktivierung von Genen sein, die anders als *in vivo* nun *in vitro* einen Wachstumsvorteil mit sich bringt (Saferali et al. 2010).

Interessant erscheinen in diesem Zusammenhang die Ergebnisse verschiedener Versuche mit

Chronophin-depletierten GBM6840-Zellen bzw. Chronophin-reexprimierenden U87-Zellen, die *in vivo* eine verminderte bzw. gesteigerte Proliferation der Glioblastomzellen aufzeigen (Schulze et al. 2015). Eine mögliche Erklärung für die verminderte Proliferation in Folge des Chronophin-Verlustes liefern Versuche mit einer inaktiven Chronophin-Mutante (CIN-D25N), die einen verzögerten Ablauf der Mitose-Phasen dokumentieren (Gohla et al. 2005). Darüber hinaus führt die Depletion von Chronophin wie bereits beschrieben zu einer verminderten Expression des Wachstumsfaktors VEGF in GBM6840-Zellen (Schulze et al. 2015). Eine epigenetische Inaktivierung von Chronophin könnte demnach auch *in vitro* einen antiproliferativen Effekt auf Glioblastomzellen haben und einen Wachstumsnachteil darstellen. Diese Überlegungen erklären möglicherweise die nicht detektierbare Hypermethylierung und Reexpression von Chronophin in den entsprechenden Glioblastom-Zelllinien.

Der monoallelische Verlust von Chromosom 22 ist mit der Initiation und Progression maligner Gliome assoziiert (Ino et al. 1999; Oskam et al. 2000; Nakamura et al. 2005; Laigle-Donadey et al. 2006) und stellt einen weiteren Mechanismus dar, der einem Verlust von Chronophin, das auf 22q12.3 lokalisiert ist, zugrunde liegen könnte. Im Rahmen einer Vorstudie zur LOH-Analyse des Chronophin-Locus gelang die Identifikation eines Mikrosatelliten-Markers im Chronophin-Intron (s. 5.3.3). Weiterführende Untersuchungen korrespondierender Blut- und Tumorproben könnten nun genaueren Aufschluss über die Assoziation zwischen Chronophin und dem für Glioblastome typischen Verlust von Chromosom 22 geben.

Möglicherweise könnte der monoallelische Verlust des Chronophin-Locus im Rahmen eines LOH, der nicht durch die Sequenzierungsanalyse festgestellt werden kann, die verminderte Chronophin-Expression der primären Glioblastom-Zelllinien erklären.

Übereinstimmend mit der *two-hit hypothesis* von Knudson könnte darüber hinaus eine Kombination genetischer und epigenetischer Aberrationen für die Inaktivierung von Chronophin in den GBM-Gewebeproben verantwortlich sein (Knudson 2001). Nakamura et al. konnten beispielsweise den monoallelischen Verlust sowie die epigenetische Inaktivierung des verbleibenden Allels von TIMP-3 in sekundären Glioblastomen aufzeigen (Nakamura et al. 2005). Ein entsprechender Pathomechanismus könnte ebenfalls dem Verlust von Chronophin zugrunde liegen.

Der Verlust von Chronophin, der vermutlich zumindest teilweise auf epigenetischen Inaktivierungsmechanismen beruht, könnte zudem im Rahmen neuer epigenetischer Therapien aufgehoben werden (s. 1.2.5). Epigenetische Therapien maligner Gliome umfassen derzeit vor allem HDAC-Inhibitoren, die Alterationen im Bereich von Histon-Modifikationen entgegenwirken (Nagarajan et al. 2009). Daneben stehen jedoch auch Wirkstoffe zur Verfügung, die die Hypermethylierung des Chronophin-Locus durch Inhibition von DNMT verhindern könnten. Weiterführende Analysen würden jedoch geeignete *in vivo*-Modelle erfordern, da die untersuchten GBM-Zelllinien keine epigenetischen Alterationen aufwiesen und sich deshalb für entsprechende Versuche vermutlich nicht eignen.

Berücksichtigt werden müssen darüber hinaus die Erkenntnisse zum inversen Einfluss von Chronophin auf Invasion und Proliferation von Gliomzellen (Schulze et al. 2015). So könnte die Reexpression von Chronophin im Rahmen einer epigenetischen Therapie zwar anti-invasiv wirken, jedoch gleichzeitig die Proliferation der Gliomzellen steigern. Epigenetische Therapieansätze müssten daher zusätzlich mit einer anti-proliferativen Therapie kombiniert werden. Ein vergleichbares, initial beschriebenes Modell stellt beispielsweise die Kombination des Zytostatikums Doxorubicin mit dem anti-invasiven Wirkstoff Imipraminblau dar (Munson et al. 2012).

Darüber hinaus könnte sich die Hypermethylierung des Chronophin-Locus möglicherweise als neuer epigenetischer Marker eignen (s. 1.2.5), da der Verlust von Chronophin und damit vermutlich auch die Promotorhypermethylierung vor allem ein Charakteristikum hochmaligner Glioblastome darstellen. Diese Überlegungen müssten durch epigenetische Analysen astrozytärer Gliome unterschiedlichen Malignitätsgrades verifiziert werden.

6.3 LIM-Kinasen: Neue Angriffspunkte in der Therapie maligner Gliome ?

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung konnte im Vergleich zum Normalgewebe eine deutlich gesteigerte Expression der Cofilin-Kinase LIMK-2 in den Tumorproben nachgewiesen werden (s. 5.2.1.4). Die LIM-Kinasen nehmen eine Schlüsselposition in der Regulation der Cofilin-Aktivität ein und prägen damit entscheidend die zelluläre Motilität.

Im Folgenden wurde daher der Einfluss des neu verfügbaren LIMK-Inhibitors BMS-5 (LIMKi) auf die Migration und Invasion maligner Gliomzellen untersucht.

Erste Studien dokumentieren bereits die Bedeutung von LIMKi für die Proliferation und Invasion von Mammakarzinomzellen (Scott et al. 2010; Li et al. 2013) und eine kürzlich erschienene Studie beschreibt erstmals Auswirkungen auf maligne Gliomzellen (Park et al. 2014).

Neben LIMKi wurde gleichzeitig der ROCK-Inhibitor Y-27632 (ROCKi) verwendet, dessen Wirkung auf maligne Gliome ebenfalls ungeklärt ist (Salhia et al. 2005; Zohrabian et al. 2009).

Für die Versuche wurde zunächst die Glioblastom-Zelllinie U87 verwendet, die sich durch eine hohe Phospho-Cofilin-Expression auszeichnet und sich daher besonders für die Inhibitor-Versuche eignete (s. 5.1).

Zunächst wurde der Einfluss von LIMKi und ROCKi auf die Zellviabilität untersucht, wobei bis 10 μM keine zytotoxischen Effekte nachgewiesen werden konnten (s. 5.4.1). Ross-Macdonald et al. beschreiben übereinstimmend mit diesen Ergebnissen erst ab 10 μM einen antiproliferativen Effekt von LIMKi und führen diesen auf die Destabilisierung von Mikrotubuli zurück (Ross-Macdonald et al. 2008).

Studien, die den Einfluss von ROCKi auf die Zellviabilität untersuchen, liefern widersprüchliche Erkenntnisse, die möglicherweise auf die Verwendung verschiedener Analysemethoden bzw. unterschiedlicher Zelllinien zurückzuführen sind. Einerseits wird ein starker antiproliferativer bzw. Apoptose-induzierender Effekt des Inhibitors bei Konzentrationen zwischen 20 und 30 μM beschrieben (Zohrabian et al. 2009; Deng et al. 2010), andererseits wird bei Konzentrationen bis 100 μM keine zytotoxische Wirkung nachgewiesen (Salhia et al. 2005).

Im Folgenden wurde der Einfluss von LIMKi und ROCKi auf den Phosphorylierungsstatus von Cofilin und MLC untersucht (s. 5.4.2). Interessanterweise zeigte sich unter 10 μM ROCKi nur eine geringe Veränderung der Cofilin-Phosphorylierung. Ursächlich könnte die reaktiv verstärkte Aktivierung des Rac/PAK-Signalweges sein, die die Effekte von ROCKi auf die LIM-Kinasen und Cofilin antagonisieren könnte. Diese Überlegungen stimmen mit den Ergebnissen von Salhia et al. überein, die eine Rac-Aktivierung unter Y-27632 detektieren konnten (Salhia et al. 2005).

Unter LIMKi zeigte sich dagegen eine konzentrationsabhängige Verminderung der Cofilin-Phosphorylierung. In Bezug auf die Cofilin-Phosphorylierung scheint daher der LIMKi dem ROCKi überlegen zu sein, da die unmittelbare Inhibition der LIM-Kinasen vermutlich nicht durch die reaktive Aktivierung des Rac/PAK-Signalweges umgangen werden kann. Eine Verminderung der Cofilin-Phosphorylierung unter höheren ROCKi-Konzentrationen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Eine reaktiv verstärkte Aktivierung des Rac/PAK-Signalweges unter ROCKi könnte beispielsweise durch Analysen der Rac- bzw. Cdc42-vermittelten Autophosphorylierung von PAK überprüft werden (Chong et al. 2001). Interessante Ergebnisse könnte darüber hinaus die gleichzeitige Verwendung eines PAK- und ROCK-Inhibitors liefern (Rudolph et al. 2015).

Die Inhibitoren zeigen dagegen nur schwache Effekte auf die Phosphorylierung von MLC. Möglicherweise sind höhere Konzentrationen von ROCKi nötig, um die MLC-Phosphorylierung signifikant zu reduzieren. So konnten Salhia et al. erst ab 25 μM Y-27632 eine signifikante Verminderung der Phosphorylierung der Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (MLCP) feststellen (Salhia et al. 2005). Zusätzlich können die Effekte von ROCKi möglicherweise durch eine reaktive Inhibition der Rac-Signalkaskade kompensiert werden, die normalerweise die Aktivität der Myosin-Leicht-Ketten-Kinase (MLCK) hemmt und so die MLC-Phosphorylierung verringert (s. Abb. 72C).

Darüber hinaus bleibt die Phosphorylierung von MLC unter LIMKi auch bis 25 μM unverändert. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Scott et al. überein, die zwar unter ROCKi nicht jedoch unter LIMKi eine Verminderung der MLC-Phosphorylierung detektieren konnten (Scott et al. 2010). Die LIM-Kinasen haben daher vermutlich keinen unmittelbaren Einfluss auf die Myosin-vermittelte zelluläre Kontraktilität.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Inhibitoren auf die Zellmorphologie untersucht, wobei festgestellt wurde, dass sowohl die Inhibition von LIMK als auch von ROCK zu charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie führen: Beide Inhibitoren induzieren

eine elongierte Zellform, den Verlust von Stressfasern sowie die Ausbildung von F-Aktinreichen Membranausstülpungen. Zusätzlich zeigt sich unter LIMKi eine signifikante Reduktion der Zellfläche.

Insbesondere unter LIMKi kommt es zu einem *stellate cell*-Phänotyp, der durch den Verlust von Aktin-Stressfasern, die Retraktion der Zellmembran sowie die Ausbildung von Membranprotrusionen definiert ist (Rosso et al. 2007; Rodnight et al. 2013). Während für den ROCK-Inhibitor Y-27632 bereits vergleichbare Veränderungen beschrieben wurden (Manning et al. 2000; Abe et al. 2003; Salhia et al. 2005; Racchetti et al. 2012), konnte im Rahmen dieser Studie erstmals ein *stellate cell*-Phänotyp unter Einfluss des LIMK-Inhibitors BMS-5 dokumentiert werden. Der Anteil an *stellate cells* nimmt dabei mit steigenden Konzentrationen von LIMKi zu.

Die molekularen Mechanismen, die diesen zellmorphologischen Veränderungen zugrunde liegen, sind allerdings bislang wenig verstanden.

Die beschriebenen Veränderungen sind mit den Auswirkungen einer verstärkten Rac-Aktivierung vergleichbar, die zur Zellelongation und Ausbildung von Lamellipodien führt (s. 1.3.1). Verschiedene Studien erklären auf diese Weise die morphologischen Veränderungen von Astrozyten unter dem Einfluss von ROCK-Inhibitoren (Abe et al. 2003; Salhia et al. 2005; Racchetti et al. 2012).

Neuere Erkenntnisse zeigen hingegen, dass die Ausbildung der beschriebenen Membranprotrusionen wohl eher nicht auf der Neuf ormation von Zellfortsätzen, sondern auf der Retraktion der Zellmembran und der lokal verzögerten Rückbildung fokaler Adhäsionen beruht (Rodnight et al. 2013).

Frühere Studien belegen zudem eine Assoziation zwischen der Induktion eines *stellate cell*-Phänotyps und der verminderten Phosphorylierung von MLC bzw. Cofilin (Baorto et al. 1992; Padmanabhan et al. 1998). Die kompensatorische Aktivierung des Rac/PAK-Signalweges hätte jedoch, genau wie die Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges, eine verstärkte Phosphorylierung von Cofilin zur Folge. Die Effekte des Rac/PAK- bzw. RhoA/ROCK-Signalweges auf die Phosphorylierung von MLC sind dagegen divergent, wobei eine verminderte MLC-Phosphorylierung mit einer verstärkten Rac-Aktivierung vereinbar wäre. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch die Induktion eines *stellate cell*-Phänotyps unter ROCKi und LIMKi ohne wesentliche Veränderungen der MLC-Phosphorylierung aufgezeigt werden. Entscheidend scheint dagegen eher die verminderte Phosphorylierung von Cofilin zu sein, die sowohl durch ROCKi als auch durch LIMKi vermittelt wurde.

Die Bedeutung der veränderten Cofilin-Aktivität für die Induktion des *stellate cell*-Phänotyps wird außerdem durch zwei weitere Ergebnisse gestützt: Die LIMK-Inhibition hatte einerseits keinen Einfluss auf die MLC-Phosphorylierung und führte dennoch zu den beschriebenen morphologischen Veränderungen. Andererseits führte LIMKi zu einer ausgeprägteren Verminderung der Cofilin-Phosphorylierung als ROCKi und beeinflusste gleichzeitig die Zellmorphologie wesentlich stärker.

Die LIM-Kinasen sind gemeinsames Zielprotein der Rho-GTPasen, daher können die morphologischen Veränderungen unter LIMKi anders als bei ROCKi nicht durch eine kompensatorische Aktivierung des Rac-Signalweges erklärt werden. Möglicherweise liegt der Induktion eines *stellate cell*-Phänotyps vielmehr die Dysregulation der Cofilin-Aktivität zugrunde, die sowohl durch Veränderungen der Rac/PAK- als auch der RhoA/ROCK-Aktivität verursacht werden kann. Berücksichtigt man die verstärkte Depolymerisation von F-Aktin im Rahmen der zellmorphologischen Veränderung, legt dies vermutlich eine verstärkte Aktivität von Cofilin nahe, die eher Ausdruck einer verminderten Rac/PAK- bzw. RhoA/ROCK-Aktivität ist.

Die beschriebenen Überlegungen werden jedoch dadurch eingeschränkt, dass bei Cofilin nicht spezifisch die Phosphorylierung von Serin 3 untersucht wurde und darüber hinaus jeweils nur eine Betrachtung des gesamten zellulären Phosphorylierungsstatus von MLC und Cofilin erfolgte. Möglicherweise spielt aber die lokale, räumlich koordinierte Aktivierung bzw. Inaktivierung dieser Schlüsselproteine eine zentrale Rolle für die Induktion des *stellate cell*-Phänotyps.

Außerdem könnten die beschriebenen Effekte auch auf die veränderte Aktivität bislang unbekannter Zielproteine der Inhibitoren zurückzuführen sein.

Interessant ist darüber hinaus, dass Scott et al. keinerlei morphologische Veränderungen von Mammakarzinomzellen unter BMS-5 nachweisen konnten (Scott et al. 2010).

Neben der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts liegt vermutlich eine Umstrukturierung des Mikrotubuli-Netzwerks den beschriebenen zellmorphologischen Veränderungen zugrunde (John et al. 2004; Salhia et al. 2005; Favero et al. 2007; Racchetti et al. 2012).

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben nun Hinweise auf einen Mikrotubuli-stabilisierenden Effekt von LIMKi (s. 5.4.3). Die Stabilisation von Mikrotubuli ist mit einer Zellelongation assoziiert (Friedl et al. 2010), ein Effekt, der ebenfalls im Rahmen der Untersuchungen beobachtet werden konnte.

Der Einfluss der LIMK-Inhibition auf das Mikrotubuli-Netzwerk ist bislang unklar. Einerseits beschreiben Ross-Macdonald et al. und Scott et al., dass das Mikrotubuli-Netzwerk unter BMS-5 völlig unbeeinflusst bleibt (Ross-Macdonald et al. 2008; Scott et al. 2010). Untersuchungen von Prudent et al. dokumentieren andererseits einen Mikrotubuli-stabilisierenden Effekt unter dem LIMK-Inhibitor Pyr1 (Prudent et al. 2012). Letzteres wird wiederum durch folgende Erkenntnisse gestützt: Gorovoy et al. zeigten, dass die LIM-Kinasen nicht nur die Polymerisation von F-Aktin durch Inaktivierung von Cofilin koordinieren, sondern auch die Destabilisation von Mikrotubuli vermitteln und dadurch die Formation kontraktile Stressfasern ermöglichen (Gorovoy et al. 2005). Ursächlich könnte die LIMK-vermittelte Phosphorylierung und Inaktivierung von *p25/tubulin polymerization promoting protein* (TPPP) sein, das normalerweise die Polymerisation von Mikrotubuli vermittelt (Acevedo et al. 2007). Die Inaktivierung der LIM-Kinasen durch LIMKi würde folglich zur Reaktivierung von TPPP führen und somit die Stabilisation von Mikrotubuli bewirken (Prudent et al. 2012).

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von LIMKi und ROCKi auf die Migration und Invasion von Glioblastomzellen untersucht (s. 5.4.4).

Interessanterweise zeigten sich trotz eines veränderten Bewegungsmusters unter Inhibitorbehandlung weder unter ROCKi noch unter LIMKi ein Einfluss auf die zurückgelegte Distanz, Geschwindigkeit oder Direktionalität der Glioblastomzellen.

Dagegen hatten ROCKi und LIMKi einen bedeutenden Einfluss auf das invasive Potential der Tumorzellen: Während sich das invasive Potential von Zelllinien mit hohem Phospho-Cofilin-Anteil unter Inhibitorbehandlung verstärkt, haben LIMKi und ROCKi eine anti-invasive Wirkung auf Glioblastom-Zelllinien mit geringer Cofilin-Phosphorylierung.

Diese Ergebnisse werfen zunächst die Frage auf, weshalb die Inhibitoren zwar einen starken Einfluss auf die Zellbewegung in 3D nicht jedoch in 2D haben.

Vergleichbare Ergebnisse wurden von Scott et al. beschrieben, die unter der BMS-5-vermittelten Inhibition von LIMK und folglich Aktivierung von Cofilin keinen Einfluss auf die 2D-Motilität, jedoch eine konzentrationsabhängige Inhibition der 3D-Invasion von MDA-MB-231-Zellen nachweisen konnten (Scott et al. 2010). Klemke et al. zeigten, dass die Inaktivierung von Cofilin zu einer verminderten Migration von T-Zellen in 3D, nicht jedoch in 2D führte (Klemke et al. 2010).

Ursächlich könnten unterschiedliche molekulare Mechanismen sein, die die 2D- und 3D-Motilität bestimmen. So beruht die 2D-Motilität von T-Zellen vermutlich primär auf der Aktin-Myosin-vermittelten Kontraktion, während die 3D-Motilität der Zellen maßgeblich durch die Formation von Lamellipodien geprägt wird (Klemke et al. 2010). In Tumorzellen beeinflussen Veränderungen der Cofilin-Aktivität daher möglicherweise hauptsächlich die Ausbildung invasiver Zellfortsätze und weniger die zelluläre Kontraktilität. Scott et al. postulierten, dass die LIM-Kinasen eine zentrale Rolle für die Ausbildung und Stabilisation von Invadopodien und daher für die Degradation der extrazellulären Matrix (*path generation*) und weniger für die bloße zelluläre Motilität (*path following*) spielen (Scott et al. 2010).

Die These, dass unterschiedliche Mechanismen für die 2D- bzw. 3D-Motilität verantwortlich sind, wird darüber hinaus durch Untersuchungen von Tang et al. gestützt, die einerseits eine gesteigerte 3D-Invasion, andererseits eine verminderte 2D-Migration von Plattenepithelkarzinomzellen nach Inaktivierung des *SCAR/WAVE Regulatory Complex* (WRC) belegen konnten (Tang et al. 2013).

Diesen Überlegungen stehen verschiedene Studien entgegen, in denen dennoch eine verminderte bzw. erhöhte 2D-Migration von Tumorzellen unter ROCKi (Salhia et al. 2005; Zohrabian et al. 2009; Deng et al. 2010) bzw. LIMKi (Li et al. 2013; Park et al. 2014) festgestellt werden konnte. Diese Beobachtungen können möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien, Analysemethoden und Inhibitorkonzentrationen erklärt werden, zeigen jedoch gleichzeitig die Notwendigkeit weiterer Studien auf, um den Einfluss von ROCKi bzw. LIMKi auf die Motilität von Tumorzellen abschließend zu klären.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, weshalb ROCKi bzw. LIMKi auf manche Glioblastom-Zelllinien eher eine proinvasive auf andere dagegen eher eine anti-invasive Wirkung haben. Eine mögliche Erklärung beruht auf der bereits erwähnten Annahme, dass kein linearer Zusammenhang zwischen der Cofilin-Aktivität und der Tumorzellinvasion besteht, also eine verstärkte Cofilin-Phosphorylierung durch eine gesteigerte LIMK-Expression nicht unmittelbar mit einer höheren Invasivität gleichzusetzen ist (Scott et al. 2010). Vielmehr bestimmt das Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem Cofilin maßgeblich das invasive Potential der Tumorzellen (Oser et al. 2009; van Rheenen et al. 2009), wobei vermutlich eine intermediäre Cofilin-Aktivität mit einer optimalen Tumorzellinvasion assoziiert ist (Yap et al. 2005). Abhängig von der basalen Cofilin-Aktivität können möglicherweise bereits kleine Änderungen der LIMK- und damit der Cofilin-Aktivität zu

einer Steigerung bzw. Verminderung der Tumorzellinvasivität führen, je nachdem, ob sich das Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem Cofilin einem optimalen Verhältnis nähert oder sich davon entfernt (Scott et al. 2010). Diese Überlegungen werden durch zwei Beobachtungen gestützt:

BMS-5 hat einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Invasivität von U87-Zellen. Während bei 10 μM ein Maximum an transmigrierten Zellen erreicht wird, fällt die Zellzahl bei 25 μM wieder ab. Dieser Effekt könnte allerdings auch auf der leichten Zytotoxizität von LIMKi bei 25 μM beruhen. Ursächlich könnte darüber hinaus die deutlich reduzierte Zellfläche von U87-Zellen bei 25 μM LIMKi sein, die mit einer geringeren Zelladhäsion und daher einer weniger effektiven Kontraktilität einhergeht.

Die Bedeutung einer intermediären Cofilin-Aktivität wird darüber hinaus jedoch auch durch die Untersuchung verschiedener GBM-Zelllinien untermauert:

In Zelllinien mit niedriger Cofilin-Basalaktivität (hohem Phospho-Cofilin-Anteil) (U87, DBTRG) führen ROCK- bzw. LIMK-Inhibition zu einer intermediären Cofilin-Aktivität und damit zu einer erhöhten Invasivität. In Zelllinien, die bereits eine hohe Cofilin-Basalaktivität (niedrigen Phospho-Cofilin-Anteil) aufweisen (GBM6840, GBM2603, U343), entfernt sich das Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem Cofilin unter ROCKi bzw. LIMKi dagegen weiter von einem intermediären Verhältnis. Folge ist eine verminderte Invasivität.

Die Effekte von ROCKi bzw. LIMKi auf die Invasivität von Gliomzellen hängen daher vermutlich maßgeblich von der basalen Cofilin-Aktivität bzw. von der unterschiedlichen Aktivität der Cofilin-Kinasen und -phosphatasen der jeweiligen Zelllinie ab.

Diese Überlegungen liefern einerseits eine Erklärung für die derzeit widersprüchliche Studienlage zur Wirkung von ROCKi auf Gliomzellen (Salhia et al. 2005; Zohrabian et al. 2009; Deng et al. 2010) und relativieren andererseits die Erkenntnisse von Park et al., die kürzlich eine Verminderung der Invasion von U87- und T98G-Glioblastomzellen unter BMS-5 postulierten (Park et al. 2014).

Die molekularen Mechanismen von Tumorzellmigration und -invasion werden bislang nur unzureichend verstanden. Die Gefahr, die die pharmakologische Beeinflussung dieses komplexen Gleichgewichtes birgt, wird durch Untersuchungen von Li et al. unterstrichen, wobei die Inhibition der LIM-Kinasen *in vitro* zwar zu einer verminderten Migration und Invasion von 4T1.2- und MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen führte, *in vivo* jedoch mit einer gesteigerten Tumorzell-Metastasierung assoziiert war (Li et al. 2013).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen das mögliche Potential von LIMK-Inhibitoren in der Therapie maligner Gliome auf, betonen darüber hinaus jedoch die hohe Heterogenität dieser Tumorentität und warnen daher gleichzeitig vor einem unkritischen Einsatz.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Das invasive Potential maligner Gliome beeinflusst maßgeblich die schlechte Prognose dieser Tumorentität. Migration und Invasion von Tumorzellen werden entscheidend durch die Cofilin-vermittelte Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts geprägt, die durch die Aktivität antagonistischer Cofilin-Kinasen und -Phosphatasen reguliert wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein progressiver Expressionsverlust der Cofilin-Phosphatase Chronophin mit ansteigendem Malignitätsgrad astrozytärer Gliome aufgezeigt werden, der mit einer Zunahme der Phosphorylierung von Cofilin einhergeht. In den entsprechenden Gewebeproben gelang gleichzeitig der Nachweis einer gesteigerten Expression der Cofilin-Kinase LIMK-2.

Genetische und epigenetische Analysen des Chronophin-Locus konnten eine Hypermethylierung im Bereich der Promotorregion der Phosphatase identifizieren, die möglicherweise dem Verlust von Chronophin in Glioblastom-Gewebeproben zugrunde liegt. In Glioblastom-Zelllinien, die unterschiedliche Expressionsmuster von Chronophin aufwiesen, konnten hingegen keine molekularen Alterationen festgestellt werden.

Untersuchungen des Einflusses von ROCK- und LIMK-Inhibitoren auf Glioblastomzellen konnten ausgeprägte Veränderungen der Zellmorphologie dokumentieren, wobei erstmals die Induktion eines *stellate cell*-Phänotyps unter Einfluss des LIMK-Inhibitors BMS-5 beschrieben wird. Während ROCK- und LIMK-Inhibitoren keinen Einfluss auf die 2D-Motilität der Tumorzellen hatten, wiesen die Glioblastomzellen in Abhängigkeit ihrer basalen Cofilin-Aktivität eine verstärkte bzw. verminderte 3D-Invasivität auf.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit unterstreichen die Bedeutung des Cofilin-Signalweges für die Migration und Invasion von Gliomzellen, zeigen neue Angriffspunkte in der Therapie maligner Gliome auf und warnen zugleich vor einem unkritischen Einsatz neuer Wirkstoffe.

8. SUMMARY

The invasive potential of malignant gliomas is the main reason for the dismal prognosis of this tumor entity. Migration and invasion of tumor cells is crucially determined by the cofilin-dependent reorganization of the actin cytoskeleton regulated by the activity of antagonistic cofilin kinases and phosphatases.

This study revealed a progressive loss of expression of the cofilin phosphatase chronophin with increasing malignancy grade of astrocytic glioma, accompanied by an increase of cofilin phosphorylation. Moreover, the analyzed glioma specimens were characterized by a simultaneous increase of expression of the cofilin kinase LIMK-2.

Integrated genetic and epigenetic analysis of the chronophin locus identified an aberrant promoter methylation as a possible mechanism leading to chronophin down-regulation in glioblastoma tissue samples. In contrast, molecular alterations of the chronophin locus were undetectable in glioblastoma cell lines characterized by different chronophin expression levels.

Analysis of glioblastoma cells demonstrated striking effects of ROCK and LIMK inhibitors on cell morphology, providing first evidence of the induction of a *stellate cell*-phenotype by the LIMK inhibitor BMS-5. While ROCK and LIMK inhibitors had no detectable effect on the 2D-motility of the tumor cells, the inhibitors increased or decreased the 3D-invasiveness of the glioma cells depending on their basal cofilin activity.

The findings of this study stress the importance of the cofilin signaling pathway as a key regulator of glioma migration and invasion, indicate novel targets for glioma therapy, but also warn against a noncritical use of new drugs.

9. ABKÜRZUNGEN

ABC	avidin biotin complex
Acc.Dist.	accumulated traveled distance, zurückgelegte Distanz
ADF	actin depolymerizing factor
ADP	Adenosindiphosphat
Amp ^r	Ampicillin-Resistenzgen
Arp	actin-related protein
ATP	Adenosintriphosphat
AZ I	pilozytisches Astrozytom
AZ II	diffuses Astrozytom
AZ III	anaplastisches Astrozytom
BCA	bicinchoninic acid
BMPRII	bone morphogenic protein receptor II
BMS	Bristol-Myers Squibb
bp	base pair(s)
BSA	bovine serum albumin
C/EBP β	CCAAT/enhancer-binding protein beta
CD	cluster of differentiation
Cdc42	cell division control protein 42 homolog
CDKN	cyclin-dependent kinase inhibitor
CDS	coding DNA sequence
CFL	Cofilin
CGI	CpG-Insel
CHI3L1	Chitinase-3-like protein 1
CIB1	calcium- and integrin-binding protein 1
CIN	Chronophin, s.a. PDXP
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
CREB	cAMP response element-binding protein
CT	Computertomographie
Ct	cycle threshold
D-PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
D2HG	D-2-Hydroxyglutarat
DAB	3,3'-Diaminobenzidin

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAPK	death-associated protein kinase
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DIC	differential interference contrast
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EC50	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
EMP3	epithelial membrane protein 3
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetal calf serum
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	normale Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G-CIMP	glioma-CpG island methylator phenotype
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAPs	GTPase-activating proteins
GBM	Glioblastoma multiforme
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitors
GDP	Guanosindiphosphat
GEFs	guanine nucleotide exchange factors
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GPCRs	G protein-coupled receptors
GSTP1	glutathione S-transferase P
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray (=1 J/kg)
HAD	haloacid dehalogenase
HDAC	Histon-Deacetylasen

HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	horseradish peroxidase
Hsp90	heat shock protein 90
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IDH	Isocitrate dehydrogenase
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	kilo base pair(s)
Ki	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
LATS	large tumor suppressor kinase
LB	lysogeny broth
LEGI	local excitation, global inhibition
LIMK	LIM (Lin-11/Isl-1/Mec-3) domain kinase
LIMKi	LIMK-Inhibitor BMS-5
LOH	loss of heterozygosity
LOI	loss of imprinting
LZTR1	Leucine-zipper-like transcriptional regulator 1
MAGE-A1	Melanoma-associated antigen-A1
MBDs	methyl-CpG-binding domain proteins
MCRD	minimal common regions of deletion
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
miR	microRNA
MLC(P)/(K)	myosin-light-chain (phosphatase) / (kinase)
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSP	methylation-specific pcr
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF1	neurofibromin 1
NMA	normal mouse astrocyte
Nurr1	nuclear receptor related-1 protein
OD	optische Dichte
OLIG-2	Oligodendrocyte transcription factor 2

Or.Dist.	distance from origin, Distanz zwischen Anfangs- und Endposition
ORF	open reading frame
P-Cofilin	Phospho-Cofilin
P-MLC	phospho-myosin-light-chain
P2A	Rundheit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	p21-activated kinases
PAR	protease activated receptor
PBS	phosphate-buffered saline
PCDH- γ -A11	protocadherin- γ subfamily A11
PcG	Polycomb-Gruppe
PCR	polymerase chain reaction
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor alpha
PDXP	pyridoxal 5'-phosphate phosphatase, s.a. CIN
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKD	Proteinkinase-Domäne
PLC β	Phospholipase C β
PLP	pyridoxal 5'-phosphate
PP1/PP2A	Protein phosphatase 1 / 2A
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RB1	retinoblastoma 1
ReSeq	Resequenzierung
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid
Rnf6	ring finger protein 6
ROCK	Rho-associated coiled-coil kinases
ROCKi	ROCK-Inhibitor Y-27632
RTKs	receptor tyrosine kinases
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
Sat2	tandem repeat satellite 2
SDS	sodium dodecyl sulfate

S.E.M.	standard error of the mean
SFKs	Src family kinases
shRNA	small hairpin RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SOB	super optimal broth
SOC	super optimal broth with catabolite repression
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1
SRC	steroid receptor co-activator
SSH	slingshot protein phosphatase
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
STR	short tandem repeat
Ta	annealing temperature
TAE	Tris-Acetate-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TB	terrific broth
TBE	Tris-Borate-EDTA
TBS(-T)	Tris-buffered saline (and Tween-20)
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TESKs	testicular protein kinases
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TIMP-3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
Tm	melting temperature
TPPP	p25/tubulin polymerization promoting protein
TUBA4A	α 4a-Tubulin
U	enzyme unit
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettstrahlung
v/v	volume per volume
VEGF	vascular endothelial growth factor
w/v	weight per volume
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome protein
WAVE	WASP family Verprolin-homologous protein
WHO	World Health Organization
WRC	WAVE regulatory complexe

wt	wild type
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem

10. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

10.1 Tabellen

Tabelle 1:	Charakterisierung der ausgewählten Glioblastom-Zelllinien.	53
Tabelle 2:	Reaktionsansatz für die Amplifikation der Mykoplasmen-16S rRNA Gensequenz.	55
Tabelle 3:	Temperatur-Zeit-Programm.	56
Tabelle 4:	Übersicht über Art, Anzahl, Lokalisation und Subklassifikation der verwendeten FFPE-Proben.	61
Tabelle 5:	Optimierte Färbeprotokolle.	62
Tabelle 6:	Überblick über die verwendeten Primer.	66
Tabelle 7:	Überblick über die verwendeten PCR-Bedingungen.	69
Tabelle 8:	Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion.	69
Tabelle 9:	Temperatur-Zeit-Programm.	70
Tabelle 10:	Reaktionsansatz für die 3'-Adenylierung.	71
Tabelle 11:	Reaktionsansatz für die Ligation.	72
Tabelle 12:	Reaktionsansatz für die Restriktionsanalyse mit EcoRI.	78
Tabelle 13:	Reaktionsansatz für die quantitative Real-Time-PCR.	85
Tabelle 14:	Temperatur-Zeit-Programm.	86
Tabelle 15:	Überblick über den verwendeten Mikrosatellitenmarker.	88
Tabelle 16:	Reaktionsansatz für die Amplifikation des Mikrosatellitenmarkers.	88
Tabelle 17:	Temperatur-Zeit-Programm.	89
Tabelle 18:	Zusammenstellung und Bewertung der detektierten Aberrationen im Chronophin-Locus.	131
Tabelle 19:	Zusammenstellung von Ct-Werten und Methylierungsstatus der analysierten Proben.	136

10.2 Abbildungen

Abbildung 1:	Systematik maligner Gliome.	2
Abbildung 2:	MRT-Befund eines Glioblastoma multiforme.	3
Abbildung 3:	Makro- und mikroskopischer Befund eines Glioblastoma multiforme.	4
Abbildung 4:	Alterationen von GBM-Schlüsselsignalwegen.	7
Abbildung 5:	Charakteristika der Glioblastom-Subtypen.	9
Abbildung 6:	Assoziation von molekularen Markern und Überlebenszeit.	9
Abbildung 7:	Schlüsselstrukturen der Zellmigration und -invasion.	11
Abbildung 8:	Der Cofilin-Signalweg und seine Regulatorproteine.	12
Abbildung 9:	Regulation von Chronophin.	16
Abbildung 10:	LOH 22q in humanen Astrozytomen.	17
Abbildung 11:	Häufige strukturelle Chromosomenaberrationen.	18
Abbildung 12:	Epigenetische Modifikationen.	19
Abbildung 13:	Bedeutung der DNA-Methylierung für die Tumorgenese.	20
Abbildung 14:	Chemische Struktur verschiedener epigenetisch-aktiver Wirkstoffe.	23
Abbildung 15:	Rho-GTPasen regulieren die Zellmorphologie und -polarisation.	25
Abbildung 16:	Rho-GTPasen prägen die Form der Zellmotilität.	26
Abbildung 17:	Struktur und Regulation der LIM-Kinasen.	27
Abbildung 18:	Molekulare Leitstruktur wichtiger ROCK-Inhibitoren.	28
Abbildung 19:	Molekulare Leitstruktur wichtiger LIMK-Inhibitoren.	29
Abbildung 20:	Ziele der Arbeit.	32
Abbildung 21:	Darstellung der Molekularinteraktion der Labeled-Avidin-Biotin-Methode.	60
Abbildung 22:	Übersicht über Chronophin-Locus und Primer-Lokalisation.	66
Abbildung 23:	Häufige sekundäre DNA-Strukturen.	67
Abbildung 24:	Ermittlung der Annealing-Temperatur für Exon1 mittels Temperaturgradient.	68
Abbildung 25:	3'-Adenylierung und Ligation.	73
Abbildung 26:	Reaktionsmechanismus der β -Galaktosidase.	75
Abbildung 27:	Identifikation rekombinanter Klone.	76
Abbildung 28:	Vektormappe mit Insert und EcoRI-Verdau.	78
Abbildung 29:	Restriktionsfragment-Muster nach EcoRI-Verdau.	78
Abbildung 30:	Grundlagen der Bisulfit-Konversion.	81

Abbildung 31: Überblick über häufige Methoden zur DNA-Methylierungsanalyse.	82
Abbildung 32: Überblick über die Reaktionsansätze.	83
Abbildung 33: Grundlagen der quantitativen Real-Time-PCR und Struktur von SYBR Green I.	85
Abbildung 34: Überblick über die Mikrosatellitenanalyse.	90
Abbildung 35: Molekularstruktur ROCKi.	91
Abbildung 36: Molekularstruktur LIMKi.	91
Abbildung 37: Vereinfachtes Wirkschema von ROCKi bzw. LIMKi.	92
Abbildung 38: Molekularstruktur von Neutralrot.	93
Abbildung 39: Multicolor-Fluorescence-Immunostaining Technik.	94
Abbildung 40: Berechnung der Zelldynamik.	97
Abbildung 41: Aufbau der Transwell-Kammer.	98
Abbildung 42: Chronophin-Expression und Cofilin-Phosphorylierung in verschiedenen humanen Glioblastom-Zelllinien.	102
Abbildung 43: Korrelation zwischen Chronophin-Expression und Cofilin-Phosphorylierung.	102
Abbildung 44: Überblicksdarstellung von Kleinhirn und pilozytischem Astrozytom (Grad I).	104
Abbildung 45: Überblicksdarstellung von Großhirn und Glioblastoma multiforme (Grad IV).	105
Abbildung 46: Expression von Chronophin in Kleinhirn und pilozytischem Astrozytom (Grad I).	107
Abbildung 47: Expression von Chronophin in Großhirn und Glioblastoma multiforme (Grad IV).	108
Abbildung 48: Expression von Chronophin in den unterschiedlichen Regionen pilozytischer Astrozytome (Grad I).	109
Abbildung 49: Expression von Cofilin-1 in Tumor- und Normalgewebe.	111
Abbildung 50: Expression von Phospho-Cofilin in Tumor- und Normalgewebe.	113
Abbildung 51: Expression von LIMK-2 in Tumor- und Normalgewebe.	115
Abbildung 52: Analyse der Riesenzellanteile im Glioblastoma multiforme (Grad IV).	116
Abbildung 53: Expression von Chronophin in humanen astrozytären Gliomen.	119
Abbildung 54: Expression von Cofilin-1 in humanen astrozytären Gliomen.	120
Abbildung 55: Expression von Phospho-Cofilin in humanen astrozytären Gliomen.	121

Abbildung 56: Expression von LIMK-2 in pilozytischen Astrozytomen (Grad I) und Glioblastomen (Grad IV).	122
Abbildung 57: Analyse des Phospho-Cofilin/Gesamt-Cofilin Quotienten.	122
Abbildung 58: Analyse von Cofilin und seiner Regulatorproteine in perivaskulären, Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten.	124
Abbildung 59: Aufbau des Chronophin-Locus.	128
Abbildung 60: Vergleich der Sequenzierungs-Ergebnisse mit der NCBI-Nukleotid-Datenbank.	129
Abbildung 61: Reevaluation der Aberrationen im Bereich der kodierenden DNA-Sequenz.	130
Abbildung 62: <i>In silico</i> -Analyse epigenetischer Veränderungen im Bereich der Promotorregion von Chronophin.	134
Abbildung 63: Validierung der Analyse mit Hilfe von Kontroll-DNA bekannten Methylierungsgrades.	135
Abbildung 64: Analyse des Methylierungsstatus der Promotorregion des Chronophin-Locus.	137
Abbildung 65: Expression von Chronophin in Patientenproben mit unterschiedlichem Methylierungsstatus der Promotorregion.	138
Abbildung 66: Analyse der Expression und Methylierung von Chronophin in humanen Glioblastomen mit Hilfe des TCGA Data Portals.	139
Abbildung 67: Lokalisation des identifizierten Mikrosatellitenmarkers und Einordnung gegenüber bekannten Markern der <i>Généthon-Database</i> .	142
Abbildung 68: Lokalisation und Sequenz des Mikrosatellitenmarkers und der verwendeten Primer in Projektion auf den Chronophin-Locus.	143
Abbildung 69: Mikrosatellitenanalyse verschiedener Blutproben.	143
Abbildung 70: Analyse der Zytotoxizität von ROCKi und LIMKi mittels Neutralrot-Tests.	145
Abbildung 71: Analyse des Phosphorylierungsstatus von Cofilin in der Glioblastom-Zelllinie U87.	147
Abbildung 72: Analyse des Phosphorylierungsstatus von MLC in der Glioblastom-Zelllinie U87.	148
Abbildung 73: Einfluss von LIMKi bzw. ROCKi auf Zellfläche und Rundheit.	150
Abbildung 74: F-Aktin-Fluoreszenz-Intensität unter LIMK- bzw. ROCK-Inhibition.	151

Abbildung 75: Repräsentative 3D-Rekonstruktionen von U87-Glioblastomzellen unter LIMK- bzw. ROCK-Inhibition.	152
Abbildung 76: <i>Stellate cell</i> -Phänotyp unter LIMK-Inhibition.	153
Abbildung 77: Bewegungsmuster einer U87-Glioblastomzelle.	156
Abbildung 78: 2D-Migrationsverlauf von U87-Glioblastomzellen.	156
Abbildung 79: 2D-Migrationsanalyse von U87-Glioblastomzellen.	157
Abbildung 80: 3D-Invasionsanalyse von U87-Glioblastomzellen.	159
Abbildung 81: 3D-Invasionsanalyse verschiedener Glioblastom-Zelllinien.	160

11. LITERATURVERZEICHNIS

- Aaij C and Borst P: "The gel electrophoresis of DNA." *Biochim Biophys Acta* 269, no. 2 (1972): 192-200.
- Abe H, Nagaoka R and Obinata T: "Cytoplasmic localization and nuclear transport of cofilin in cultured myotubes." *Exp Cell Res* 206, no. 1 (1993): 1-10.
- Abe K and Misawa M: "Astrocyte stellation induced by Rho kinase inhibitors in culture." *Brain Res Dev Brain Res* 143, no. 1 (2003): 99-104.
- Abe K and Saito H: "Adenosine stimulates stellation of cultured rat cortical astrocytes." *Brain Res* 804, no. 1 (1998): 63-71.
- Acevedo K, Li R, Soo P, et al.: "The phosphorylation of p25/TPPP by LIM kinase 1 inhibits its ability to assemble microtubules." *Exp Cell Res* 313, no. 20 (2007): 4091-106.
- Acevedo K, Moussi N, Li R, et al.: "LIM kinase 2 is widely expressed in all tissues." *J Histochem Cytochem* 54, no. 5 (2006): 487-501.
- Adalsteinsson BT and Ferguson-Smith AC: "Epigenetic control of the genome-lessons from genomic imprinting." *Genes (Basel)* 5, no. 3 (2014): 635-55.
- Aich P, Patra M, Chatterjee AK, et al.: "Calcium chloride made E. coli competent for uptake of extraneous DNA through overproduction of OmpC protein." *Protein J* 31, no. 5 (2012): 366-73.
- Akhshi TK, Wernike D and Piekny A: "Microtubules and actin crosstalk in cell migration and division." *Cytoskeleton (Hoboken)* 71, no. 1 (2014): 1-23.
- Alaminos M, Davalos V, Ropero S, et al.: "EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma." *Cancer Res* 65, no. 7 (2005): 2565-71.
- Albini A and Benelli R: "The chemoinvasion assay: a method to assess tumor and endothelial cell invasion and its modulation." *Nat Protoc* 2, no. 3 (2007): 504-11.
- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, et al.: "A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells." *Cancer Res* 47, no. 12 (1987): 3239-45.
- Alon R and Shulman Z: "Chemokine triggered integrin activation and actin remodeling events guiding lymphocyte migration across vascular barriers." *Exp Cell Res* 317, no. 5 (2011): 632-41.
- Amatya VJ, Naumann U, Weller M, et al.: "TP53 promoter methylation in human gliomas." *Acta Neuropathol* 110, no. 2 (2005): 178-84.

- Ambach A, Saunus J, Konstandin M, et al.: "The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes." *Eur J Immunol* 30, no. 12 (2000): 3422-31.
- Ammerpohl O, Martin-Subero JI, Richter J, et al.: "Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation." *Biochim Biophys Acta* 1790, no. 9 (2009): 847-62.
- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, et al.: "Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase." *Nature* 393, no. 6687 (1998): 805-9.
- Ausubel FM: "Current protocols in molecular biology " 7. Aufl. New York: John Wiley & Sons Inc., 2013.
- Baeza N, Weller M, Yonekawa Y, et al.: "PTEN methylation and expression in glioblastomas." *Acta Neuropathol* 106, no. 5 (2003): 479-85.
- Bagheri-Yarmand R, Mazumdar A, Sahin AA, et al.: "LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system." *Int J Cancer* 118, no. 11 (2006): 2703-10.
- Bai RY, Staedtke V and Riggins GJ: "Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies." *Trends Mol Med* 17, no. 6 (2011): 301-12.
- Baker ES, Dupuis NF and Bowers MT: "DNA hairpin, pseudoknot, and cruciform stability in a solvent-free environment." *J Phys Chem B* 113, no. 6 (2009): 1722-7.
- Bamburg JR: "Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics." *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, (1999): 185-230.
- Baorto DM, Mellado W and Shelanski ML: "Astrocyte process growth induction by actin breakdown." *J Cell Biol* 117, no. 2 (1992): 357-67.
- Barami K: "Biology of the subventricular zone in relation to gliomagenesis." *J Clin Neurosci* 14, no. 12 (2007): 1143-9.
- Baraniskin A, Kuhnenn J, Schlegel U, et al.: "Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as biomarker for the diagnosis of glioma." *Neuro Oncol* 14, no. 1 (2012): 29-33.
- Bartel DP: "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116, no. 2 (2004): 281-97.
- Bartel DP: "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* 136, no. 2 (2009): 215-33.
- Bellenchi GC, Gurniak CB, Perlas E, et al.: "N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex." *Genes Dev* 21, no. 18 (2007): 2347-57.
- Benson G: "Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences." *Nucleic Acids Res* 27, no. 2 (1999): 573-80.

- Berdasco M and Esteller M: "Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry." *Dev Cell* 19, no. 5 (2010): 698-711.
- Bernard O: "Lim kinases, regulators of actin dynamics." *Int J Biochem Cell Biol* 39, no. 6 (2007): 1071-6.
- Bernstein BW and Bamburg JR: "ADF/cofilin: a functional node in cell biology." *Trends Cell Biol* 20, no. 4 (2010): 187-95.
- Bethwaite PB, Koreth J, Herrington CS, et al.: "Loss of heterozygosity occurs at the D11S29 locus on chromosome 11q23 in invasive cervical carcinoma." *Br J Cancer* 71, no. 4 (1995): 814-8.
- Bhowmick DA, Zhuang Z, Wait SD, et al.: "A functional polymorphism in the EGF gene is found with increased frequency in glioblastoma multiforme patients and is associated with more aggressive disease." *Cancer Res* 64, no. 4 (2004): 1220-3.
- Birnboim HC and Doly J: "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7, no. 6 (1979): 1513-23.
- Birner P, Pusch S, Christov C, et al.: "Mutant IDH1 inhibits PI3K/Akt signaling in human glioma." *Cancer* 120, no. 16 (2014): 2440-7.
- Böcker W, Denk H, Heitz PU, et al.: "Pathologie " 5. Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier, 2012.
- Boe AS, Bredholt G, Knappskog PM, et al.: "Pyridoxal phosphatase is a novel cancer autoantigen in the central nervous system." *Br J Cancer* 91, no. 8 (2004): 1508-14.
- Bokoch GM: "Biology of the p21-activated kinases." *Annu Rev Biochem* 72, (2003): 743-81.
- Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, et al.: "Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium." *Cancer* 113, no. 7 Suppl (2008): 1953-68.
- Borenfreund E and Puerner JA: "A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR90)." *Journal of Tissue Culture Methods* 9, (1984): 7-9.
- Bravo-Cordero JJ, Magalhaes MA, Eddy RJ, et al.: "Functions of cofilin in cell locomotion and invasion." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, no. 7 (2013): 405-15.
- Breathnach R and Chambon P: "Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins." *Annu Rev Biochem* 50, (1981): 349-83.
- Brena RM and Costello JF: "Genome-epigenome interactions in cancer." *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1, (2007): R96-105.
- Brennan C, Momota H, Hambarzumyan D, et al.: "Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations." *PLoS One* 4, no. 11 (2009): e7752.

- Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al.: "The somatic genomic landscape of glioblastoma." *Cell* 155, no. 2 (2013): 462-77.
- Buchwalow IB, Minin EA and Boecker W: "A multicolor fluorescence immunostaining technique for simultaneous antigen targeting." *Acta Histochem* 107, no. 2 (2005): 143-8.
- Bugyi B and Carlier MF: "Control of actin filament treadmilling in cell motility." *Annu Rev Biophys* 39, (2010): 449-70.
- Cadioux B, Ching TT, VandenBerg SR, et al.: "Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation." *Cancer Res* 66, no. 17 (2006): 8469-76.
- Cai L, Marshall TW, Uetrecht AC, et al.: "Coronin 1B coordinates Arp2/3 complex and cofilin activities at the leading edge." *Cell* 128, no. 5 (2007): 915-29.
- Cai X, Li L, Krumholz A, et al.: "Multi-scale molecular photoacoustic tomography of gene expression." *PLoS One* 7, no. 8 (2012): e43999.
- Cancer Genome Atlas Research N: "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." *Nature* 455, no. 7216 (2008): 1061-8.
- Carlier MF, Laurent V, Santolini J, et al.: "Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility." *J Cell Biol* 136, no. 6 (1997): 1307-22.
- Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, et al.: "The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours." *Nature* 463, no. 7279 (2010): 318-25.
- Castano E, Philimonenko VV, Kahle M, et al.: "Actin complexes in the cell nucleus: new stones in an old field." *Histochem Cell Biol* 133, no. 6 (2010): 607-26.
- Chae HJ, Kang JS, Byun JO, et al.: "Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts." *Pharmacol Res* 42, no. 4 (2000): 373-81.
- Chan AY, Coniglio SJ, Chuang YY, et al.: "Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion." *Oncogene* 24, no. 53 (2005): 7821-9.
- Chhabra ES and Higgs HN: "The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures." *Nat Cell Biol* 9, no. 10 (2007): 1110-21.
- Chinnaiyan P, Cerna D, Burgan WE, et al.: "Postradiation sensitization of the histone deacetylase inhibitor valproic acid." *Clin Cancer Res* 14, no. 17 (2008): 5410-5.
- Chong C, Tan L, Lim L, et al.: "The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity." *J Biol Chem* 276, no. 20 (2001): 17347-53.

- Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, et al.: "Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma." *Biochem Biophys Res Commun* 334, no. 4 (2005): 1351-8.
- Clark JM: "Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases." *Nucleic Acids Res* 16, no. 20 (1988): 9677-86.
- Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, et al.: "U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line." *PLoS Genet* 6, no. 1 (2010): e1000832.
- Collazo J, Zhu B, Larkin S, et al.: "Cofilin drives cell-invasive and metastatic responses to TGF-beta in prostate cancer." *Cancer Res* 74, no. 8 (2014): 2362-73.
- Costello JF, Berger MS, Huang HS, et al.: "Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation." *Cancer Res* 56, no. 10 (1996): 2405-10.
- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, et al.: "Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns." *Nat Genet* 24, no. 2 (2000): 132-8.
- Dagert M and Ehrlich SD: "Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells." *Gene* 6, no. 1 (1979): 23-8.
- Dang L, White DW, Gross S, et al.: "Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate." *Nature* 462, no. 7274 (2009): 739-44.
- Davila M, Frost AR, Grizzle WE, et al.: "LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer." *J Biol Chem* 278, no. 38 (2003): 36868-75.
- De Hauwer C, Darro F, Camby I, et al.: "In vitro motility evaluation of aggregated cancer cells by means of automatic image processing." *Cytometry* 36, no. 1 (1999): 1-10.
- Decaestecker C, Debeir O, Van Ham P, et al.: "Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration." *Med Res Rev* 27, no. 2 (2007): 149-76.
- Deng L, Li G, Li R, et al.: "Rho-kinase inhibitor, fasudil, suppresses glioblastoma cell line progression in vitro and in vivo." *Cancer Biol Ther* 9, no. 11 (2010): 875-84.
- Devineni N, Minamide LS, Niu M, et al.: "A quantitative analysis of G-actin binding proteins and the G-actin pool in developing chick brain." *Brain Res* 823, no. 1-2 (1999): 129-40.
- Dhanak D and Jackson P: "Development and classes of epigenetic drugs for cancer." *Biochem Biophys Res Commun* 455, no. 1-2 (2014): 58-69.
- Di Tomaso E, Pang JC, Lam HK, et al.: "Establishment and characterization of a human cell line from paediatric cerebellar glioblastoma multiforme." *Neuropathol Appl Neurobiol* 26, no. 1 (2000): 22-30.

- Dib C, Faure S, Fizames C, et al.: "A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites." *Nature* 380, no. 6570 (1996): 152-4.
- Ding SJ, Li Y, Shao XX, et al.: "Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials." *Proteomics* 4, no. 4 (2004): 982-94.
- Dong M, Yan BP, Liao JK, et al.: "Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases." *Drug Discov Today* 15, no. 15-16 (2010): 622-9.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, et al.: "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." *Nature* 429, no. 6990 (2004): 457-63.
- Ehrlich M: "DNA methylation in cancer: too much, but also too little." *Oncogene* 21, no. 35 (2002): 5400-13.
- Ellenbroek SI and Collard JG: "Rho GTPases: functions and association with cancer." *Clin Exp Metastasis* 24, no. 8 (2007): 657-72.
- Entin-Meer M, Rephaeli A, Yang X, et al.: "Butyric acid prodrugs are histone deacetylase inhibitors that show antineoplastic activity and radiosensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas." *Mol Cancer Ther* 4, no. 12 (2005): 1952-61.
- Entin-Meer M, Yang X, VandenBerg SR, et al.: "In vivo efficacy of a novel histone deacetylase inhibitor in combination with radiation for the treatment of gliomas." *Neuro Oncol* 9, no. 2 (2007): 82-8.
- Entschladen F and Zanker KS: "Locomotion of tumor cells: a molecular comparison to migrating pre- and postmitotic leukocytes." *J Cancer Res Clin Oncol* 126, no. 12 (2000): 671-81.
- Esteller M: "Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps." *Nat Rev Genet* 8, no. 4 (2007): 286-98.
- Esteller M: "Epigenetics in cancer." *N Engl J Med* 358, no. 11 (2008): 1148-59.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al.: "Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents." *N Engl J Med* 343, no. 19 (2000): 1350-4.
- Eyupoglu IY, Hahnen E, Buslei R, et al.: "Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) has potent anti-glioma properties in vitro, ex vivo and in vivo." *J Neurochem* 93, no. 4 (2005): 992-9.
- Fabian MR, Sonenberg N and Filipowicz W: "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." *Annu Rev Biochem* 79, (2010): 351-79.

- Fanelli M, Caprodossi S, Ricci-Vitiani L, et al.: "Loss of pericentromeric DNA methylation pattern in human glioblastoma is associated with altered DNA methyltransferases expression and involves the stem cell compartment." *Oncogene* 27, no. 3 (2008): 358-65.
- Farrell CJ and Plotkin SR: "Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes." *Neurol Clin* 25, no. 4 (2007): 925-46, viii.
- Favero CB and Mandell JW: "A pharmacological activator of AMP-activated protein kinase (AMPK) induces astrocyte stellation." *Brain Res* 1168, (2007): 1-10.
- Fedorchenko O: "Rolle von Chronophin für die Cofilin-vermittelte Aktin-Dynamik in astrozytären Tumorzellen." Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2009).
- Field CM and Lenart P: "Bulk cytoplasmic actin and its functions in meiosis and mitosis." *Curr Biol* 21, no. 19 (2011): R825-30.
- Fingerman IM, McDaniel L, Zhang X, et al.: "NCBI Epigenomics: a new public resource for exploring epigenomic data sets." *Nucleic Acids Res* 39, no. Database issue (2011): D908-12.
- Foletta VC, Moussi N, Sarmiere PD, et al.: "LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues." *Exp Cell Res* 294, no. 2 (2004): 392-405.
- Fonda ML: "Purification and characterization of vitamin B6-phosphate phosphatase from human erythrocytes." *J Biol Chem* 267, no. 22 (1992): 15978-83.
- Forsting M and Jansen O: "MRT des Zentralnervensystems." 2. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2014.
- Fortin Ensign SP, Mathews IT, Symons MH, et al.: "Implications of Rho GTPase Signaling in Glioma Cell Invasion and Tumor Progression." *Front Oncol* 3, (2013): 241.
- Frattoni V, Trifonov V, Chan JM, et al.: "The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma." *Nat Genet* 45, no. 10 (2013): 1141-9.
- Friedl P and Wolf K: "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." *Nat Rev Cancer* 3, no. 5 (2003): 362-74.
- Friedl P and Wolf K: "Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model." *J Cell Biol* 188, no. 1 (2010): 11-9.
- Friedman HS, Kerby T and Calvert H: "Temozolomide and treatment of malignant glioma." *Clin Cancer Res* 6, no. 7 (2000): 2585-97.
- Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, et al.: "Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice." *Science* 338, no. 6110 (2012): 1080-4.

- Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, et al.: "MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators." *Mol Cell Biol* 28, no. 17 (2008): 5369-80.
- Ghosh M, Song X, Mouneimne G, et al.: "Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility." *Science* 304, no. 5671 (2004): 743-6.
- Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, et al.: "Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment." *J Clin Oncol* 21, no. 8 (2003): 1624-36.
- Gladson CL, Prayson RA and Liu WM: "The pathobiology of glioma tumors." *Annu Rev Pathol* 5, (2010): 33-50.
- Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, et al.: "Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal." *Cancer Res* 68, no. 22 (2008): 9125-30.
- Gohla A, Birkenfeld J and Bokoch GM: "Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics." *Nat Cell Biol* 7, no. 1 (2005): 21-9.
- Gohla A and Bokoch GM: "14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin." *Curr Biol* 12, no. 19 (2002): 1704-10.
- Goldberg L and Kloog Y: "A Ras inhibitor tilts the balance between Rac and Rho and blocks phosphatidylinositol 3-kinase-dependent glioblastoma cell migration." *Cancer Res* 66, no. 24 (2006): 11709-17.
- Gorovoy M, Niu J, Bernard O, et al.: "LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells." *J Biol Chem* 280, no. 28 (2005): 26533-42.
- Green MR and Sambrook J: "Molecular cloning : a laboratory manual." 4. Aufl. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- Guan R, Xu X, Chen M, et al.: "Advances in the studies of roles of Rho/Rho-kinase in diseases and the development of its inhibitors." *Eur J Med Chem* 70, (2013): 613-22.
- Guerard M, Zeller A, Singer T, et al.: "In vitro genotoxicity of neutral red after photo-activation and metabolic activation in the Ames test, the micronucleus test and the comet assay." *Mutat Res* 746, no. 1 (2012): 15-20.
- Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S: "The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques." *J Histochem Cytochem* 27, no. 8 (1979): 1131-9.
- Gunnensen JM, Spirkoska V, Smith PE, et al.: "Growth and migration markers of rat C6 glioma cells identified by serial analysis of gene expression." *Glia* 32, no. 2 (2000): 146-54.

- Guo H, Gu F, Li W, et al.: "Reduction of protein kinase C zeta inhibits migration and invasion of human glioblastoma cells." *J Neurochem* 109, no. 1 (2009): 203-13.
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al.: "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." *Nature* 466, no. 7308 (2010): 835-40.
- Hall A: "Rho GTPases and the control of cell behaviour." *Biochem Soc Trans* 33, no. Pt 5 (2005): 891-5.
- Hall A: "The cytoskeleton and cancer." *Cancer Metastasis Rev* 28, no. 1-2 (2009): 5-14.
- Hall A: "Rho family GTPases." *Biochem Soc Trans* 40, no. 6 (2012): 1378-82.
- Hanahan D: "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* 166, no. 4 (1983): 557-80.
- Hanahan D and Weinberg RA: "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144, no. 5 (2011): 646-74.
- Hanna S and El-Sibai M: "Signaling networks of Rho GTPases in cell motility." *Cell Signal* 25, no. 10 (2013): 1955-61.
- Harlow E and Lane D: "Stripping immunoblots for reprobing or storage." *CSH Protoc* 2006, no. 1 (2006).
- Harrison BA, Whitlock NA, Voronkov MV, et al.: "Novel class of LIM-kinase 2 inhibitors for the treatment of ocular hypertension and associated glaucoma." *J Med Chem* 52, no. 21 (2009): 6515-8.
- Hartmann C, Numann A, Mueller W, et al.: "Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytoma." *Int J Cancer* 108, no. 6 (2004): 839-44.
- Hayatsu H: "Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis--a personal account." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84, no. 8 (2008): 321-30.
- Hayry V, Tanner M, Blom T, et al.: "Copy number alterations of the polycomb gene BMI1 in gliomas." *Acta Neuropathol* 116, no. 1 (2008): 97-102.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al.: "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." *N Engl J Med* 352, no. 10 (2005): 997-1003.
- Herman JG and Baylin SB: "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." *N Engl J Med* 349, no. 21 (2003): 2042-54.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, et al.: "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." *Biotechnology (N Y)* 10, no. 4 (1992): 413-7.
- Holemon H, Korshunova Y, Ordway JM, et al.: "MethylScreen: DNA methylation density monitoring using quantitative PCR." *Biotechniques* 43, no. 5 (2007): 683-93.

- Holland EC: "Glioblastoma multiforme: the terminator." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, no. 12 (2000): 6242-4.
- Holliday R: "The inheritance of epigenetic defects." *Science* 238, no. 4824 (1987): 163-70.
- Holton TA and Graham MW: "A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors." *Nucleic Acids Res* 19, no. 5 (1991): 1156.
- Horwitz JP, Chua J, Curby RJ, et al.: "Substrates for Cytochemical Demonstration of Enzyme Activity. I. Some Substituted 3-Indolyl-Beta-D-Glycopyranosides." *J Med Chem* 7, (1964): 574-5.
- Huang TY, Minamide LS, Bamburg JR, et al.: "Chronophin mediates an ATP-sensing mechanism for cofilin dephosphorylation and neuronal cofilin-actin rod formation." *Dev Cell* 15, no. 5 (2008): 691-703.
- Huang Y, Pastor WA, Shen Y, et al.: "The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing." *PLoS One* 5, no. 1 (2010a): e8888.
- Huang YW, Huang TH and Wang LS: "Profiling DNA methylomes from microarray to genome-scale sequencing." *Technol Cancer Res Treat* 9, no. 2 (2010b): 139-47.
- Hube F, Reverdiau P, Iochmann S, et al.: "Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences." *Mol Biotechnol* 31, no. 1 (2005): 81-4.
- Hughes CS, Postovit LM and Lajoie GA: "Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture." *Proteomics* 10, no. 9 (2010): 1886-90.
- Humphrey JD, Dufresne ER and Schwartz MA: "Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, no. 12 (2014): 802-12.
- Huse JT, Holland E and DeAngelis LM: "Glioblastoma: molecular analysis and clinical implications." *Annu Rev Med* 64, (2013): 59-70.
- Huvelde D, Lewis-Tuffin LJ, Carlson BL, et al.: "Targeting Src family kinases inhibits bevacizumab-induced glioma cell invasion." *PLoS One* 8, no. 2 (2013): e56505.
- Ichetovkin I, Grant W and Condeelis J: "Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex." *Curr Biol* 12, no. 1 (2002): 79-84.
- Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, et al.: "IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas." *Neuro Oncol* 11, no. 4 (2009): 341-7.
- Ino Y, Silver JS, Blazejewski L, et al.: "Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade." *J Neuropathol Exp Neurol* 58, no. 8 (1999): 881-5.

- Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, et al.: "Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases." *Mol Pharmacol* 57, no. 5 (2000): 976-83.
- Issa JP and Kantarjian HM: "Targeting DNA methylation." *Clin Cancer Res* 15, no. 12 (2009): 3938-46.
- Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, et al.: "Angiogenesis in brain tumours." *Nat Rev Neurosci* 8, no. 8 (2007): 610-22.
- Jang YM, Kim DW, Kang TC, et al.: "Human pyridoxal phosphatase. Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution." *J Biol Chem* 278, no. 50 (2003): 50040-6.
- Jelinic P and Shaw P: "Loss of imprinting and cancer." *J Pathol* 211, no. 3 (2007): 261-8.
- Jenuwein T and Allis CD: "Translating the histone code." *Science* 293, no. 5532 (2001): 1074-80.
- John GR, Chen L, Riviaccio MA, et al.: "Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis." *J Neurosci* 24, no. 11 (2004): 2837-45.
- Jones PA and Baylin SB: "The fundamental role of epigenetic events in cancer." *Nat Rev Genet* 3, no. 6 (2002): 415-28.
- Jones PA and Baylin SB: "The epigenomics of cancer." *Cell* 128, no. 4 (2007): 683-92.
- Jones TS and Holland EC: "Standard of care therapy for malignant glioma and its effect on tumor and stromal cells." *Oncogene* 31, no. 16 (2012): 1995-2006.
- Kapuscinski J: "DAPI: a DNA-specific fluorescent probe." *Biotech Histochem* 70, no. 5 (1995): 220-33.
- Kelly TK, De Carvalho DD and Jones PA: "Epigenetic modifications as therapeutic targets." *Nat Biotechnol* 28, no. 10 (2010): 1069-1078.
- Keshamouni VG, Michailidis G, Grasso CS, et al.: "Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype." *J Proteome Res* 5, no. 5 (2006): 1143-54.
- Kestler C, Knobloch G, Tessmer I, et al.: "Chronophin dimerization is required for proper positioning of its substrate specificity loop." *J Biol Chem* 289, no. 5 (2014): 3094-103.
- Keunen O, Johansson M, Oudin A, et al.: "Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, no. 9 (2011): 3749-54.
- Kim JB: "Three-dimensional tissue culture models in cancer biology." *Semin Cancer Biol* 15, no. 5 (2005): 365-77.

- Kim JE, Kim DW, Kwak SE, et al.: "Potential role of pyridoxal-5'-phosphate phosphatase/chronopin in epilepsy." *Exp Neurol* 211, no. 1 (2008): 128-40.
- Kim JE, Ryu HJ, Kim MJ, et al.: "Pyridoxal-5'-phosphate phosphatase/chronopin induces astroglial apoptosis via actin-depolymerizing factor/cofilin system in the rat brain following status epilepticus." *Glia* 58, no. 16 (2010): 1937-48.
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E and Koike T: "Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE." *Nat Protoc* 4, no. 10 (2009): 1513-21.
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E and Koike T: "Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions." *Proteomics* 12, no. 2 (2012): 192-202.
- Kiselev KV, Dubrovina AS and Tyunin AP: "The methylation status of plant genomic DNA influences PCR efficiency." *J Plant Physiol* 175C, (2014): 59-67.
- Kiuchi T, Ohashi K, Kurita S, et al.: "Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers." *J Cell Biol* 177, no. 3 (2007): 465-76.
- Klapper A, MacKay B and Resh MD: "Rapid high resolution western blotting: from gel to image in a single day." *Biotechniques* 12, no. 5 (1992): 650-4.
- Klemke M, Kramer E, Konstandin MH, et al.: "An MEK-cofilin signalling module controls migration of human T cells in 3D but not 2D environments." *EMBO J* 29, no. 17 (2010): 2915-29.
- Knudson AG: "Two genetic hits (more or less) to cancer." *Nat Rev Cancer* 1, no. 2 (2001): 157-62.
- Koreth J, O'Leary JJ and J ODM: "Microsatellites and PCR genomic analysis." *J Pathol* 178, no. 3 (1996): 239-48.
- Kouzarides T: "Chromatin modifications and their function." *Cell* 128, no. 4 (2007): 693-705.
- Krueger F, Kreck B, Franke A, et al.: "DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data." *Nat Methods* 9, no. 2 (2012): 145-51.
- Kruse CA, Mitchell DH, Kleinschmidt-DeMasters BK, et al.: "Characterization of a continuous human glioma cell line DBTRG-05MG: growth kinetics, karyotype, receptor expression, and tumor suppressor gene analyses." *In Vitro Cell Dev Biol* 28A, no. 9-10 (1992): 609-14.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al.: "The real-time polymerase chain reaction." *Mol Aspects Med* 27, no. 2-3 (2006): 95-125.
- Kumar S, Cheng X, Klimasauskas S, et al.: "The DNA (cytosine-5) methyltransferases." *Nucleic Acids Res* 22, no. 1 (1994): 1-10.

- Laemmli UK: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227, no. 5259 (1970): 680-5.
- Laigle-Donadey F, Criniere E, Benouaich A, et al.: "Loss of 22q chromosome is related to glioma progression and loss of 10q." *J Neurooncol* 76, no. 3 (2006): 265-8.
- Laird PW: "The power and the promise of DNA methylation markers." *Nat Rev Cancer* 3, no. 4 (2003): 253-66.
- Laird PW: "Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis." *Nat Rev Genet* 11, no. 3 (2010): 191-203.
- Lane AA and Chabner BA: "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy." *J Clin Oncol* 27, no. 32 (2009): 5459-68.
- Larjavaara S, Mantyla R, Salminen T, et al.: "Incidence of gliomas by anatomic location." *Neuro Oncol* 9, no. 3 (2007): 319-25.
- Lee YJ, Mazzatti DJ, Yun Z, et al.: "Inhibition of invasiveness of human lung cancer cell line H1299 by over-expression of cofilin." *Cell Biol Int* 29, no. 11 (2005): 877-83.
- Li C, Liang YY, Feng XH, et al.: "Essential phosphatases and a phospho-degron are critical for regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function and turnover." *Mol Cell* 31, no. 6 (2008): 835-49.
- Li R, Doherty J, Antonipillai J, et al.: "LIM kinase inhibition reduces breast cancer growth and invasiveness but systemic inhibition does not reduce metastasis in mice." *Clin Exp Metastasis* 30, no. 4 (2013): 483-95.
- Linz U: "Commentary on Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial (Lancet Oncol. 2009;10:459-466)." *Cancer* 116, no. 8 (2010): 1844-6.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al.: "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." *Acta Neuropathol* 114, no. 2 (2007): 97-109.
- Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, et al.: "VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex." *Cancer Cell* 22, no. 1 (2012): 21-35.
- Lucio-Eterovic AK, Cortez MA, Valera ET, et al.: "Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas." *BMC Cancer* 8, (2008): 243.
- Luk SK, Piekorz RP, Nurnberg B, et al.: "The catalytic phosphoinositol 3-kinase isoform p110 delta is required for glioma cell migration and invasion." *European Journal of Cancer* 48, no. 1 (2012): 149-157.
- Ma Y, Wang B, Li W, et al.: "Intersectin1-s is involved in migration and invasion of human glioma cells." *J Neurosci Res* 89, no. 7 (2011): 1079-90.

- Mack GS: "Epigenetic cancer therapy makes headway." *J Natl Cancer Inst* 98, no. 20 (2006): 1443-4.
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, et al.: "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." *Science* 285, no. 5429 (1999): 895-8.
- Malzkorn B, Wolter M, Riemenschneider MJ, et al.: "Unraveling the glioma epigenome: from molecular mechanisms to novel biomarkers and therapeutic targets." *Brain Pathol* 21, no. 6 (2011): 619-32.
- Manetti F: "LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators." *Med Res Rev* 32, no. 5 (2012): 968-98.
- Manning TJ, Jr., Parker JC and Sontheimer H: "Role of lysophosphatidic acid and rho in glioma cell motility." *Cell Motil Cytoskeleton* 45, no. 3 (2000): 185-99.
- Martinez R: "Beyond Genetics in Glioma Pathways: The Ever-Increasing Crosstalk between Epigenomic and Genomic Events." *J Signal Transduct* 2012, (2012): 519807.
- Martinez R and Esteller M: "The DNA methylome of glioblastoma multiforme." *Neurobiol Dis* 39, no. 1 (2010): 40-6.
- Martoglio AM, Tom BD, Starkey M, et al.: "Changes in tumorigenesis- and angiogenesis-related gene transcript abundance profiles in ovarian cancer detected by tailored high density cDNA arrays." *Mol Med* 6, no. 9 (2000): 750-65.
- Mashiach-Farkash E, Rak R, Elad-Sfadia G, et al.: "Computer-based identification of a novel LIMK1/2 inhibitor that synergizes with salirasib to destabilize the actin cytoskeleton." *Oncotarget* 3, no. 6 (2012): 629-39.
- Masoudi A, Eloppe M, Amini E, et al.: "Influence of valproic acid on outcome of high-grade gliomas in children." *Anticancer Res* 28, no. 4C (2008): 2437-42.
- Masuhr K, Masuhr F and Neumann M: "Duale Reihe Neurologie." 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2013.
- Mazumder B, Seshadri V and Fox PL: "Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means." *Trends Biochem Sci* 28, no. 2 (2003): 91-8.
- McDowell DG, Burns NA and Parkes HC: "Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR." *Nucleic Acids Res* 26, no. 14 (1998): 3340-7.
- Meberg PJ: "Signal-regulated ADF/cofilin activity and growth cone motility." *Mol Neurobiol* 21, no. 1-2 (2000): 97-107.
- Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al.: "Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors." *N Engl J Med* 353, no. 19 (2005): 2012-24.

- Minamide LS, Striegl AM, Boyle JA, et al.: "Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function." *Nat Cell Biol* 2, no. 9 (2000): 628-36.
- Mizuno K: "Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation." *Cell Signal* 25, no. 2 (2013): 457-69.
- Mizuno K, Okano I, Ohashi K, et al.: "Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif." *Oncogene* 9, no. 6 (1994): 1605-12.
- Mouneimne G, DesMarais V, Sidani M, et al.: "Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis." *Curr Biol* 16, no. 22 (2006): 2193-205.
- Mseka T and Cramer LP: "Actin depolymerization-based force retracts the cell rear in polarizing and migrating cells." *Curr Biol* 21, no. 24 (2011): 2085-91.
- Mülhardt C: "Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics." Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- Mullis KB and Faloona FA: "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* 155, (1987): 335-50.
- Mund C and Lyko F: "Epigenetic cancer therapy: Proof of concept and remaining challenges." *Bioessays* 32, no. 11 (2010): 949-57.
- Munson JM, Fried L, Rowson SA, et al.: "Anti-invasive adjuvant therapy with imipramine blue enhances chemotherapeutic efficacy against glioma." *Sci Transl Med* 4, no. 127 (2012): 127ra36.
- Murali A and Rajalingam K: "Small Rho GTPases in the control of cell shape and mobility." *Cell Mol Life Sci* 71, no. 9 (2014): 1703-21.
- Nagai S, Moreno O, Smith CA, et al.: "Role of the cofilin activity cycle in astrocytoma migration and invasion." *Genes Cancer* 2, no. 9 (2011): 859-69.
- Nagarajan RP and Costello JF: "Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme." *Semin Cancer Biol* 19, no. 3 (2009): 188-97.
- Nagata K, Ohashi K, Yang N, et al.: "The N-terminal LIM domain negatively regulates the kinase activity of LIM-kinase 1." *Biochem J* 343 Pt 1, (1999): 99-105.
- Nakabayashi H and Shimizu K: "HA1077, a Rho kinase inhibitor, suppresses glioma-induced angiogenesis by targeting the Rho-ROCK and the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) signal pathways." *Cancer Sci* 102, no. 2 (2011): 393-9.
- Nakamura M, Ishida E, Shimada K, et al.: "Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas." *Lab Invest* 85, no. 2 (2005): 165-75.

- Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, et al.: "Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas." *Lab Invest* 81, no. 1 (2001): 77-82.
- Narumiya S, Ishizaki T and Uehata M: "Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632." *Methods Enzymol* 325, (2000): 273-84.
- Naumanen P, Lappalainen P and Hotulainen P: "Mechanisms of actin stress fibre assembly." *J Microsc* 231, no. 3 (2008): 446-54.
- Nebl G, Meuer SC and Samstag Y: "Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin." *J Biol Chem* 271, no. 42 (1996): 26276-80.
- Negrini S, Gorgoulis VG and Halazonetis TD: "Genomic instability--an evolving hallmark of cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, no. 3 (2010): 220-8.
- Nemes Z, Dietz R, Luth JB, et al.: "The pharmacological relevance of vital staining with neutral red." *Experientia* 35, no. 11 (1979): 1475-6.
- Nishita M, Wang Y, Tomizawa C, et al.: "Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion." *J Biol Chem* 279, no. 8 (2004): 7193-8.
- Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, et al.: "Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin." *Cell* 108, no. 2 (2002): 233-46.
- Nobes CD and Hall A: "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement." *J Cell Biol* 144, no. 6 (1999): 1235-44.
- Norden AD, Drappatz J and Wen PY: "Antiangiogenic therapies for high-grade glioma." *Nat Rev Neurol* 5, no. 11 (2009): 610-20.
- Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al.: "Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma." *Cancer Cell* 17, no. 5 (2010): 510-22.
- Nurnberg A, Kitzing T and Grosse R: "Nucleating actin for invasion." *Nat Rev Cancer* 11, no. 3 (2011): 177-87.
- Oakes CC, La Salle S, Robaire B, et al.: "Evaluation of a quantitative DNA methylation analysis technique using methylation-sensitive/dependent restriction enzymes and real-time PCR." *Epigenetics* 1, no. 3 (2006): 146-52.
- Ohgaki H and Kleihues P: "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma." *Am J Pathol* 170, no. 5 (2007): 1445-53.
- Ohgaki H and Kleihues P: "The definition of primary and secondary glioblastoma." *Clin Cancer Res* 19, no. 4 (2013): 764-72.

- Okamoto I, Pirker C, Bilban M, et al.: "Seven novel and stable translocations associated with oncogenic gene expression in malignant melanoma." *Neoplasia* 7, no. 4 (2005): 303-11.
- Olson MF: "Applications for ROCK kinase inhibition." *Curr Opin Cell Biol* 20, no. 2 (2008): 242-8.
- Oser M and Condeelis J: "The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia." *J Cell Biochem* 108, no. 6 (2009): 1252-62.
- Oskam NT, Bijleveld EH and Hulsebos TJ: "A region of common deletion in 22q13.3 in human glioma associated with astrocytoma progression." *Int J Cancer* 85, no. 3 (2000): 336-9.
- Padmanabhan J and Shelanski ML: "Process formation in astrocytes: modulation of cytoskeletal proteins." *Neurochem Res* 23, no. 3 (1998): 377-84.
- Panja S, Aich P, Jana B, et al.: "How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of Escherichia coli?" *Mol Membr Biol* 25, no. 5 (2008): 411-22.
- Park JB, Agnihotri S, Golbourn B, et al.: "Transcriptional profiling of GBM invasion genes identifies effective inhibitors of the LIM kinase-Cofilin pathway." *Oncotarget* 5, no. 19 (2014): 9382-95.
- Parri M and Chiarugi P: "Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control." *Cell Commun Signal* 8, (2010): 23.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al.: "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." *Science* 321, no. 5897 (2008): 1807-12.
- Paugh BS, Qu C, Jones C, et al.: "Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease." *J Clin Oncol* 28, no. 18 (2010): 3061-8.
- Peeraer Y, Rabijns A, Collet JF, et al.: "How calcium inhibits the magnesium-dependent enzyme human phosphoserine phosphatase." *Eur J Biochem* 271, no. 16 (2004): 3421-7.
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al.: "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis." *Cancer Cell* 9, no. 3 (2006): 157-73.
- Pickering BM and Willis AE: "The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease." *Semin Cell Dev Biol* 16, no. 1 (2005): 39-47.
- Pollard TD and Borisy GG: "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." *Cell* 112, no. 4 (2003): 453-65.
- Ponten J and Macintyre EH: "Long term culture of normal and neoplastic human glioma." *Acta Pathol Microbiol Scand* 74, no. 4 (1968): 465-86.

- Prudent R, Vassal-Stermann E, Nguyen CH, et al.: "Pharmacological inhibition of LIM kinase stabilizes microtubules and inhibits neoplastic growth." *Cancer Res* 72, no. 17 (2012): 4429-39.
- Purow B and Schiff D: "Advances in the genetics of glioblastoma: are we reaching critical mass?" *Nat Rev Neurol* 5, no. 8 (2009): 419-26.
- Racchetti G, D'Alessandro R and Meldolesi J: "Astrocyte stellation, a process dependent on Rac1 is sustained by the regulated exocytosis of enlargeosomes." *Glia* 60, no. 3 (2012): 465-75.
- Rando OJ, Zhao K and Crabtree GR: "Searching for a function for nuclear actin." *Trends Cell Biol* 10, no. 3 (2000): 92-7.
- Rathinam R, Berrier A and Alahari SK: "Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression." *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, (2011): 2561-71.
- Reiser M and Bartenstein P: "Duale Reihe Radiologie." 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2011.
- Relton CL and Davey Smith G: "Epigenetic epidemiology of common complex disease: prospects for prediction, prevention, and treatment." *PLoS Med* 7, no. 10 (2010): e1000356.
- Renart J, Reiser J and Stark GR: "Transfer of proteins from gels to diazobenzylmethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, no. 7 (1979): 3116-20.
- Reymond N, d'Agua BB and Ridley AJ: "Crossing the endothelial barrier during metastasis." *Nat Rev Cancer* 13, no. 12 (2013): 858-70.
- Ridder IS and Dijkstra BW: "Identification of the Mg²⁺-binding site in the P-type ATPase and phosphatase members of the HAD (haloacid dehalogenase) superfamily by structural similarity to the response regulator protein CheY." *Biochem J* 339 (Pt 2), (1999): 223-6.
- Ridley AJ: "Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking." *Trends Cell Biol* 16, no. 10 (2006): 522-9.
- Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, et al.: "Molecular diagnostics of gliomas: state of the art." *Acta Neuropathol* 120, no. 5 (2010): 567-84.
- Riento K and Ridley AJ: "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, no. 6 (2003): 446-56.
- Rius M and Lyko F: "Epigenetic cancer therapy: rationales, targets and drugs." *Oncogene* 31, no. 39 (2012): 4257-65.
- Rodnight RB and Gottfried C: "Morphological plasticity of rodent astroglia." *J Neurochem* 124, no. 3 (2013): 263-75.

- Rollins RA, Haghghi F, Edwards JR, et al.: "Large-scale structure of genomic methylation patterns." *Genome Res* 16, no. 2 (2006): 157-63.
- Ross-Macdonald P, de Silva H, Guo Q, et al.: "Identification of a nonkinase target mediating cytotoxicity of novel kinase inhibitors." *Mol Cancer Ther* 7, no. 11 (2008): 3490-8.
- Rossi ML, Jones NR, Candy E, et al.: "The mononuclear cell infiltrate compared with survival in high-grade astrocytomas." *Acta Neuropathol* 78, no. 2 (1989): 189-93.
- Rosso L, Pierson PM, Golfier C, et al.: "Pituicyte stellation is prevented by RhoA-or Cdc42-dependent actin polymerization." *Cell Mol Neurobiol* 27, no. 6 (2007): 791-804.
- Roth P, Wischhusen J, Happold C, et al.: "A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients." *J Neurochem* 118, no. 3 (2011): 449-57.
- Rougerie P and Delon J: "Rho GTPases: masters of T lymphocyte migration and activation." *Immunol Lett* 142, no. 1-2 (2012): 1-13.
- Rozen S and Skaletsky H: "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods Mol Biol* 132, (2000): 365-86.
- Rudolph J, Crawford JJ, Hoeflich KP, et al.: "Inhibitors of p21-activated kinases (PAKs)." *J Med Chem* 58, no. 1 (2015): 111-29.
- Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE: "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro." *Nucleic Acids Res* 18, no. 21 (1990): 6409-12.
- Sacchetti P, Carpentier R, Segard P, et al.: "Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1." *Nucleic Acids Res* 34, no. 19 (2006): 5515-27.
- Sadikovic B, Al-Romaih K, Squire JA, et al.: "Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer." *Curr Genomics* 9, no. 6 (2008): 394-408.
- Sadok A and Marshall CJ: "Rho GTPases: masters of cell migration." *Small GTPases* 5, (2014): e29710.
- Saferali A, Grundberg E, Berlivet S, et al.: "Cell culture-induced aberrant methylation of the imprinted IG DMR in human lymphoblastoid cell lines." *Epigenetics* 5, no. 1 (2010): 50-60.
- Sahai E and Marshall CJ: "Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis." *Nat Cell Biol* 5, no. 8 (2003): 711-9.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al.: "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230, no. 4732 (1985): 1350-4.

- Saito T, Lamy F, Roger PP, et al.: "Characterization and identification as cofilin and destrin of two thyrotropin- and phorbol ester-regulated phosphoproteins in thyroid cells." *Exp Cell Res* 212, no. 1 (1994): 49-61.
- Salhia B, Rutten F, Nakada M, et al.: "Inhibition of Rho-kinase affects astrocytoma morphology, motility, and invasion through activation of Rac1." *Cancer Res* 65, no. 19 (2005): 8792-800.
- Sanai N, Alvarez-Buylla A and Berger MS: "Neural stem cells and the origin of gliomas." *N Engl J Med* 353, no. 8 (2005): 811-22.
- Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM, et al.: "Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase." *Science* 283, no. 5410 (1999): 2083-5.
- Sandoval J and Esteller M: "Cancer epigenomics: beyond genomics." *Curr Opin Genet Dev* 22, no. 1 (2012): 50-5.
- Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, et al.: "Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement." *Cell* 135, no. 3 (2008): 510-23.
- Sanz-Moreno V, Gaggioli C, Yeo M, et al.: "ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma." *Cancer Cell* 20, no. 2 (2011): 229-45.
- Sanz-Moreno V and Marshall CJ: "The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration." *Curr Opin Cell Biol* 22, no. 5 (2010): 690-6.
- Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, et al.: "Molecularly targeted therapy for malignant glioma." *Cancer* 110, no. 1 (2007): 13-24.
- Schlegel U, Weller M and Westphal M: "Neuroonkologie." 2., erweiterte Auflage Stuttgart: Thieme, 2003.
- Schmeichel KL and Bissell MJ: "Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions." *J Cell Sci* 116, no. Pt 12 (2003): 2377-88.
- Schneeberger C, Speiser P, Kury F, et al.: "Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain." *PCR Methods Appl* 4, no. 4 (1995): 234-8.
- Schulze M: "Role of Chronophin for glioma cell migration and invasion." Inaugural-Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg (2015).
- Schulze M, Fedorchenko O, Zink TG, et al.: "Chronophin is a glial tumor modifier involved in the regulation of glioblastoma growth and invasiveness." *Oncogene* (2015), accepted.
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, et al.: "Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma." *Nature* 482, no. 7384 (2012): 226-31.

- Scott RW, Hooper S, Crighton D, et al.: "LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells." *J Cell Biol* 191, no. 1 (2010): 169-85.
- Scott RW and Olson MF: "LIM kinases: function, regulation and association with human disease." *J Mol Med (Berl)* 85, no. 6 (2007): 555-68.
- Seifried A, Schultz J and Gohla A: "Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease." *FEBS J* 280, no. 2 (2013): 549-71.
- Seng TJ, Ichimura K, Liu L, et al.: "Complex chromosome 22 rearrangements in astrocytic tumors identified using microsatellite and chromosome 22 tile path array analysis." *Genes Chromosomes Cancer* 43, no. 2 (2005): 181-93.
- Senger DL, Tudan C, Guiot MC, et al.: "Suppression of Rac activity induces apoptosis of human glioma cells but not normal human astrocytes." *Cancer Res* 62, no. 7 (2002): 2131-40.
- Sharp PA, Sugden B and Sambrook J: "Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis." *Biochemistry* 12, no. 16 (1973): 3055-63.
- Shen L, Guo Y, Chen X, et al.: "Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis." *Biotechniques* 42, no. 1 (2007): 48, 50, 52 passim.
- Shen R, Mo Q, Schultz N, et al.: "Integrative subtype discovery in glioblastoma using iCluster." *PLoS One* 7, no. 4 (2012): e35236.
- Silber J, Lim DA, Petritsch C, et al.: "miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells." *BMC Med* 6, (2008): 14.
- Sinha P, Hutter G, Kottgen E, et al.: "Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas." *Electrophoresis* 20, no. 14 (1999): 2952-60.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al.: "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150, no. 1 (1985): 76-85.
- Soosairajah J, Maiti S, Wiggan O, et al.: "Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin." *EMBO J* 24, no. 3 (2005): 473-86.
- Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, et al.: "Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies." *Science* 318, no. 5848 (2007): 287-90.
- Strell C and Entschladen F: "Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells." *Cell Commun Signal* 6, (2008): 10.

- Strien J, Sanft J and Mall G: "Enhancement of PCR Amplification of Moderate GC-Containing and Highly GC-Rich DNA Sequences." *Mol Biotechnol* 54, no. 3 (2013): 1048-54.
- Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, et al.: "Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions." *J Clin Oncol* 25, no. 26 (2007): 4127-36.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al.: "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." *Lancet Oncol* 10, no. 5 (2009): 459-66.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al.: "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *N Engl J Med* 352, no. 10 (2005): 987-96.
- Sturm D, Bender S, Jones DT, et al.: "Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge." *Nat Rev Cancer* 14, no. 2 (2014): 92-107.
- Sturm D, Witt H, Hovestadt V, et al.: "Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma." *Cancer Cell* 22, no. 4 (2012): 425-37.
- Sun CX, Magalhaes MA and Glogauer M: "Rac1 and Rac2 differentially regulate actin free barbed end formation downstream of the fMLP receptor." *J Cell Biol* 179, no. 2 (2007): 239-45.
- Takeuchi J and Barnard RO: "Perivascular lymphocytic cuffing in astrocytomas." *Acta Neuropathol* 35, no. 3 (1976): 265-71.
- Tang H, Li A, Bi J, et al.: "Loss of Scar/WAVE complex promotes N-WASP- and FAK-dependent invasion." *Curr Biol* 23, no. 2 (2013): 107-17.
- Taylor RG, Walker DC and McInnes RR: "E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing." *Nucleic Acids Res* 21, no. 7 (1993): 1677-8.
- Theeler BJ, Yung WK, Fuller GN, et al.: "Moving toward molecular classification of diffuse gliomas in adults." *Neurology* 79, no. 18 (2012): 1917-26.
- Toshima J, Toshima JY, Amano T, et al.: "Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation." *Mol Biol Cell* 12, no. 4 (2001a): 1131-45.
- Toshima J, Toshima JY, Takeuchi K, et al.: "Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells." *J Biol Chem* 276, no. 33 (2001b): 31449-58.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J: "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, no. 9 (1979): 4350-4.

- Tsuji T, Ishizaki T, Okamoto M, et al.: "ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts." *J Cell Biol* 157, no. 5 (2002): 819-30.
- Turcan S, Rohle D, Goenka A, et al.: "IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype." *Nature* 483, no. 7390 (2012): 479-83.
- Turhani D, Krapfenbauer K, Thurnher D, et al.: "Identification of differentially expressed, tumor-associated proteins in oral squamous cell carcinoma by proteomic analysis." *Electrophoresis* 27, no. 7 (2006): 1417-23.
- Tybulewicz VL and Henderson RB: "Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes." *Nat Rev Immunol* 9, no. 9 (2009): 630-44.
- Ugur HC, Ramakrishna N, Bello L, et al.: "Continuous intracranial administration of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibits tumor growth in an orthotopic glioma model." *J Neurooncol* 83, no. 3 (2007): 267-75.
- Uhlmann K, Rohde K, Zeller C, et al.: "Distinct methylation profiles of glioma subtypes." *Int J Cancer* 106, no. 1 (2003): 52-9.
- Unwin RD, Craven RA, Harnden P, et al.: "Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect." *Proteomics* 3, no. 8 (2003): 1620-32.
- van Rheenen J, Condeelis J and Glogauer M: "A common cofilin activity cycle in invasive tumor cells and inflammatory cells." *J Cell Sci* 122, no. Pt 3 (2009): 305-11.
- van Zijl F, Krupitza G and Mikulits W: "Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration." *Mutat Res* 728, no. 1-2 (2011): 23-34.
- Vartiainen MK, Mustonen T, Mattila PK, et al.: "The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics." *Mol Biol Cell* 13, no. 1 (2002): 183-94.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al.: "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." *Cancer Cell* 17, no. 1 (2010): 98-110.
- Waha A, Guntner S, Huang TH, et al.: "Epigenetic silencing of the protocadherin family member PCDH-gamma-A11 in astrocytomas." *Neoplasia* 7, no. 3 (2005): 193-9.
- Wang W, Eddy R and Condeelis J: "The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis." *Nat Rev Cancer* 7, no. 6 (2007): 429-40.
- Wang W, Goswami S, Lapidus K, et al.: "Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors." *Cancer Res* 64, no. 23 (2004): 8585-94.
- Wang W, Mouneimne G, Sidani M, et al.: "The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors." *J Cell Biol* 173, no. 3 (2006): 395-404.

- Wang Y, Shibasaki F and Mizuno K: "Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin." *J Biol Chem* 280, no. 13 (2005): 12683-9.
- Weaver KD, Grossman SA and Herman JG: "Methylated tumor-specific DNA as a plasma biomarker in patients with glioma." *Cancer Invest* 24, no. 1 (2006): 35-40.
- Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, et al.: "Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4." *J Biol Chem* 243, no. 17 (1968): 4543-55.
- Welch HC, Coadwell WJ, Stephens LR, et al.: "Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac." *FEBS Lett* 546, no. 1 (2003): 93-7.
- Weller M, Gorlia T, Cairncross JG, et al.: "Prolonged survival with valproic acid use in the EORTC/NCIC temozolomide trial for glioblastoma." *Neurology* 77, no. 12 (2011): 1156-64.
- Wen PY and Kesari S: "Malignant gliomas in adults." *N Engl J Med* 359, no. 5 (2008): 492-507.
- Wiencke JK, Zheng S, Jelluma N, et al.: "Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma." *Neuro Oncol* 9, no. 3 (2007): 271-9.
- Wiggan O, Shaw AE, DeLuca JG, et al.: "ADF/cofilin regulates actomyosin assembly through competitive inhibition of myosin II binding to F-actin." *Dev Cell* 22, no. 3 (2012): 530-43.
- Wikstrand CJ, McLendon RE, Friedman AH, et al.: "Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII." *Cancer Res* 57, no. 18 (1997): 4130-40.
- Wulf E, Deboben A, Bautz FA, et al.: "Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, no. 9 (1979): 4498-502.
- Xu W, Yang H, Liu Y, et al.: "Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases." *Cancer Cell* 19, no. 1 (2011): 17-30.
- Yakovchuk P, Protozanova E and Frank-Kamenetskii MD: "Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix." *Nucleic Acids Res* 34, no. 2 (2006): 564-74.
- Yamazaki D, Kurisu S and Takenawa T: "Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates." *Oncogene* 28, no. 13 (2009): 1570-83.
- Yang EJ, Yoon JH, Min DS, et al.: "LIM kinase 1 activates cAMP-responsive element-binding protein during the neuronal differentiation of immortalized hippocampal progenitor cells." *J Biol Chem* 279, no. 10 (2004): 8903-10.

- Yang HW, Shin MG, Lee S, et al.: "Cooperative activation of PI3K by Ras and Rho family small GTPases." *Mol Cell* 47, no. 2 (2012): 281-90.
- Yang N, Higuchi O, Ohashi K, et al.: "Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization." *Nature* 393, no. 6687 (1998): 809-12.
- Yap CT, Simpson TI, Pratt T, et al.: "The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner." *Cell Motil Cytoskeleton* 60, no. 3 (2005): 153-65.
- Yin D, Ong JM, Hu J, et al.: "Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor: effects on gene expression and growth of glioma cells in vitro and in vivo." *Clin Cancer Res* 13, no. 3 (2007): 1045-52.
- Yoshioka K, Foletta V, Bernard O, et al.: "A role for LIM kinase in cancer invasion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, no. 12 (2003): 7247-52.
- Zheng HT, Peng ZH, Li S, et al.: "Loss of heterozygosity analyzed by single nucleotide polymorphism array in cancer." *World J Gastroenterol* 11, no. 43 (2005): 6740-4.
- Zhou H, Miki R, Eeva M, et al.: "Reciprocal regulation of SOCS 1 and SOCS3 enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme." *Clin Cancer Res* 13, no. 8 (2007): 2344-53.
- Zohrabian VM, Forzani B, Chau Z, et al.: "Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation." *Anticancer Res* 29, no. 1 (2009): 119-23.
- Zoudilova M, Kumar P, Ge L, et al.: "Beta-arrestin-dependent regulation of the cofilin pathway downstream of protease-activated receptor-2." *J Biol Chem* 282, no. 28 (2007): 20634-46.
- Zoudilova M, Min J, Richards HL, et al.: "beta-Arrestins scaffold cofilin with chronophin to direct localized actin filament severing and membrane protrusions downstream of protease-activated receptor-2." *J Biol Chem* 285, no. 19 (2010): 14318-29.

Internetquellen:

http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_SourceBook_Section_VII_-_Separation_of_DNA_in_Polyacrylamide_Gels.pdf

<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4A957146-5056-8A76-4E97-81995432210B>

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/Y0503?lang=de®ion=DE>

https://www.symansis.com/product_sheets/544.pdf

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Antje Gohla für die Überlassung dieses faszinierenden und anspruchsvollen Projektes, das ich in ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg durchführen konnte, sowie für die hervorragende Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit. Ihre jederzeit gewährte Unterstützung, ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und kompetenten Ratschläge haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Danken möchte ich darüber hinaus:

- Herrn Prof. Dr. Andreas Rosenwald, Institut für Pathologie der Universität Würzburg, und Herrn Prof. Dr. Stefan Gaubatz, Biozentrum der Universität Würzburg, für ihre hilfreichen Anmerkungen, wertvollen Diskussionen sowie die Betreuung dieser Arbeit.
- Frau Dr. Camelia-Maria Monoranu, Abteilung für Neuropathologie des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg, für die Bereitstellung der FFPE-Proben, die Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der immunhistochemischen Präparate sowie für die freundschaftliche Betreuung dieser Arbeit.
- Herrn Dr. Carsten Hagemann, Neurochirurgische Klinik des Universitätsklinikums Würzburg, und Frau Alexandra Bohl, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg, für die Bereitstellung der kryokonservierten Tumorproben bzw. der primären Maus-Astrozyten.
- Herrn Dr. Markus Schulze, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg, für die professionelle Einführung in die Techniken der Molekular- und Zellbiologie sowie die zahllosen Hilfestellungen, Ratschläge und Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Frau Dr. Elisabeth Jeanclos, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg, für die Einführung ins Labor sowie die hilfreichen Diskussionen und Unterstützung während dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Martin Lohse für die exzellente Arbeitsatmosphäre am Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg.

DANKSAGUNG

- Allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität.
- Meiner Familie und meinen Freunden, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
- Meiner Frau, Miriam Zink, für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Liebe und Motivation. Danke !

CURRICULUM VITAE

Angaben zur Person

Name : **Thomas Gerd Zink (geb. Sondergeld)**

Geburtsdatum :

Kontakt:



Akademischer Werdegang

- | | |
|-------------|---|
| 1994 - 2007 | Allgemeine Hochschulreife / Abitur (Note: sehr gut 1,0) |
| 2007 - 2014 | Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg |
| 2010 | „Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung“ (Note: sehr gut 1,5) |
| 2014 | „Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung“ (Note: sehr gut 1,5) |
| 2015 | Approbation als Arzt |
| 2012 - 2015 | Promotionsstudent (Dr. med.) am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Prof. Dr. A. Gohla / Prof. Dr. M. Lohse), Universität Würzburg |
| seit 2015 | Promotionsstudent (Dr. rer. nat.) am Institut für Hygiene und Mikrobiologie (PD Dr. Dr. C. Schoen / Prof. Dr. M. Frosch), MD/PhD-Programm, Universität Würzburg |

Stipendien

- | | |
|-------------|---|
| 2012 | Doktoranden-Stipendium der DFG innerhalb des „Integrated Graduate College“ (IGC), SFB-Transregio 17, Universität Würzburg |
| 2013 - 2014 | Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät, Universität Würzburg |

- 2013 - 2015 Stipendiat der „Graduate School of Life Sciences“ (GSLs),
 „Exzellenzprogramm für Medizinische Doktoranden“,
 Universität Würzburg
- seit 2015 Stipendiat des „Interdisciplinary Center for Clinical Research“ (IZKF)
 und der „Graduate School of Life Sciences“ (GSLs),
 MD/PhD-Programm, Universität Würzburg

PUBLIKATIONEN

Schulze M, Fedorchenko O, **Zink TG**, Knobbe-Thomsen CB, Kraus S, Schwinn S, Beilhack A, Reifenberger G, Monoranu CM, Sirén AL, Jeanclos E and Gohla A: "Chronophin is a glial tumor modifier involved in the regulation of glioblastoma growth and invasiveness." *Oncogene* (2015), accepted.

Sondergeld TG, Schulze M, Monoranu CM and Gohla A: "Mechanism of chronophin loss in glioblastoma multiforme." *The 8th International Symposium of the Graduate School of Life Sciences*, University of Würzburg (2013).

Würzburg, den 14. September 2015

Ort, Datum

Unterschrift

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Der Cofilin-Signalweg im Glioblastoma multiforme - Ursachen für den Verlust von Chronophin und Einfluss von LIM-Kinase-Inhibitoren“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 14. September 2015

Ort, Datum

Unterschrift

AFFIDAVIT

I hereby confirm that my thesis entitled "The cofilin pathway in glioblastoma multiforme - Reasons for chronophin loss and effect of LIM-kinase inhibitors" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Wuerzburg, 14th September 2015

Place, Date

Signature