

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med R.-I. Ernestus

Die Bedeutung von MACC1 für die Pathogenese und klinische Prognose humaner Glioblastome

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Steffen Eberhard Fuchs

aus Dünzendorf

Würzburg, Februar 2016

Referent: Prof. Dr. med. Giles Hamilton Vince
Korreferent: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2017

Der Promovend ist Arzt

Teile der Arbeit wurden bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

Publikationen

1. Carsten Hagemann, Steffen Fuchs, Camelia Maria Monoranu, Pia Herrmann, Janice Smith, Tim Hohmann, Urszula Grabiec, Almuth Friedericke Kessler, Faramarz Dehghani, Mario Löhr, Ralf-Ingo Ernestus, Giles Hamilton Vince, Ulrike Stein. **Impact of MACC1 on human malignant glioma progression and patients' unfavorable prognosis.** *Neuro-Oncology*, 2013; 15 (12): 1696-1709.

Titelgeschichte in dieser Ausgabe.

Kongressbeiträge

1. Ulrike Stein, Steffen Fuchs, Camelia Maria Monoranu, Pia Herrmann, Janice Smith, Ralf-Ingo Ernestus, Giles Hamilton Vince, Carsten Hagemann. **Abstract 444: MACC1 as biomarker for progression and prognosis of human malignant glioma.** 103. Jahreskongress der Amerikanischen Gesellschaft für Krebsforschung (AACR). 31.03.-03.04.2012, Chicago (IL), USA. *Cancer Research*, 72 (8) (Supplement): 444-444. *Posterpräsentation.*
2. Carsten Hagemann, Steffen Fuchs, Camelia Maria Monoranu, Ralf-Ingo Ernestus, Giles Hamilton Vince, Ulrike Stein. **MACC1 expression correlates with human malignant glioma progression and unfavourable patients' prognosis.** 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC). 13.-16.06.2012, Leipzig. German Medical Science Publishing House; 2012. *Vortrag.*
3. Steffen Fuchs, Carsten Hagemann, Camelia Maria Monoranu, Pia Herrmann, Janice Smith, Ralf-Ingo Ernestus, Giles Hamilton Vince, Ulrike Stein. **MACC1 in human and astrocytic tumors: correlation with tumor progression and patients' survival.** 127. Tagung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte e.V. (GDNÄ). 14.-18.09.2012, Göttingen. *Posterpräsentation.*

4. Carsten Hagemann, Steffen Fuchs, Camelia Maria Monoranu, Almuth Friedericke Kessler, Pia Herrmann, Janice Smith, Ralf-Ingo Ernestus, Mario Löhr, Giles Hamilton Vince, Ulrike Stein. **Correlation of MACC1 expression with human malignant glioma progression and unfavorable patients' prognosis.** Brain Tumor. 23.-24.05.2013, Berlin. *Posterpräsentation.*
5. Steffen Fuchs, Carsten Hagemann, Camelia Maria Monoranu, Pia Herrmann, Janice Smith, Ralf-Ingo Ernestus, Giles Hamilton Vince, Ulrike Stein. **MACC1 expression correlates with human malignant glioma progression and unfavorable patients' prognosis.** 1st International Student Conference. 04.-07.07.2013, Graz, Österreich. *Plenarvortrag. Wahl zum besten Vortrag.*
6. Carsten Hagemann, Steffen Fuchs, Almuth Friedericke Kessler, Pia Herrmann, Janice Smith, Tim Hohmann, Urszula Grabiec, Thomas Linsenmann, Faramarz Dehghani, Ralf-Ingo Ernestus, Mario Löhr, Ulrike Stein. **MACC1 reguliert die Migration und Invasion von Glioblastomzellen.** Sektionstagung Neuroonkologie der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC). 15.-16.11.2013, Göttingen. *Vortrag. Wahl zum besten Vortrag.*
7. Carsten Hagemann, Steffen Fuchs, Almuth Friedericke Kessler, Pia Herrmann, Janice Smith, Tim Hohmann, Urszula Grabiec, Thomas Linsenmann, Faramarz Dehghani, Ralf-Ingo Ernestus, Mario Löhr, Ulrike Stein. **MACC1 regulates migration and invasion of glioblastoma cells.** 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC). 11.-14.05.2014, Dresden. *Präsentation des prämierten Vortrages der Sektionstagung Neuroonkologie.*
8. Carsten Hagemann, Steffen Fuchs, Almuth Friedericke Kessler, Pia Herrmann, Janice Smith, Tim Hohmann, Urszula Grabiec, Nikolas Neuhaus, Thomas Linsenmann, Matthias Eyrich, Faramarz Dehghani, Ralf-Ingo Ernestus, Mario Löhr, Ulrike Stein. **MACC1 regulates migration and invasion of glioblastoma cells.** Brain Tumor. 28.-29.05.2015, Berlin. *Vortrag.*

9. Carsten Hagemann, Steffen Fuchs, Almuth Friedericke Kessler, Pia Herrmann, Janice Smith, Tim Hohmann, Urszula Grabiec, Nikolas Neuhaus, Thomas Linsenmann, Matthias Eyrich, Faramarz Dehghani, Ralf-Ingo Ernestus, Mario Löhr, Ulrike Stein. **MACC1 regulates migration and invasion of glioblastoma cells and may serve as a new prognostic marker for glioblastoma patients.** 19. Surgical Research Days. 08.-10.10.2015, Würzburg. European Surgical Research 55, 205-206. *Posterpräsentation.*

Diese Arbeit wurde im Tumorbiologischen Labor der Neuroonkologischen Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. med. G. H. Vince (bis 2011) und Priv.-Doz. Dr. med. M. Löhr (ab 2011) sowie Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Hagemann an der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg (Direktor Prof. Dr. med. R.-I. Ernestus) angefertigt. Die Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät Würzburg gefördert.

Teile dieses Projekts wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. U. Stein, Experimental and Clinical Research Center, eine Kooperation der Charité-Universitätsmedizin Berlin und dem Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin, bearbeitet. Folgende Versuche wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Stein durchgeführt: Quantitative RT-PCR, Generierung von stabilen Zelllinien, Koloniebildungsassay und Echtzeit-Messung von Zellmigration und Proliferation.

Gewidmet meiner Familie
und meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Glioblastoma multiforme ist ein maligner astrozytärer Hirntumor	1
1.1.1	Histopathologie und Molekulargenetik	3
1.1.2	Klinik und Diagnostik	8
1.1.3	Therapie und Prognose	10
1.2	MACC1 ist ein prognostischer Marker für die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms	12
1.2.1	Der HGF-Met Signalweg wird durch MACC1 reguliert	14
1.2.2	Die Expression von MACC1 korreliert mit einer ungünstigen Prognose solider Tumoren	16
1.3	Fragestellung dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Geräte	18
2.1.2	Kits	19
2.1.3	Chemikalien	19
2.1.4	Zellkulturmaterial	20
2.1.5	Verbrauchsmaterial	21
2.1.6	Primer und Hybridisierungssonden	21
2.1.7	Plasmide	22
2.1.8	Größenmarker und Enzyme	23
2.1.9	Antikörper	23
2.1.10	Zelllinien und Bakterienstämme	23
2.1.11	Patientenproben	24
2.1.12	Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien	26
2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellbiologie und Zellkultur	30
2.2.1.1	Kultur von Zelllinien und primären Zellkulturen	30
2.2.1.2	Generierung von stabil MACC1-exprimierenden Zelllinien	31
2.2.1.3	Sphäroid-Migrationsassay.....	32
2.2.1.4	Echtzeitmessung von Zellmigration und Proliferation	34
2.2.1.5	Koloniebildungsassay	36
2.2.2	Proteinbiochemie	36
2.2.2.1	Protein-Isolation aus Zellen	36
2.2.2.2	Protein-Isolation aus Gewebe	37
2.2.2.3	SDS-PAGE und Western Blot.....	38

2.2.3	Molekularbiologie	39
2.2.3.1	RNA-Isolation aus Zellen	39
2.2.3.2	RNA-Isolation aus Gewebe	40
2.2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.3.4	Copy DNA-Synthese	41
2.2.3.5	Semiquantitative RT-PCR	42
2.2.3.6	Quantitative RT-PCR	43
2.2.3.7	Transformation von Bakterien	44
2.2.3.8	Plasmid-DNA Präparation	45
2.2.4	Histologie	46
2.2.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	46
2.2.4.2	Immunhistochemie	47
2.2.5	Datenbankanalyse	49
2.2.6	Statistische Auswertung	50
3	Ergebnisse.....	51
3.1	MACC1-Expressionsanalyse in Glioblastomzellen.....	51
3.1.1	Die Analyse von Microarrays zeigte eine starke Expression und Veränderung der Anzahl der Genkopien von MACC1 in Glioblastomen	51
3.1.2	Die MACC1 und Met mRNA-Expression korrelierte mit dem WHO-Grad astrozytärer Tumoren	53
3.1.2.1	MACC1 war unterschiedlich stark in humanen GBM-Zelllinien exprimiert	53
3.1.2.2	Die Expression von MACC1 und Met in Glioblastomproben war signifikant höher als in niedergradigen Astrozytomen	54
3.1.3	Anhand der MACC1-Protein Expression konnte zwischen verschiedenen Astrozytom-Entwicklungsstadien unterschieden werden	56
3.2	Effekte von MACC1 auf das Überleben von Glioblastompatienten	59
3.3	Funktionelle in vitro Analysen des Einflusses von MACC1 auf Schlüsseleigenschaften von Glioblastomzellen.....	60
3.3.1	Die Migration von Glioblastom-Primärkulturen korrelierte mit der endogenen MACC1-Expression	60
3.3.2	Die Überexpression von MACC1 führte zu einer erhöhten Zellmigration ...	63
3.3.3	MACC1 induzierte eine Erhöhung der Proliferation, auch zelladhäsionsunabhängig	65
4	Diskussion.....	67
4.1	MACC1 war in Glioblastomen verstärkt exprimiert	67
4.2	Die MACC1-Expression hatte prognostische Bedeutung für Patienten mit astrozytären Tumoren	69
4.3	MACC1 regulierte Schlüsseleigenschaften von Glioblastomzellen	72
4.4	Ausblick	75

5	Zusammenfassung.....	77
6	Abstract	79
	Literaturverzeichnis	81
	Web-Verzeichnis	89
	Abbildungsverzeichnis.....	91
	Abkürzungsverzeichnis.....	92
	Danksagung	95
	Lebenslauf	97

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastoma multiforme ist ein maligner astrozytärer Hirntumor

Tumorerkrankungen sind nach den Erkrankungen des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Web 1). Im Erwachsenenalter sind vor allem Prostata-, Brust-, Lungen- und Darmneoplasien häufig. Darunter sind die primären Hirntumoren mit nur ca. 2 % aller Neoplasien eher selten. Jedoch zählt der häufigste Vertreter dieser Gruppe, das Glioblastoma multiforme, generell zu den gefährlichsten Tumorentitäten überhaupt und weist eine infauste Prognose auf (Reifenberger und Collins, 2004). Glioblastome zeigen eine Inzidenz von drei bis vier Fällen pro 100.000 Erwachsenen und stellen ca. 20 % aller Hirnläsionen in Deutschland dar (Web 2). Im Jahre 2012 wurden in Deutschland 7.180 neue Fälle von Hirntumoren diagnostiziert. Zum Vergleich: Die Zahl der Krebsneuerkrankungen betrug im selben Jahr 477.950 Fälle (Web 3).

Das Glioblastom gehört zur Gruppe der Astrozytome, die von einer Untergruppe der Gliazellen des Gehirns, den Astrozyten, ausgehen. Astrozytome sind mit Abstand die häufigsten Tumoren der Gruppe der sogenannten Gliome. Dazu gehören neben Ependymomen, ausgehend von Ependymzellen, z.B. noch oligodendrogliale Tumoren. Die aktuelle Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2007 unterscheidet neun verschiedene astrozytäre Tumorentitäten hauptsächlich anhand von histologischen Kriterien. Sie werden nach Dignität von Grad I, eher benigne, bis zu Grad IV, äußerst maligne, eingeteilt (Louis *et al.*, 2007) (Tab. 1.1).

Niedergradige Astrozytome WHO-Grad I kommen vor allem im Kindesalter vor und wachsen sehr langsam. Hirntumore stellen bei Kindern im Allgemeinen mit 24,4 % aller Tumorerkrankungen nach den Leukämien (33,4 %) die zweithäufigste Krebsart dar (Web 3). Mit einer Inzidenz von 0,8/100.000 Kindern ist das Pilozytische Astrozytom der häufigste Hirntumor bei Kindern und kommt vor allem im Kleinkindesalter vor. Es ist ein zellarmer, benigner Tumor und kann daher häufig kurativ reseziert werden. Die Prognose ist mit einer Fünfjahresüberlebensrate (5-JÜR) von 85-100 % sehr gut. Dauerheilungen sind möglich (Pfister und Witt, 2009).

Tab. 1.1: Klassifikation und Grading von astrozytären Tumoren. Einteilung der Tumoren nach der aktuellen vierten Auflage der WHO-Klassifikation von Tumoren des zentralen Nervensystems. Die häufigsten Entitäten sind fett markiert. Grad I entspricht gut differenzierten, eher benignen Tumoren und Grad IV sehr malignen Tumorentitäten (Louis *et al.*, 2007)

Tumorentität	WHO-Grad
Subependymales Riesenzell-Astrozytom	I
Pilozytisches Astrozytom	I
Pilomyxoides Astrozytom	II
Diffuses Astrozytom	II
Pleomorphes Xanthoastrozytom	II
Anaplastisches Astrozytom	III
Glioblastoma multiforme	IV
Riesenzell-Glioblastom	IV
Gliosarkom	IV

Diffuse Astrozytome WHO-Grad II kommen bei Erwachsenen mittleren Alters vor und weisen einen Altersgipfel von 46 Jahren auf. Sie sind gut differenzierte Tumoren, aber infiltrieren diffus in das umliegende Gewebe. Daher ist eine komplette Resektion oft nicht möglich. Dies führt dazu, dass diffuse Astrozytome häufig rezidivieren oder sich zu Astrozytomen eines höheren WHO-Grades entwickeln. Die 5-JÜR beträgt 45 % (Riemenschneider und Reifenberger, 2009).

Anaplastische Astrozytome entstehen häufig aus niedergradigen astrozytären Tumoren. Sie weisen bereits eine höhere Zellteilungsrate auf als die benignen Läsionen und sind wenig differenzierte Tumoren. Das mittlere Erkrankungsalter liegt mit ca. 50 Jahren etwas höher als bei den diffusen Astrozytomen. Die 5-JÜR beträgt nur ungefähr 28 %. Auch sie können sich zu einem Glioblastom entwickeln (Riemenschneider und Reifenberger, 2009).

Man unterscheidet klassischerweise zwei unterschiedliche Formen von Glioblastomen (GBM): Das primäre Glioblastom (pGBM), welches *de novo* entsteht und das sekundäre Glioblastom (sGBM), das sich aus niedergradigen Astrozytomen entwickelt. Primäre Glioblastome sind mit mehr als 90 % aller GBM die häufigste Variante und stellen eine schnell proliferierende Tumorentität dar. Diese führt trotz optimaler Therapie meist innerhalb von wenigen Monaten zum Tod. Das durchschnittliche Alter bei der

Erstdiagnose liegt bei ca. 60 Jahren. Sekundäre Glioblastome hingegen treten deutlich früher auf, mit einem Häufigkeitsgipfel von 45 Jahren. Sie wachsen langsamer und führen erst nach ungefähr vier bis fünf Jahren zum Tod. Das relative 5-JÜR für alle Glioblastom-Patienten liegt unter 3 %. Durchschnittlich sind Männer ca. 1,3-fach häufiger von der Krankheit betroffen als Frauen (Riemenschneider und Reifenberger, 2009). Eine Assoziation des Auftretens von Gliomen mit bestimmten Umweltfaktoren war bisher vergebens. Der einzige gesicherte unabhängige Faktor, der die Ausbildung eines Glioms begünstigen kann, ist die therapeutische Bestrahlung des Gehirns. Diese wird zum Beispiel bei Hirnmetastasen oder bei ZNS-Manifestation einer Leukämie im Kindesalter angewandt (Ohgaki und Kleihues, 2005). Gliome treten hierbei oft in weniger als 10 Jahren nach der Bestrahlung auf. Weiterhin können Gliome mit verschiedenen hereditären Tumorsyndromen, wie z.B. dem Li-Fraumeni-Syndrom, der Neurofibromatose 1 und 2 und der tuberösen Sklerose assoziiert sein (Ostrom *et al.*, 2015).

1.1.1 Histopathologie und Molekulargenetik

Obwohl man in der klinischen Praxis zwischen zwei verschiedenen Untertypen von Glioblastomen differenziert, findet man histologisch keine Unterschiede. Zu den charakteristischen feingeweblichen Merkmalen von Glioblastomen, die sie von niedergradigen Astrozytomen unterscheiden, gehören eine starke Vaskularisierung und Nekrosen. Die Gefäße sind typischerweise wie ein Knäuel angeordnet („Gefäß-Glomerulus“) und häufig unreif, was zu Einblutungen führen kann (Riemenschneider und Reifenberger, 2009). Die Nekrosen sind oft streifenförmig ausgebildet und von dick gepackten Tumorzellen radial in einem „pseudo-palisadenartigen“ Muster umgeben (Abb. 1.1b). Die Zellen eines Glioblastoms sind hochgradig pleomorph und inhomogen. Es finden sich teilweise gut differenzierte Zellen, teilweise aber auch Riesenzellen mit mehreren Kernen oder spindelförmige Zellen. Auch gemistozytische Zellen, d.h. große Tumorzellen mit exzentrischem Zellkern und stark vermehrtem eosinophilem Zytoplasma kommen vor, was einem reaktiven Zustand der Astrozyten entspricht. Dieses gemischte Bild spricht für die genetische Instabilität von Glioblastomen, welche sich in einem variablen Zellphänotyp äußert. Weiterhin ist die

mitotische Aktivität hoch und auch atypische Mitosen treten gehäuft auf (Riemenschneider und Reifenberger, 2009).

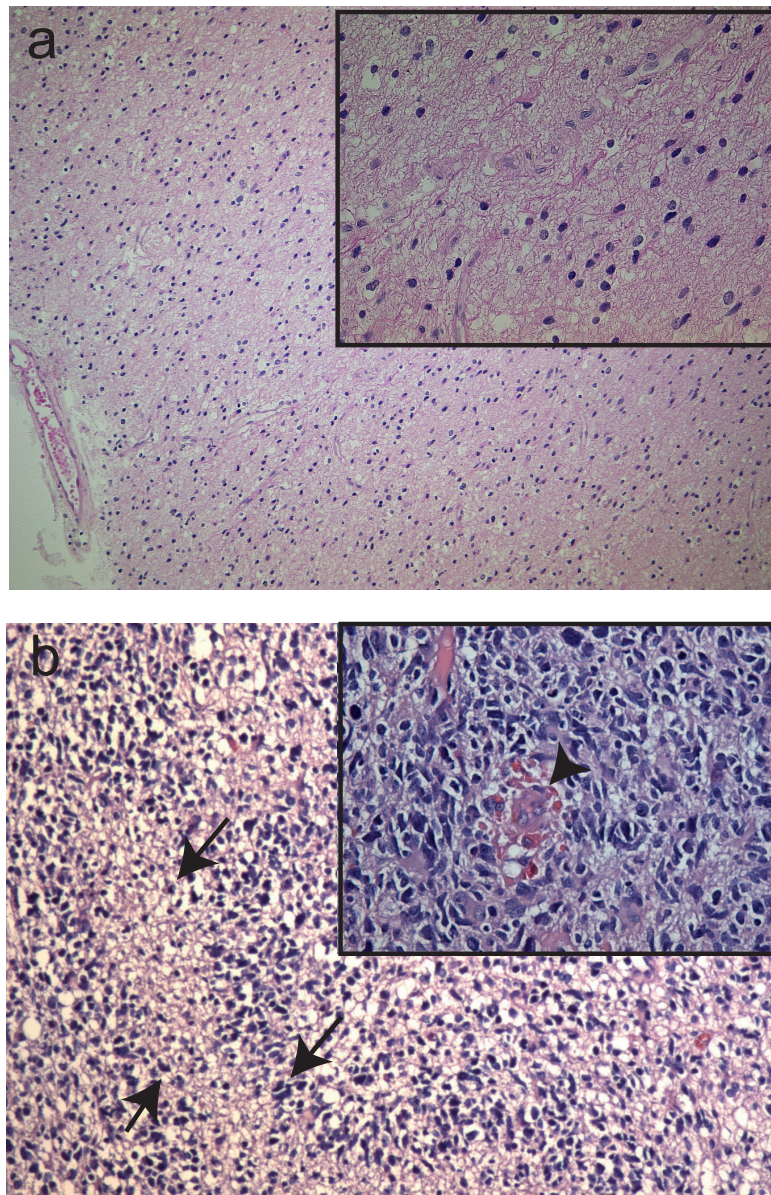


Abb. 1.1: Das Glioblastom ist ein zellreicher Tumor mit starker Vaskularisierung und Nekrosen. a) Das diffuse Astrozytom stellt sich als ein gut differenzierter, eher zellarmer Tumor dar (eigene Aufnahmen). b) Ausschnitt eines Glioblastoms. Man erkennt die hohe Zellularität. Im linken Teil des großen Fotos zeigen sich nekrotische Areale (Pfeile). Im kleinen Bild sind zahlreiche Gefäße angeschnitten (Pfeilspitze) (Aufnahmen von Camelia Monoranu, Neuropathologie Würzburg). Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten. Vergrößerung großes Bild 10x, kleines Bild 40x.

Makroskopisch präsentieren sich Glioblastome meist als eine diffuse Masse mit Einblutungen und Nekrosen, welche in die weiße Substanz, meist supratentoriell im

Bereich der Großhirnhemisphären, einwächst (Abb. 1.2). Wächst der Tumor über eine Infiltration des Corpus callosum in beide Hemisphären ein, wird er wegen seines charakteristischen Aussehens im Frontalschnitt als „Schmetterlingsglioblastom“ bezeichnet. Dieser hohe Grad an Heterogenität und Variabilität, sowohl aus mikro- und makroanatomischer Sicht, sorgte 1926 für die historische Bezeichnung als Glioblastoma multiforme (Bailey und Cushing, 1926).

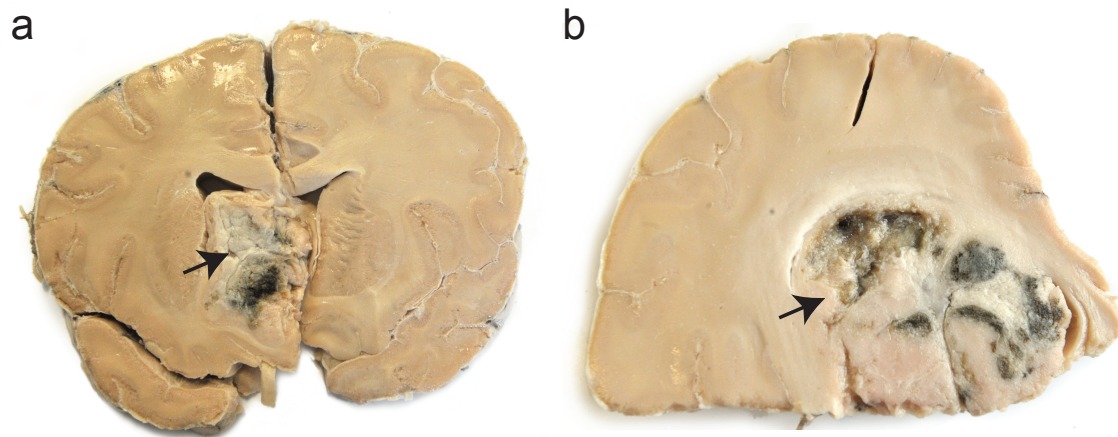


Abb. 1.2: Das Glioblastom ist ein invasiv wachsender Tumor. a,b) Makroskopische Präsentation eines Glioblastoms. Der Tumor infiltriert diffus Basalganglien, Diencephalon, Corpus callosum und das Ventrikelsystem. Auffällig sind die nekrotischen Anteile des Glioblastoms und einige ältere Blutungen (Pfeile) (Aufnahmen von Camelia Monoranu, Neuropathologie Würzburg). Frontalschnitte durch ein Hirnpräparat.

Diese Eigenschaft der diffusen Infiltration in umliegende Gewebe trägt besonders zur ungünstigen Prognose von Glioblastomen bei. In einer Arbeit aus dem Jahr 2012 wurde durch immunhistochemische Färbung von Schnitten durch komplette Gehirne gezeigt, dass sich die Tumorzellen bei Patienten mit sekundärem Glioblastom überall verteilt im Gehirn befinden können, oft weit entfernt vom Primarius. Dies macht eine Heilung meist unmöglich (Sahm *et al.*, 2012). Extrakranielle Metastasen von Glioblastomen hingegen sind äußerst selten und treten nur in weniger als 0,5 % aller Fälle auf (Lun *et al.*, 2011).

Im Vergleich zum Glioblastom sind niedergradige Astrozytome WHO-Grad II histologisch gut differenzierte und weniger zellreiche Tumoren. Mitosen und Atypien finden sich nur selten (Riemenschneider und Reifenberger, 2009) (Abb. 1.1a).

Obwohl sich aus histologischer Sicht wenige Unterschiede zwischen primären und sekundärem Glioblastom finden, unterscheiden sich diese Tumoren auf molekular-genetischer Ebene stark und weisen grundlegend unterschiedliche Mutationen und chromosomale Veränderungen auf. Für pGBM typisch ist eine Amplifikation des *Epidermal Growth Factor Receptors* (EGFR), eine Mutation des *Phosphatase and Tensin Homolog* Gens (PTEN) und ein Verlust von Chromosom 10. Sekundäre Glioblastome hingegen weisen häufig eine Mutation der Tumorsuppressorgene 53 (TP53) und Retinoblastom (RB) sowie einen Verlust des langen Arms von Chromosom 19 auf. Es findet sich so ein unterschiedliches genetisches Profil für primäre und sekundäre Glioblastome, welches aber für diagnostische Zwecke schwer zu nutzen ist (Furnari *et al.*, 2007; Ohgaki und Kleihues, 2013) (Abb. 1.3).

In 2008 fiel durch eine genomweite Mutationsanalyse von Glioblastomen auf, dass einige der Tumoren Mutationen des Gens der Isozitatdehydrogenase und darunter vor allem des Isotyps 1 (IDH1) aufwiesen. Erstaunlicherweise waren dies in fast allen Fällen sGBM (Yan *et al.*, 2009) (Abb. 1.3). Die IDH katalysiert im Rahmen des Zitratzyklus die Reaktion von Isozitat zu α -Ketoglutarat. Durch die häufigste Mutation der IDH an einem Arginin an Stelle 132 (R132) im aktiven Zentrum bekommt das Enzym eine neue katalytische Aktivität und bildet 2-Hydroxyglutarat (2-HG) als Reaktionsprodukt. Es konnte gezeigt werden, dass 2-HG die Demethylierung von Histonen hemmt und so die Differenzierung von Zellen verhindern kann (Lu *et al.*, 2012). Tumoren mit einer mutierten IDH zeigen außerdem eine verstärkte Methylierung von Genpromotoren, was zur epigenetischen Inaktivierung verschiedener Gene führt (*Glioma CpG-island methylator phenotype*, G-CIMP). G-CIMP positive Tumoren stellen eine distinkte Subgruppe mit besserer Prognose dar (Noussmehr *et al.*, 2010; Turcan *et al.*, 2012). Weitere Studien konnten IDH1 mittlerweile in der klinischen Praxis als diagnostischen Marker für sGBM etablieren (Nobusawa *et al.*, 2009; Ohgaki und Kleihues, 2013). Warum die IDH vor allem in sGBM mutiert ist, bleibt unklar, könnte aber einen Hinweis darauf liefern, dass in dieser Tumorentität der zelluläre Metabolismus für den Methylierungsstatus mitentscheidend ist und so zur Pathogenese des Tumors beiträgt (Cloughesy *et al.*, 2014).

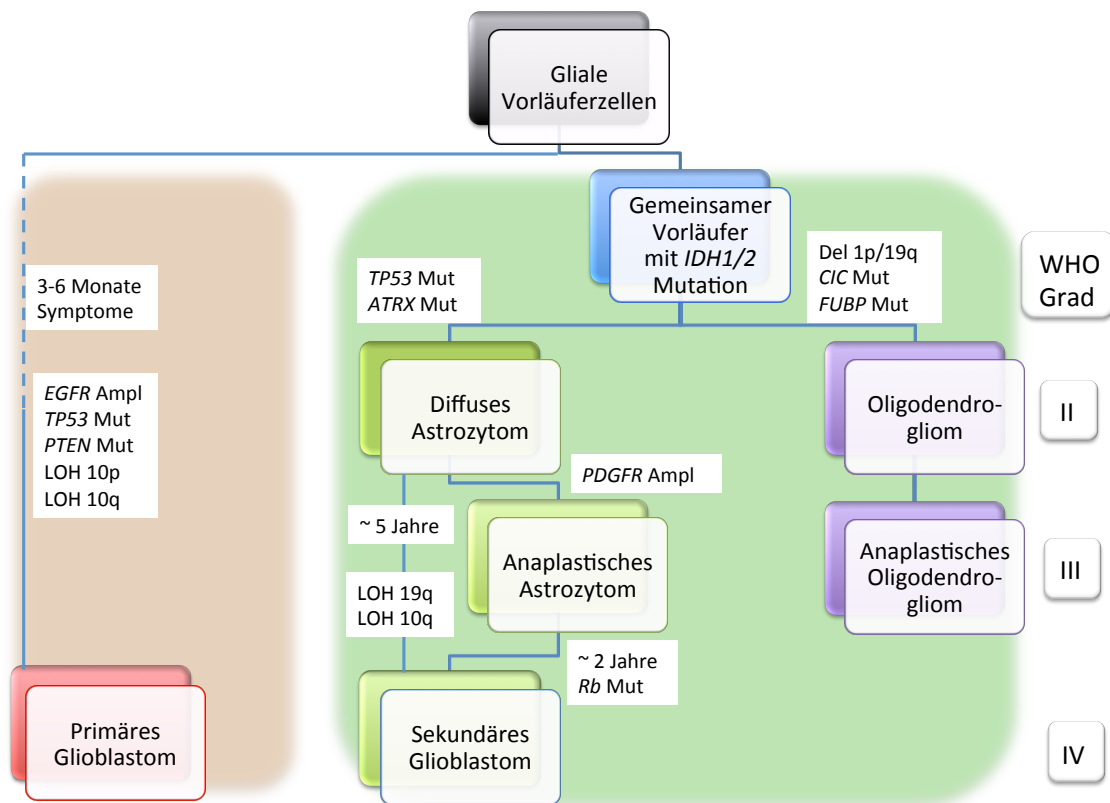


Abb. 1.3: Primäre und sekundäre Glioblastome weisen unterschiedliche genetische Veränderungen auf. Stark vereinfacht dargestellt sind die verschiedenen Mutationen und chromosomalen Veränderungen, die von den glialen Vorläuferzellen ausgehend zu unterschiedlichen Gliomen führen. Die durchschnittliche Dauer bis zum nächsten Entwicklungsschritt ist angegeben. Es wird vermutet, dass oligodendrozytische Tumoren und sGBM von einer gemeinsamen Vorläuferzelle mit *IDH1/2* Mutationen ausgehen, wohingegen pGBM eine distinkte Gruppe darstellen. LOH, *Loss of Heterozygosity*; Mut, Mutation; Ampl, Amplifikation; Del, Deletion; IDH, Isozitratdehydrogenase; EGFR, *Epithelial Growth Factor Receptor*; TP53, Tumorsuppressorgen 53; PTEN, *Phosphatase and Tensin Homolog*; ATRX, *α -Thalassemia / Mental-Retardation-Syndrome-X-Linked*, PDGFR, *Platelet Derived Growth Factor Receptor*; Rb, Retinoblastom Tumorsuppressorgen; CIC, Homolog des Gens *Capicua* von *D. melanogaster*; FUBP, *Far Upstream Element (FUSE) Binding Protein 1* (nach Furnari *et al.*, 2007; Ohgaki und Kleihues, 2013).

Eine noch detailliertere Einteilung der Glioblastome in weitere Untergruppen gelang im Jahre 2010 im Rahmen des Projekts „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA, 2008; Verhaak *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser groß angelegten internationalen Studie sollten genetische Veränderungen einer Vielzahl von Tumoren klassifiziert werden, um so eine Grundlage für neue Therapien zu liefern. Hierbei untersuchten Roel G.W. Verhaak *et al.* die sequenzierten Genome von 206 Glioblastomen auf gemeinsame genetische

Veränderungen. Dadurch konnten vier molekulare Untergruppen definiert werden: Proneurale, neurale, klassische und mesenchymale Glioblastome. Die Unterschiede beruhen vor allem auf Mutationen, bzw. unterschiedlicher Expression der Gene *Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha Polypeptide* (PDGFRA), Neurofibromin 1 (NF1), EGFR und IDH1. Diese Klassifikation nimmt auch Bezug zur „klassischen Einteilung“ in primäre und sekundäre Glioblastome. So sind die sGBM fast ausschließlich als proneurale GBM in dieser Klassifizierung zu finden. Neuere Erkenntnisse konnten diese Einteilung jedoch teilweise wieder relativieren. Sottoriva *et al.* zeigten, dass die molekularen Subtypen nach Verhaak *et al.* bereits alle innerhalb eines einzigen Glioblastoms eines Patienten vorkommen können (Sottoriva *et al.*, 2013).

Diese Entwicklung vom Versuch der histologischen zur molekulargenetischen Klassifikation der Glioblastome zeigt sehr deutlich, wie heterogen diese Tumorentität ist und wie schwer sie trotz verschiedener wissenschaftlicher Ansätze im klinischen Alltag zu fassen ist.

1.1.2 Klinik und Diagnostik

Glioblastome werden häufig erst sehr spät klinisch auffällig. Meist sind die Initialsymptome durch den erhöhten Hirndruck bedingt, den der diffus intrazerebral wachsende Tumor verursacht. Eine Verlegung des Ventrikelsystems durch den Tumor, oder das häufige perifokale Ödem um die Läsion herum, lassen den Druck noch zusätzlich ansteigen. Es kann zu Übelkeit, Kopfschmerzen und Sehstörungen kommen. Auch epileptische Anfälle, Vigilanzminderungen und psychische Veränderungen treten auf. Je nach Lokalisation des Tumors kann es zu fokalen neurologischen Ausfällen kommen (Ichimura *et al.*, 2004; Poeck und Hacke, 2006).

Die Diagnostik stützt sich auf die bildgebenden Methoden der Neuroradiologie. Mittel der Wahl ist die Magnetresonanztomographie (MRT) mit und ohne Kontrastmittelinjektion. Hierdurch können Informationen über die Lokalisation des Tumors, das perifokale Ödem und Massenverschiebungen im Gehirn, meist in Form von Verlagerungen der Mittellinie, gewonnen werden. Eine eventuelle Kontrastmittelaufnahme gibt Hinweise auf eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke. Der Vorteil des

MRT ist zusätzlich die bessere Darstellung des Weichteilgewebes im Vergleich zur Computertomographie (CT), was eine noch bessere Abgrenzung des Tumors- zum umgebenden Hirngewebe ermöglicht (Poeck und Hacke, 2006). Nach Kontrastmittelgabe zeigt sich typischerweise eine ringförmige Kontrastmittelaufnahme, die der starken peripheren Vaskularisierung und zentralen Nekrose des Tumors entspricht

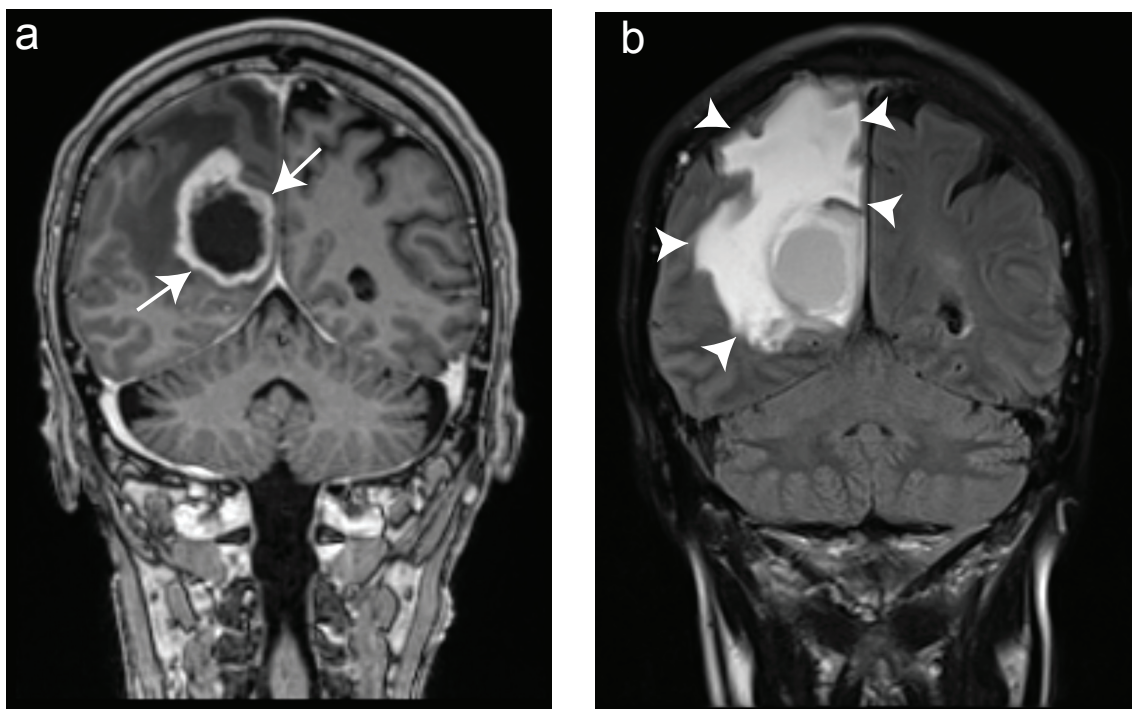


Abb. 1.4: Patient mit Glioblastom im rechten Parietallappen. a) Der Tumor stellt sich durch eine ringförmige Kontrastmittelaufnahme in der rechten Hemisphäre dar (Pfeile). Er verlegt teilweise den rechten Seitenventrikel. MRT-Aufnahme in Koronarebene in T1-Wichtung nach Kontrastmittelinjektion. b) In der FLAIR-Sequenz zeigt sich ein großes perifokales Ödem (Pfeilspitzen). MRT-Aufnahme in Koronarebene in T2-Wichtung mit FLAIR-Sequenz. FLAIR, *Fluid-attenuated inversion recovery* (Aufnahmen von Joanna Pocij, Klinik und Hochschulambulanz für Radiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin).

(Abb. 1.4a). Moderne MRT-Sequenzen wie das *Fluid attenuated inversion recovery* (FLAIR) zeigen noch genauer das intraparenchymatöse Wachstum des Tumors, sowie das perifokale Ödem und ermöglichen eine exaktere Diagnose (Abb. 1.4b). In Sonderfällen und zur differentialdiagnostischen Abgrenzung kann zusätzlich noch eine CT des Schädels angezeigt sein, welche unter anderem Verkalkungen besser darstellen kann. Weitere Abgrenzung beispielsweise zu entzündlichen Differentialdiagnosen wie dem Hirnabszess kann eine Lumbalpunktion bringen. Diese ist jedoch häufig wegen des durch die Erkrankung bedingten erhöhten Hirndrucks kontraindiziert (Web 2).

Zur Diagnosesicherung ist eine Analyse von histologischem Gewebe unumgänglich. Dies geschieht meist im Rahmen der Operation des Tumors. Bei nicht operablen Tumoren oder schlechtem Allgemeinzustand des Patienten kann auch eine stereotaktische Biopsie durchgeführt werden. Die Biopsie führt in über 90 % der Fälle zur richtigen Diagnose (Grasbon-Frodl *et al.*, 2007; Simon und Schramm, 2009).

Astrozytäre Tumoren werden mikroskopisch mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) nach der WHO-Klassifikation eingeteilt (Tab. 1.1). Hier finden sich für das Glioblastom die unter 1.1.1 beschriebenen morphologischen Kriterien. Durch immunhistochemische Färbungen lässt sich die Diagnose weiter eingrenzen. Beispielsweise spielt der astrozytäre Marker *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) eine wichtige Rolle für die Diagnose von astrozytären Tumoren, jedoch verliert er sich häufig mit zunehmender Malignität, was die Unterscheidung der verschiedenen Entitäten schwierig macht (Riemenschneider und Reifenberger, 2009). Außerdem können auch oligodendrozytische Tumoren positiv für GFAP sein. Da es sich bei den Glioblastomen um hochproliferative Tumoren handelt, dienen Proliferationsmarker wie Ki-67 zur weiteren Abgrenzung. Der Nachweis einer mutierten IDH1 dient weiterhin der Diagnose von sGBM. Trotzdem fehlt ein eindeutiger immunhistochemischer Marker für die viel häufiger vorkommenden pGBM. Außerdem dient die Immunhistochemie dem Ausschluss von Differentialdiagnosen, wie Karzinometastasen oder Lymphomen, die z.B. positiv für Zytokeratine oder lymphozytäre Marker wie CD20 wären (Web 2).

1.1.3 Therapie und Prognose

Aktuell werden GBM interdisziplinär durch operative Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie behandelt. Trotz bestmöglicher Behandlung ist noch keine kurative Therapie möglich und das mediane Überleben beträgt lediglich 14,6 Monate (Stupp *et al.*, 2005).

Die Basis der Glioblastomtherapie stellt die möglichst vollständige neurochirurgische Resektion des Tumors dar. Hierdurch kann die Tumormasse reduziert und der intrakranielle Druck gesenkt werden. Dies kann sowohl die klinische Symptomatik lindern als auch die Prognose verbessern. Eine Entfernung des Tumors im Gesunden ist jedoch häufig schwierig, da umgebende Hirnstrukturen geschädigt werden und oft

nicht ohne Funktionsverlust entfernt werden können.

Neuere Techniken wie die Markierung des Tumorgewebes mit fluoreszierenden Farbstoffen, die intraoperative MRT oder die Überwachung neurologischer Funktionen durch z.B. motorisch evozierte Potentiale, führten zu einem besseren Resektionsergebnis und konnten das progressionsfreie Überleben positiv beeinflussen (Neuloh *et al.*, 2004; Senft *et al.*, 2011; Stummer *et al.*, 2006).

Einen weiteren Pfeiler der Glioblastombehandlung stellt die Strahlentherapie dar. Diese wird meist mit einer Gesamtdosis von ca. 60 Gy in 30 Fraktionen durchgeführt (Laperriere *et al.*, 2002).

Des Weiteren hat im letzten Jahrzehnt die Einführung von Chemotherapeutika in den Behandlungsalgorithmus die Glioblastomtherapie revolutioniert. Im Rahmen der EORTC-NCIC Studie 22981/26981 wurde 2005 gezeigt, dass das Alkylanz Temozolomid (TMZ) in Kombination mit Operation und Bestrahlung die mediane Überlebenszeit signifikant von 12,1 auf 14,6 Monate im Vergleich zur alleinigen Operation und Strahlentherapie verlängern konnte (Stupp *et al.*, 2009; Stupp *et al.*, 2005). Seither gehört TMZ im Rahmen des „Stupp-Protokolls“ zur GBM Erstlinientherapie. Die Standardtherapie umfasst die orale Gabe von TMZ als Begleittherapie zur Bestrahlung. Nach einer Therapiepause werden im Anschluss 6 Zyklen TMZ als adjuvante Monotherapie weitergegeben (Web 4).

Temozolomid gehört zur Klasse der Alkylanzien und führt durch Methylierung von Guanin an der O⁶-Position zu DNA-Schäden und damit zur Apoptose. Die Wirksamkeit von Temozolomid hängt maßgeblich von der Aktivität des Enzyms O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ab. Dieses Enzym schützt die DNA physiologischerweise vor alkylierenden Mutagenen. Ist die MGMT im Tumorgewebe aktiv, wird der durch TMZ gesetzte Schaden repariert und der Tumor ist therapieresistent. In ca. 45 % der GBM ist der Promotor des MGMT-Gens methyliert und somit das Gen durch epigenetische Modifikation inaktiv. Hegi *et al.* zeigten, dass GBM-Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor unabhängig von der Therapie ein signifikant längeres medianes Gesamtüberleben aufwiesen (Hegi *et al.*, 2005; 18,2 Monate vs. 12,2 Monate; $p < 0,001$). Solche Tumoren sprechen konsequenterweise besonders gut auf die Behandlung mit TMZ an. Die Stärke der Methylierung des MGMT-Promotors

kann mittels methylierungsspezifischer Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt werden. Der MGMT-Methylierungsstatus wurde durch mehrere größere klinische Studien wie Nordic Trial und NOA-8 als prädiktiver Biomarker für ältere Patienten etabliert und kann bei der Entscheidung helfen, ob TMZ eingesetzt wird oder nicht (Malmstrom *et al.*, 2012; Wick *et al.*, 2012).

Die früher häufig verwendeten Nitrosoharnstoffe wurden durch TMZ weitgehend aus der Primärtherapie verdrängt und finden nur noch im Rezidivfall eine Anwendung. Auch die Anwendung von Carmustin als sogenannter Wafer intraoperativ direkt in die Resektionshöhle eingebracht, konnte sich nicht durchsetzen (Web 2). Im Rezidivfall kann außerdem noch der monoklonale Antikörper Bevacizumab eingesetzt werden, der gegen den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) gerichtet ist. Dieser hat jedoch aktuell in Deutschland noch keine Zulassung, da sich in klinischen Studien nur ein Effekt auf das progressionsfreie Überleben und nicht auf das Gesamtüberleben bestätigen lies (Gilbert *et al.*, 2014).

Als negative prognostische Faktoren im Rahmen der GBM-Therapie gelten ein schlechter Allgemeinzustand, bewertet als Karnowski-Index < 70, hohes Alter > 65-70 Jahre und vor allem bei älteren Patienten ein hypomethylierter MGMT-Promotor (Web 2).

1.2 MACC1 ist ein prognostischer Marker für die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms

Metastasierung ist die Haupttodesursache von Tumorerkrankungen (Talmadge und Fidler, 2010). Die Fähigkeit zur Bildung von Metastasen setzt voraus, dass Tumorzellen in der Lage sind zu migrieren und in fremde Gewebe einzuwachsen. Diese Eigenschaften zählen unter anderem neben der Eigenversorgung mit Wachstumsfaktoren, der Induktion von Angiogenese und der Resistenz gegenüber proapoptotischen Signalen zu den Schlüsseleigenschaften von Krebszellen und wurden bereits Anfang des Jahrhunderts als „*Hallmarks of cancer*“ definiert (Hanahan und Weinberg, 2000, 2011).

2009 wurde im Rahmen eines genomweiten Screenings auf metastasierungsassoziierte Gene im Kolonkarzinom (CRC) ein neues Gen mit dem Namen *Metastasis*

Associated in Colon Cancer 1 (MACC1) identifiziert. Die MACC1-Expression war im malignen Karzinomgewebe und den Metastasen signifikant höher als im Normalgewebe. Betrachtet man das Modell zur Entstehung des Kolonkarzinoms, die Adenom-Karzinom-Sequenz, so war MACC1 vor allem am Übergang von benignem zu malignem Gewebe signifikant erhöht (Arlt und Stein, 2009; Fearon und Vogelstein, 1990). MACC1 reguliert unter anderem Proliferation und Migration und konnte als ein unabhängiger prognostischer Marker für die Metastasierung und das metastasefreie Überleben von Patienten mit CRC etabliert werden (Stein *et al.*, 2009b).

Das MACC1-Gen liegt auf Chromosom 7p21.1. Es besitzt sieben Exons und sechs Introns und kodiert für ein Protein mit 852 Aminosäuren. Das Gen ist evolutionär konserviert. Orthologe wurden unter anderem in *Pan troglodytes* (Gemeiner Schimpanse), *Canis familiaris* (Haushund), *Rattus norvegicus* (Wanderratte), *Mus musculus* (Hausmaus) und *Gallus gallus* (Bakivahuhn) nachgewiesen (Stein *et al.*, 2009b). Verschiedene Proteininteraktionsdomänen konnten für das MACC1-Protein durch *in silico* Analysen vorausgesagt werden (Abb. 1.5). So finden sich beispielsweise mehrere Tyrosinreste, die phosphoryliert werden können. Solche Reste können dann von anderen Proteinen mit einer *Src Homology 2 Domain* (SH2-Domäne) erkannt werden und zur Interaktion dienen. Weiterhin existiert eine *Src Homology 3 Domain* (SH3-Domäne), an die Proteine mit prolinreichen Motiven binden können. Ein solches weist auch MACC1 selbst auf, was auf eine zweiseitige Interaktionsmöglichkeit

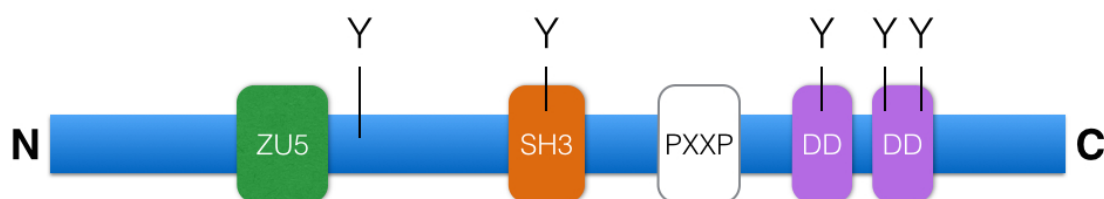


Abb. 1.5: Die Domänenstruktur von MACC1 zeigt Charakteristika eines Signalmoleküls. Schematische Darstellung eines Ausschnitts des MACC1-Genprodukts. Proteindomänen wurden durch *in silico* Analysen vorausgesagt. Durch die Vielzahl an Domänen besitzt das MACC1-Protein eine große Bandbreite von Interaktionsmöglichkeiten. N, N-Terminus; C, C-Terminus; Y, Tyrosinrest, der phosphoryliert werden kann; ZU5, ZU5-Domäne, SH3, *Src Homology 3 Domain*; PXXP, prolinreiches Bindemotiv; DD, *Death-Domain* (nach Stein *et al.*, 2010).

schließen lässt und auch die Bildung von Dimeren ermöglichen könnte. Sowohl die SH3-Domäne als auch die prolinreiche Domäne sind unabdingbar für die Funktion von MACC1 (Stein *et al.*, 2010). Eine ZU5-Domäne kann weitere Wechselwirkungen z.B. mit zytoskelettalen Proteinen vermitteln (Huo *et al.*, 2011). In der Nähe des C-Terminus finden sich noch zwei sogenannte „Death-Domains“, die zum einen mit der Aktivierung von Apoptose und zum anderen aber auch mit immunologischen Funktionen in Zusammenhang gebracht werden (Reed *et al.*, 2004).

Diese spezielle Domänenstruktur ermöglicht MACC1 sowohl Interaktionen mit anderen Proteinen, als auch Modifikationen am MACC1 Protein selbst. Dies prädestiniert MACC1 als Signalmolekül.

1.2.1 Der HGF-Met Signalweg wird durch MACC1 reguliert

MACC1 kann *in vitro* Proliferation, Migration und Invasion induzieren. Eine Überexpression von MACC1 in einer CRC-Zelllinie konnte beispielsweise das Maß an Zellmigration und -invasion mehr als verfünffachen. *In vivo* führte eine intrasplenische Injektion von CRC-Zellen, die MACC1 überexprimierten, zu Lebermetastasen in einem Mausmodell. Ein Knockdown von MACC1 reduzierte die Metastasenbildung drastisch (Stein *et al.*, 2009b). Auffällig war außerdem, dass die Überexpression von MACC1 zu einer erhöhten Expression des Met-Protoonkogens (Met) führte. Ein Knockdown von MACC1 mittels siRNA bewirkte das Gegenteil. Diese und weitere Versuche ergaben, dass MACC1 ein wichtiger Regulator des *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)-Met Signalweges ist und so vermutlich zumindest zum Teil seine Funktion entfaltet (Arlt und Stein, 2009) (Abb. 1.6).

Eine Bindung von HGF an die Rezeptortyrosinkinase Met führt unter anderem zu Proliferation, Migration und Invasion in verschiedenen Zelltypen. Beide Gene sind essentiell für die Embryonalentwicklung, wobei sowohl HGF- als auch Met-Knockoutmäuse nicht lebensfähig sind (Bladt *et al.*, 1995; Uehara *et al.*, 1995). Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von HGF-Met auch an der Entstehung multipler solider und hämatologischer Neoplasien beschrieben (Birchmeier *et al.*, 2003). Nach Bindung von HGF an Met werden mehrere Signalwege, wie der Phosphoinositol-3-Kinase-(PI3K) und der MAP-Kinase-Signalweg (MAPK-Signalweg) aktiviert. Experimente mit Inhibitoren konnten zeigen, dass hiervon für die Funktion und Expression von MACC1

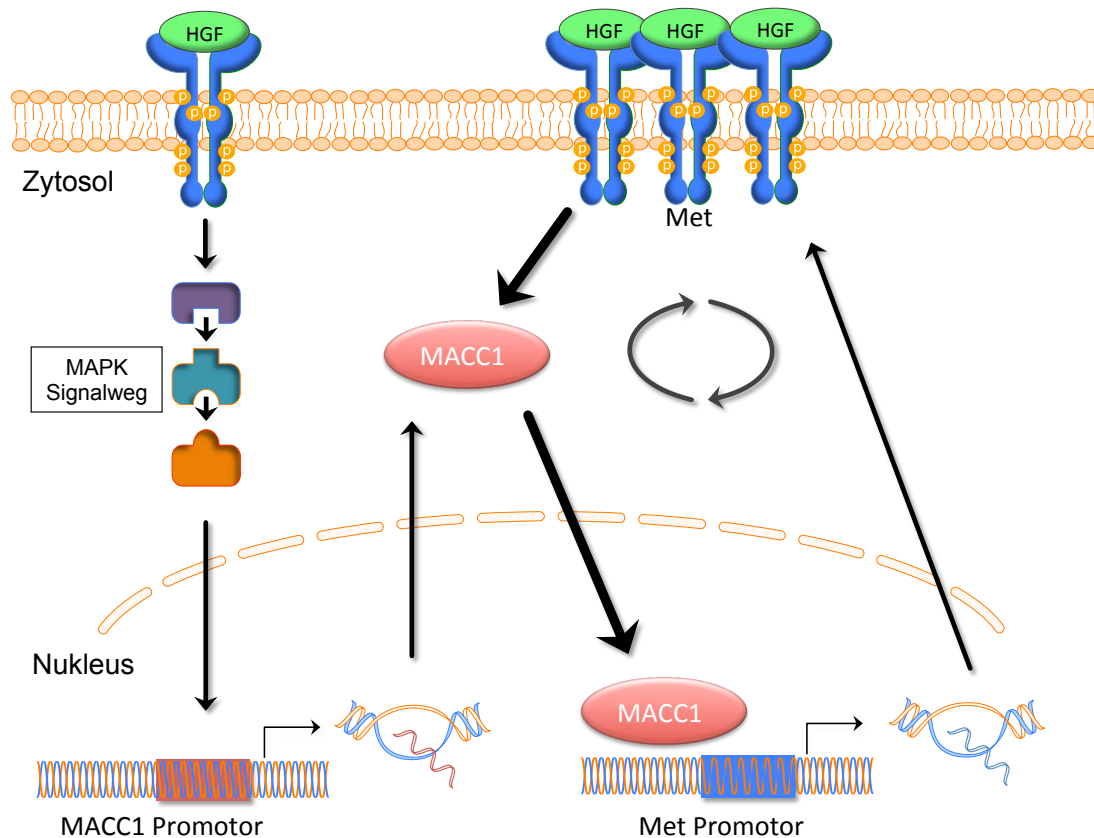


Abb. 1.6: MACC1 reguliert den HGF-Met-Signalweg als transkriptioneller Aktivator von Met. Nach Bindung von HGF an Met wird über Zwischenschritte v.a. der MAPK-Signalweg aktiviert. Dies führt zur Transkription des MACC1 Gens. Bei weiterer Aktivierung des MAPK-Signalwegs wird das MACC1-Protein in den Nukleus verlagert und interagiert als transkriptioneller Regulator mit dem Met-Promotor. MACC1 übt hierbei seine Aktivität möglicherweise über Interaktionspartner aus. Das Met Protein gelangt als Rezeptor für HGF in die Zellmembran. So entsteht ein positiver Feedback-Kreislauf. HGF, *Hepatocyte Growth Factor*; Met, *Met-Protoonkogen*; MAPK, *Mitogen Activated Protein Kinase* (nach Arlt und Stein, 2009).

der MAPK-Signalweg der wichtigere zu sein scheint (Stein *et al.*, 2009b). Dieser kann z.B. den Transkriptionsfaktor *Activator Protein-1* (AP-1, meist ein Heterodimer aus c-Jun und c-Fos) aktivieren, welcher direkt an den MACC1-Promotor bindet (Juneja *et al.*, 2013). Es existieren bereits verschiedene Arbeiten, die diese Transkriptionsfaktoren im onkologischen Kontext untersucht haben (Wang *et al.*, 2000). Posttranskriptionell wird die Expression von MACC1 durch verschiedene microRNAs (miRNA) gehemmt. So inhibieren beispielsweise miR-143 und miR-574-5p die MACC1-Expression im kolorektalen Karzinom (Cui *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012).

Eine Aktivierung der HGF-Met Achse führt zu verstärkter Expression von MACC1 und weiterhin zur Translokation des MACC1-Proteins aus dem Zytoplasma in den Nukleus (Abb. 1.6). Dort steigert MACC1 als transkriptioneller Regulator die Expression von Met. Hierbei bindet MACC1 vermutlich nicht direkt an die Promotorsequenz sondern vermittelt seine Wirkung indirekt über Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren wie Sp1 (Stein *et al.*, 2009a). So ergibt sich ein positiver Rückkopplungs-Mechanismus, der letztendlich dazu führt, dass Proliferation, Invasion und Migration von Tumorzellen gesteigert werden.

Neben der beschriebenen Rolle von MACC1 im pathologischen Kontext gibt es bisher kaum Informationen über die physiologische Funktion des Gens. Da MACC1 unter anderem Proliferation und Migration reguliert, lässt sich eine Funktion in der Embryonalentwicklung vermuten, da beide Eigenschaften charakteristisch für Zellen dieser Phase sind. Einen ersten Hinweis hierfür lieferte eine Studie im Modellorganismus *Danio rerio* (Zebrafisch), die zeigte, dass eine Hemmung der MACC1-Expression in Embryonen zu schweren Gesichtsschädel- und Knorpeldefekten führte (Melvin *et al.*, 2013).

1.2.2 Die Expression von MACC1 korreliert mit einer ungünstigen Prognose solider Tumoren

Seit der Entdeckung von MACC1 im kolorektalen Karzinom konnte eine Überexpression von MACC1 in vielen soliden Tumorentitäten nachgewiesen und mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert werden. Beispielsweise wurde eine hohe MACC1-Expression im Magenkarzinom nachgewiesen. In einer Studie mit 98 Patienten wurde die MACC1-Expression mittels Immunhistochemie analysiert. Ein positiver Nachweis korrelierte signifikant mit einem geringen medianen Gesamtüberleben (Guo *et al.*, 2013). Weitere Studien ergaben, dass eine hohe MACC1-Expression im hepatozellulären Karzinom (HCC) mit einem niedrigen Gesamtüberleben und Metastasierung assoziiert war (Qiu *et al.*, 2011). Darüber hinaus identifizierten weitere Arbeitsgruppen eine erhöhte Expression des Gens z.B. im Ovarialkarzinom und Mammakarzinom (Hu *et al.*, 2014; Muendlein *et al.*, 2014). In jedem der Fälle korrelierte eine hohe MACC1-Expression mit ungünstigen klinischen Parametern, wie kurzem Überleben, Metastasierung oder Rezidiven.

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

In den vorherigen Abschnitten wurde die breite Bedeutung von MACC1 als Schlüsselfaktor für die Entstehung solider Tumoren beschrieben. Daher stellte sich die Frage, ob MACC1 auch eine Bedeutung für die Pathogenese von Glioblastomen haben könnte. Zu Beginn dieser Arbeit war eine Rolle von MACC1 in Glioblastomen und Hirntumoren im Allgemeinen noch komplett unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war der Nachweis von MACC1 in humanen Glioblastomen *in silico* und *in vitro*. Hierfür wurden sowohl bereits publizierte Microarray-Studien, GBM-Zelllinien als auch primäre Glioblastomzellkulturen auf die MACC1-mRNA-Expression untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von Met analysiert. Weiterhin wurde in Paraffinschnitten aus Operationsgewebe von Glioblastomen die Höhe der MACC1-Proteinexpression bestimmt und diese mit dem medianen Patientenüberleben korreliert.

In einem nächsten Schritt folgten dann funktionelle Analysen der Wirkung von MACC1 auf Schlüsseleigenschaften von Glioblastomzellen. Hierfür wurde die endogene MACC1-Expression primärer Glioblastomzellkulturen mit der Fähigkeit zur Migration korreliert. Weiterhin wurde MACC1 in GBM-Zelllinien überexprimiert und die Auswirkungen auf Migration und Proliferation in funktionellen *in vitro* Assays gemessen.

Zusammenfassend sollte durch diese Arbeit geprüft werden, ob MACC1 eine Rolle im Glioblastom spielt und zukünftig als therapeutisches Ziel für die Glioblastomtherapie dienen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Abzug	Kötterman, Hänigsen
BioDocAnalyse digital	Biometra, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau
Centrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Cryofuge 6000i	Heraeus Instruments, Hanau
Elektrophoresekammer	Biozym, Hessisch Oldendorf
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Heizblöcke	Grant Boekel, Eppendorf
LightCycler 480 Instrument	Roche, Mannheim
MacsMix	Miltenyi Biotec, Auburn CA, USA
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
Mikropipetten 10-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Olympus BX41 Fluoreszenz	Olympus, Hamburg
Mikroskop Wilovert	Hundt, Wetzlar
Mikrotom	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Sharp, Osaka, J
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetboy	Integra Biosciences, Ijamsville, MD, USA
Power Ease	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Power Supply für Elektrophoresekammern	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Rotamax	Heidolph, Schwabach
Schüttler Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Sterilwerkbänke	Heraeus Instruments, Hanau
Thermo Cycler T3000	Biometra, Göttingen
Thermo Printer DPU-414	Seiko Instruments, Neu-Isenburg
Vakuumpumpe	Thomas Industries, Puchheim
Vortex Genie-2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Hartenstein, Würzburg
X Cell Sure Lock Western Blot System	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
xCELLigence RTCA (DP) Instrument	Roche, Mannheim
xCELLigence RTCA control unit	Roche, Mannheim
Zählkammer Fuchs-Rosenthal	Hartenstein, Würzburg
Zentrifugationsbecher 500ml	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.2 Kits

Kit	Hersteller
ECL Western-Blotting Analysis System	Amersham Biosciences, Braunschweig
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA/Protein	Macherey-Nagel, Düren
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, Ontario, Kanada
SV Total RNA Isolation Kit	Promega, Madison, WI, USA
ZytoChem-Plus HRP Kit (Broad Spectrum)	Zytomed Systems, Berlin
LightCycler h-G6PDH Housekeeping Gene Set	Roche, Mannheim
LightCycler DNA Master Hybridization Probes	Roche, Mannheim

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agar noble	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aquatex	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Bacto Trypton	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Bacto Hefeextrakt	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Borsäure	ICN Biomedical, Meckenheim
Citrat Puffer, 20x, pH 6,0	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Diethyldicarbonat	Hartenstein, Würzburg
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTPs 100 mM, à 25 mM	Fermentas, Ontario, Kanada
DreamTaq Puffer, 10x	Fermentas, Ontario, Kanada
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eosin G	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 100 % absolut	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol, 70 % absolut	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eukitt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Hämalaun nach Mayer	Roth, Karlsruhe
HCl, 25 %	Merck, Darmstadt
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Loading Dye, 6x	Fermentas, Ontario, Kanada
Magermilchpulver	AppliChem, Gatersleben

MES-Puffer, 20x	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Metafectene pro	Biontix Laboratories, Planegg
MOPS-Puffer, 20x	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Neomycin	PAA Laboratories, Cölbe
NuPage 4-12 % Bis-Tris Polyacrylamid-Gele	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage Reducing Agent	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage Transfer Buffer, 20x	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PBS	Biochrom, Berlin
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris Base, Tris-CL	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ultra pure water	Biochrom, Berlin
Xylol, Isomerengemisch	Riedel-de Haën, Seelze

2.1.4 Zellkulturmaterial

Zellkulturartikel	Hersteller
Deckgläser	Hartenstein, Würzburg
DMEM, 1 g/l Glucose + Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Gewebehomogenisator	Hartenstein, Würzburg
Kryoröhrchen	Nailgene, Brüssel
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Penicillin/Streptomycin-Gemisch	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories, Cölbe
Trypanblau, 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Vitamine, 100x	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
xCELLigence 16-Well CIM plate	Roche, Mannheim
xCELLigence E-plate 16	Roche, Mannheim
Zellkulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ²	Corning, New York, NY, USA
Zellkulturplatten, 6-, 96-Well	Corning, New York, NY, USA
Zellkulturschalen, 60x15 mm, 100x20 mm	Hartenstein, Würzburg
Zellschaber	Hartenstein, Würzburg

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsartikel	Hersteller
Bottle Top Filter	Nailgene, Brüssel
Deckgläser, 24x50 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Röhrchen, 15, 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Hyperfilm TM ECL	Amersham Biosciences, Braunschweig
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Mini PAP-Pen	Zytomed Systems, Berlin
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Parafilm	Pechiney Packing, Chicago, IL, USA
Pasteurpipetten	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen, gestopft und ungestopft	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße SafeLock 0,2-2 ml	Eppendorf, Hamburg
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Whatman-Papier	Hartenstein, Würzburg

2.1.6 Primer und Hybridisierungs sonden

Sequenz	Amplikon	Name	Anwendung
5'-GCAGGGGGGAGCCAAAAGGG-3'	566 bp	GAPDH human sense	sq RT-PCR
5'-TGCCAGCCCCAGCGTCAAAG-3'		GAPDH human antisense	sq RT-PCR
5'-CTTGGTGTCCAGAAAAAGTTTATG-3'	513 bp	MACC1 human sense	sq RT-PCR
5'-CTCCAGTGTTCAGTACAGG-3'		MACC1 human antisense	sq RT-PCR
5'-TTCTTTTGATTCTCCGGTGA-3'	136 bp	MACC1 human sense	q RT-PCR
5'-ACTCTGATGGGCATGTGCTG-3'		MACC1 human antisense	q RT-PCR
5'-GCTGGTGTCTCAATATCA-3'	170 bp	Met human sense	q RT-PCR
5'-GTTGGGCTTACACTTCGG-3'		Met human antisense	q RT-PCR
5'-GCAGACTTCTCAAGAAATTCTGGAAGATCTA-3'		MACC1 FITC-probe	q RT-PCR
5'-AGTGTTCAGAACTTCTGGACATTTAGACGA-3'		MACC1 LCR640-probe	q RT-PCR
5'-GCATGTAATTAGTTCGCTACGATGCA-3'		Met FITC-probe	q RT-PCR
5'-AGTACACTCCTCATTTGGATAGGCTTGT-3'		Met LCR640-probe	q RT-PCR

Die Oligonukleotide für die semiquantitative RT-PCR (sq RT-PCR) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg synthetisiert. Die Primer für die quantitative real time PCR (q RT-PCR) wurden von der Firma BioTeZ, Berlin und die Hybridisierungs-sonden von TIB MolBiol, Berlin, synthetisiert. Für die q RT-PCR wurde außerdem das h-G6PDH Housekeeping Gene Set (Roche, Mannheim) verwendet und von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) ein Amplikon mit 113 bp Länge generiert. Das Kit enthielt auch die entsprechenden Sonden für G6PDH. LCR640, LightCycler Red; FITC, Fluorescein.

2.1.7 Plasmide

Name	Hersteller
pcDNA3.1D/MACC1-V5-His	Stein <i>et al.</i> , 2009
pcDNA3.1	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Das MACC1-Gen codiert für eine mRNA mit 2559 bp Länge. Das Genprodukt ist 852 Aminosäuren lang. Die MACC1 copy DNA (cDNA) wurde von der Arbeitsgruppe Stein *et al.* in den pcDNA3.1 Vektor kloniert (Stein *et al.*, 2009b) (Abb. 2.1).

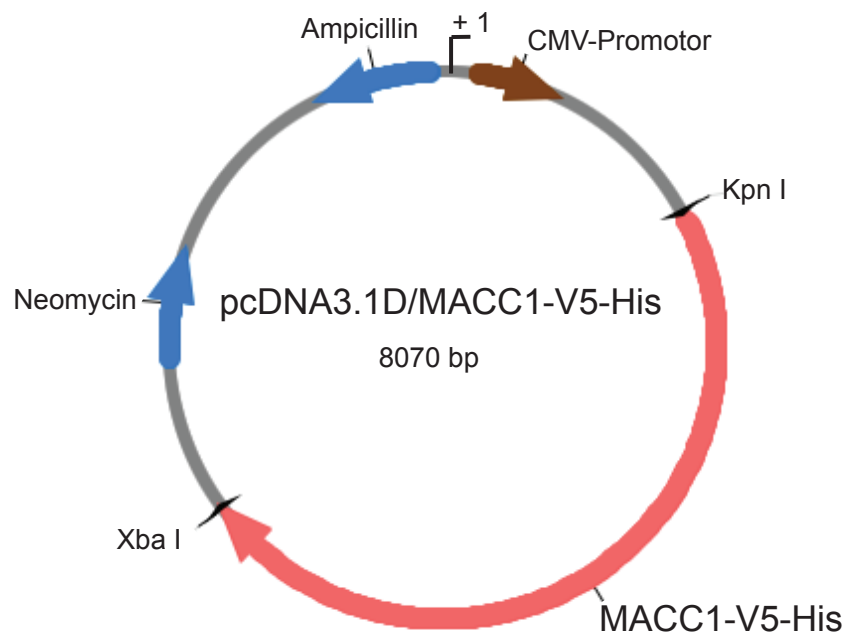


Abb. 2.1: Vektorkarte von pcDNA3.1D/MACC1-V5-His. Die MACC1 cDNA wurde in das Plasmid pcDNA3.1 kloniert. Das Plasmid trägt ein Ampicillin- sowie ein Neomycin-Resistenzgen als Selektionsmarker. Ein pCMV Promotor sorgt für eine starke Expression von MACC1. Die cDNA kann durch schneiden mit den Restriktionsenzymen Kpn I und Xba I herausgelöst werden. V5, V5-Epitop; His, Polyhistidin-Tag (nach Stein *et al.*, 2009b).

Als Selektionsmarker für die Expression in Bakterienzellen diente ein Ampicillin- bzw. für die Expression in Säugerzellen ein Neomycinresistenzgen. Zum Nachweis der ektopen Genproduktion nach Transfektion in Zelllinien ist das MACC1 Gen mit einem V5-Motiv, bzw. einem 6x Polyhistidin-Rest (His-Tag) markiert (Aminosäuresequenz des V5-Epitops: GKPIPPLLGLDST). Die beiden Epitope können mit V5-, bzw. polyhistidin-spezifischen Antikörpern nachgewiesen und so die ektopre MACC1-Expression von der

endogenen Expression unterschieden werden. Als Negativkontrolle für die Transfektionsexperimente diente der Leervektor pcDNA3.1 ohne klonierte cDNA Sequenz.

2.1.8 Größenmarker und Enzyme

Marker	Hersteller
SeeBlue Plus 2 prestained	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
MassRuler Express Reverse	Fermentas, Ontario, Kanada
Gene Ruler 100 bp Plus DNA-Ladder	Fermentas, Ontario, Kanada
DreamTaq Polymerase	Fermentas, Ontario, Kanada

2.1.9 Antikörper

Zielprotein	Herkunft	Verwendung	Hersteller
MACC1 human	Kaninchen, poly (HPA020081)	IHC, 1:250, Prim	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MACC1 human	Kaninchen, poly (HPA020103)	WB, 1:1000, Prim	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MACC1 human	Kaninchen, poly	WB, 1:500, Prim	ProSci, Poway, CA, USA
V5-Epitop	Maus, mono	WB, 1:2500, HRP, Prim	Invitrogen, Darmstadt
β -Tubulin human	Maus, mono	WB, 1:1000, Prim	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
γ -Tubulin human	Maus, mono	WB, 1:5000, Prim	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
anti-Maus	Schaf, poly	WB, 1:2000, HRP, Sek	GE-Healthcare, Freiburg
anti-Kaninchen	Ziege, poly	WB, 1:2000, HRP, Sek	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA

Abkürzungen: IHC, Immunhistochemie; WB, Western Blot; HRP, Meerrettichperoxidase; Prim, Primärantikörper; Sek, Sekundärantikörper; mono, monoklonal; poly, polyklonal.

2.1.10 Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinie/Stamm	Ursprung	Hersteller
U87	Human, Glioblastom	ATCC, Rockville, MD, USA
U138	Human, Glioblastom	CLS, Eppelheim
U251	Human, Glioblastom	CLS, Eppelheim
U343	Human, Glioblastom	ATCC, Rockville, MD, USA
U373	Human, Glioblastom	ATCC, Rockville, MD, USA
GaMG	Human, Glioblastom	Universität Bergen, Norwegen (Akslen <i>et al.</i> , 1988)
SW620	Human, Kolonkarzinom	ATCC, Rockville, MD, USA
DH5 α	<i>Escherichia coli</i>	GIBCO BRL, Karlsruhe

2.1.11 Patientenproben

Für die molekularbiologischen, zellbiologischen und histologischen Analysen wurden Patientenproben in drei unabhängigen Kohorten verwendet (s. Tab. 2.1-2.3). Es handelte sich um Operationsgewebe von Patienten der Poliklinik und Klinik für Neurochirurgie der Universität Würzburg der Jahre 1999 bis 2010. Die Patienten waren durchschnittlich zwischen 30 und 80 Jahren alt. Der Umgang mit den Proben erfolgte anonymisiert und folgte den Auflagen der lokalen Ethikkommission.

Wenn nicht anders angegeben, handelte es sich um die Erstoperation ohne vorherige weitere Therapie. Auf die chirurgische Resektion des Tumors folgte standardmäßig eine Chemotherapie mit Temozolomid, sowie die Bestrahlung des Operationsgebiets. Soweit bekannt, wurde die Lokalisation des Tumors, das Geschlecht und das Alter des Patienten angegeben. Die Diagnose wurde vom Institut für Neuropathologie Würzburg nach WHO-Kriterien gestellt. Zusammengehörige Rezidive von Tumoren desselben Patienten wurden durch Pfeile markiert. Es wurden nur Tumoren ausgewählt, die in der Morphologie möglichst homogen waren und keine Abnormitäten aufwiesen.

Insgesamt wurden für die zell- und molekularbiologischen Versuche acht niedergradige Astrozytome WHO-Grad II (LGA) und 24 Glioblastome WHO-Grad IV (GBM), bzw. für die histologischen Analysen 24 LGA und 14 GBM verwendet. Als Positivkontrolle für die Histologie dienten Proben eines kolorektalen Karzinoms und als Negativkontrolle Gewebe eines Sektionsfalls, welcher als Multisystematrophie diagnostiziert worden war. Zusätzlich wurden drei Normalhirnproben (NB) durch PCR analysiert und dienten als Negativkontrolle. Sie stammten von Epilepsiepatienten der Universitätsklinik Freiburg im Breisgau und wurden von Thomas Freimann zur Verfügung gestellt.

Tab. 2.1: Patientenproben für semiquantitative und quantitative RT-PCR

Tumorprobe	Alter	Geschlecht	Diagnose	Lokalisation
LGA01	58	w	LGA _d	frontal
LGA02	24	m	LGA	frontoparietal
LGA03	54	m	LGA	temporal
LGA04	3	m	LGA _a	mesencephal
LGA05	12	w	LGA _{a,e}	parietal
LGA06	34	m	LGA	frontotemporal
LGA07	34	m	LGA	
LGA08	40	m	LGA _c	

Tumorprobe	Alter	Geschlecht	Diagnose	Lokalisation
GBM01	54	w	GBM _b	temporal
GBM02	18	w	GBM _a	frontal
GBM03	68	m	GBM	frontal
GBM04	60	m	GBM	temporal
GBM05	65	m	GBM	parietooccipital
GBM06	41	m	GBM	bifrontal
GBM07	69	m	GBM	temporal
GBM08	62	m	GBM	temporal
GBM09	62	w	GBM _c	frontal
GBM10	62	w	GBM	temporal
GBM11	59	w	GBM	frontal
GBM12	12	w	GBM	
GBM13	65	m	GBM	
GBM14	79	m	GBM	
GBM15	53	m	GBM	

Tab. 2.2: Patientenproben für Immunhistochemie

Tumorprobe	Alter	Geschlecht	Diagnose	Lokalisation
LGA mit Progression zu sGBM				
LGA09 ⇒ n.a.	36 ⇒ n.a.	m	LGA ⇒ GBM*	temporal ⇒ n.a.
LGA10 ⇒ GBM26	24 ⇒ 34	m	LGA ⇒ GBM	temporal ⇒ frontal
LGA11 ⇒ GBM27	34 ⇒ 36	m	LGA ⇒ GBM	temporal ⇒ temporal
LGA12 ⇒ GBM28	54 ⇒ 55	m	LGA ⇒ GBM	temporal ⇒ temporal
LGA13 ⇒ GBM29	54 ⇒ 54	w	LGA ⇒ GBM	temporal ⇒ temporal
LGA14 ⇒ n.a.	40 ⇒ 43	w	LGA ⇒ GBM*	temporal ⇒ n.a.
LGA mit Rezidiv des gleichen WHO-Grads				
LGA15 ⇒ LGA28	1 ⇒ 2	w	LGA ⇒ LGA	Med. obl. ⇒ Med. obl.
LGA16 ⇒ LGA29	49 ⇒ 52	w	LGA ⇒ LGA	frontal ⇒ frontal
LGA17 ⇒ LGA30	39 ⇒ 42	w	LGA ⇒ LGA	
LGA18 ⇒ LGA31	35 ⇒ 36	m	LGA ⇒ LGA	temporal ⇒ temporal
LGA19 ⇒ LGA32	39 ⇒ 40	m	LGA ⇒ LGA	temporal ⇒ temporal
LGA20 ⇒ n.a.	40 ⇒ n.a.	m	LGA ⇒ LGA*	temporal ⇒ n.a.
LGA ohne bekannte Progression/Rezidiv				
LGA21	41	m	LGA	frontal
LGA22	65	w	LGA	temporal
LGA23	12	w	LGA	parietal
LGA24	31	m	LGA	frontal
LGA25	45	w	LGA	temporal
LGA26	27	m	LGA	temporal
LGA27	69	m	LGA	temporal
pGBM				
GBM16	69	m	GBM	parietal
GBM17	46	m	GBM	parietal

Tumorprobe	Alter	Geschlecht	Diagnose	Lokalisation
GBM18	57	m	GBM	frontal
GBM19	76	m	GBM	temporal
GBM20	67	m	GBM	frontal
GBM21	45	m	GBM	occipital
GBM22	69	m	GBM	parietooccipital
GBM23	60	m	GBM	temporoparietal
GBM24	63	m	GBM	parietal
GBM25	60	w	GBM	temporal

Tab. 2.3: Patientenproben für Sphäroid-Migrationsassay.

Tumorprobe	Alter	Geschlecht	Diagnose	Lokalisation
GBM30	59	m	GBM	parietooccipital
GBM31	34	m	GBM	temporal
GBM32		w	GBM	
GBM33	57	m	GBM	frontal
GBM34	55	m	GBM	
GBM35	58	w	GBM	temporal
GBM36	65	m	GBM	frontal
GBM37	53	m	GBM	
GBM38	44	m	GBM	temporal

Fußnoten:

^a Keine Informationen über vorangegangene Therapie oder Operation

^b Rezidiv mit Radiatio und/oder Chemotherapie vor der chirurgischen Resektion

^c Rezidiv ohne Informationen über Vorbehandlung

^d Progression zu GBM

^e Protoplasmatisches Astrozytom

n.a.: Probe nicht verfügbar; Med. obl., Medulla oblongata; m, männlich; w, weiblich.

* Diese Diagnose ist bekannt, jedoch stand die Probe nicht zur Verfügung.

2.1.12 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien

Agarosegel (1 %) für DNA-Gelelektrophorese

1,5 g Agarose in 150 ml 1xTBE

5 min aufkochen

Abkühlen auf ca. 50 °C

11 µl Ethidiumbromid (1 µg/µl)

in Gelkammer gießen

30 min lichtgeschützt polymerisieren lassen

Ampicillin-Lösung 100 µg/ml

1 g Ampicillin in 10 ml dH₂O lösen

Sterilfiltrieren

Blockierlösung für Western Blot

5 g Magermilchpulver in 100 ml TBST

EDTA 0,5 M pH 8,0

37,22 g EDTA

mit dH₂O auf 200 ml auffüllen

pH 8,0 Einstellen

Eosin-Lösung

Eosin-Lösung 1 % In Ethanol 70 % filtrieren

Zugabe von 2 Tropfen Essigsäure

Ethidiumbromid-Lösung 1 µg/µl

10 mg Ethidiumbromid

10 ml dH₂O

Lyse-Puffer

für 500 ml Stock-Lösung

5 ml Triton-X-100

4,38 g NaCl

5 ml Tris (1 M, pH 7,4)

1 ml EDTA (0,5 M)

0,2 g EGTA

2,5 ml IGEPAL CA-630

mit dH₂O auf 500 ml auffüllen

für Gebrauchslysepuffer

5 ml Lysepuffer

50 µl PMSF

5 µl Leupeptin (0,5 mg/ml in dH₂O)

50 µl Aprotinin

TBE-Puffer (5x), 5 l Stock-Lösung

270 g Tris

137,5 g Borsäure

100 ml EDTA (0,5 M pH 8,0)

mit dH₂O auf 5 l auffüllen

TBST, 1 l Stock-Lösung

6,05 g Tris Base

8,77 g NaCl

mit dH₂O auf 1 l auffüllen

mit HCl auf pH 8,0 einstellen

10 ml Tween 20

Transferpuffer für Western Blot

50 ml NuPage Transfer Buffer (20x)
100 ml Methanol
1 ml NuPage Antioxidant
mit dH₂O auf 1000 ml auffüllen

Tris (1 M, pH 7,4)

30,28 g Tris
mit dH₂O auf 250 ml auffüllen
pH 7,4 einstellen

2x TY-Medium

16 g Bacto Trypton
10 g Bacto Hefeextrakt
5 g NaCl
mit dH₂O auf 1 l auffüllen
mit NaOH pH 7,4 einstellen

2x TY-Selektions-Platten

1 l 2x TY-Medium
15 g Bacto Agar
Autoklavieren
Abkühlen auf ca. 50 °C
+ 1 ml Ampicillin-Lösung (100 µg/ml)
Platten gießen

Zellkulturmedium für Glioblastom-Zelllinien

500 ml DMEM (1 g/l Glucose , inkl. Glutamin)
50 ml FCS, hitzeinaktiviert für 30 min. bei 56 °C
10 ml NEAA
2 ml Penicillin/Streptomycin

Zellkulturmedium für Glioblastom-Primärkulturen

500 ml DMEM 1 g/l Glucose + Glutamin
100 ml FCS, hitzeinaktiviert für 30 min. bei 56 °C
10 ml NEAA
6 ml Vitamine
2 ml Penicillin/Streptomycin

Zellkulturmedium für Kolonkarzinom-Zelllinien

450 ml RPMI-1640 Medium
50 ml FCS, hitzeinaktiviert für 30 min. bei 56 °C

Einfriermedium

1 Volumenanteil Zellkulturmedium

1 Volumenanteil FCS hitzeinaktiviert für 30 min. bei 56 °C

Einfriermittel

Einfriermedium + 10 % DMSO frisch zusetzen

Vorkühlen 4 °C

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologie und Zellkultur

2.2.1.1 Kultur von Zelllinien und primären Zellkulturen

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien und der Primärkulturen aus Patientenbiopsaten erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Begasung. Als Kulturgefäße dienten vorwiegend 25 cm², bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen und das Volumen an Medium betrug 5 ml, bzw. 15 ml. Sobald die Gefäße zu 80-90 % konfluent waren, wurden die Zellen in ein neues Kulturgefäß passagiert. Hierfür wurde das Zellkulturmedium komplett abgenommen und die adhären Zellen wurden einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurden 3 ml vorgewärmte Trypsin-EDTA Lösung zugegeben und das Zellkulturgefäß wurde für 3-4 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch beurteilt. Anschließend wurde die Reaktion mit 7 ml vorgewärmtem Medium abgestoppt und die Zellsuspension je nach benötigtem Verhältnis auf andere Kulturgefäße, die schon vorgewärmtes Medium enthielten, überführt.

Aus Operationsgewebe wurden primäre Zellkulturen angelegt. Das Gewebe wurde mit einem Gewebehomogenisator zerkleinert und anschließend mit Trypsin angedaut um einzelne Zellen vom Tumor zu lösen. Diese Suspension konnte unter Verwendung von Medium für Primärkulturen in Kultur genommen werden. Nachdem die Zellen konfluent waren, was einige Tage dauern konnte, wurde das Medium gewechselt. Die so entstandenen Primärkulturen wurden maximal einmal passagiert bevor sie für Experimente verwendet wurden.

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Zellen wurden diese bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Da bei dieser Temperatur intrazelluläre Eiskristalle entstehen können, ist es nötig dem Zellkulturmedium eine Art Frostschutzmittel wie Dimethylsulfoxid (DMSO) zuzusetzen um so die Zerstörung von Zellorganellen zu verhindern. Für das Einfrieren wurden die Zellen einer konfluenten Flasche wie oben beschrieben mit Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 4 °C für 9 min bei 200 x g ohne Bremse zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml

vorgekühltem Einfriermittel aufgenommen und in ein Kryoröhrchen auf Trockeneis überführt. Die Lagerung erfolgte längerfristig bei -196 °C oder kurzfristig bei -80 °C.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen zügig in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Sofort nachdem die Zellen aufgetaut waren, wurde die Suspension in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 20 ml vorgewärmtem Medium überführt und resuspendiert, um das Einfriermittel zu verdünnen. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt um Reste des zytotoxischen DMSO zu entfernen.

Für die Versuche wurden Zellen mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer gezählt. In die Kammer (Kammerfaktor 1000) wurde 20 µl Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden vorher mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die vitalen Zellen wurden ausgezählt und die Zellzahl wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl [ml]} = \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{gezählte Zellen} / 3,2$$

2.2.1.2 Generierung von stabil MACC1-exprimierenden Zelllinien

Für die funktionellen *in vitro* Versuche wurden Zelllinien generiert, die MACC1 stabil exprimierten. Hierfür wurden die GBM Zelllinien U138 und U251 mit dem pcDNA3.1D/MACC1-V5-His Plasmid transfiziert. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pcDNA3.1.

Beim Prozess der Transfektion werden DNA- oder RNA-Moleküle in Zellen eingebracht, die dann dort exprimiert werden können, bzw. die Expression anderer Gene verändern können. Es gibt verschiedene Verfahren zur Transfektion. In unserem Projekt wurden die Zellen mit dem polykationischen Transfektionsreagenz Metafectene transfiziert. Das Reagenz bildet auf Grund seiner positiv geladenen chemischen Struktur kompakte Komplexe mit der negativ geladenen DNA. Diese sogenannten Lipoplexe können leicht mit der Zellmembran fusionieren und so aufgenommen werden. Im Inneren der Zelle wird die DNA wieder freigesetzt und kann, nachdem sie in den Zellkern gelangt ist, transkribiert werden. Die DNA gelangt vor allem während der Zellteilung leicht in den Zellkern, da dann die Kernmembran aufgelöst wird. Daher ist es wichtig die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase zu transfizieren und darauf zu achten,

dass die Kulturschale nicht zu stark bewachsen ist, da es sonst zur Kontakthemmung der Proliferation kommen kann.

Alle beschriebenen Arbeitsschritte, außer den Zentrifugationsschritten, wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Der Ablauf folgte dem Herstellerprotokoll. Da Antibiotikazusätze während des Transfektionsvorgangs zytotoxisch wirken können, wurde nur antibiotikafreies Medium benutzt. Durch mehrere Vorversuche wurde ein optimales Verhältnis zwischen Metafectene und DNA von 8:1 ermittelt, d.h. 8 µl Metafectene und 1 µg Plasmid. Es wurde für 48 h transfiziert. Da das pcDNA3.1-Plasmid ein Neomycin-Resistenzgen enthält, konnte im Anschluss mit 1 mg/ml Neomycin auf MACC1-exprimierende Klone selektiert werden (positive Selektion) (Southern und Berg, 1982). Neomycin, auch Aminoglykosid-Phosphotransferase genannt, ist ein Aminoglykosid, das durch Blockade der Ribosomen zum Zelltod führen kann. Die Kultur im Selektionsmedium wurde für ca. zwei Wochen durchgeführt, wobei das Medium dreimal pro Woche gewechselt wurde. Danach bildeten sich auf den Platten scharf abgegrenzte Kolonien, die gepickt und in separaten Kulturgefäßen unter konstantem Selektionsdruck vermehrt werden konnten.

Für die funktionellen Versuche mit den stabil MACC1 exprimierenden Zelllinien U138/MACC1, U251/MACC1, bzw. den Kontrollen U138/Vektor, U251/Vektor wurden für jedes Experiment mindestens drei unabhängige Klone analysiert, wovon jeweils ein repräsentativer Klon gezeigt ist.

2.2.1.3 Sphäroid-Migrationsassay

Die Zellmigration primärer Zellkulturen wurde durch einen Sphäroid-Migrationsassay getestet (Hagemann *et al.*, 2010; Khaitan *et al.*, 2006). Hierfür wurden aus Primärkulturen runde multizelluläre Aggregate, sogenannte Sphäroide, auch Neurosphären genannt, generiert. Mit der Zeit entfernen sich Zellen vom Sphäroid durch aktive Zellmigration, welche nach definierten Zeitintervallen dokumentiert wurden. Anschließend wurden Korrelationsanalysen von Migration und MACC1-Expression durchgeführt. Insgesamt wurden im Migrationsassay neun GBM untersucht. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Sphäroide eine dreidimensionale Struktur aufweisen. So kann annähernd das tatsächliche Mikromilieu eines Tumors simuliert

werden, welcher zum Beispiel hypoxische Zustände im Innern aufweist und daher Nekrosen bildet.

Für die Herstellung von multizellulären Sphäroiden wurden nach der von Yuhas beschriebenen Methode Zellkulturgefäße mit Agarose beschichtet um die Adhäsion der später zugegebenen Zellen zu verhindern (Yuhas *et al.*, 1977). Diese kugeln sich dann ab und wachsen als Sphäroide. Der Vorteil dieser einfachen Methode ist, dass das Wachstum der Sphäroide *in vitro* dem *in vivo* annähernd proportional ist. Für die Beschichtung wurde 1 g Agar Noble in 20 ml dH₂O gelöst und in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Anschließend wurde die Lösung mit 80 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium vermischt und luftblasenfrei 2 ml davon in jedes Well einer 6-Well Platte pipettiert. Nach ungefähr 30 min war die Agarose polymerisiert und die Platten konnten verwendet oder mit Parafilm verschlossen bei 4 °C für bis zu drei Wochen aufbewahrt werden.

Die im Folgenden beschriebene Methode wurde zunächst mit Zelllinien getestet und anschließend in einem neuen Ansatz mit Primärkulturen durchgeführt. Es wurden 1×10^6 Zellen pro Well ausgesät und mit 3 ml Medium bei 37 °C/5 % CO₂ inkubiert. Nach 1-2 Tagen hatten sich Sphäroide von 100-300 µm Durchmesser gebildet, welche für den Assay benutzt werden konnten. Aggregate aus mehreren Sphäroiden und nekrotische Sphäroide wurden nicht verwendet. Nicht benötigte Sphäroide wurden lysiert und mittels Western Blot analysiert (s. 2.2.2.3). Die Sphäroide für den Assay wurden mit einem Okular-Mikrometer lichtmikroskopisch kontrolliert und die Suspension wurde anschließend in ein 15 ml Röhrchen gegeben, damit sich die Sphäroide nach einigen Minuten absetzen konnten. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Die Sphäroide wurden in 3 ml Medium aufgenommen und in eine 60 mm Zellkulturschale überführt. Währenddessen wurden 300 µl Medium pro Well einer 96-Well Platte bei 37 °C/5 % CO₂ vorgewärmt. Einzelne Sphäroide wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette blasenfrei in die Mitte eines Wells der Platte überführt, wobei insgesamt zehn Sphäroide pro Tumor in den Assay einbezogen wurden. Anschließend wurden die Sphäroide sofort mit einer Mikroskop-Kamera fotografiert (entspricht 0 h). Weitere Aufnahmen erfolgten bei gleicher Vergrößerung alle 6 h, wobei das letzte Bild nach 48 h aufgenommen wurde. Die Evaluation der

Migration erfolgte mittels einer nicht kommerziell erhältlichen Software („Vermessung von Zellkulturen“ 1.2, Bögel und Hoffmann, 1997). Hierbei wurde mit dem Programm manuell die Fläche des Sphäroids zum Zeitpunkt 0 h annähernd durch eine Ellipse beschrieben und anschließend der Abstand der acht am weitesten migrierten Zellen zum Mittelpunkt der Ellipse gemessen. Insgesamt wurden pro Primärkultur zehn Sphäroide ausgesät und deren Migration gemessen. So konnte für jede Primärkultur die mediane Migration zum jeweiligen Zeitpunkt bestimmt werden. Anschließend wurde die Migration der verschiedenen Primärkulturen miteinander verglichen und mit der MACC1-Expression korreliert.

2.2.1.4 Echtzeitmessung von Zellmigration und Proliferation

Neben der Messung der Zellmigration durch einen Sphäroidmigrations-Assay wurden sowohl die Migration, als auch die Proliferation von Zellen zusätzlich noch in Echtzeit gemessen. Hierfür wurde das xCELLigence Real-Time Cell Analyzer Dual Plate Instrument benutzt (Bird, 2009). Dieses System basiert auf einer Echtzeitmessung der zellulären elektrischen Impedanz (Solly *et al.*, 2004). Das Prinzip wurde erstmals 1990 vorgeschlagen (Kowolenko *et al.*, 1990). Hierbei werden Zellen auf mit Gold beschichteten Zellkulturgefäßen ausgesät. Zellen verhalten sich durch ihre isolierende Zellmembran wie dielektrische Partikel. Je mehr Zellen sich auf der Elektrode anheften, desto größer wird die Impedanz. Verändert eine Zelle ihre Morphologie oder bewegt sich, so ändert sich die Fläche mit der die Zelle an der Elektrode angeheftet ist und die Ströme fließen verändert. Somit ändert sich auch die Impedanz, welche direkt proportional zur von den Zellen bedeckten Fläche der Elektrode ist. Das xCELLigence-System misst diese Impedanzänderung in Echtzeit, wobei die Änderung als dimensionsloser Parameter ausgedrückt wird, welcher vom Hersteller als „Zellindex“ bezeichnet wird.

Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Messung der Proliferation wurden $1,5 \times 10^3$ Zellen in Zellkulturmedium ohne FCS pro Well einer xCELLigence E-plate ausgesät. In den ersten 12 h erfolgte alle 30 min eine Messung, danach alle 15 min für die nächsten 88 h, woraus eine gesamte Messdauer von 100 h resultierte.

Der Versuchsaufbau für die Messung der Zellmigration ist ähnlich dem des klassischen Transwell-Migrations-Assays, der erstmals 1962 von Boyden beschrieben wurde (Boyden, 1962). Hierbei wird in ein Well einer, zum Beispiel 6-Well-Zellkulturplatte, eine Membran mit kleinen Poren gestellt, welche das Well in eine obere und untere Kammer aufteilt. Die Zellen befinden sich oberhalb der Membran und müssen durch aktive Zellmigration durch die Membran wandern, um in die untere Kammer zu gelangen. Dies kann durch Zugabe von Chemokinen oder Wachstumsfaktoren in der unteren Kammer unterstützt werden. Die Zellen, die durch die Membran migriert sind, können anschließend angefärbt und gezählt werden. Die impedanzbasierte Echtzeit-Messung der Zellmigration mit xCELLigence funktioniert ähnlich, wobei die Unterseite der Membran mit Gold beschichtet ist und eine Migration von Zellen zu einer Impedanzänderung führt, welche gemessen werden kann (s. Abb. 2.2).

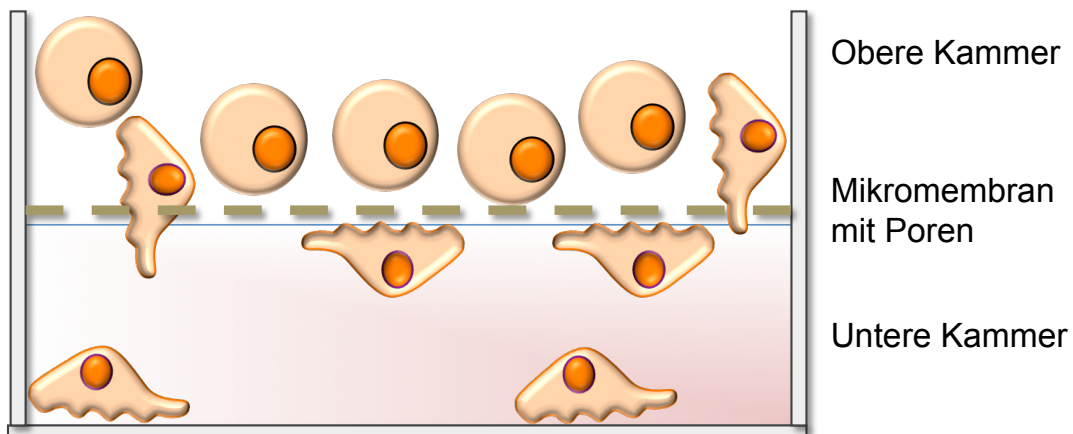


Abb. 2.2: Messung der Zellmigration mit dem xCELLigence System. Gezeigt ist ein schematischer Ausschnitt eines Wells der CIM-16 Platte mit eingelegter Mikromembran, durch die die Zellen wandern. Die Unterseite der Membran ist mit Gold beschichtet. Bei der Migration durch die Poren haben die Zellen Kontakt mit der Membran, was so zu einer messbaren Impedanzänderung führt (nach Bird, 2009).

Für das Experiment wurden 1×10^5 Zellen in Zellkulturmedium ohne FCS in die obere Kammer eines Wells der CIM-16 xCELLigence-Plate ausgesät. Die untere Kammer wurde mit vollwertigem Zellkulturmedium gefüllt, welches FCS enthielt, um die Zellen chemotaktisch anzuziehen. Die Zellmigration wurde alle 5 min in den ersten 25 h gemessen, dann alle 15 min in den nächsten 15 h. Die gesamte Messdauer betrug 40 h.

Die Proliferation, bzw. Zellmigration der stabil MACC1 exprimierenden Zelllinien U138/MACC1 und U251/MACC1 wurde mit den Kontrollen verglichen. Es wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Experimente als Triplikat durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der mitgelieferten Software (Version 1.2.1).

2.2.1.5 Koloniebildungsassay

Eine weitere Schlüsseleigenschaft maligner Zellen ist die gesteigerte Proliferation, die keiner Zelladhäsion oder anderer Zellkontakte bedarf. Um dies zu messen, wurde ein Koloniebildungsassay auf Weichagar durchgeführt (Puck *et al.*, 1956). Bei dieser Methode werden einzelne Zellen auf mit Agar beschichteten Zellkulturgefäßen ausgesät. Der Agar verhindert das Ausbilden von Zellkontakten und somit die Adhäsion der Zellen an den Untergrund. Physiologischerweise heften sich Zellen an die Extrazellulärmatrix in den Geweben des menschlichen Körpers an und bilden meist Integrin-vermittelte Zellkontakte wie Hemidesmosomen oder Fokalkontakte aus. Dieses Anheften ist normalerweise essentiell für das Überleben und die Proliferation von Zellen. Deshalb wird der Koloniebildungsassay auf Weichagar als eine sehr stringente Methode zum Nachweis von maligner Transformation von Zellen angesehen.

Für den Versuch wurden Zellkulturgefäße mit Zellkulturmedium vorbereitet, welches 0,33 % Agarose enthielt. Dann wurden jeweils 8×10^3 Zellen von U138/MACC1, U138/Vektor, U251/MACC1 und U251/Vektor als Einzelzellsuspension in separate Zellkulturgefäße ausgesät. Weichagar ist sehr viskös und hemmt dadurch die Beweglichkeit von Zellen. Deshalb können sich in diesem Medium maligne Zellen leicht als individuelle einzelne Kolonien entwickeln, welche später identifiziert und gezählt werden können. Anschließend wurden die Zellen in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ für 14 d inkubiert. Es wurden nur Kolonien, die mehr als vier Zellen enthielten, gezählt. Die Experimente wurden zweimal, jeweils als Triplikat durchgeführt.

2.2.2 Proteinbiochemie

2.2.2.1 Protein-Isolation aus Zellen

Zur Analyse der MACC1-Expression auf Proteinebene wurden sowohl adhärente Zellen, als auch Sphäroide mit Gebrauchslysepuffer lysiert. Für die Lyse der adhären Zellen

wurde eine konfluente 75 cm² Zellkulturflasche, bzw. eine 6-Well Zellkulturschale auf Eis gelegt und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nachdem das PBS vollständig durch eine Vakuumpumpe entfernt worden war, wurde der Gebrauchslysepuffer auf die Zellen gegeben. Das Volumen betrug für eine 75 cm² Zellkulturflasche 500 µl, bzw. 100 µl pro Well einer 6-Well Zellkulturschale. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen sorgfältig abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um Zelltrümmer zu entfernen wurde für 10 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die gelösten Proteine und konnte bei -20 °C mittelfristig aufbewahrt oder direkt für Versuche genutzt werden.

Die Sphäroide wurden direkt in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 9 min ohne Bremse bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und nach Hinzufügen von 5 ml PBS wurde bei gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurde der Überstand möglichst komplett abgenommen. Die Sphäroide wurden in 100 µl Gebrauchslysepuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zentrifugieren bei 20.000 x g für 10 min sorgte für das Absetzen von Zelltrümmern. Der Überstand enthielt die gelösten Proteine und wurde bei -20 °C mittelfristig aufbewahrt.

2.2.2.2 Protein-Isolation aus Gewebe

Proteine wurden aus kryokonserviertem Operationsgewebe mit dem Total RNA and Protein Isolation-NucleoSpin RNA/Protein Kit nach Herstelleranleitung isoliert. Hierfür wurden 30 mg Gewebe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und auftauen lassen. Nach Zugabe von 350 µl RA1-Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol wurde das Gewebe mit einer sterilen Mikropistille lysiert. Das Gewebe wurde anschließend mit einer Spritze und verschiedenen großen Kanülen als Aufsatz weiter homogenisiert. Das so entstandene Lysat wurde auf eine NucleoSpin Filter unit aufgetragen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Zu dem Durchfluss wurden 350 µl 70 % Ethanol gegeben und sorgfältig resuspendiert. Eine RNA/Protein Säule wurde auf ein 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt, das komplette Lysat aufgetragen und für 30 s bei 8.000 x g zentrifugiert. An der Säule wurden die Nukleinsäuren gebunden, der Durchfluss enthielt die gelösten Proteine. Die Säule wurde in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß gegeben und für die RNA-Isolierung verwendet (s. 2.2.3.2). Für die Aufreinigung der Proteine wurden

300 µl des Durchflusses in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Damit die Proteine präzipitieren konnten, wurde ein Volumen PP Puffer zugegeben und der Ansatz dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 11.000 x g, wobei im Anschluss der Überstand verworfen wurde. Nach Zugabe von 500 µl 50 % Ethanol folgte eine weitere Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g um die Proteine zu waschen. Wieder wurde der Überstand verworfen und das entstandene Protein-Pellet für 5-10 min unter dem Abzug getrocknet. Das Pellet wurde dann in 100 µl PSB-Puffer unter reduzierenden Bedingungen gelöst und für 3 min bei ca. 95 °C aufgeköcht. Nach Abkühlen der Proben wurde kurz für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert und das Proteinlysate dann bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 SDS-PAGE und Western Blot

Die Proteinlysate wurden zunächst mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend durch Western-Blotting untersucht. Es wurde das X-Cell Sure Lock Western-Blot System nach Herstellerprotokoll verwendet.

Für die SDS-PAGE wurden 4-12 % Bis-Tris Gradientengele, bzw. 10 % Polyacrylamidgele verwendet. Für einen Ansatz wurden 32,5 µl Proteinlysate mit 5 µl Reducing Agent und 12,5 µl Sample Buffer versetzt und anschließend für 10 min bei 70 °C aufgeköcht. Nach kurzem Abkühlen wurde für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Pro Probe wurden 15-20 µl auf ein Gel aufgetragen. Der verwendete Puffer war MOPS-Puffer, wobei der Puffer für die innere Kammer zusätzlich mit 500 µl Antioxidant versetzt wurde. Die Elektrophorese wurde mit dem Programm „NuPage Gel“ für 1 h bei 200 V und 120 mA durchgeführt.

Für den anschließenden Blotvorgang wurde das Gel in Transferpuffer gewaschen und in das Blotmodul mit der Nitrozellulosemembran und dem Whatman-Papier zwischen die Blotting Pads platziert. Alle Bestandteile wurden vorher in Transferpuffer eingeweicht und auch die innere Kammer wurde damit gefüllt. Die äußere Kammer wurde mit dH₂O gefüllt. Der Blotvorgang wurde mit dem Programm „Western Blot“ für 2 h bei 30 V und 170 mA durchgeführt. Nach dem Proteintransfer wurden die Markerbanden auf der Nitrozellulosemembran mit Bleistift markiert und die freien Bindungsstellen der Membran für 30 min mit 5 % Magermilchpulver in TBST geblockt.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4 °C im MacsMix Drehinkubator, wobei die Antikörper mit 5 % Magermilchpulver in TBST und 0,01 % Natriumazid angesetzt wurden. Nach der Inkubation folgten drei Waschschrte für 5 min in TBST. Der Sekundärantikörper wurde in TBST angesetzt und die Inkubation erfolgte für 2 h bei 4 °C im Drehinkubator. Ungebundene Antikörper wurden durch fünf Waschschrte à 5 min mit TBST entfernt.

Die Detektion wurde mit dem ECL Western-Blotting Analysis System durchgeführt. Da die Sekundärantikörper mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert waren, konnte das in der Lösung enthaltene Luminol enzymatisch umgesetzt werden. Bei dieser Reaktion kam es zu Chemolumineszenz, die gemessen werden konnte. Die Membran wurde für 2 min mit dem ECL-Reagenz inkubiert und das emittierte Licht dann durch Auflegen eines Films in einer Dunkelkammer nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mit dem Programm BioDocAnalyse von Biometra, bzw. mit ImageJ (Abramoff M.D., 2004). Die Werte für MACC1 wurden auf die Werte der konstitutiv exprimierten Gene (sog. „Housekeeping-Gene“) γ -Tubulin, bzw. β -Tubulin normalisiert.

2.2.3 Molekularbiologie

2.2.3.1 RNA-Isolation aus Zellen

Die Gesamt-RNA von Zellen wurde mit dem SV Total RNA Isolation Kit nach Herstellerangaben isoliert. Zellen einer konfluenten 75 cm² Flasche wurden wie zuvor beschrieben mit Trypsin abgelöst, dann wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 230 x g bei 4 °C ohne Bremse zentrifugiert. Nachdem der Überstand komplett entfernt worden war, folgten zwei Waschschrte mit 25 ml eiskaltem PBS. Das Zellpellet wurde in 175 μ l RNA-Lysepuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Zusätzliches Homogenisieren wurde durch Resuspendieren mit einer feinen 1 ml Spritze erreicht. Zu der Suspension wurden 350 μ l RNA-Dilution Puffer gegeben und für 3 min bei 70 °C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 20.000 x g. Der klare Überstand wurde in ein neues RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 200 μ l 96 % Ethanol vermischt, auf eine Säule gegeben und erneut für 1 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Die

Säulenmembran wurde einmal mit 600 µl RNA-Waschlösung gewaschen. Um störende DNA zu entfernen wurde die Säule für 15 min bei Raumtemperatur mit 50 µl DNase-Mix inkubiert. Die DNase-Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Stopplösung und Zentrifugieren für 1 min bei 20.000 x g beendet. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die gebundene RNA zweimal mit 600 µl, bzw. 250 µl RNA-Waschlösung gewaschen. Die Säule wurde in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 100 µl nukleasefreiem Wasser und Zentrifugieren für 1 min bei 20.000 x g gelöst.

Die Reinheit der RNA wurde photometrisch analysiert. Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht einer Wellenlänge von 260 nm abhängig von der Art des Moleküls. Proteine absorbieren Licht von 280 nm Wellenlänge. Von reiner RNA wurde ausgegangen, wenn das Verhältnis $A_{260/280}$ ungefähr 2 betrug. Das $A_{260/230}$ Verhältnis weist auf Kontaminationen durch organische Komponenten hin, welche Licht einer Wellenlänge von 230 nm absorbieren. Das Verhältnis sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen. Weiterhin wurde die Integrität der RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese ermittelt (s. 2.2.3.3). Die mittelfristige Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.3.2 RNA-Isolation aus Gewebe

Die RNA-Isolation aus Gewebeproben erfolgte mit dem NucleoSpin RNA/Protein Kit und schloss sich der Protein-Isolation aus Gewebe an (s. 2.2.2.2). Im Rahmen der Isolierung befanden sich die gelösten Proteine im Durchfluss und die Nukleinsäuren waren an der Säule gebunden, welche sich auf Eis befand. Im Folgenden konnte sowohl die genomische DNA (gDNA), als auch die RNA von der Säule aufgereinigt werden. Da in den Folgeversuchen die Genexpression untersucht werden sollte, wurde nur die RNA aus der Säule gewaschen. Hierfür wurden 350 µl Membrane Desalting Agent zugegeben um den Salzgehalt des Präzipitats zu verringern und die Nukleinsäuren wieder in Lösung zu bringen. Für die Folgeversuche störende gDNA wurde mit DNase degradiert. Ein DNase-Mix wurde aus 90 µl DNase Reaction Buffer und 10 µl DNase I frisch angesetzt. Der DNase-Mix wurde für 15 min auf der Membran der Säule bei Raumtemperatur inkubiert. Drei darauf folgende Waschschrte mit verschiedenen Waschpuffern (RA2, bzw. RA3) entfernten Salz und andere störende zelluläre Komponenten, wobei sich jeweils ein Zentrifugationsschritt bei 11.000 x g für

30 s anschloss. Zum Schluss wurde die gereinigte RNA in 60 µl RNase-freiem Wasser gelöst und mittelfristig bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Integrität und Konzentration der isolierten RNA wurde durch 1,5 % TBE-Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid als Farbstoff bestimmt. Der TBE Puffer wurde mit DEPC behandeltem H₂O angesetzt um RNasen zu inaktivieren. Es wurden 0,5 µl RNA mit 10 µl DEPC H₂O verdünnt und anschließend mit 2 µl Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Laufzeit des Gels betrug 8 min bei 200 V. Es wurde darauf geachtet, dass alle Proben deutliche Banden der 28 S, bzw. 18 S RNA aufwiesen, was für eine nicht degenerierte RNA spricht.

Die Analyse von PCR-Produkten erfolgte analog der hier beschriebenen Methode. Die Agarosekonzentration betrug nur 1 % und der TBE-Puffer wurde mit dH₂O angesetzt. Schließlich wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl Ladepuffer gemischt und aufgetragen. Die Laufzeit betrug 1 h bei 100 V. Die DNA-Banden wurden anschließend mit dem BioDocAnalyse Gel-Dokumentationssystem unter UV-Licht angeregt und fotografiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte auch mit diesem System.

2.2.3.4 Copy DNA-Synthese

Bei der RNA-Isolation erhält man das komplette Transkriptom einer Zelle. Hierbei handelt es sich neben mRNA auch um andere RNA-Typen wie ribosomale RNA und microRNA. Für die Expressionsanalyse von proteinkodierenden Genen ist aber vor allem die mRNA von Interesse. Durch reverse Transkription wird durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase zur mRNA komplementäre copy DNA (cDNA) synthetisiert. So bekommt man die Möglichkeit alle in einer Zelle transkribierten Gene abzubilden und zum Beispiel durch PCR zu analysieren.

Die Reaktion wurde mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit in RNase-freien Reaktionsgefäßen auf Eis durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 1 µg der isolierten RNA mit 2 µl 10 mM dNTP's und 1 µl Oligo(dT)18 Primer gemischt und anschließend mit DEPC behandeltem H₂O auf 14 µl aufgefüllt. Der Primer bindet das Poly-Adenosin-Ende der mRNAs und garantiert so, dass vor allem mRNA als Matrize für die Synthese dient. Der Ansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und Sekundärstrukturen der RNA

wurden durch Inkubation für 10 min bei 70 °C zerstört. Anschließend wurde die Aktivität möglicher RNasen durch Zugabe von 1 µl Ribonuklease-Inhibitor (20 U/µl) und 4 µl 5x Reaktionspuffer gehemmt. Erneut wurde kurz zentrifugiert und der Ansatz für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die reverse Transkription erfolgte durch Zugabe von 1 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) und Inkubation für 1 h bei 42 °C. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70 °C abgestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde mittelfristig bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.5 Semiquantitative RT-PCR

Die synthetisierte cDNA repräsentierte alle exprimierten proteinkodierenden Gene der untersuchten Zellen. Um das Expressionsmuster bestimmter Gene zu untersuchen, ist es möglich Abschnitte dieser Gene mit Hilfe von spezifischen Primern in einer Polymerasekettenreaktion zu amplifizieren und semiquantitativ (sq RT-PCR) zu analysieren (Barre *et al.*, 2000). Nach Normalisierung auf relativ gleichmäßig exprimierte Gene (*Housekeeping*-Gene), können die Expressionsprofile verschiedener Tumoren semiquantitativ miteinander verglichen werden. Als *Housekeeping*-Gene können z.B. Gene, die für Enzyme des basalen Stoffwechsels kodieren, verwendet werden. Hier wurde das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Es ist Teil der Glykolyse und es konnte gezeigt werden, dass es in Gliomen relativ konstant exprimiert wird (Said *et al.*, 2007).

Die MACC1-Expression wurde in GBM-Zelllinien und weiterhin in Operationsgewebe von Patienten untersucht. Zusätzlich dienten Normalhirnproben als Kontrolle.

Die Primer wurden mit der Online-Anwendung Primer 3 Plus erstellt und hatten eine Länge von 18-25 bp (Web 5). Es wurde darauf geachtet, dass der GC-Gehalt möglichst 40-60 % und die Schmelztemperatur 55-63 °C betrug. Anschließend wurden die Primer mit dem Online-Tool NetPrimer auf mögliche Sekundärstrukturen oder Dimerbildung untersucht, welche die PCR-Reaktion hemmen könnten (Web 6). Schließlich wurden die Sequenzen der Primer noch mittels des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) mit dem humanen Genom verglichen um sicherzustellen, dass die Primer nur die gewünschte mRNA binden (Web 7). Für die sq RT-PCR wurde in getrennten Reaktionen unter gleichen Bedingungen sowohl ein Genabschnitt von MACC1 als auch von GAPDH amplifiziert. Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert und die Reaktion in einem Thermo

Cycler T3000 durchgeführt (Tab. 2.4, 2.5). Die PCR-Produkte wurden anschließend wie unter 2.2.3.3 durch Agarose-Gelelektrophorese densitometrisch analysiert und die Werte für MACC1 auf die von GAPDH normalisiert.

Tab. 2.4: Reaktionsansatz für die sq RT-PCR. Angegeben sind die berechneten Volumina für einen Reaktionsansatz. Für den Versuch wurde jeweils ein 10x Master-Mix pipetiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne DNA.

Komponente	Ausgangskonzentration	Volumen	Endkonzentration
Taq-Puffer	10x	2,5 µl	1x
dNTP's	à 25 mM	0,5 µl	à 0,5 mM
Primer sense	10 µmol/µl	1,25 µl	500 nmol/µl
Primer antisense	10 µmol/µl	1,25 µl	500 nmol/µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,125 µl	0,025 U/µl
DNA	variabel	1 µl	0,1-1 ng/µl
Ultra pure water		18,375 µl	
Gesamtvolumen		25 µl	

Tab. 2.5: Programm für die sq RT-PCR von GAPDH und MACC1. Die Reaktionsschritte zwei bis vier wurden bei GAPDH in 21 Zyklen, bzw. bei MACC1 in 36 Zyklen wiederholt. Der Reaktionsschritt Annealing wurde für GAPDH bei 68 °C für 30 s und für MACC1 bei 53,3 °C für 60 s durchgeführt.

Nummer	Reaktionsschritt	T [°C]	t [s]
1	Initiale Denaturierung	94	600
2	Denaturierung	94	30
3	Annealing	68	30
4	Elongation	72	60

2.2.3.6 Quantitative RT-PCR

Neben der semiquantitativen, klassischen PCR wurde zusätzlich noch eine q RT-PCR durchgeführt. Der Vorteil der Methode liegt darin, dass sich die PCR-Reaktion durch Fluoreszenzmessung in Echtzeit verfolgen lässt. Hierbei ergibt sich eine viel genauere Quantifizierung der amplifizierten Genabschnitte.

Die q RT-PCR wurde mit einem LightCycler, wie bereits an anderer Stelle beschrieben, durchgeführt (Stein *et al.*, 2006). Zur Quantifizierung können verschiedene Verfahren eingesetzt werden, wobei hier Hybridisierungs-Sonden verwendet wurden, die eine spezifische Detektion der amplifizierten Genabschnitte ermöglichen. Diese Sonden bestehen aus zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden, die nebeneinander auf dem zu amplifizierenden Genabschnitt hybridisieren können. Beide sind mit Fluoreszenz-

farbstoffen markiert: Ein Oligonukleotid ist am 5'-Ende mit einem LightCycler Red (LCRed) Fluorophor und das andere am 3'-Ende mit Fluorescein markiert. Nur bei der Hybridisierung mit der Zielsequenz kommen sich die beiden Oligonukleotide so nahe, dass ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) auftreten kann. Hierbei wird das Donor-Fluorophor Fluorescein durch eine Lichtquelle im PCR-Gerät angeregt und gibt dann die aufgenommene Energie an das Akzeptor-Fluorophor LCRed weiter, welches im Anschluss Licht eines bestimmten Spektrums emittiert. Das vom Akzeptor abgegebene Licht kann gemessen werden und die Intensität korreliert mit der Menge des synthetisierten PCR-Produkts.

Die q RT-PCR wurde in Duplikaten und die verschiedenen Reaktionen wurden parallel durchgeführt. Das PCR-Programm ist in Tabelle 2.6 gezeigt. Um Primer-Paare auszuschließen wurde vor dem Versuch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Durch q RT-PCR wurden acht LGA und 15 GBM auf die Expression der Gene *MACC1* und *Met* untersucht. Als *Housekeeping*-Gen diente das zum Pentosephosphat-Weg gehörende Enzym *G6PDH*.

Tab. 2.6: Programm für die q RT-PCR von *MACC1*, *Met* und *G6PDH*. Schritt zwei und drei wurden insgesamt in 45 Zyklen durchgeführt.

Nummer	Reaktionsschritt	T [°C]	t [s]
1	Initiale Denaturierung	95	600
2	Denaturierung	95	10
3	Annealing	60	30
4	Elongation	72	4

Die Berechnung erfolgte nach dem Standardkurven-Modell. Hierbei dient DNA einer Probe als Standard (sog. *calibrator* cDNA), von der bekannt ist, dass sie die zu untersuchenden Gene exprimiert. In diesem Fall war es die CRC-Zelllinie SW620, da sie sowohl *MACC1*, als auch *Met* endogen exprimiert (Stein *et al.*, 2009b). Die Expression der Gene in den Proben wird dann relativ zur Expression in der Standard-Zelllinie angegeben. Hierbei kann die Expression sowohl als prozentuale Abweichung vom Standard, als auch als n-fache Änderung angegeben werden.

2.2.3.7 Transformation von Bakterien

Zur Amplifikation des *MACC1*-Plasmids für die spätere Transfektion in GBM-Zellen wurden *Escherichia coli DH5α* mit der Plasmid-DNA transformiert. Die Bakterien

wurden vorher mit der CaCl_2 -Methode chemisch kompetent gemacht um eine bessere Aufnahme der fremden DNA zu erreichen (Chuang *et al.*, 1995; Hengen, 1996). Für die Transformation wurden 50 μl Bakterien auf Eis aufgetaut und 1 μl Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s um die bakterielle Zellwand für kurze Zeit für die DNA permeabel zu machen. Im Anschluss wurde wieder für 10 min auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 300 μl 2x TY-Medium gegeben und dann für 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann auf einer 2x TY Agarose-Platte ausplattiert, welche Ampicillin zur Selektion enthielt. Nur Bakterien welche das Plasmid aufgenommen hatten, konnten ein Ampicillinresistenzgen exprimieren und wuchsen auf der Agarose-Platte. Die Platte wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag konnten Kolonien von der Platte gepickt werden.

Für die Anzucht der Bakterien wurde wie folgt eine Starterkultur angelegt: Eine Kolonie wurde von der Selektionsplatte gepickt und in 10 ml 2x TY Medium mit 10 μl Ampicillin gegeben. Die Flüssigkultur wurde für 8 h bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttler inkubiert. Dies entspricht der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien. Anschließend wurde die Starterkultur in 500 ml 2x TY Medium mit 500 μl Ampicillin verdünnt. Es wurde darauf geachtet, dass der für die Anzucht verwendete Erlenmeyerkolben mindestens das vierfache Volumen der Kultur besitzt um eine ausreichende Belüftung der Bakterien zu gewährleisten. Die Kultur wurde über Nacht bei denselben Bedingungen inkubiert.

Alternativ konnten die transformierten Bakterien auch aufbewahrt und später genutzt werden. Eine gute Möglichkeit ist das Anlegen von Glycerol-Stocks, wodurch die Bakterien mittelfristig bei -80 °C für einige Monate bis Jahre gelagert werden können. Hierfür wurde ca. 1 ml der Bakteriensuspension mit 15 % Glycerol versetzt und in einem Kryoröhrchen eingefroren. Wichtig ist die Bakterien bei Wiederverwendung zunächst auf einer Selektionsplatte anzuzüchten, um sicher zu gehen, dass sie das Wunschplasmid zwischenzeitlich nicht verloren haben.

2.2.3.8 Plasmid-DNA Präparation

Die Präparation der Plasmid-DNA aus den transformierten *Escherichia coli* Zellen erfolgte mit dem NucleoBond PC 500 Kit nach Herstellerangaben. 500 ml der

Flüssigkultur wurden für 10 min bei 4 °C und 4000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 12 ml Puffer S1 aufgenommen und anschließend 12 ml Puffer S2 zugegeben und für 5 min die DNA aus den Bakterien durch alkalische Lyse freigesetzt. Durch Inkubation für 5 min auf Eis und Zugabe von Puffer S3, welcher unter anderem Kaliumacetat enthielt, wurde die Suspension wieder neutralisiert. Dabei entstand ein Präzipitat aus bakteriellen Bestandteilen und genomischer DNA, wobei die Plasmid-DNA in Lösung blieb. Der Ansatz wurde auf einen Papierfilter gegeben und das filtrierte Lysat in eine mit Puffer N2 equilibrierte Silica-Säule gefüllt. Die negativ geladene Plasmid-DNA wurde nun an die Säule gebunden und konnte durch zwei Waschschrte mit je 16 ml Puffer N3 gereinigt werden. Schließlich wurde die Plasmid-DNA in 15 ml Puffer N5 gelöst. Für die weitere Aufreinigung wurde die DNA durch Zugabe von 12 ml Isopropanol ausgefällt. Die DNA wurde für 30 min bei 4 °C und 3000 x g abzentrifugiert und das Pellet an der Luft getrocknet. Im Anschluss wurde die DNA in 250-500 µl Ultra pure water gelöst und Konzentration und Reinheit wie unter 2.2.3.1 photometrisch bestimmt. Für reine doppelsträngige Plasmid-DNA sollte das $A_{260/280}$ -Verhältnis ungefähr 1,8 betragen. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Histologie

2.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die histologische Analyse wurden Gewebeproben aus neurochirurgischen Operationen in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom Schnitte von 2-4 µm Dicke angefertigt und auf einen SuperFrost Plus Objektträger aufgezogen.

Um die Morphologie der Tumoren beurteilen zu können, wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefertigt. Hierfür wurden die Präparate zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe sukzessive vom Paraffin befreit. Nach zweimal für 15 min in Xylol wurden die Schnitte zweimal für 2 min in 100 % Ethanol, zweimal für 1 min in 96 % Ethanol und zweimal für 30 s in 70 % Ethanol entparaffiniert und zum Schluss mit destilliertem Wasser gespült

Es folgte ein Färbeschritt mit frisch filtriertem Hämalaun nach Mayer für 25 s. Im Anschluss wurde sofort für 10 min unter fließendem Wasser gebläut, wodurch sich der pH-Wert erhöhte und der Farbton des Hämalaun in blauviolett umschlug. Der Vorgang

wurde durch kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser abgestoppt. Anschließend wurden die Präparate für 2 min in Eosin-Lösung gestellt, welche vor allem basische Zytoplasmabestandteile anfärbt. Nach zwei kurzen Inkubationen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Eukitt eingedeckt.

2.2.4.2 Immunhistochemie

Mit der Immunhistochemie kann die Genexpression in einem Gewebe auf Proteinebene immunologisch nachgewiesen werden. Die Färbung wurde nach dem Prinzip der Avidin-Biotin-Complex-Methode mit dem ZytoChem-Plus HRP Kit (Broad Spectrum) nach Herstelleranleitung durchgeführt (Bratthauer, 2010). Hierbei wird das Epitop des Zielproteins von einem spezifischen Primärantikörper gebunden, welcher wiederum von einem gegen den F_c-Teil gerichteten Sekundärantikörper erkannt wird. Der Sekundärantikörper ist mit dem kleinen Protein Biotin konjugiert. Biotin fungiert als Vitamin H in verschiedenen Stoffwechselfvorgängen als prosthetische Gruppe von Carboxy-Transferasen, hat aber zusätzlich die Eigenschaft das Glykoprotein Avidin mit sehr hoher Affinität zu binden. Deshalb wird zu den gebundenen Antikörpern ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat gegeben. Streptavidin ist ein Avidin-Analogon welches aus *Streptomyces avidinii* gewonnen wird. Die Peroxidase katalysiert nach Zugabe des Substrates Diaminobenzidin (DAB) die Entstehung eines dunkelbraunen unlöslichen Reaktionsprodukts am Ort des Zielantigens. Somit kann die Expression und Lokalisation eines Proteins im Gewebe mit dieser Methode qualitativ untersucht werden. Als Kontrolle wurde das Gewebe mit geeigneten isotypischen Kontroll-Antikörpern, welche keine relevante Spezifität gegenüber dem Zielantigen aufwiesen, gefärbt.

Die Paraffinschnitte wurden wie bei der HE-Färbung (s. 2.2.4.1) durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und rehydratisiert. Anschließend wurden die Epitope durch Aufkochen mit Zitratpuffer dreimal für 5 min demaskiert und so für die Antikörper zugänglich gemacht (sog. *Heat induced epitope retrieval*). Nach 15 min Abkühlen wurden die Schnitte kurz in destilliertes Wasser und dann in PBS gestellt. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde durch eine Blockierlösung für 10 min gehemmt um eine Reduzierung der Hintergrundfärbung zu erreichen. Nach einem Waschschrift

mit PBS wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen für 5 min geblockt. Überschüssige Lösung wurde abgewaschen und die Inkubation mit dem Primärantikörper folgte für 30 min. Nach dreimal 2 min stringentem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 15 min. Nach drei erneuten Waschsritten wurde das Enzym-Streptavidin-Konjugat zugegeben und für 15 min auf die Schnitte einwirken lassen. Drei Waschsritte gingen der fünfminütigen Inkubation mit der DAB-Färbelösung voraus. Die DAB-Lösung wurde durch Zugabe von 1 Tropfen DAB-Konzentrat auf 1,25 ml Pufferlösung frisch angesetzt. Die Farbreaktion wurde abgestoppt, indem die Präparate kurz in destilliertes Wasser gestellt wurden. Dann wurde mit Hämalaun für 25 s gegengefärbt. Nach der Gegenfärbung wurden die Schnitte analog der HE-Färbung für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Schließlich wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt und nach dem Trocknen bei 4 °C aufbewahrt.

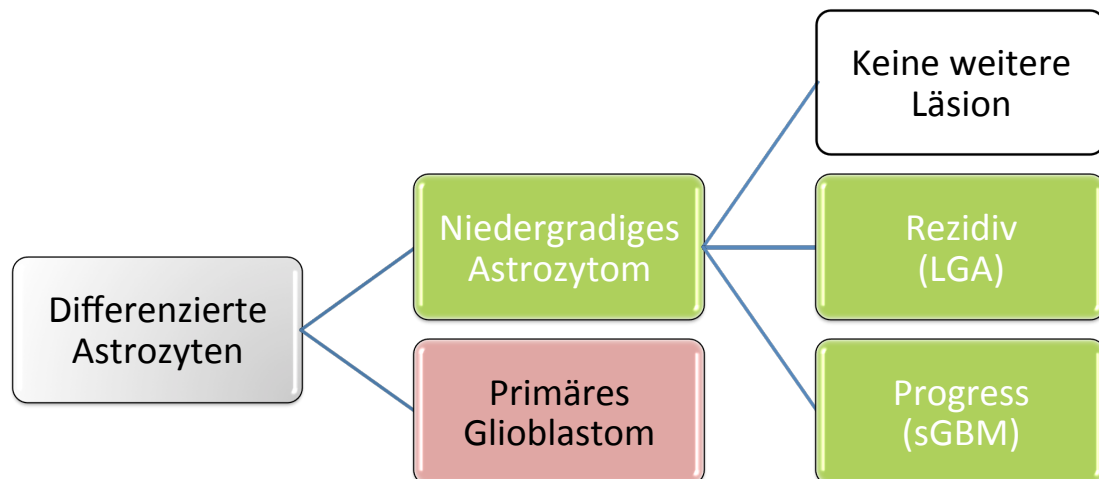


Abb. 2.3: Übersicht der Gruppen astrozytärer Tumoren, welche für die Immunhistochemie verwendet wurden. Es wurden fünf Gruppen unterschieden: Ruhende LGA ohne Progress oder Rezidiv, rezidivierende LGA, LGA mit Progress zu einem sGBM und pGBM. Außerdem diente Normalhirngewebe als Negativ- und Gewebe eines Kolonkarzinoms als Positivkontrolle. Für Details zur Entstehung siehe Abb. 1.3.

Für die Auswertung wurden pro Präparat fünf Gesichtsfelder bei 60-facher Vergrößerung mit dem Cell Counter Plugin für ImageJ ausgezählt und das Verhältnis von positiven Zellen zur gesamten Zellzahl wurde bestimmt (Abramoff M.D., 2004). Es wurden insgesamt fünf Gruppen unterschieden: Ruhende niedergradige Astrozytome, welche nach Behandlung keine weitere Läsion zeigten, rezidivierende niedergradige

Astrozytome, welche nach der Behandlung wieder ein Astrozytom desselben WHO-Grades bildeten, niedergradige Astrozytome mit Progress, welche nach der Behandlung ein sekundäres Glioblastom ausbildeten und außerdem primäre und sekundäre Glioblastome. Normalhirngewebe diente als Negativkontrolle (NB) und ein CRC als Positivkontrolle (s. Abb. 2.3).

2.2.5 Datenbankanalyse

Die experimentellen Daten wurden durch Analysen von Datenbanken erweitert. Zur Analyse der Variation der Kopien des MACC1 Gens (*copy number variations*) wurde das cBio Cancer Genomics Portal benutzt (Web 8). Das Portal erlaubt die Analyse verschiedenster Datensätze diverser Tumorentitäten. Die größte Studie für das Glioblastom stellte der Datensatz „TCGA provisional“ des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) dar, welcher 585 Fälle umfasst (TCGR, 2008). Das cBio Cancer Genomics Portal verwendet den GISTIC Algorithmus (Beroukhi *et al.*, 2007), welcher chromosomale Veränderung analysiert. So können Abweichungen der Genkopienanzahl in Tumoren abgeschätzt werden. Diese können dann mit mRNA-Expressionsdaten korreliert werden. Das Portal wurde mit Standardeinstellungen verwendet. Den mRNA-Expressionsdaten von MACC1 wurden Microarrays zu Grunde gelegt, wobei ein z-score von ± 2 als Grenzwert diente.

Da das cBio Cancer Genomics Portal nicht die Auswertung der mRNA Expressionsdaten unterstützt, wurde hierfür das Portal Anduril benutzt (Web 9). Anduril erlaubt die Auswertung der Daten des TCGA auf mRNA-Ebene. Für Genexpressionsanalysen benutzt Anduril den Affymetrix Human Genome U133A Array. Der Glioblastomdatensatz des Portals wurde mit Standardeinstellungen und dem Suchbegriff „MACC1“ durchsucht.

Oncomine (Web 10) ist ein weiteres Datenportal, welches Genexpressionsanalysen verschiedener Microarrays erlaubt. Das Portal wurde mit Standardeinstellungen und den Suchbegriffen „MACC1“ und „Glioblastoma“ verwendet. Analysiert wurde der Microarray von Sun, welcher 23 Normalhirn- und 81 Glioblastomproben enthält (Sun *et al.*, 2006). Den Daten liegt der Human Genome U133 2.0 Array von Affymetrix zu Grunde. Der verwendete Reporter war 1559361_at. Es wurden jeweils die log₂ transformierten medianen Intensitäten verwendet.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der Software Microsoft Excel 2010, und GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde durch gepaarte und ungepaarte zweiseitige t-Tests ermittelt, je nachdem ob es sich um voneinander abhängige oder unabhängige Stichproben handelte. Zum Vergleich von mehreren unterschiedlichen Gruppen wurde der ANOVA-Test (Analysis of variance) benutzt. Hierbei wurde jeweils eine Normalverteilung vorausgesetzt. Konnte dies nicht zu Grunde gelegt werden, wurde der nicht-parametrische, zweiseitige Mann-Whitney Rangsummen-Test verwendet. Für die Analyse des Gesamtüberlebens wurde das Kaplan-Meier Modell verwendet. Hierbei wurde „Tod“ als Ereignis definiert. Die Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rank Test auf Signifikanz getestet. Für Korrelationsanalysen wurde der Pearson-Test genutzt. Bei allen Tests wurde ein P-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Wenn nicht anders angegeben, stellen Säulendiagramme den Mittelwert und die Fehlerbalken die entsprechende Standardabweichung (SD) dar. Bei Boxplots repräsentieren die Whisker jeweils den kleinsten und größten Wert der Daten.

3 Ergebnisse

3.1 MACC1-Expressionsanalyse in Glioblastomzellen

In dieser Arbeit soll der Hypothese nachgegangen werden, dass MACC1 eine Bedeutung für die Pathogenese von humanen Glioblastomen hat. Im ersten Teil sollte eine mögliche Expression von MACC1 in Glioblastomen untersucht werden.

3.1.1 Die Analyse von Microarrays zeigte eine starke Expression und Veränderung der Anzahl der Genkopien von MACC1 in Glioblastomen

Zunächst wurden online verfügbare Microarrays auf die Expression von MACC1 in Glioblastomen durchsucht. Hierfür wurde mit dem Portal Oncomine der Microarray von Sun *et al.* analysiert. Sun verglich 23 Normalhirn- mit 81 Glioblastomproben (Abb. 3.1). Es zeigte sich eine 2,393-fach höhere MACC1 mRNA-Expression in GBM im Vergleich zu den NB (zweiseitiger t-Test; $p < 0,0001$, signifikant).

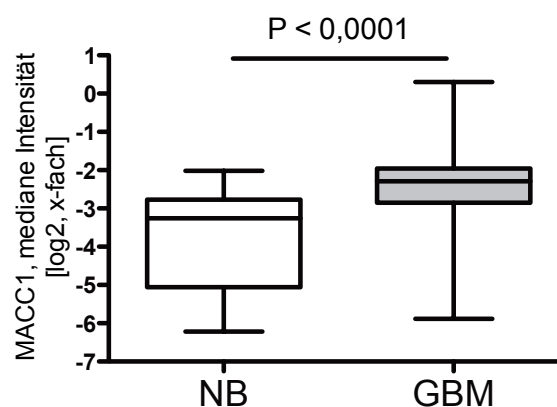


Abb. 3.1: Die Analyse von Microarrays zeigte eine signifikant höhere MACC1-Expression in Glioblastomen im Vergleich zum Normalhirn. Der Microarray von Sun *et al.* vergleicht unter anderem die Genexpression von 23 Normalhirnproben mit 81 Glioblastomproben. Er wurde über das online Portal Oncomine auf die MACC1 mRNA-Expression durchsucht. Die log2 transformierte, mediane Intensität der Proben wurde zugrunde gelegt. MACC1 wurde signifikant stärker in GBM als in NB exprimiert (2,393-fach, zweiseitiger t-Test, $p < 0,0001$). Die Ergebnisse sind als Box-Plot dargestellt.

Ein vergleichbares Portal ist Anduril. Hiermit wurden Expressionsdaten von Glioblastomen aus dem TCGA mit denen von Epilepsie-Patienten verglichen, welche als Normalhirnproben dienten. Es fand sich eine 2,27-fach höhere MACC1-Expression auf

mRNA-Ebene in Glioblastomen im Vergleich zum Normalhirn. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (zweiseitiger t-Test, $p = 0,0004$).

Um die Ergebnisse zu erweitern, wurden Glioblastome auf Veränderungen der MACC1 Genkopienanzahl untersucht. Hierfür diente das cBio Cancer Genomics Portal. Die zugrunde liegenden Glioblastomdaten stammten von TCGA. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Genkopien von MACC1 in 7,7 % (45 Fälle) aller Tumoren verändert ist (s. Abb. 3.2). In den meisten Fällen ließ sich ein Zugewinn an Genkopien feststellen (Gain), d.h. es lagen mehr als zwei Genkopien in den Zellen vor. Diese Veränderungen korrelierten positiv mit der MACC1 mRNA Expression. In 0,7 % der Fälle lag auch das

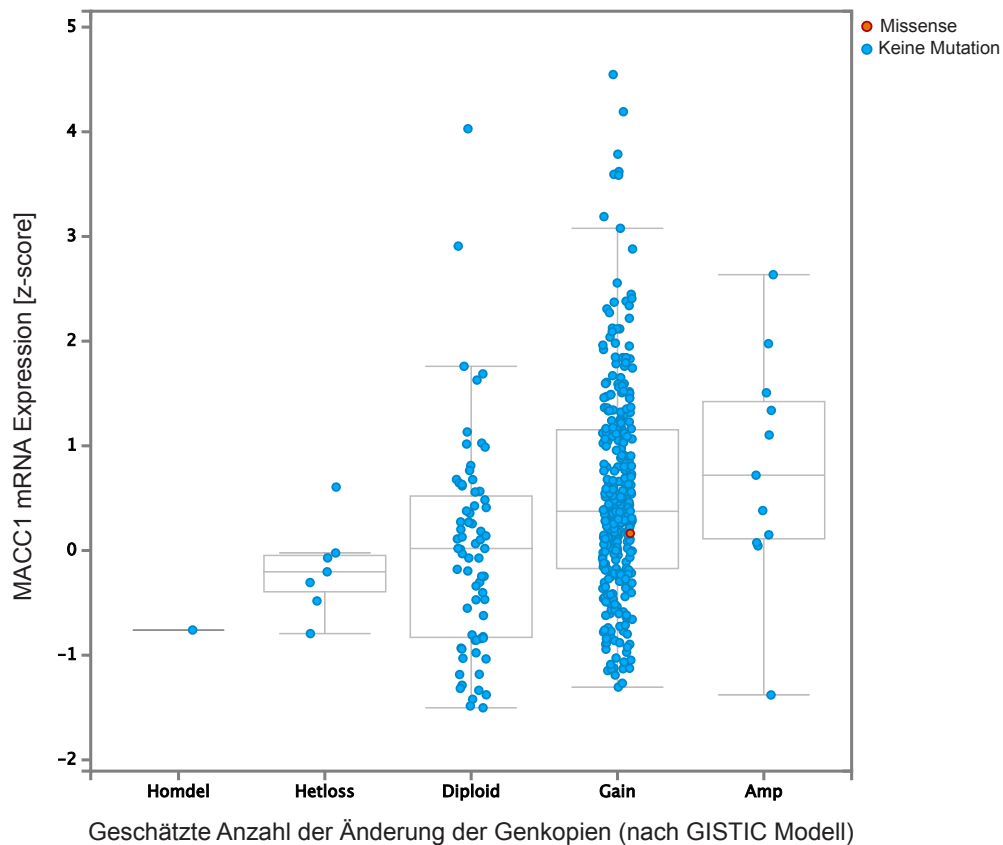


Abb. 3.2: Veränderungen der MACC1 Genkopienanzahl korrelierten positiv mit der mRNA Expression. Das cBio Cancer Genomics Portal wurde auf Veränderungen der Genkopienanzahl von MACC1 durchsucht. Es wurde der Datensatz „TCGA provisional“ mit Standardeinstellungen analysiert. Die Häufigkeit der verschiedenen Veränderungen (x-Achse) korrelierte positiv mit der MACC1 mRNA Expression (y-Achse). Ein Wert von 0 gibt definitionsgemäß das Vorliegen einer diploiden Genkopie an. Ein Wert kleiner 0 bedeutet ein Verlust von Genkopien, ein Wert größer 0 ein Zugewinn. Die Ergebnisse sind als Box-Plot dargestellt. Homdel, homozygote Deletion; Hetloss, heterozygote Deletion; Diploid, diploide Genkopie; Gain, Zugewinn an Genkopien; Amp, Gen liegt mehrfach amplifiziert vor.

Gen selbst mutiert vor. Durchsucht man das Portal zusätzlich auf Veränderungen von Genen, die in enger Beziehung zu MACC1 stehen, wie HGF und Met, so zeigen sich Alterationen in ca. 35 % (203 Fälle) der Tumoren.

3.1.2 Die MACC1 und Met mRNA-Expression korrelierte mit dem WHO-Grad astrozytärer Tumoren

3.1.2.1 MACC1 war unterschiedlich stark in humanen GBM-Zelllinien exprimiert

Um die erhaltenen *in silico* Ergebnisse zu bestätigen, sollte die Expression von MACC1 *in vitro* in humanen Glioblastom-Zelllinien auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Hierfür wurden die Zelllinien U87, U138, U251, U343, U373 und GaMG mittels sq RT-PCR analysiert (Abb. 3.3).

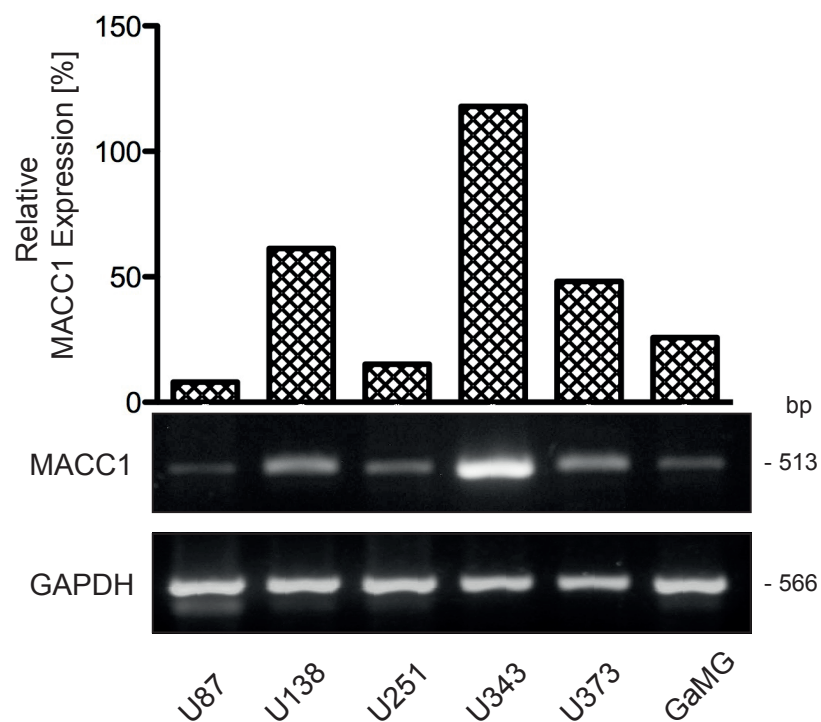


Abb. 3.3: Humane Glioblastom-Zelllinien zeigten eine unterschiedlich starke MACC1-Expression. Die MACC1-Expression wurde durch sq RT-PCR in sechs Glioblastom-Zelllinien untersucht und anschließend densitometrisch ausgewertet. Das Säulendiagramm zeigt die relative MACC1-Expression auf die Expression von GAPDH normalisiert.

Die relative MACC1-Expression wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert und densitometrisch ausgewertet. Es war ein deutlicher Unterschied zwischen den

verschiedenen Zelllinien zu erkennen, wobei U343 die stärkste endogene MACC1-Expression zeigte und U87 und U251 die geringste. Die restlichen Zelllinien exprimierten MACC1 auf mittlerem Niveau.

3.1.2.2 Die Expression von MACC1 und Met in Glioblastomproben war signifikant höher als in niedergradigen Astrozytomen

Nachdem die Expression von MACC1 in humanen Glioblastom-Zelllinien gezeigt werden konnte, wurde als nächstes der Nachweis in Operationsgewebe durchgeführt. Hierfür wurde ein Kollektiv aus 15 Patienten mit der Diagnose GBM und acht Patienten mit LGA gebildet. Diese Patienten wurden am Universitätsklinikum Würzburg operiert und das resezierte Tumorgewebe wurde anschließend durch sq RT-PCR auf die MACC1-Expression analysiert. Als Kontrolle dienten drei NB (Abb. 3.4).

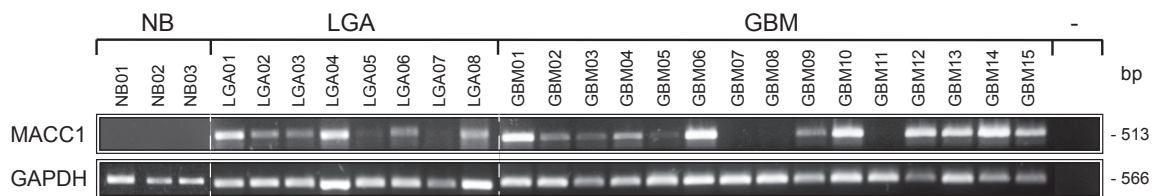


Abb. 3.4: Die MACC1-Expression stieg mit zunehmendem WHO-Grad astrozytärer Tumoren an. Operationsgewebe von Patienten mit Glioblastom, bzw. niedergradigem Astrozytom wurde durch sq RT-PCR auf die MACC1-Expression untersucht. Insgesamt wurden 15 GBM, acht LGA und drei NB untersucht. Als interne Kontrolle diente die Expression von GAPDH. (-), Negativkontrolle ohne DNA im Ansatz. Gestrichelte Linien zeigen, wo Gelbilder zusammengesetzt wurden.

Im NB fand sich keine MACC1 mRNA, wobei sie in den anderen Gruppen eindeutig nachweisbar war. Die statistische Auswertung zeigte einen signifikanten Unterschied der relativen MACC1-Expression zwischen GBM (Median = 46,750), LGA (Median = 28,635) und NB (Median = 0, ANOVA, $p = 0,0199$; Abb. 3.5a).

Die Ergebnisse dieses semiquantitativen Ansatzes wurden im Anschluss durch q RT-PCR bestätigt. Die MACC1-Expression wurde auf die Expression von G6PDH normalisiert und relativ im Vergleich zur Kolonkarzinomzelllinie SW620 angegeben, welche als Standardprobe diente (Abb. 3.5b). Es fand sich eine ca. 3-fach höhere MACC1-Expression in GBM (1,486 %) im Vergleich zu LGA (0,658 %). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p = 0,0048$). Somit korrelierte das MACC1-Expressionsniveau auf mRNA-Ebene mit dem WHO-Grad der astrozytären Tumoren.

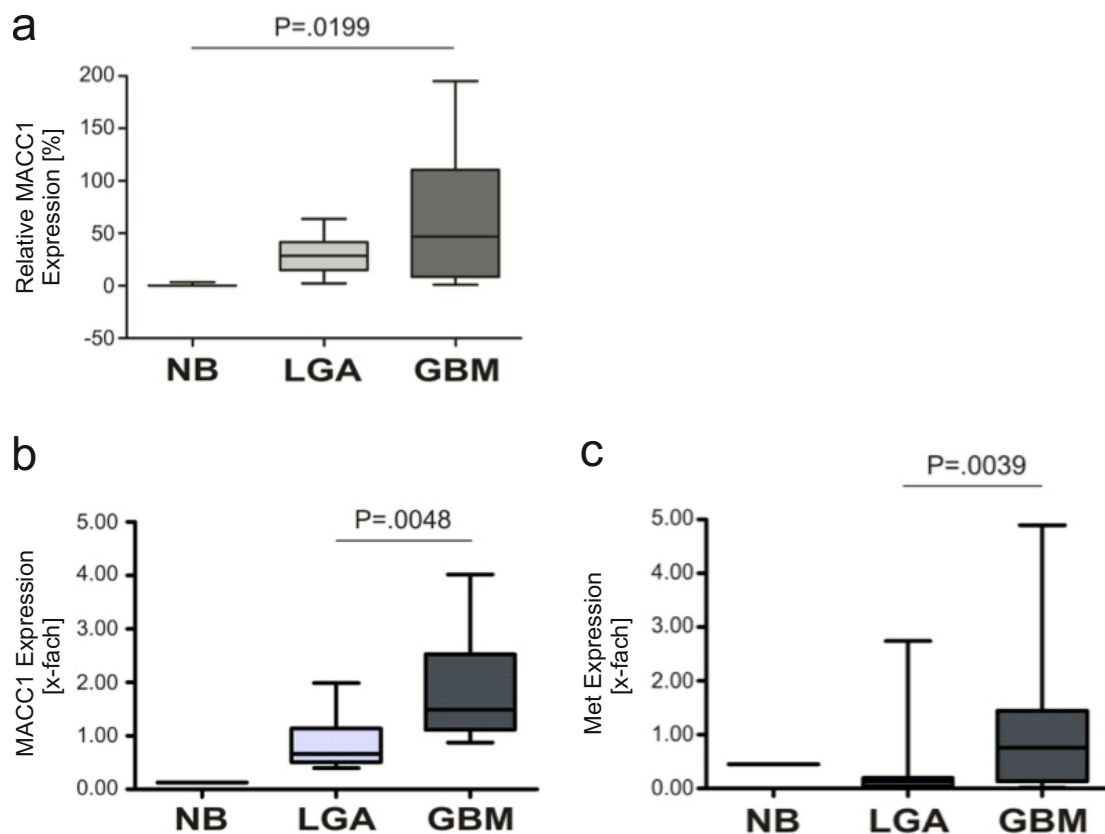


Abb. 3.5: Sowohl MACC1 als auch Met waren in Glioblastomen signifikant höher exprimiert als in niedergradigen Astrozytomen. a) Operationsgewebe von Patienten (15 GBM, ach LGA und drei NB) wurde durch sq RT-PCR auf die Expression von MACC1 untersucht. Angegeben ist die mediane relative Expressionsintensität normalisiert auf die Expression von GAPDH. Glioblastome exprimierten MACC1 am stärksten (46,75), LGAs mittelstark (28,64) und NB nahezu nicht. Der ANOVA-Test ergab einen statistisch signifikanten Anstieg der MACC1-Expression in Abhängigkeit vom WHO-Grad ($p = 0,0199$). b) Bestätigung der Ergebnisse aus a) durch q RT-PCR. Es fand sich ein signifikanter Unterschied der MACC1-Expression zwischen LGA (Median: 0,0658 %) und GBM (Median: 1,486 %, t-Test; $p = 0,0048$). c) Analyse der Met Expression durch q RT-PCR in denselben Tumorproben. Die Expression war signifikant höher in GBM (Median: 0,755 %) als in LGA (Median: 0,122 %, t-Test; $p = 0,0039$). Die Ergebnisse sind als Box-Plot dargestellt. In b) und c) wurde die MACC1-, bzw. Met-Expression auf die von G6PDH normalisiert. Angegeben ist die relative Expression im Vergleich zur Expression in der Standardprobe SW620.

Weiterhin wurde in denselben Tumorproben die Expression von Met untersucht, welches durch MACC1 transkriptionell reguliert wird. In GBM (0,755 %) wurde Met 7-fach höher exprimiert als in LGA (0,122 %), was ein statistisch signifikanter Unterschied war ($p = 0,0039$). Jedoch war die Streuung der Expressionsstärke größer als bei der Analyse der MACC1-Expression (Abb. 3.5c, Whisker der Box-Plots).

3.1.3 Anhand der MACC1-Protein Expression konnte zwischen verschiedenen Astrozytom-Entwicklungsstadien unterschieden werden

Nachdem die MACC1 mRNA-Expression in astrozytären Tumoren verschiedener WHO-Gradierung gezeigt worden war, folgte als nächstes der Nachweis auf Proteinebene. Hierfür wurde ein von den vorherigen Versuchen unabhängiges Patientenkollektiv aus 24 LGA und 14 GBM durch Immunhistochemie untersucht. Im Kollektiv wurden mehrere Gruppen unterschieden (s. Abb. 2.3). Es enthielt neben zusammengehörigen Proben von rezidivierenden Tumoren (Initialtumor war ein LGA und nach Behandlung bildete sich ein LGA-Rezidiv) und Tumoren mit Progression (Initialtumor war ein LGA und daraus entstand ein sGBM) von denselben Patienten auch Tumoren, die nach einer Operation keine weitere Läsion bildeten (ruhende LGAs, welche weder ein Rezidiv bildeten, noch Progress zeigten). Als Negativkontrolle diente Gewebe eines Patienten mit Multisystematrophie, welches als Normalhirnprobe fungierte und als Positivkontrolle wurde Gewebe eines CRC verwendet.

Im Normalhirn zeigten nur einige Neurone im Markbereich eine positive Färbung für MACC1, Astrozyten waren jedoch deutlich negativ. Im LGA färbten sich einige wenige Tumorzellen und Pyramidenzellen an. In den GBMs zeigte sich ein sehr heterogenes Bild. Isomorphe Regionen färbten sich nur schwach an, wohingegen polymorphe Regionen im Tumor eine sehr starke Färbung aufwiesen. Generell färbten sich nur Tumorzellen stark an, nekrotische Anteile oder Immunzellen blieben negativ. Beim Vergleich von primären mit sekundären GBM zeigte sich bei hoher Vergrößerung nur bei sGBM sowohl eine Kern-, als auch eine Zytoplasmafärbung, wohingegen pGBM, als auch LGA, ausschließlich eine Färbung des Zytoplasmas aufwiesen (Abb. 3.6).

Von jedem Präparat wurden insgesamt fünf Gesichtsfelder bei 60-facher Vergrößerung ausgezählt und das Verhältnis von positiven Tumorzellen zu allen Tumorzellen wurde bestimmt (Abb. 3.7). In LGA exprimierten $14,71 \pm 15,64$ % der Tumorzellen MACC1 ($n = 24$), wohingegen im GBM $38,21 \pm 24,49$ % positive Zellen zu finden waren ($n = 14$, $p = 0,0017$; Abb. 3.7a). Daraufhin wurden die Untergruppen der LGA analysiert. Nur $4,29 \pm 4,536$ % der Zellen des ruhenden LGA waren positiv für MACC1 ($n = 7$). Die LGA mit Progression, bzw. Rezidiv hingegen zeigten eine positive Färbung für

18,67 ± 18,82 % der Tumorzellen (n = 12, p = 0,0050; Abb. 3.7b). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in der MACC1-Expression des initialen LGA (16,00 ± 6,60 %, n = 6) und des dazugehörigen Rezidivs des gleichen WHO-Grades feststellen

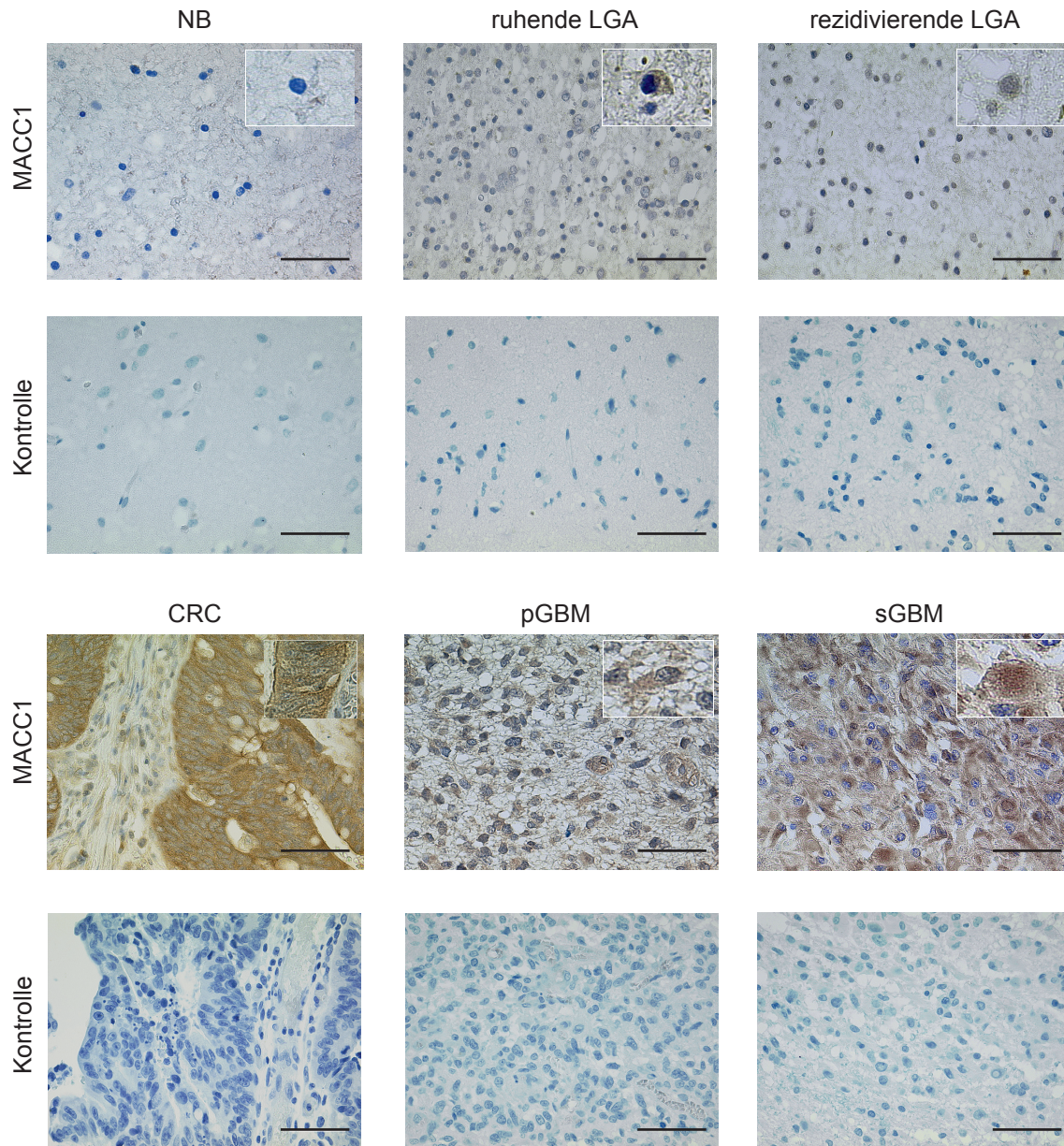


Abb. 3.6: MACC1-Expression in Gewebeschnitten astrozytärer Tumoren. In Paraffin eingebetetes Tumorgewebe wurde mit einem MACC1 spezifischen Antikörper gefärbt (braune Färbung). Gewebe, welches mit einem isotypischen Kontroll-Antikörper gefärbt wurde, diente als Negativkontrolle. Gewebe eines mit einer Multisystematrophie diagnostizierten Patienten wurde als Normalhinprobe verwendet. Als Positivkontrolle diente ein Kolonkarzinom. Es sind repräsentative Beispiele der Färbungen der Multisystematrophie (NB; n = 1), der ruhenden LGA (n = 7), der rezidivierenden LGA (n = 12), der primären GBM (n = 10) und der sekundären GBM (n = 4) gezeigt. Vergrößerung 40x, Vergrößerung der Einzelzellen 60x. Die Skala entspricht 50 µm.

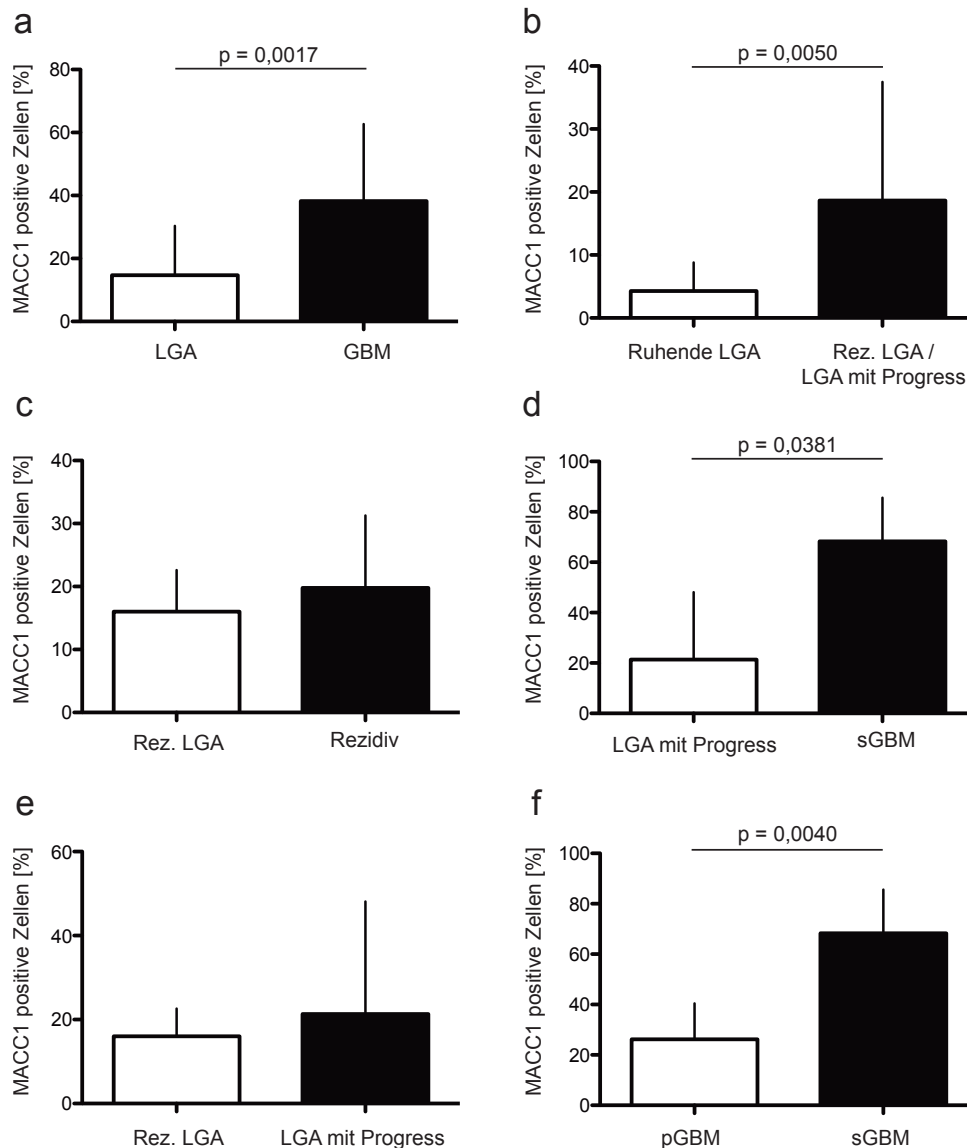


Abb. 3.7: Bestimmung der MACC1-Expression auf Proteinebene erlaubte eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Astrozytom-Entwicklungsstadien. In Paraffin eingebettete Tumorproben wurden mit einem spezifischen MACC1-Antikörper gefärbt (Abb. 3.6). Für jeden Tumor wurden fünf Gesichtsfelder bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt und die für MACC1 positiven Tumorzellen ins Verhältnis zu allen Tumorzellen gesetzt. a) Signifikant mehr Zellen exprimierten MACC1 in GBM (n = 14) im Vergleich zu LGA (n = 24, p = 0,0017). b) Die MACC1-Expression in ruhenden LGA (n = 7) war geringer als in rezidivierenden LGA und LGA, die Progress zeigten (n = 12, p = 0,0050). c) Rezidivierende LGA (n = 6) zeigten eine unterschiedliche MACC1-Expression im Vergleich zum zugehörigen Rezidiv (n = 5, p = 0,6451). d) LGA, welche sich zu einem höhergradigen Gliom entwickelten (n = 6), zeigten signifikant niedrigere Werte für MACC1 positive Zellen, als die zugehörigen sekundären GBM (n = 4, p = 0,0381). e) Der Anteil MACC1 positiver Tumorzellen in LGA, welche Progress zeigten (n = 6), war höher als in LGA, die ein Rezidiv zeigten (n = 6, p = 0,8089). f) Sekundäre GBM (n = 4) exprimierten signifikant höhere Mengen von MACC1 als primäre GBM (n = 10, p = 0,0040). Statistische Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Rangsummentest berechnet.

(19,80 ± 11,48 %, n = 5, p = 0,6541; Abb. 3.7c). Wurden jedoch die initialen LGA (21,33 ± 26,80 %, n = 6) mit dem daraus entstehenden sekundären GBM (68,25 ± 17,35 %, n = 4) verglichen, so verdreifachte sich die Zahl der positiven Zellen, was einen statistisch signifikanten Unterschied darstellte (p = 0,0381; Abb. 3.7d). Zwischen rezidivierenden LGA (16,00 ± 6,603 %, n = 6) und LGA mit Progress zu einem sekundären GBM (21,33 ± 26,80 %, n = 6) fand sich kein signifikanter Unterschied (p = 0,8089; Abb. 3.7e). Es waren jedoch signifikant weniger Tumorzellen positiv für MACC1 in primären GBM (26,20 ± 14,30 %; n = 10) verglichen mit sekundären GBM (68,25 ± 17,35 %, n = 4, p = 0,0040; Abb. 3.7f).

Anhand der Bestimmung der MACC1-Expression auf Proteinebene konnte daher nicht nur zwischen LGA und GBM, sondern auch zwischen primären und sekundären GBM, bzw. ruhenden LGA und LGA mit Progression, bzw. Rezidiv unterschieden werden.

3.2 Effekte von MACC1 auf das Überleben von Glioblastompatienten

Die bisher gewonnenen MACC1-Expressionsdaten wurden im Folgenden mit klinischen Parametern korreliert. Von den 14 Glioblastompatienten, die durch IHC analysiert worden waren, waren elf Männer und drei Frauen. Die Tumorlokalisation lag fast immer supratentoriell in den Großhirnhemisphären, meist frontal oder temporal. Das mittlere Erkrankungsalter betrug 55,6 Jahre und das mediane Überleben 11 Monate. Die MACC1 Protein-Expressionsdaten (s. 3.1.2) wurden mit dem Gesamtüberleben in Monaten ab Diagnose Glioblastoma multiforme korreliert. Es wurde zwischen Patienten unterschieden, die MACC1 stark und Patienten die das Gen schwach exprimierten. Als Schwellenwert wurde die mediane Expression auf Proteinebene definiert, welche 33 % betrug. Zur Berechnung der Überlebensfunktion wurde das Modell nach Kaplan-Meier benutzt.

Es zeigte sich, dass Patienten, die MACC1 stark exprimierten (8 Monate, n = 6) im Vergleich zu schwach exprimierenden Patienten (16 Monate, n = 8) ein signifikant kürzeres medianes Gesamtüberleben hatten (p = 0,0358, Log-Rank Test; Abb. 3.8). Das Hazard-Ratio lag bei 4,73 (95 % KI: 1,11-20,19).

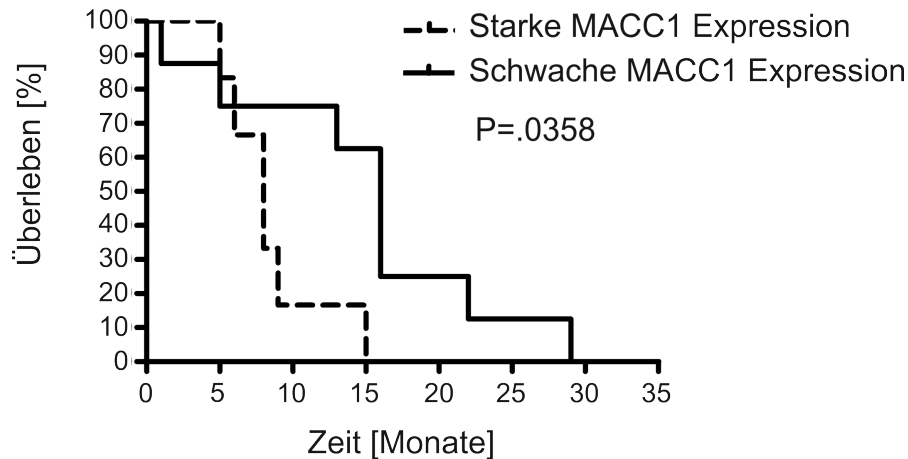


Abb. 3.8: Glioblastom-Patienten mit hoher MACC1-Expression hatten eine ungünstige klinische Prognose. Patienten mit der Diagnose Glioblastom wurden durch Immunhistochemie auf ihre MACC1-Expression untersucht und in eine schwach MACC1-exprimierende (n = 8) und eine stark exprimierende Gruppe aufgeteilt (n = 6). Der Schwellenwert war die mediane MACC1-Expression und lag bei 33 % positiven Tumorzellen. Anschließend wurde das mediane Gesamtüberleben ab Diagnosebeginn in Monaten mittels des Kaplan-Meier Modells mit der MACC1-Expression korreliert. Patienten mit starker MACC1-Expression zeigten ein signifikant kürzeres medianes Überleben (8, bzw. 16 Monate, $p = 0,0358$; Log-Rank Test).

3.3 Funktionelle *in vitro* Analysen des Einflusses von MACC1 auf Schlüsseigenschaften von Glioblastomzellen

Nachdem durch verschiedene Methoden gezeigt werden konnte, dass Glioblastome MACC1 überexprimierten, wurde im Anschluss die funktionelle Rolle des MACC1-Proteins in dieser Tumorentität untersucht. MACC1 wurde als ein im Zusammenhang mit Metastasierung und Invasion stehendes Protein im CRC etabliert, daher wurde auch ein Einfluss auf Schlüsseigenschaften von Glioblastomzellen, wie Migration und Proliferation angenommen.

3.3.1 Die Migration von Glioblastom-Primärkulturen korrelierte mit der endogenen MACC1-Expression

Um Effekte von MACC1 auf die Migration von GBM zu zeigen, wurde ein Sphäroid-Migrationsassay durchgeführt. Hierfür wurden primäre Zellkulturen verwendet, welche direkt aus Operationsgewebe gewonnen und maximal einmal passagiert worden waren. Insgesamt wurden neun verschiedene Glioblastome verwendet, wobei für jeden Tumor jeweils zehn unterschiedliche Sphäroide untersucht wurden. Die

Sphäroide wurden für 48 h zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 24 h, 36 h und 48 h analysiert. Tumor GBM36 wurde nach 36 h vom Versuch ausgeschlossen, da die Probe eine Kontamination aufwies. Außerdem wurde von allen Tumoren die endogene MACC1-Proteinexpression durch Western-Blotting bestimmt und die Kohorte anschließend in eine Gruppe von Tumoren mit starker und eine Gruppe mit schwacher MACC1-Expression aufgeteilt (Abb. 3.9).

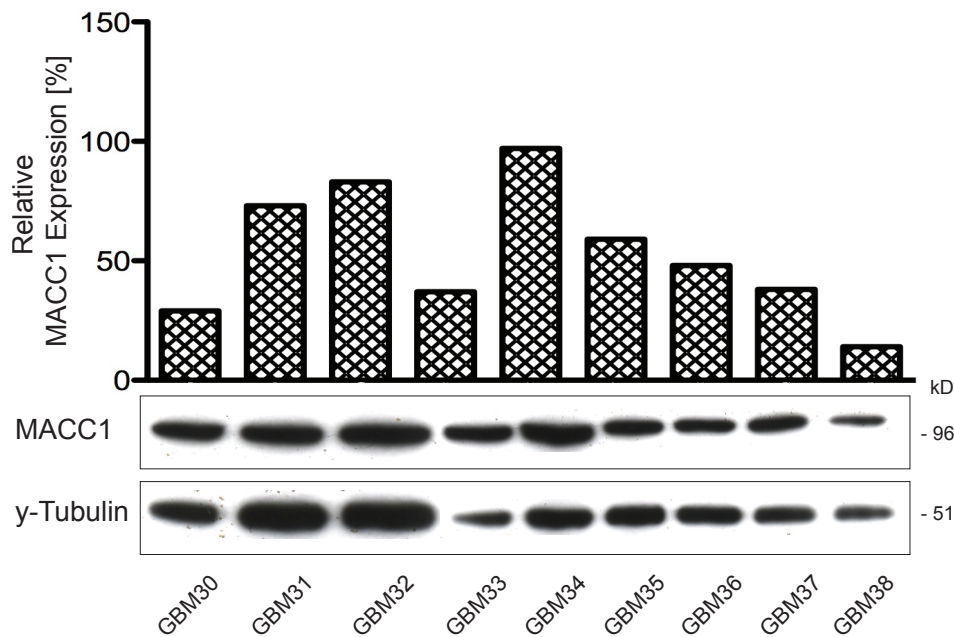


Abb. 3.9: Die endogene MACC1-Expression primärer Glioblastom-Zellkulturen variierte stark. Die endogene MACC1-Expression von neun verschiedenen primären Zellkulturen wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen MACC1 durch Western-Blotting bestimmt. Die Intensität der MACC1-Expression wurde photodensitometrisch gemessen und auf die Expression von γ -Tubulin normalisiert.

Zunächst wurde die Migration qualitativ analysiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Sphäroid eines Tumors mit hoher MACC1-Expression und starker Migration (Abb. 3.10a, Tumor GBM31) und ein Sphäroid von einem Glioblastom mit sowohl geringer MACC1-Expression als auch niedriger Migrationsrate (Abb. 3.10a, Tumor GBM38). Auffallend war, dass sich bei GBM31 Tumorzellen bereits nach 12 h vom Sphäroid entfernten, wohingegen bei GBM38 die Migration erst nach 24 h allmählich begann. Außerdem migrierten bei GBM31 deutlich mehr Zellen und sie bewegten sich weiter vom Sphäroid weg als bei GBM38. Nach 36-48 h hatte sich der GBM31-Sphäroid nahezu aufgelöst, da sich der größte Anteil der Zellen vom Zentrum entfernt hatte,

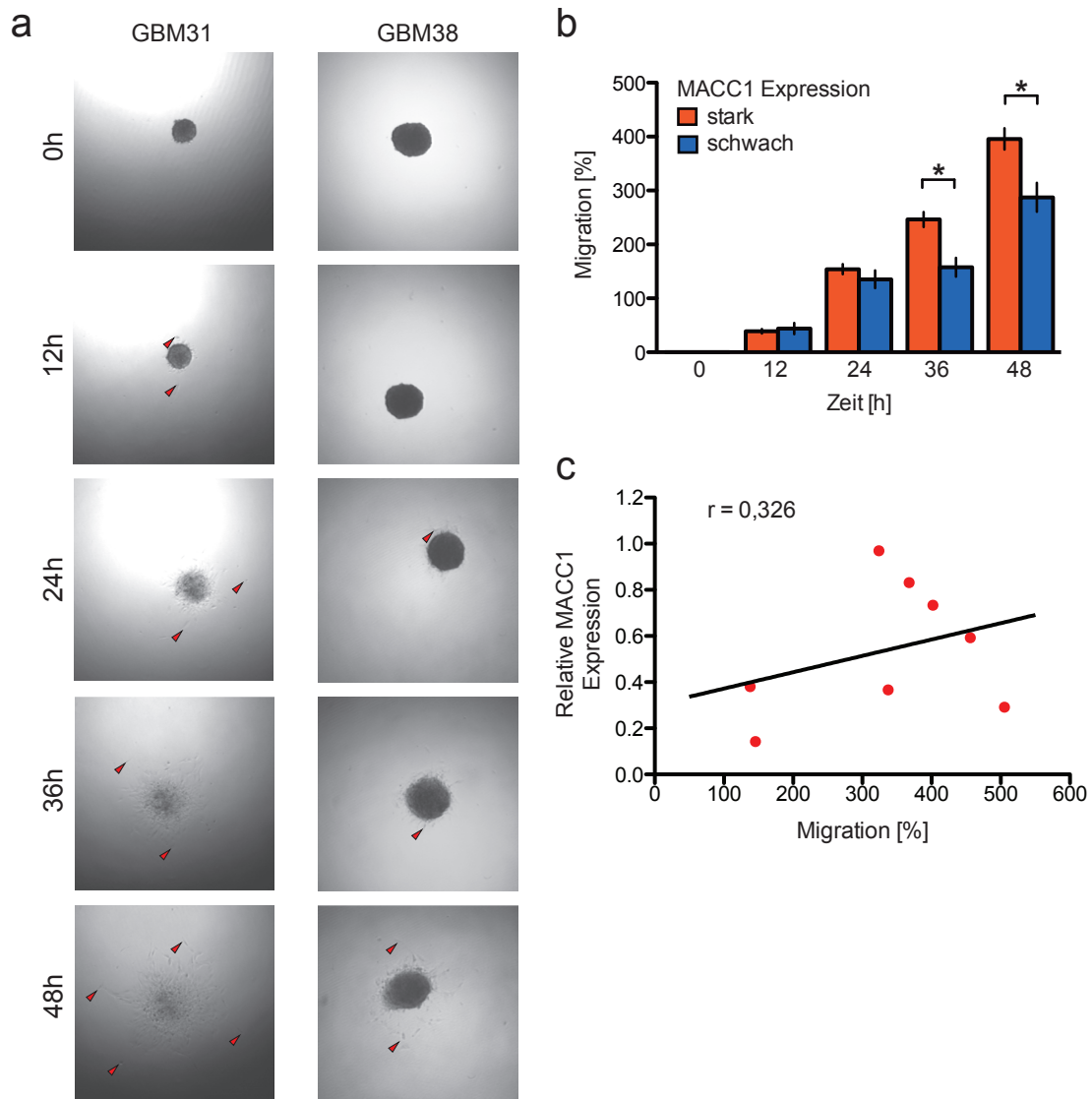


Abb. 3.10: Die endogene MACC1-Expression korrelierte positiv mit der Migrationsrate primärer Glioblastom-Zellkulturen. Die Migration von insgesamt neun verschiedenen GBM Primärkulturen wurde in einem Sphäroid-Migrationsassay für 48 h untersucht. Basierend auf den MACC1-Proteinexpressionsdaten wurde zwischen einer Gruppe, die MACC1 stark exprimierte und einer schwach exprimierenden Gruppe unterschieden. Je Tumor wurden zehn Sphäroide analysiert. a) Gezeigt ist ein repräsentativer Sphäroid von GBM31, einem Tumor mit hoher MACC1-Expression und starker Migration und von GBM38, einem Glioblastom mit relativ niedriger MACC1-Expression und geringer Migrationsrate. Die jeweils am weitesten migrierten Zellen sind durch rote Pfeilspitzen markiert. b) Quantifizierung der Migration aller Sphäroide beider Gruppen zu den verschiedenen Messpunkten. Nach 36 h (MACC1 hoch: 246,3 vs. MACC1 niedrig: 157,6, $p = 0,0002$) und 48 h zeigte sich eine signifikant stärkere Migration der stark MACC1-exprimierenden Gruppe im Vergleich zur anderen Gruppe (MACC1 hoch: 395,8 vs. MACC1 niedrig: 287,5, $p = 0,0017$). c) Es zeigte sich eine positive Korrelation der Zellmigration aller Tumoren nach 48 h mit der endogenen MACC1-Expression (Pearson $r = 0,326$). Vergrößerung in a) 10 fach. Fehlerbalken in b) entsprechen dem SEM. Statistische Unterschiede wurden durch zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet. *, $p < 0,05$.

während der GBM38-Sphäroid immer noch eine deutlich abgegrenzte, kompakte Form aufwies.

Neben der Analyse des phänotypischen Unterschieds wurde die Migration der Tumoren quantifiziert (Abb. 3.10b). Hierfür wurde für jeden Tumor jeweils der Abstand der acht am weitesten von den Sphäroiden migrierten Zellen zum Sphäroidzentrum gemessen. Die Migration der stark MACC1-exprimierenden Tumoren wurde mit der Gruppe der MACC1-schwach exprimierenden Tumoren zu den verschiedenen Messzeitpunkten verglichen. In den ersten 12 h migrierten die Zellen ähnlich weit in den beiden Gruppen (MACC1 hoch: $38,96 \pm 30,39$ vs. MACC1 niedrig: $44,01 \pm 65,36$, $p = 0,6292$). Ab 24 h zeigte es sich, dass die Zellen der GBM mit starker MACC1-Expression im Mittel weiter migrierten als in der anderen Gruppe (MACC1 hoch: $154,1 \pm 66,03$ vs. MACC1 niedrig: $135,3 \pm 104,60$, $p = 0,31$). Dieser Unterschied wurde noch deutlicher nach 36 h (MACC1 hoch: $246,3 \pm 98,60$ vs. MACC1 niedrig: $157,6 \pm 100,60$, $p = 0,0002$) und war am größten nach 48 h (MACC1 hoch: $395,8 \pm 118,70$ vs. MACC1 niedrig: $287,6 \pm 167,50$, $p = 0,0017$).

Eine Korrelation der Migration der verschiedenen Tumoren nach 48 h mit der endogenen MACC1-Proteinexpression zeigte einen positiven Zusammenhang (Pearson $r = 0,326$) (Abb. 3.10c).

3.3.2 Die Überexpression von MACC1 führte zu einer erhöhten Zellmigration

Die bisher durchgeführten Experimente dienten vor allem der Untersuchung der endogenen MACC1-Expression. Daher wurde das Gen nun in GBM-Zelllinien überexprimiert und die Auswirkungen wurden in funktionellen Versuchen analysiert. Hierfür wurden die Zelllinien U138 und U251 gewählt, da beide MACC1 endogen relativ niedrig exprimierten, jedoch trotzdem ausreichend schnell proliferierten um für die funktionellen Versuche verwendet werden zu können. Die beiden Zelllinien wurden mit einem Vektor transfiziert, der MACC1 enthielt und so stabil MACC1-überexprimierende Glioblastom-Zelllinien generiert (U138/MACC1, bzw. U251/MACC1). Als Kontrolle wurden die Zelllinien mit einem Kontrollvektor transfiziert (U138/Vektor, bzw. U251/Vektor). Die Überexpression wurde auf RNA-Ebene durch q RT-PCR und auf Protein-Ebene durch Western Blot mit einem MACC1-spezifischen und einem gegen

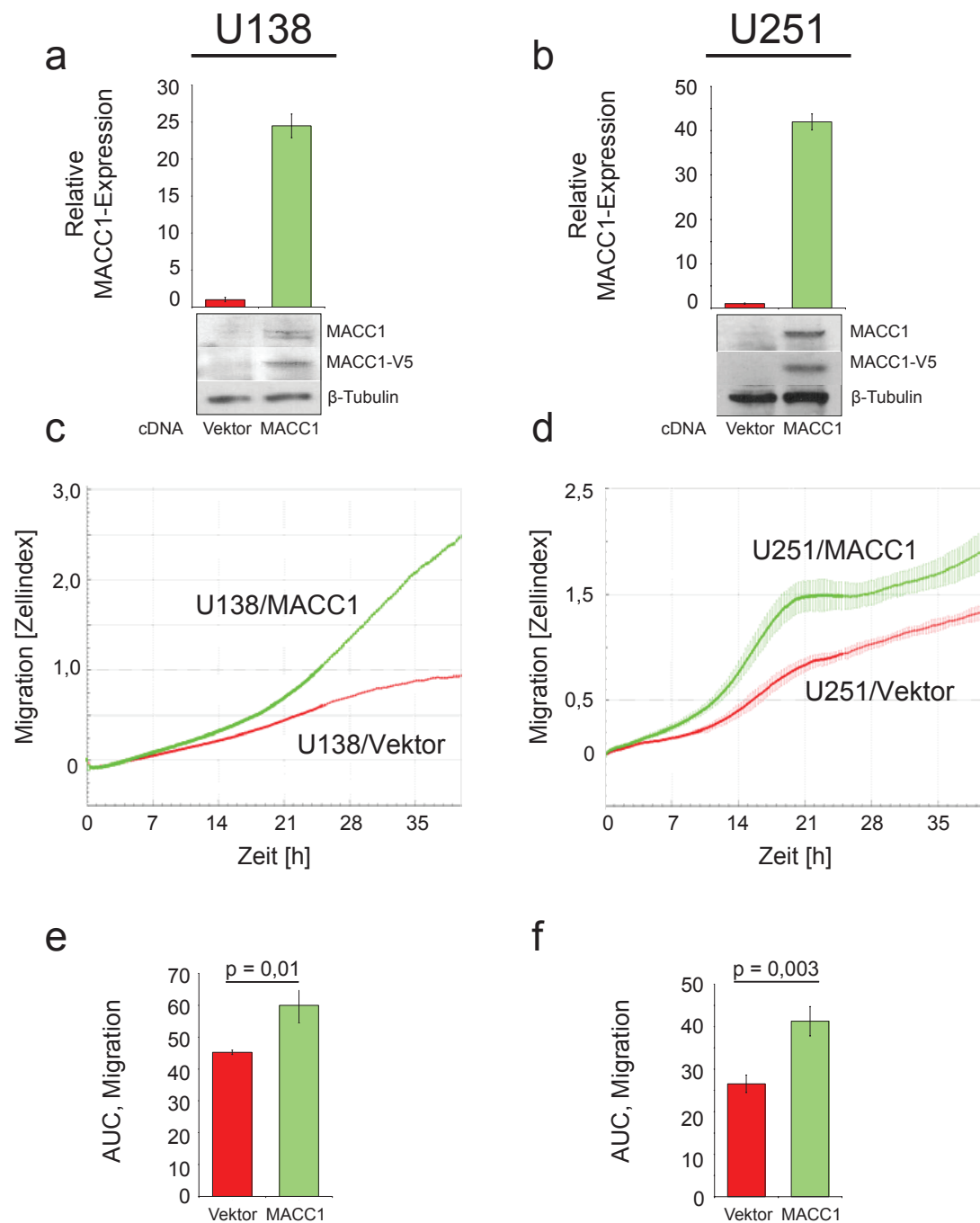


Abb. 3.11: Die Überexpression von MACC1 in Glioblastomzelllinien führte zu einer höheren Zellmigration. Die beiden GBM-Zelllinien U138 und U251 wurden stabil mit MACC1 transfiziert (U138/MACC1, bzw. U251/MACC1). Als Kontrolle wurde mit den entsprechenden Leervektoren transfiziert (U138/Vektor, bzw. U251/Vektor). Die Überexpression wurde durch q RT-PCR und durch Western-Blotting mit einem spezifischen Antikörper, bzw. einem gegen das V5-Epitop gerichteten Antikörper nachgewiesen (a, b). Die Zellmigration wurde mit dem xCELLigence System für 40 h in Echtzeit gemessen (c, d). Eine Bestimmung des Integrals der Kurven (AUC) zeigte eine signifikant höhere Zellmigration in den MACC1-überexprimierenden Zelllinien (U138: $p = 0,01$, bzw. U251: $p = 0,003$; e, f).

das V5-Epitop gerichteten Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.11a, b).

Zunächst wurde der Effekt auf die Zellmigration gemessen. Für diese Fragestellung wurde das xCELLigence System benutzt. Die Migration wurde in beiden Zelllinien für 40 h in Echtzeit untersucht (Abb. 3.11c, d) und anschließend jeweils das Integral der Migration berechnet und miteinander verglichen (Area under the curve, AUC). Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Zellmigration für die MACC1-überexprimierenden Zelllinien. Für U138/MACC1 im Vergleich zu U138/Vektor betrug der maximale Zellindex 2,46 bzw. 0,91 ($p = 0,01$; Abb. 3.11e). Für U251/MACC1 betrug er im Vergleich zu U251/Vektor 1,93 bzw. 1,34 ($p = 0,003$; Abb. 3.11f).

3.3.3 MACC1 induzierte eine Erhöhung der Proliferation, auch zelladhäsionsunabhängig

Nachdem ein Effekt von MACC1 auf die Zellmigration gezeigt werden konnte, wurden im Folgenden die Auswirkungen auf die Proliferation von Glioblastom-Zelllinien untersucht. Hierfür wurden dieselben Zelllinien wie in Abschnitt 3.3.2 mit dem xCELLigence System analysiert. Die Proliferation wurde für 100 h in Echtzeit gemessen (Abb. 3.12a, b). Es zeigte sich nach Kalkulation der Integrale (AUC), dass die MACC1-überexprimierenden Zelllinien U138/MACC1 und U251/MACC1 eine signifikant höhere Proliferationsrate aufwiesen als die jeweiligen Kontrollen (U138: $p < 0,001$; U251: $p = 0,046$; Abb. 3.12c, d). Die relative Proliferation in U138/MACC1 war deutlich höher als in U251/MACC1.

Bei der Messung unter den Bedingungen des xCELLigence Systems konnten sich die Zellen an die beschichteten Gefäße anheften, Zellkontakte zu anderen Zellen ausbilden und proliferieren. Es wurde jedoch auch die zellkontaktunabhängige Proliferation durch einen Koloniebildungsassay untersucht. Hierfür wurden dieselben Zelllinien als Einzelzellsuspension auf Weichagar ausgesät und nach 14 Tagen die sich gebildeten Kolonien ausgezählt. Insgesamt bildeten U138/MACC1 (151 %, $p = 0,026$; Abb. 3.12e) und U251/MACC1 (127 %, $p = 0,029$; Abb. 3.12f) signifikant mehr Kolonien, als in den jeweiligen Kontrollgruppen.

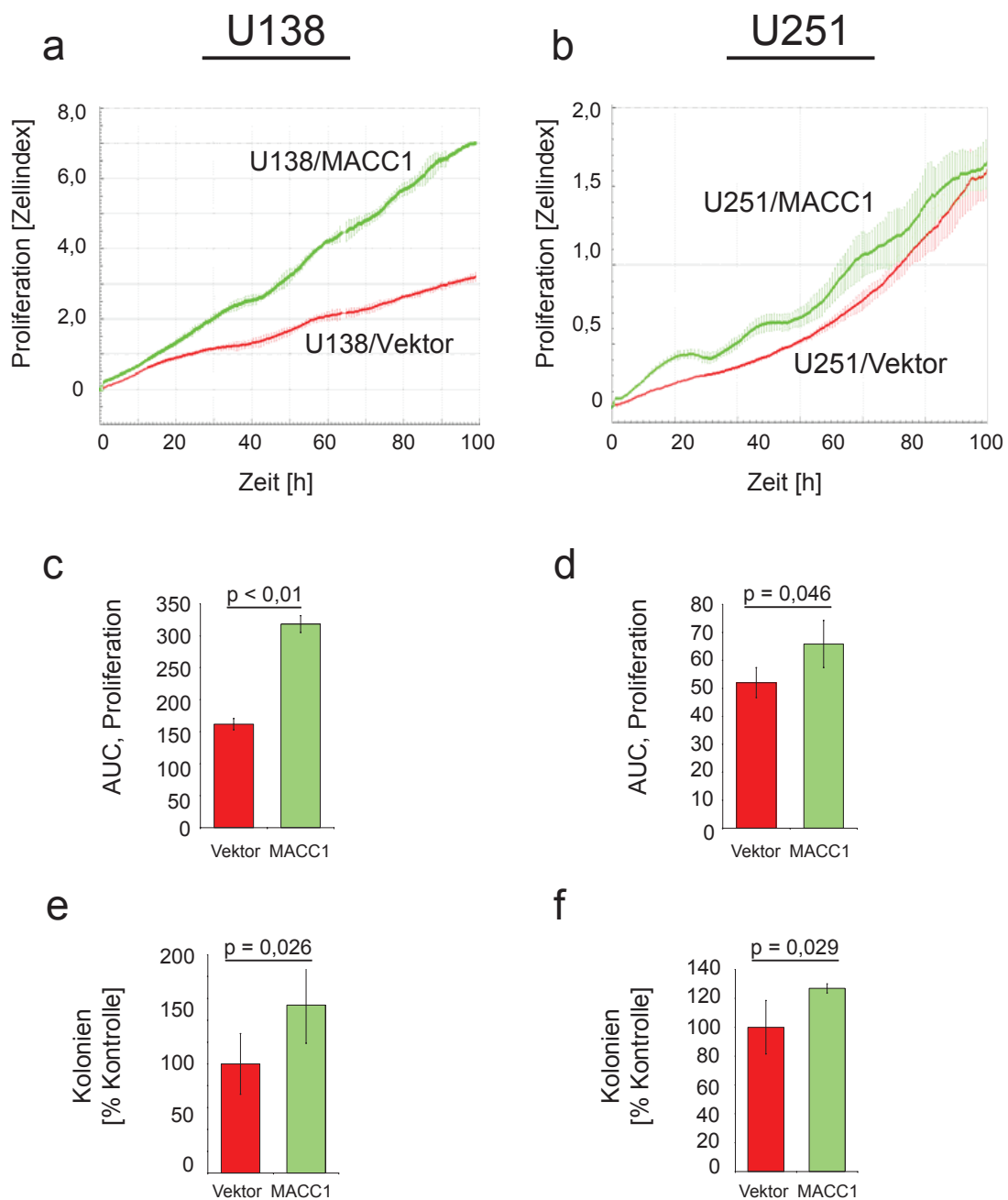


Abb. 3.12: MACC1 hatte einen positiven Effekt auf die Proliferation von Glioblastomzelllinien. Das MACC1 Gen wurde in den GBM Zelllinien U138 und U251 stabil überexprimiert. Die zelladhäsionsabhängige Proliferation wurde für 100 h in Echtzeit mit dem xCELLigence System gemessen (a, b). Anschließend wurde das Integral der Kurven berechnet (AUC). Es zeigte sich eine signifikant höhere Proliferation von U138/MACC1 ($p < 0,001$; c), bzw. U251/MACC1 ($p = 0,046$; d) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Weiterhin wurde die zelladhäsionsunabhängige Migration durch einen Koloniebildungsassay untersucht. Hierfür wurden dieselben Zelllinien als Einzelzellen auf Weichagar ausgesät und die Kolonien nach 14 Tagen gezählt. Es wurden signifikant mehr Kolonien von U138/MACC1-Zellen (151 %, $p = 0,026$; e), bzw. von U251/MACC1-Zellen (127 %, $p = 0,029$; f) im Vergleich zur Kontrolle gebildet.

4 Diskussion

4.1 MACC1 war in Glioblastomen verstärkt exprimiert

Glioblastome zählen zu den Tumorentitäten mit einer besonders ungünstigen Prognose. Ihr hoch invasives Wachstum macht bisher eine kurative Therapie unmöglich. Obwohl in den letzten zehn Jahren verschiedene therapeutische Ansätze getestet wurden, konnte die Prognose nicht signifikant verbessert werden. Die Faktoren, die für die Entstehung dieses astrozytären Tumors und für das invasive Wachstum verantwortlich sind, sind bisher noch wenig verstanden.

Das neu beschriebene Gen MACC1 wurde im kolorektalen Karzinom als prognostischer Marker für metachrone Metastasierung und metastasefreies Überleben beschrieben. Eine hohe MACC1-Expression führte zu einer verstärkten Proliferation, Migration und *in vivo* Metastasenbildung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde MACC1 erstmals in humanen Glioblastomen nachgewiesen (Hagemann *et al.*, 2013). Bioinformatische Untersuchungen von publizierten Microarrays und des TCGA zeigten eine Überexpression von MACC1 in Glioblastomen.

Diese *in silico* Ergebnisse wurden durch *in vitro* Ergebnisse bestätigt. Zunächst erfolgte der positive Nachweis einer MACC1-Expression in verschiedenen GBM-Zelllinien. Zusätzlich fand sich bei Analyse von Gewebeproben von Glioblastompatienten eine signifikant höhere Expression von MACC1 in GBM im Vergleich zu LGA und NB auf mRNA-Ebene. Somit korrelierte die MACC1-Expression mit ansteigendem WHO-Grad.

Auch im kolorektalen Karzinom stieg die MACC1-Expression auf mRNA-Ebene mit zunehmender Malignität des Gewebes an. So war die Expression im normalen Kolongewebe sehr niedrig, im Adenom etwas höher und im kolorektalen Karzinom mit zunehmendem UICC-Stadium am höchsten (Stein *et al.*, 2009b). Das Adenom ist, je nach histologischer Differenzierung, meist eine gutartige Wucherung, die jedoch weiter entarten kann und als Vorstufe zum kolorektalen Karzinom gilt (Vogelstein *et al.*, 1988). Das LGA ist, trotz seines meist invasiven Charakters, auch eine eher benigne Läsion. Durch weitere Mutationen kann es in einen malignen Tumor übergehen - das sekundäre Glioblastom. In vielen weiteren Tumoren wie dem Magenkarzinom, dem

hepatozellulären Karzinom, und dem Ösophaguskarzinom fand sich eine erhöhte MACC1 mRNA-Expression im malignen Gewebe (Shirahata *et al.*, 2011; Shirahata *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013). Es zeigte sich, dass MACC1 generell in fortgeschrittenen und höhergradigen Tumoren stark exprimiert ist, was unseren MACC1-Expressionsdaten entspricht.

Nach der Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit erschienen zwei weitere Studien, die MACC1 in Gliomen nachwiesen (Shang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2013). Auch hier fand sich eine höhere MACC1-Expression im Tumorgewebe, wodurch unsere Ergebnisse bestätigt werden konnten. Jedoch bezogen sich die Expressionsanalysen dieser Studien nicht speziell auf Glioblastome, sondern auf Gliome im Allgemeinen. Weiterhin differenzierten Shang *et al.* weder zwischen Astrozytomen unterschiedlichen WHO-Grades noch nutzten sie Normalhirngewebe als Vergleichsgewebe, sondern den Tumor umgebendes Gewebe. Durch das invasive Wachstum von Glioblastomen finden sich trotz mikrochirurgisch kompletter Resektion mit großer Wahrscheinlichkeit noch Tumorzellen im umliegenden Gewebe. Es sollten daher möglichst Gewebeproben von Patienten ohne Tumorerkrankung zum Vergleich verwendet werden um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Häufig wird Gewebe aus der Epilepsiechirurgie genutzt.

Das MACC1-Gen liegt auf Chromosom 7p21.1 auf dem Minusstrang. Dieses Chromosom liegt in Karzinomen häufig amplifiziert vor, wie zum Beispiel im Magen-, Pankreas- und kolorektalen Karzinom (Harada *et al.*, 2007; Herbergs *et al.*, 1996; Morohara *et al.*, 2006). Auch im GBM existiert eine solche Polysomie von Chromosom 7, vor allem des kurzen p-Arms. Dies kommt nicht bei Gliomen niederen WHO-Grades vor (Arslantas *et al.*, 2007). Interessanterweise liegen neben MACC1 auch HGF (7q21.1) und Met (7q31.1) auf Chromosom 7. Es wurde daher vermutet, dass dieser Zugewinn an genetischem Material des Chromosoms 7 zur verstärkten Expression des MACC1-Gens beiträgt (Stein *et al.*, 2010). Unsere Analyse des TCGA über das cBio Cancer Genomics Portal konnte einen positiven Zusammenhang zwischen der Anzahl der Genkopien von MACC1 und der mRNA-Expression bestätigen.

Der Grund für die Aneuploidie von Glioblastomen, also der anormalen Anzahl von Chromosomen, liegt an der hohen genetischen Instabilität dieser Tumoren (Furnari *et al.*, 2007). Vor kurzem wurde gezeigt, dass sowohl verschiedene Regionen innerhalb desselben Tumors, als auch Rezidive unterschiedliche Mutationen tragen können. Dies spricht für eine genetische Veränderung des Tumors in räumlicher und zeitlicher Ebene (Nickel *et al.*, 2012).

Des Weiteren wurden Chromosomenabschnitte identifiziert, welche besonders häufig in Astrozytomen verändert sind. Vor allem die Regionen 5p15.33, 9p21.3, 1p21.2, 3q26.2 und 7p15.3 zeigen häufig sogenannte *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs), das heißt Veränderungen in bestimmten einzelnen Nukleotiden (Yang *et al.*, 2011). In der Nähe des Abschnitts 7p15.3 liegen MACC1, Met und HGF.

Zusätzlich liegen in der Nachbarschaft des MACC1-Lokus weitere Gene wie Integrin 8 oder Twist, die mit Migration und Invasion in Bezug gebracht werden (Paschos *et al.*, 2009; Stein *et al.*, 2010). Twist beispielsweise induziert die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT). Bei der EMT gehen Zellen von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp über. Das heißt, dass eine Zelle, welche bislang in einem Verbund mit Zellkontakten zu ihren Nachbarn war, die Fähigkeit erhält, diese Kontakte aufzulösen und aktiv migrieren zu können. Dies ist essentiell für die Embryonalentwicklung, aber auch für die Bildung von Metastasen (Yang *et al.*, 2006).

4.2 Die MACC1-Expression hatte prognostische Bedeutung für Patienten mit astrozytären Tumoren

Eine verstärkte mRNA-Expression bzw. erhöhte Anzahl von Genkopien bedeutet nicht zwangsläufig, dass auch das entsprechende Protein gebildet wird und so eine mögliche funktionelle Relevanz besteht. Um dies für MACC1 im GBM zu zeigen wurden die mRNA-Expressionsdaten durch eine immunhistochemische Färbung von Proben einer unabhängigen Patientenkohorte bestätigt. Eine erhöhte MACC1-Expression auf Proteinebene wurde beispielsweise bereits im Bronchialkarzinom und Magenkarzinom gezeigt (Chundong *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

Eine genaue Auswertung der einzelnen Untergruppen unserer Studie erlaubte außerdem eine Differenzierung zwischen unterschiedlichen Astrozytom-Entwicklungsstufen. So ließ sich anhand der MACC1-Expression nicht nur zwischen niedergradigem

Astrozytom und Glioblastom unterscheiden, sondern auch zwischen pGBM und sGBM, wobei die sGBM eine ca. 2,5-fach höhere MACC1-Expression hatten. Dies könnte von großem klinischen Interesse sein, da primäres und sekundäres Glioblastom sich zwar phänotypisch nicht unterscheiden, aber große Unterschiede in der Prognose bestehen. Zwar ist mit der immunhistochemischen Färbung von mutierter IDH1 bereits ein verlässlicher Nachweis von sGBM möglich, jedoch fehlt ein molekularer Marker für das viel häufiger vorkommende pGBM (Nobusawa *et al.*, 2009). Eine Bestimmung der MACC1 Protein-Expression, welche für pGBM deutlich niedriger als für sGBM war, könnte diese diagnostische Lücke schließen.

Weiterhin konnte durch Bestimmung der MACC1-Proteinexpression zwischen LGA und dem daraus entstehenden sGBM differenziert werden. Viel erstaunlicher war jedoch die Tatsache, dass sich auch signifikante Unterschiede zwischen ruhenden LGA und solchen LGA, welche metachron ein Rezidiv des gleichen WHO-Grades oder Progress zu einem sGBM aufwiesen, zeigten. Im kolorektalen Karzinom ließ sich durch Analyse der MACC1-Expression bestimmen, ob Patienten später Metastasen bildeten. So konnten hier Hochrisikopatienten gefunden werden (Stein *et al.*, 2009b). Auch im Bronchialkarzinom, hepatozellulären Karzinom und Mammakarzinom korrelierte eine hohe MACC1-Expression mit Metastasenbildung und einem kurzen rezidivfreien Überleben (Huang *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2012; Shimokawa *et al.*, 2010). Eine Bestimmung von MACC1 bei Patienten mit LGA könnte daher in der Zukunft Risikopatienten identifizieren.

Stein *et al.* analysierten weiterhin die intrazelluläre Lokalisation von MACC1. Sie fanden heraus, dass MACC1 bei Patienten mit späterer Metastasenbildung vor allem im Zellkern vorlag, wohingegen das MACC1-Protein bei Patienten ohne metachrone Metastasenbildung hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert war (Arlt und Stein, 2009). Auch im Glioblastom fand sich ein vergleichbarer Sachverhalt. So war MACC1 in LGA und pGBM ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Im Gegensatz dazu zeigten die sGBM zusätzlich eine MACC1 Kernfärbung. Warum die nukleäre Lokalisation nur im sGBM vorkam, bleibt vorerst unklar. MACC1 reguliert im Zellkern die Transkription von Met vermutlich über indirekte Interaktion mit der Sp1-Domäne des Met-Promotors. Eine Translokation von MACC1 würde daher zu einer höheren Expression von Met

führen und auf diesem Weg Migration und Invasion induzieren. Die hohe Invasivität von sGBM Zellen konnte in den letzten Jahren durch Nachweis von einzelnen Tumorzellen nahezu im gesamten Gehirn gezeigt werden (Sahm *et al.*, 2012). Da dies auf einem Nachweis von mutierter IDH1 beruhte, kann durch diese Methode bisher keine Aussage über die Verteilung der Tumorzellen bei pGBM gemacht werden, weil diese Tumorentität fast nie solche Veränderungen aufweist. Möglicherweise ist das sGBM trotz besserer Prognose mehr von der transkriptionellen Aktivität von MACC1 abhängig als das pGBM, was die starke Migration der Tumorzellen bedingt. Es wurde bereits vor einigen Jahren vermutet, dass die Fähigkeit zur starken Migration die proliferative Aktivität der Glioblastomzellen einschränken kann, da distinkte genetische Programme aktiviert werden (Giese *et al.*, 2003). Möglicherweise ist dies vor allem für die Pathogenese von sGBM charakteristisch, was durch die Tatsache des deutlich langsameren Wachstums im Vergleich zum pGBM unterstützt wird.

Wie bereits erwähnt korrelierte die MACC1-Expression im kolorektalen Karzinom mit metachroner Metastasenbildung und mit einem kurzen metastasefreien Überleben. Wir konnten nun erstmals einen Effekt von MACC1 auf die Prognose von Glioblastompatienten zeigen. Es stellte sich heraus, dass Patienten mit Tumoren, die MACC1 stark exprimierten ein signifikant kürzeres medianes Gesamtüberleben hatten (8 Monate) als schwach exprimierenden Patienten (16 Monate). Dieser große Unterschied im Gesamtüberleben könnte MACC1 als einen neuen prognostischen Marker für Glioblastome qualifizieren. Eine Bestimmung der MACC1-Expression bei Patienten mit Diagnose GBM könnte so Hinweise über den Verlauf und die Prognose der Erkrankung liefern. Jedoch ist eine größere Studie mit mehr Patienten nötig um diese Ergebnisse zu verifizieren.

Eine kürzlich erschienene Metaanalyse verglich insgesamt 20 Studien über MACC1 in verschiedenen Tumorerkrankungen miteinander, darunter Arbeiten über Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Ösophaguskarzinom und Osteosarkom. Es fand sich über fast alle Tumorentitäten hinweg eine signifikante negative Korrelation einer hohen MACC1-Expression sowohl mit kurzem krankheitsfreien und rezidivfreien als auch mit geringem medianen Gesamtüberleben (Wang *et al.*, 2014). Dies unterstreicht die prognostische Bedeutung von MACC1 und bestätigt unsere Ergebnisse.

4.3 MACC1 regulierte Schlüsseigenschaften von Glioblastomzellen

In den bisherigen Versuchen konnte eine erhöhte MACC1-Expression in Glioblastomen nachgewiesen und auch eine prognostische Relevanz demonstriert werden. Um die Hypothese zu bestätigen, dass MACC1 auch eine Bedeutung für Schlüsseigenschaften von Glioblastomzellen, wie Proliferation und Migration hat, folgten im Anschluss funktionelle *in vitro* Versuche. In einem Sphäroid-Migrationsassay konnte gezeigt werden, dass die endogene MACC1-Expression mit der Migration von primären Glioblastomzellkulturen korrelierte. Da sich aus diesen Korrelationen noch nicht schließen lässt, ob tatsächlich MACC1 für die erhöhte Migration verantwortlich war und nicht andere Faktoren, wurde zusätzlich MACC1 in zwei Glioblastomzelllinien stabil überexprimiert und die Effekte auf Proliferation und Migration wurden in Echtzeit gemessen. In der Tat zeigten die beiden stabil transfizierten Zelllinien signifikant höhere Werte für Proliferation und Migration als die Kontrollen. Im daraufhin durchgeführten Koloniebildungsassay wurde die zellkontaktunabhängige Proliferation gemessen. Dies gilt als relativ stringenter Versuch zum Nachweis von malignen Zellen. Auch hier bildeten die MACC1-überexprimierenden Zelllinien mehr Kolonien als die Kontrollen.

Eine funktionelle Relevanz von MACC1 wurde auch in anderen Tumorerkrankungen nachgewiesen. Wang *et al.* zeigten, dass eine Überexpression des Gens in zwei Magenkarzinomzelllinien zu einer erhöhten Proliferation und Invasion *in vitro* führte (Wang *et al.*, 2013). Ein Knockdown von MACC1 in der Zelllinie Huh7, die von einem HCC abgeleitet wurde, hemmte die Fähigkeit zur Invasion und Migration (Gao *et al.*, 2013).

Die Effekte von MACC1 auf Proliferation, Migration und Invasion werden wahrscheinlich zumindest zum Teil über die HGF-Met Achse vermittelt. Eine Beteiligung der beiden Gene wurde in der Mehrzahl der soliden und hämatologischen Neoplasien und auch im Glioblastom gefunden (Abounader und Laterra, 2005; Nabeshima *et al.*, 1997). MACC1 wurde im kolorektalen Karzinom als transkriptioneller Aktivator von Met identifiziert und führte zu dessen verstärkter Expression (Stein *et al.*, 2009b). Auch wir konnten in Gewebeproben von Glioblastompatienten eine

erhöhte Expression von Met auf mRNA-Ebene im Vergleich zum LGA nachweisen. Mit dem Nachweis von MACC1 im Glioblastom wird die Bedeutung des HGF-Met Signalwegs in dieser Tumorentität noch vergrößert.

Eine Aktivierung der HGF-Met Achse führt z.B. zu einer Steigerung von Proliferation und Migration. Weitere Effekte sind die Förderung von Angiogenese und die Induktion von Invasion und einer Neuordnung des Zytoskeletts durch epitheliale-mesenchymale Transition. Generell sind die Folgen einer Met-Aktivierung komplex und es ist naheliegend, dass eine Überaktivierung zur Krebsentstehung beitragen kann (Gherardi *et al.*, 2012).

Seine Funktion übt Met über Aktivierung mehrerer Signalwege aus. Am wichtigsten ist hierbei die Aktivierung des PI3K- und des MAPK-Signalweges (Birchmeier *et al.*, 2003). Der MAPK-Signalweg kann von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden und reguliert beispielsweise den Zellzyklus und die Proliferation durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *V-Ets Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 1* (Ets1) oder der AP-1 Familie. Es konnte gezeigt werden, dass AP-1 an den MACC1 Promotor bindet. Somit führt eine Aktivierung des MAPK-Wegs über HGF/Met zur verstärkten MACC1-Expression, was wiederum in der verstärkten Transkription von Met resultierte (Juneja *et al.*, 2013). Eine andere Studie untersuchte den Einfluss von MACC1 auf den MAPK-Weg im Pankreaskarzinom. Ein Knockdown von MACC1 führte zu einer geringeren Aktivierung von *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK), einer Effektorkinase dieses Signalwegs. Interessanterweise resultierte dies in einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika wie Gemcitabine, dem Therapiestandard beim Pankreaskarzinom (Wang *et al.*, 2012). Ähnliche Ergebnisse fanden sich vor kurzem auch für das Glioblastom. Eine MACC1-Überexpression führte zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin, wohingegen ein Knockdown die Empfindlichkeit erhöhte (Shang *et al.*, 2015). Diese Ergebnisse sind jedoch schwierig auf die *in vivo* Situation zu übertragen, da Cisplatin aktuell keinen Therapiestandard in der Glioblastomtherapie darstellt. Die Versuche sollten mit Temozolomid wiederholt werden. Trotzdem ist der Ansatz interessant und möglicherweise könnte MACC1 zukünftig ein neuer prädiktiver Marker für das Ansprechen von Chemotherapie im GBM werden, so wie das bisher für den MGMT-Methylierungsstatus der Fall ist.

Als zweiten wichtigen Signalweg aktiviert Met den PI3K-Weg. Dieser führt zur Aktivierung von Akt (auch bekannt als Proteinkinase B). Eine Wirkung von Akt ist die Phosphorylierung des pro-apoptotischen Proteins *BCL2-Associated Agonist Of Cell Death* (Bad). Bad wird dadurch inaktiv. Somit ist ein Effekt des PI3K-Wegs die Resistenz gegenüber antiapoptotischen Signalen und der Förderung des Überlebens der Zelle (Xiao *et al.*, 2001). Zhang *et al.* zeigten, dass MACC1 Akt im Osteosarkom aktivieren kann. Ein Knockdown von MACC1 durch siRNA hatte einen gegenteiligen Effekt und führte zu verstärkter Apoptose (Zhang *et al.*, 2014).

Diese Beispiele verdeutlichen, dass die HGF-Met Achse eine große Rolle in der Pathogenese verschiedener Tumorentitäten besitzt. Deshalb wurden bereits viele Ansätze verfolgt um eine Hemmung dieses Signalwegs zu erreichen. Zum Beispiel wurden monoklonale Antikörper gegen Met entwickelt wie Onartuzumab („MetMab“), die das Tumorwachstum unter anderem im Pankreaskarzinom hemmen konnten (Jin *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde nach Aufklärung der Proteinstruktur von Met eine Vielzahl an Kinaseinhibitoren hergestellt, welche in mehreren klinischen Studien evaluiert werden (Web 11). Aktuell sind in den USA 94 klinische Studien der Phasen 1-3 registriert (Web 12). Neben Met wird auch mit HGF als therapeutischem Ziel gearbeitet. Es wurden beispielsweise Antikörper gegen HGF entwickelt, welche in einem Tiermodell das Glioblastomwachstum reduzieren konnten (Cao *et al.*, 2001)

Weiterführende Arbeiten aus dem Tumorbiologischen Labor untersuchten die Effektivität des Met-Inhibitors Crizotinib im Zusammenhang mit MACC1 (Hagemann *et al.*, 2013). Es wurde bereits gezeigt, dass Crizotinib das Tumorwachstum im GBM hemmen konnte (Rath *et al.*, 2013). Für die Versuche wurden dieselben GBM-Zelllinien benutzt, die MACC1 stabil überexprimierten, wie in der vorliegenden Arbeit. Es stellte sich heraus, dass eine Behandlung mit Crizotinib die Migration der Zellen *in vitro* hemmte, sowie die Invasion in einem Schnittkulturmodell von murinen Gehirnen reduzierte.

Zusammenfassend zeigt dies den funktionellen Zusammenhang zwischen MACC1 und Met im Glioblastom. Wegen dieser Bedeutung von Met für die Pathogenese des Glioblastoms wurden bereits Antikörper in klinischen Studien für diese Tumorentität getestet. In einer Phase II Studie wurde der gegen Met gerichtete monoklonale

Antikörper Rilotumumab bei Glioblastompatienten im Rezidivfall getestet. Es zeigte sich keine signifikante antitumorale Aktivität (Wen *et al.*, 2011). Da MACC1 ein wichtiger Regulator des HGF-Met Signalwegs ist, könnte es vielleicht ein besseres therapeutisches Ziel als Met darstellen (Stein, 2013).

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass MACC1 eine Schlüsselrolle für die Pathogenese des Glioblastoma multiforme spielte. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Gens mit zunehmendem WHO-Grad anstieg und zudem mit einer ungünstigen klinischen Prognose für Glioblastompatienten korrelierte. Um MACC1 als prognostischen Marker in astrozytären Tumoren etablieren zu können, sollte eine groß angelegte klinische Studie durchgeführt werden. Im Rahmen dessen sollte versucht werden, die prognostischen Aussagen zu bestätigen, die durch diese Arbeit gefunden wurden. Bestätigen sich die Effekte sollte eine routinemäßige MACC1 Bestimmung, am besten durch Immunhistochemie, bei jedem Patienten mit Astrozytom durchgeführt werden um Risikopatienten identifizieren zu können. Ein erstes Patent für MACC1 als diagnostischen Test für hepatobiliäre Tumoren wurde vor kurzem angemeldet (Stein, 2014). Dies bereitet den Weg für kommerziell erhältliche Tests, die Einzug in die klinische Diagnostik halten könnten. Mit großer Wahrscheinlichkeit werden in naher Zukunft weitere Tests für andere Tumorentitäten folgen. Analog dazu könnte auch ein Test im Glioblastom etabliert werden

Weiterhin konnten wir zeigen, dass MACC1 Schlüsseleigenschaften von Glioblastomzellen, wie Migration und Proliferation induzieren konnte. Daher könnte MACC1 ein neues therapeutisches Ziel im GBM darstellen und könnte vor allem für MACC1-hochoxprimierende Patienten relevant sein. Es ist daher wichtig die Ergebnisse dieser translationalen Forschung möglichst bald in die klinische Anwendung zu übersetzen. Deshalb ist die Suche nach möglichen Inhibitoren für MACC1 wichtig. Es fanden sich im letzten Jahr mit Rottlerin und Lovastatin zwei viel versprechende Substanzen (Juneja, 2014). Rottlerin ist eine pflanzliche Substanz aus dem Karmalabaum. Lovastatin ist ein HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, der zur Cholesterinsenkung, z.B. im Rahmen der Sekundärprävention von kardiovaskulären Ereignissen eingesetzt wird. Falls sich die antitumorale Wirksamkeit der beiden Substanzen in klinischen Studien bestätigen

sollte, könnte eine Zulassung zur Tumorthherapie erfolgen. Diese Medikamente sollten auch im Glioblastom getestet werden und für die klinische Anwendung verfügbar gemacht werden. So könnte durch Hemmung von MACC1 schließlich die Qualität der Behandlung des Glioblastoms gesteigert und die bisher schlechte Prognose für die Patienten verbessert werden.

5 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der primäre maligne Hirntumor mit der höchsten Prävalenz bei Erwachsenen. Dieser astrozytäre Tumor ist durch ein besonders schnelles Wachstum und ein äußerst invasives Verhalten charakterisiert. Deshalb beträgt das mediane Überleben nach Diagnose trotz interdisziplinärer Therapie nur ungefähr 14,6 Monate.

Metastasis Associated in Colon Cancer-1 (MACC1) ist ein neuer prognostischer Marker für Metastasierung im kolorektalen Karzinom. Es ist ein transkriptioneller Regulator von Met, dem Rezeptor des *Hepatocyte Growth Factor* (HGF). Überexpression von MACC1 führt zur Induktion von Migration und Proliferation. Es wurde gezeigt, dass MACC1 auch in anderen Tumorentitäten wie dem Magenkarzinom, Bronchialkarzinom und hepatozellulärem Karzinom verstärkt exprimiert ist. Jedoch gab es bisher noch keine Daten über die Rolle von MACC1 in astrozytären Tumoren. Obwohl GBM nur selten metastasieren, ist ihr aggressives und invasives Verhalten mit dem von metastasierenden Tumoren vergleichbar. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit zu zeigen, dass MACC1 auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Glioblastomen spielen könnte.

Die MACC1-Expression von Glioblastomen wurde zunächst *in silico* mit frei zugänglichen Microarray-Plattformen analysiert. Von Gewebeproben humaner niedergradiger Astrozytome (LGA) und GBM wurde die MACC1- und Met-Expression mittels PCR bestimmt. Die Analyse der Expression auf Proteinebene wurde durch Immunhistochemie (IHC) von Patientengewebe durchgeführt. Funktionelle Analysen folgten in Form eines Sphäroidmigrationsassays von primären GBM Zellkulturen. Weiterhin wurde MACC1 in zwei GBM-Zelllinien stabil überexprimiert und deren Migration und Proliferation in Echtzeit gemessen. Komplettiert wurden die funktionellen Versuche durch einen Koloniebildungsassay.

Die Expression von MACC1 stieg mit zunehmendem WHO-Grad auf mRNA- und Proteinebene an. Die Analyse von MACC1 durch IHC erlaubte eine Differenzierung nicht nur zwischen ruhenden LGA und LGA welche später ein Rezidiv bildeten, bzw. Progress zeigten, sondern auch zwischen primären und sekundären GBM. Eine hohe MACC1-Expression war mit einer ungünstigen klinischen Prognose der Patienten

assoziiert. Die endogene Expression von MACC1 korrelierte mit der Migrationsaktivität primärer GBM-Zellkulturen. Die Überexpression von MACC1 in GBM-Zelllinien induzierte Proliferation, Migration und Koloniebildung und korrelierte somit mit Schlüsseleigenschaften maligner Zellen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit zum ersten Mal eine essentielle Rolle von MACC1 für die Pathogenese von Glioblastomen. Deshalb könnte MACC1 ein potentiell neues therapeutisches Ziel für die Behandlung von Glioblastomen sein und eventuell sogar als neuer prognostischer Marker dienen.

6 Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the primary malignant brain tumor with the highest prevalence in adults. This astrocytic tumor is characterized by a particular rapid growth and a highly invasive behavior. Thus, it leads to a median survival of only about 14.6 months after diagnosis despite a multidisciplinary treatment consisting of surgery, radiation, and chemotherapy.

Metastasis Associated in Colon Cancer-1 (MACC1) is a new prognostic indicator of metastasis formation in colon carcinoma. It is a transcriptional regulator of Met, the receptor of the Hepatocyte Growth Factor (HGF). An overexpression of MACC1 leads to an acceleration of migration and proliferation. Recently, MACC1 was also shown to be upregulated in other tumor entities such as gastric, lung, and hepatocellular carcinoma. However, there were no data available yet which address a potential role of MACC1 in human astrocytic tumors. Although GBM rarely metastasize, their invasive and migratory behavior is comparable to those of metastasizing tumors. Therefore, the aim of this study was to show that MACC1 may also play an important role in glioblastoma pathogenesis.

GBM microarray platforms were screened for MACC1 expression. PCR measurements were performed to study the MACC1 and Met expression in tissue samples of human low grade astrocytoma (LGA) and GBM. Immunohistochemistry (IHC) of paraffin-embedded glioma patients' tissue samples was carried out to analyze MACC1 expression on the protein level. Finally, functional analyses were performed by a spheroid migration assay with primary GBM cell cultures. Additionally, MACC1 was stably overexpressed in two GBM cell lines. Subsequent real-time measurements of the cells' migration, proliferation, and colony formation abilities were performed.

MACC1 expression increased concomitantly with augmenting WHO grading of the tumors on the mRNA- and protein-level. Analysis of MACC1 expression by IHC allowed a distinction between dormant and recurrent or progressing LGA, respectively. Moreover, a differentiation could also be made between primary and secondary GBM. A strong expression of MACC1 corresponded with a poor patients' survival. Endogenous expression of MACC1 was correlated with migration of GBM primary cell cultures. Overexpression of MACC1 in GBM cell lines led to an increased proliferation,

migration, and colony formation activity. Taken together, the results of this work indicate for the first time a crucial role of MACC1 for the pathogenesis of glioblastoma. Its expression correlates with hallmarks of cancer cells like proliferation and migration along with affecting GBM-patients' prognosis. Therefore, MACC1 may represent a putative new target for treatment of glioblastoma and may even serve as a new prognostic marker.

Literaturverzeichnis

- Abounader, R., Laterra, J., 2005. Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro-Oncology* 7, 436-451.
- Abramoff M.D., M. P. J., Ram S. J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Intern* 11, 36-42.
- Akslen, L. A., Andersen, K. J., Bjerkvig, R., 1988. Characteristics of human and rat glioma cells grown in a defined medium. *Anticancer Res* 8, 797-803.
- Arlt, F., Stein, U., 2009. Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic pacemakers. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2356-2359.
- Arslantas, A., Artan, S., Oner, U., Muslumanoglu, M. H., Ozdemir, M., Durmaz, R., Arslantas, D., Vural, M., Cosan, E., Atasoy, M. A., 2007. Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Pathol Oncol Res* 13, 39-46.
- Bailey, P., Cushing, H., 1926. A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis. *Brit J Surg* 55, 554-555.
- Barre, P. E., Redini, F., Boumediene, K., Vielpeau, C., Pujol, J. P., 2000. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of syndecan-1 and -4 messages in cartilage and cultured chondrocytes from osteoarthritic joints. *Osteoarthr Cartilage* 8, 34-43.
- Beroukhi, R., Getz, G., Nghiemphu, L., Barretina, J., Hsueh, T., Linhart, D., Vivanco, I., Lee, J. C., Huang, J. H., Alexander, S., Du, J., Kau, T., Thomas, R. K., Shah, K., Soto, H., Perner, S., Prensner, J., DeBiasi, R. M., Demichelis, F., Hatton, C., Rubin, M. A., Garraway, L. A., Nelson, S. F., Liau, L., Mischel, P. S., Cloughesy, T. F., Meyerson, M., Golub, T. A., Lander, E. S., Mellinghoff, I. K., Sellers, W. R., 2007. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 20007-20012.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., Vande Woude, G. F., 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 915-925.
- Bird, C. K., S, 2009. Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xCELLigence system. *Nat Methods* 6, V-VI.
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., Birchmeier, C., 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-771.
- Boyden, S., 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115, 453-466.
- Bratthauer, G. L., 2010. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods Mol Biol* 588, 257-270.
- Cao, B., Su, Y., Oskarsson, M., Zhao, P., Kort, E. J., Fisher, R. J., Wang, L. M., Vande Woude, G. F., 2001. Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7443-7448.
- Chuang, S. E., Chen, A. L., Chao, C. C., 1995. Growth of *E. coli* at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucleic Acids Res* 23, 1641.

- Chundong, G., Uramoto, H., Onitsuka, T., Shimokawa, H., Iwanami, T., Nakagawa, M., Oyama, T., Tanaka, F., 2011. Molecular Diagnosis of MACC1 Status in Lung Adenocarcinoma by Immunohistochemical Analysis. *Anticancer Res* 31, 1141-1145.
- Cloughesy, T. F., Cavenee, W. K., Mischel, P. S., 2014. Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annu Rev Pathol* 9, 1-25.
- Cui, Z., Tang, J., Chen, J., Wang, Z., 2014. Hsa-miR-574-5p negatively regulates MACC-1 expression to suppress colorectal cancer liver metastasis. *Cancer Cell Int* 14, 47.
- Fearon, E. R., Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W. C., Ligon, K. L., Louis, D. N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. A., Cavenee, W. K., 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21, 2683-2710.
- Gao, J., Ding, F., Liu, Q., Yao, Y., 2013. Knockdown of MACC1 expression suppressed hepatocellular carcinoma cell migration and invasion and inhibited expression of MMP2 and MMP9. *Mol Cell Biochem* 376, 21-32.
- Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., Vande Woude, G., 2012. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer* 12, 89-103.
- Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M. E., Westphal, M., 2003. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 21, 1624-1636.
- Gilbert, M. R., Dignam, J. J., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Blumenthal, D. T., Vogelbaum, M. A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., Jeraj, R., Brown, P. D., Jaeckle, K. A., Schiff, D., Stieber, V. W., Brachman, D. G., Werner-Wasik, M., Tremont-Lukats, I. W., Sulman, E. P., Aldape, K. D., Curran, W. J., Jr., Mehta, M. P., 2014. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 370, 699-708.
- Grasbon-Frodl, E. M., Kreth, F. W., Ruiter, M., Schnell, O., Bise, K., Felsberg, J., Reifenberger, G., Tonn, J. C., Kretschmar, H. A., 2007. Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int J Cancer* 121, 2458-2464.
- Guo, T., Yang, J., Yao, J., Zhang, Y., Da, M., Duan, Y., 2013. Expression of MACC1 and c-Met in human gastric cancer and its clinical significance. *Cancer Cell Int* 13, 121.
- Hagemann, C., Fuchs, S., Monoranu, C. M., Herrmann, P., Smith, J., Hohmann, T., Grabiec, U., Kessler, A. F., Dehghani, F., Lohr, M., Ernestus, R. I., Vince, G. H., Stein, U., 2013. Impact of MACC1 on human malignant glioma progression and patients' unfavorable prognosis. *Neuro-Oncology* 15, 1696-1709.
- Hagemann, C., Said, H. M., Flentje, M., Roosen, K., Vince, G. H., 2010. Proteins involved in cell migration from glioblastoma neurospheres analyzed by overexpression and siRNA-mediated knock-down. *Methods Mol Biol* 650, 129-143.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harada, T., Baril, P., Gangeswaran, R., Kelly, G., Chelala, C., Bhakta, V., Caulee, K., Mahon, P. C., Lemoine, N. R., 2007. Identification of genetic alterations in pancreatic cancer by the combined use of tissue microdissection and array-based comparative genomic hybridisation. *Brit J Cancer* 96, 373-382.

- Hegi, M., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J., Hainfellner, J., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J., Hau, P., Mirimanoff, R., Cairncross, J., Janzer, R., Stupp, R., 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997-1003.
- Hengen, P. N., 1996. Methods and reagents. preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 21, 75-76.
- Herbergs, J., Hopman, A. H., De Bruine, A. P., Ramaekers, F. C., Arends, J. W., 1996. In situ hybridization and flow cytometric analysis of colorectal tumours suggests two routes of tumourigenesis characterized by gain of chromosome 7 or loss of chromosomes 17 and 18. *J Pathol* 179, 243-247.
- Hu, H., Tian, D., Chen, T., Han, R., Sun, Y., Wu, C., 2014. Metastasis-Associated in Colon Cancer 1 Is a Novel Survival-Related Biomarker for Human Patients with Renal Pelvis Carcinoma. *PloS one* 9, e100161.
- Huang, Y., Zhang, H., Cai, J., Fang, L., Wu, J., Ye, C., Zhu, X., Li, M., 2013. Overexpression of MACC1 and Its significance in human Breast Cancer Progression. *Cell Biosci* 3, 16.
- Huo, L., Wen, W., Wang, R., Kam, C., Xia, J., Feng, W., Zhang, M., 2011. Cdc42-dependent formation of the ZO-1/MRCK-beta complex at the leading edge controls cell migration. *Embo J* 30, 665-678.
- Ichimura, K., Ohgaki, H., Kleihues, P., Collins, V. P., 2004. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol* 70, 137-160.
- Jin, H., Yang, R., Zheng, Z., Romero, M., Ross, J., Bou-Reslan, H., Carano, R. A., Kasman, I., Mai, E., Young, J., Zha, J., Zhang, Z., Ross, S., Schwall, R., Colbern, G., Merchant, M., 2008. MetMAB, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival. *Cancer Res* 68, 4360-4368.
- Juneja, M., 2014. Novel insights into MACC1 transcriptional regulation for identifying small molecule MACC1 inhibitors to restrict colorectal cancer progression. Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt Universität zu Berlin.
- Juneja, M., Ilm, K., Schlag, P. M., Stein, U., 2013. Promoter identification and transcriptional regulation of the metastasis gene MACC1 in colorectal cancer. *Mol Oncol* 5, 929-943.
- Khaitan, D., Chandna, S., Arya, M. B., Dwarakanath, B. S., 2006. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *J Transl Med* 4, 12.
- Kowolenko, M., Keese, C. R., Lawrence, D. A., Giaever, I., 1990. Measurement of macrophage adherence and spreading with weak electric fields. *J Immunol Methods* 127, 71-77.
- Laperriere, N., Zuraw, L., Cairncross, G., 2002. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol* 64, 259-273.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., Kleihues, P., 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.
- Lu, C., Ward, P. S., Kapoor, G. S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C. R., Khanin, R., Figueroa, M. E., Melnick, A., Wellen, K. E., O'Rourke, D. M., Berger, S. L., Chan, T. A., Levine, R. L., Mellinghoff, I. K., Thompson, C. B., 2012. IDH

- mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483, 474-478.
- Lun, M., Lok, E., Gautam, S., Wu, E., Wong, E. T., 2011. The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 105, 261-273.
- Malmstrom, A., Gronberg, B. H., Marosi, C., Stupp, R., Frappaz, D., Schultz, H., Abacioglu, U., Tavelin, B., Lhermitte, B., Hegi, M. E., Rosell, J., Henriksson, R., 2012. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13, 916-926.
- Melvin, V. S., Feng, W., Hernandez-Lagunas, L., Artinger, K. B., Williams, T., 2013. A morpholino-based screen to identify novel genes involved in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn* 242, 817-831.
- Morohara, K., Tajima, Y., Nakao, K., Nishino, N., Aoki, S., Kato, M., Sakamoto, M., Yamazaki, K., Kaetsu, T., Suzuki, S., Tsunoda, A., Tachikawa, T., Kusano, M., 2006. Gastric and intestinal phenotypic cell marker expressions in gastric differentiated-type carcinomas: association with E-cadherin expression and chromosomal changes. *J Cancer Res Clin* 132, 363-375.
- Muendlein, A., Hubalek, M., Geller-Rhomberg, S., Gasser, K., Winder, T., Drexel, H., Decker, T., Mueller-Holzner, E., Chamson, M., Marth, C., Lang, A. H., 2014. Significant survival impact of MACC1 polymorphisms in HER2 positive breast cancer patients. *Eur J Cancer* 12, 2134-2141.
- Nabeshima, K., Shima, Y., Sato, S., Kataoka, H., Moriyama, T., Kawano, H., Wakisaka, S., Kono, M., 1997. Expression of c-Met correlates with grade of malignancy in human astrocytic tumours: an immunohistochemical study. *Histopathology* 31, 436-443.
- The cancer genome research network (TCGR) 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-1068.
- Neuloh, G., Pechstein, U., Cedzich, C., Schramm, J., 2004. Motor evoked potential monitoring with supratentorial surgery. *Neurosurgery* 54, 1061-1070.
- Nickel, G. C., Barnholtz-Sloan, J., Gould, M. P., McMahon, S., Cohen, A., Adams, M. D., Guda, K., Cohen, M., Sloan, A. E., LaFramboise, T., 2012. Characterizing mutational heterogeneity in a glioblastoma patient with double recurrence. *PLoS one* 7, e35262.
- Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., Ohgaki, H., 2009. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res* 15, 6002-6007.
- Noushmehr, H., Weisenberger, D. J., Diefes, K., Phillips, H. S., Pujara, K., Berman, B. P., Pan, F., Pelloski, C. E., Sulman, E. P., Bhat, K. P., Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Hayes, D. N., Perou, C. M., Schmidt, H. K., Ding, L., Wilson, R. K., Van Den Berg, D., Shen, H., Bengtsson, H., Neuvial, P., Cope, L. M., Buckley, J., Herman, J. G., Baylin, S. B., Laird, P. W., Aldape, K., Cancer Genome Atlas Research, N., 2010. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 17, 510-522.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109, 93-108.

- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2013. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19, 764-772.
- Ostrom, Q., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S., Barnholtz-Sloan, J., 2015. Epidemiology of Gliomas, in: Raizer, J., Parsa, A. (Eds.), *Current Understanding and Treatment of Gliomas*. Springer Berlin, 1-14.
- Paschos, K. A., Canovas, D., Bird, N. C., 2009. The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. *Cell Signal* 21, 665-674.
- Pfister, S., Witt, O., 2009. Pediatric Gliomas, in: von Deimling, A. (Ed.), *Gliomas*. Springer Berlin, 67-81.
- Poeck, K., Hacke, W., 2006. *Neurologie*, 12. aktualisierte und erweiterte Auflage. Springer Berlin.
- Puck, T. T., Marcus, P. I., Cieciura, S. J., 1956. Clonal growth of mammalian cells in vitro: growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J Exp Med* 103, 273-283.
- Qiu, J., Huang, P., Liu, Q., Hong, J., Li, B., Lu, C., Wang, L., Wang, J., Yuan, Y., 2011. Identification of MACC1 as a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med* 9, 166.
- Qu, J. H., Chang, X. J., Lu, Y. Y., Bai, W. L., Chen, Y., Zhou, L., Zeng, Z., Wang, C. P., An, L. J., Hao, L. Y., Xu, G. L., Gao, X. D., Lou, M., Lv, J. Y., Yang, Y. P., 2012. Overexpression of metastasis-associated in colon cancer 1 predicts a poor outcome of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 18, 2995-3003.
- Rath, P., Lal, B., Ajala, O., Li, Y., Xia, S., Kim, J., Laterra, J., 2013. In Vivo c-Met Pathway Inhibition Depletes Human Glioma Xenografts of Tumor-Propagating Stem-Like Cells. *Transl Oncol* 6, 104-111.
- Reed, J. C., Doctor, K. S., Godzik, A., 2004. The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Sci Signal* 239, 1-29.
- Reifenberger, G., Collins, V. P., 2004. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* 82, 656-670.
- Riemenschneider, M., Reifenberger, G., 2009. Astrocytic Tumors, in: von Deimling, A. (Ed.), *Gliomas*. Springer Berlin, 3-24.
- Sahm, F., Capper, D., Jeibmann, A., Habel, A., Paulus, W., Troost, D., von Deimling, A., 2012. Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis. *Arch Neurol-Chicago* 69, 523-526.
- Said, H. M., Hagemann, C., Stojic, J., Schoemig, B., Vince, G. H., Flentje, M., Roosen, K., Vordermark, D., 2007. GAPDH is not regulated in human glioblastoma under hypoxic conditions. *BMC Mol Biol* 8, 55.
- Senft, C., Bink, A., Franz, K., Vatter, H., Gasser, T., Seifert, V., 2011. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* 12, 997-1003.
- Shang, C., Hong, Y., Guo, Y., Liu, Y. H., Xue, Y. X., 2015. Influence of the MACC1 Gene on Sensitivity to Chemotherapy in Human U251 Glioblastoma Cells. *Asian Pac J Cancer P* 16, 195-199.
- Shimokawa, H., Uramoto, H., Onitsuka, T., Chundong, G., Hanagiri, T., Oyama, T., Yasumoto, K., 2010. Overexpression of MACC1 mRNA in lung adenocarcinoma is associated with postoperative recurrence. *J Thorac Cardiovasc Surg* 4, 895-898.

- Shirahata, A., Fan, W., Sakuraba, K., Yokomizo, K., Goto, T., Mizukami, H., Saito, M., Ishibashi, K., Kigawa, G., Nemoto, H., Sanada, Y., Hibi, K., 2011. MACC 1 as a Marker for Vascular Invasive Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res* 31, 777-780.
- Shirahata, A., Sakata, M., Kitamura, Y., Sakuraba, K., Yokomizo, K., Goto, T., Mizukami, H., Saito, M., Ishibashi, K., Kigawa, G., Nemoto, H., Hibi, K., 2010. MACC 1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma. *Anticancer Res* 30, 3441-3444.
- Simon, M., Schramm, J., 2009. Surgical Management of Intracranial Gliomas, in: von Deimling, A. (Ed.), *Gliomas*. Springer Berlin, 105-124.
- Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B., Zheng, W., 2004. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev Techn* 2, 363-372.
- Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S. G., Touloumis, A., Collins, V. P., Marioni, J. C., Curtis, C., Watts, C., Tavare, S., 2013. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 4009-4014.
- Southern, P. J., Berg, P., 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1, 327-341.
- Stein, U., 2013. MACC1 - a novel target for solid cancers. *Expert Opin Ther Tar* 9, 1039-1052.
- Stein, U., Arlt, F., Walther, W., Smith, J., Waldman, T., Harris, E., Mertins, S., Heizmann, C., Allard, D., Birchmeier, W., Schlag, P., Shoemaker, R., 2006. The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology* 131, 1486-1500.
- Stein, U., Dahlmann, M., Walther, W., 2010. MACC1 - more than metastasis? Facts and predictions about a novel gene. *J Mol Med* 88, 11-18.
- Stein, U., Smith, J., Walther, W., Arlt, F., 2009a. MACC1 controls Met: what a difference an Sp1 site makes. *Cell Cycle* 8, 2467-2469.
- Stein, U., Walther, W., Arlt, F., Schwabe, H., Smith, J., Fichtner, I., Birchmeier, W., Schlag, P. M., 2009b. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat Med* 15, 59-67.
- Stein, U., Schlag, P. M., Lederer, A., Seehofer, D., Hermann, P., 2014. MACC1 as a prognostic biomarker for hepatobiliary tumors. Patent. Charité - Universitätsmedizin Berlin.
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., Reulen, H.-J., 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 7, 392-401.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Mirimanoff, R. O., 2009. 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, 459-466.

- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-996.
- Sun, L., Hui, A. M., Su, Q., Vortmeyer, A., Kotliarov, Y., Pastorino, S., Passaniti, A., Menon, J., Walling, J., Bailey, R., Rosenblum, M., Mikkelsen, T., Fine, H. A., 2006. Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell* 9, 287-300.
- Talmadge, J. E., Fidler, I. J., 2010. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 70, 5649-5669.
- Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L. A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A. W., Lu, C., Ward, P. S., Thompson, C. B., Kaufman, A., Guryanova, O., Levine, R., Heguy, A., Viale, A., Morris, L. G., Huse, J. T., Mellinghoff, I. K., Chan, T. A., 2012. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483, 479-483.
- Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T., Kitamura, N., 1995. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-705.
- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H. S., Hodgson, J. G., James, C. D., Sarkaria, J. N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P. T., Wilson, R. K., Speed, T. P., Gray, J. W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C. M., Hayes, D. N., 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98-110.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., Bos, J. L., 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-532.
- Wang, G., Fu, Z., Li, D., 2014. MACC1 overexpression and survival in solid tumors: a meta-analysis. *Tumor Biol* 2, 1055-1065.
- Wang, G., Kang, M. X., Lu, W. J., Chen, Y., Zhang, B., Wu, Y. L., 2012. MACC1: A potential molecule associated with pancreatic cancer metastasis and chemoresistance. *Oncol Lett* 4, 783-791.
- Wang, H., Birkenbach, M., Hart, J., 2000. Expression of Jun family members in human colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 21, 1313-1317.
- Wang, L., Wu, Y., Lin, L., Liu, P., Huang, H., Liao, W., Zheng, D., Zuo, Q., Sun, L., Huang, N., Shi, M., Liao, Y., Liao, W., 2013. MACC1 upregulation predicts a poor prognosis of gastric cancer, and promotes tumor cell proliferation and invasion. *Int J Cancer* 6, 1419-1430.
- Wen, P. Y., Schiff, D., Cloughesy, T. F., Raizer, J. J., Lattera, J., Smitt, M., Wolf, M., Oliner, K. S., Anderson, A., Zhu, M., Loh, E., Reardon, D. A., 2011. A phase II study evaluating the efficacy and safety of AMG 102 (rilotumumab) in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology* 13, 437-446.
- Wick, W., Platten, M., Meisner, C., Felsberg, J., Tabatabai, G., Simon, M., Nikkhah, G., Papsdorf, K., Steinbach, J. P., Sabel, M., Combs, S. E., Vesper, J., Braun, C., Meixensberger, J., Ketter, R., Mayer-Steinacker, R., Reifenberger, G., Weller,

- M., 2012. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13, 707-715.
- Xiao, G. H., Jeffers, M., Bellacosa, A., Mitsuuchi, Y., Vande Woude, G. F., Testa, J. R., 2001. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 247-252.
- Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., Bigner, D. D., 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360, 765-773.
- Yang, J., Mani, S. A., Weinberg, R. A., 2006. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* 66, 4549-4552.
- Yang, T., Kong, B., Kuang, Y. Q., Cheng, L., Gu, J. W., Zhang, J. H., Shu, H. F., Yu, S. X., He, W. Q., Xing, X. M., Huang, H. D., 2013. Overexpression of MACC1 protein and its clinical implications in patients with glioma. *Tumor Biol* 1, 815-819.
- Yang, T. H., Kon, M., Hung, J. H., Delisi, C., 2011. Combinations of newly confirmed Glioma-Associated loci link regions on chromosomes 1 and 9 to increased disease risk. *BMC Med Genomics* 4, 63.
- Yuhas, J. M., Li, A. P., Martinez, A. O., Ladman, A. J., 1977. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 37, 3639-3643.
- Zhang, K., Tian, F., Zhang, Y., Zhu, Q., Xue, N., Zhu, H., Wang, H., Guo, X., 2014. MACC1 is involved in the regulation of proliferation, colony formation, invasion ability, cell cycle distribution, apoptosis and tumorigenicity by altering Akt signaling pathway in human osteosarcoma. *Tumor Biol* 35, 2537-2548.
- Zhang, Y., Wang, Z., Chen, M., Peng, L., Wang, X., Ma, Q., Ma, F., Jiang, B., 2012. MicroRNA-143 Targets MACC1 to Inhibit Cell Invasion and Migration in Colorectal Cancer. *Mol Cancer* 11, 23.
- Zhu, M., Xu, Y., Mao, X., Gao, Y., Shao, L., Yan, F., 2013. Overexpression of Metastasis-Associated in Colon Cancer-1 Associated with Poor Prognosis in Patients with Esophageal Cancer. *Pathol Oncol Res* 4, 749-753.

Web-Verzeichnis

- Web 1: Becker N., Wahrendorf. J. (1998). Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990 (Regelmäßig online aktualisiert). www.krebsatlas.de, aufgerufen am 07.01.2015.
- Web 2: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (2012). S2k Leitlinie: Gliome (zuletzt aktualisiert 03/2014). www.awmf.org/leitlinien/detail/II/030-099.html, aufgerufen am 08.01.2015.
- Web 3: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012 (10. Auflage). www.krebsdaten.de, aufgerufen am 15.02.2015.
- Web 4: MSD Merck & Sharp & Dohme AG, Hertfordshire UK (2014). Fachinformation Temozolomid Zulassungsnummer: EU1/98/096/001-022, bzw. -025 (Stand 02/2014). www.fachinfo.de/suche/fi/004842, abgerufen am 24.01.2015.
- Web 5: Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35, W71-74. www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi, aufgerufen am 01.05.2010.
- Web 6: PREMIER Biosoft International (2009). NetPrimer. www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html, aufgerufen am 01.05.2010.
- Web 7: Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool (BLAST). *J Mol Biol* 215, 403-410. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, aufgerufen am 01.05.2010.
- Web 8: Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2, 401-404. www.cbioportal.org, aufgerufen am 01.08.2013.
- Web 9: Ovaska, K., Laakso, M., Haapa-Paananen, S., Louhimo, R., Chen, P., Aittomaki, V., Valo, E., Nunez-Fontarnau, J., Rantanen, V., Karinen, S., Nousiainen, K., Lahesmaa-Korpinen, A. M., Miettinen, M., Saarinen, L., Kohonen, P., Wu, J., Westermarck, J., Hautaniemi, S. (2010). Large-scale data integration framework provides a comprehensive view on glioblastoma multiforme. *Genome Med* 2, 65. www.anduril.org, aufgerufen am 01.08.2013.
- Web 10: Rhodes, D. R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A., Chinnaiyan, A. M. (2004). ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* 6, 1-6. www.oncomine.org, aufgerufen am 01.08. 2013.
- Web 11: Underiner, T. L., Herbertz, T., Miknyoczki, S. J. (2010). Discovery of small molecule c-Met inhibitors: Evolution and profiles of clinical candidates. *Anti-Cancer Agent Me* 10, 7-27. www.vai.org/metinhibitors, aufgerufen am 19.03.2015.

Web 12: Van Andel Institute, USA. www.vai.org/metclinicaltrials,
aufgerufen am 19.03.2015.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Das Glioblastom ist ein zellreicher Tumor mit starker Vaskularisierung und Nekrosen.
- Abb. 1.2: Das Glioblastom ist ein invasiv wachsender Tumor.
- Abb. 1.3: Primäre und sekundäre Glioblastome weisen unterschiedliche genetische Veränderungen auf.
- Abb. 1.4: Patient mit Glioblastom im rechten Parietallappen.
- Abb. 1.5: Die Domänenstruktur von MACC1 zeigt Charakteristika eines Signalmoleküls.
- Abb. 1.6: MACC1 reguliert den HGF-Met-Signalweg als transkriptioneller Aktivator von Met.
- Abb. 2.1: Vektorkarte von pcDNA3.1D/MACC1-V5-His
- Abb. 2.2: Messung der Zellmigration mit dem xCELLigence System.
- Abb. 2.3: Übersicht der Gruppen astrozytärer Tumoren, welche für die Immunhistochemie verwendet wurden.
- Abb. 3.1: Die Analyse von Microarrays zeigte eine signifikant höhere MACC1-Expression in Glioblastomen im Vergleich zum Normalhirn.
- Abb. 3.2: Veränderungen der MACC1 Genkopienanzahl korrelierten positiv mit der mRNA-Expression.
- Abb. 3.3: Humane Glioblastom-Zelllinien zeigten eine unterschiedlich starke MACC1-Expression.
- Abb. 3.4: Die MACC1-Expression stieg mit zunehmendem WHO-Grad astrozytärer Tumoren an.
- Abb. 3.5: Sowohl MACC1 als auch Met waren in Glioblastomen signifikant höher exprimiert als in niedergradigen Astrozytomen.
- Abb. 3.6: MACC1-Expression in Gewebeschnitten astrozytärer Tumoren.
- Abb. 3.7: Bestimmung der MACC1-Expression auf Proteinebene ermöglichte eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Astrozytom-Entwicklungsstadien.
- Abb.3.8: Glioblastom-Patienten mit hoher MACC1-Expression hatten eine ungünstige klinische Prognose.
- Abb. 3.9: Die endogene MACC1-Expression primärer Glioblastomzellkulturen variierte stark.
- Abb. 3.10: Die endogene MACC1-Expression korrelierte positiv mit der Migrationsrate primärer Glioblastomzellkulturen.
- Abb. 3.11: Die Überexpression von MACC1 in Glioblastomzelllinien führte zu einer höheren Zellmigration.
- Abb. 3.12: MACC1 hatte einen positiven Effekt auf die Proliferation von Glioblastomzelllinien.

Abkürzungsverzeichnis

2-HG	2-Hydroxyglutarat
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
Akt	Proteinkinase B
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
AP-1	Activator Protein 1
AS	Aminosäuren
ATRX	α -Thalassemia / Mental-Retardation-Syndrom-X-Linked
AUC	Area under the curve
Bad	BCL2-Associated Agonist Of Cell Death
bp	Basenpaare
Ca	Carcinoma (Karzinom)
CD	Cluster of differentiation
c-Fos	FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog
CIC	Homolog des Gens Capicua von <i>Drosophila melanogaster</i>
c-Jun	Jun Protoonkogen
CMV	Cytomegalievirus
CRC	Kolorektales Karzinom
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DD	Death-Domain
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Dinukleotidtriphosphate
ECL	Enhanced Chemoluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGTA	Ethylen-Glycol-Tetraacetat
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase, Synonym: MAPK1 ,Mitogen-Activated Protein Kinase 1
Ets1	V-Ets Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 1
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein
FLAIR	Fluid-attenuated inversion recovery
FUBP1	Far Upstream Element (FUSE) Binding Protein 1
G6PDH	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM, pGBM, sGBM	Glioblastoma multiforme, primäres, sekundäres Glioblastom
G-CIMP	Glioma CpG island methylator phenotype
gDNA	Genomische DNA
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRP	Meerrettichperoxidase
IDH1	Isozitatdehydrogenase 1
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
KI67	Antigen Ki-67
LCRed	Light Cycler Red
LGA	Niedergradiges Astrozytom WHO-Grad II (Low grade astrocytoma)
LOH	Verlust der Heterozygotität (Loss of Heterozygosity)
MACC1	Metastasis Associated in Colon Cancer-1
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEKK	MAPK/Erk Kinase
Met	MET-Protoonkogen
MGMT	O6-Methylguanin DNA-Methyltransferase
miRNA	microRNA
Mono	Monoklonal
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NB	Normalhirn (Normal brain)
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NF1	Neurofibromin 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PDGFRA	Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha Polypeptide
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly	Polyklonal
Prim	Primärantikörper
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
q RT-PCR	Quantitative Echtzeit reverse transcription PCR, real-time PCR
RB	Retinoblastom Tumorsuppressorgen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sek	Sekundärantikörper
SH2-Domäne	Src Homology 2 Domain
SH3-Domäne	Src Homology 3 Domain
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA

SNPs	Single nucleotide polymorphisms
SP-1	Sp1 Transcription Factor
sq RT-PCR	Semiquantitative reverse transcription PCR
TCGA	The Cancer Genome Atlas
Tm	Annealing temperature
TMZ	Temozolomid
TP53	Tumorsuppressorgen 53
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	Union International Contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus dafür bedanken, dass er mir dieses interessante Forschungsprojekt überlassen hat und ich meine Promotionsarbeit im Tumorbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Universität Würzburg durchführen durfte. Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Giles Hamilton Vince und Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Carsten Hagemann für die sehr gute Betreuung danken. Sie hatten immer ein offenes Ohr für Fragen aller Art. Durch die wissenschaftlichen Diskussionen, die ich mit ihnen führte, konnte diese Arbeit stets ein Stück weitergebracht werden. Erst dies hat das große Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten in mir geweckt.

Weiterhin gilt großer Dank Frau Stefanie Gerngras und Frau Siglinde Kühnel. Mit ihrer immensen Erfahrung halfen sie mir die benötigten experimentellen Techniken zu erlernen. Durch diese Grundkenntnisse bin ich auch für alle zukünftigen Forschungsprojekte vorbereitet, die noch kommen mögen. Danke sagen möchte ich auch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Mario Löhr und Frau Dr. med. Almuth Fridericke Kessler für die Anregungen und Ideen aus der Sicht des Klinikers.

Außerdem danke ich der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Stein vom Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin für die fruchtbare Kooperation im Rahmen derer das Thema zu meiner Promotionsarbeit entstanden ist. Hierbei ergab sich ein so guter Kontakt, der dazu führte, dass ich mein nächstes Forschungsprojekt in Berlin durchführen werde.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. med. Matthias Eyrich für die Übernahme der Zweitbetreuung. Großer Dank gilt auch Frau Dr. med. Camelia Monoranu für ihre Hilfe mit den pathologischen Präparaten und die vielen interessanten und anregenden Diskussionen.

Neben dem wissenschaftlichen spielte natürlich auch das private Umfeld eine Rolle während dieser Doktorarbeit. Deshalb möchte ich nun meinen Eltern danken! Sie haben mir immer die nötige Unterstützung und Freiheit gegeben um forschen zu können. Ich wusste zu jedem Zeitpunkt, dass ich von ihnen einen bedingungslosen Rückhalt erhalten werde. Hierfür danke ich ihnen von ganzem Herzen. Weiterhin danke ich meiner Schwester und meiner Freundin, die mich mit allen Kräften

aufgebaut, ermutigt und motiviert haben. Auch meine Freunde und Kommilitonen möchte ich nicht vergessen. Mit ihnen habe ich zahllose Stunden in der Bibliothek verbracht, um an dieser Arbeit zu schreiben. Erfahrungen mit dem wissenschaftlichen Arbeiten wurden ausgetauscht und neue Ideen kamen auf. Ohne den großen sozialen Rückhalt, den ich genießen durfte, wäre diese Arbeit unmöglich gewesen.

Aus Datenschutzgründen ist der Lebenslauf nicht in der elektronischen Version dieser Arbeit enthalten.