

Der Einfluss der Tumorsuppressorproteine p16 und
p14/Alternative Reading Frame auf die Zytostatikasensitivität
maligner Gliome in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von David Voß
aus Salzkotten

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr PD Dr. med. Matthias Simon
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Ulrich Herrlinger

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.01.2009

Aus der Neurochirurgischen Universitätsklinik Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Schramm

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	10
1.1 Maligne Gliome	10
1.1.1 Klassifikation glialer Tumoren	10
1.1.2 Therapie maligner Gliome	11
1.1.3 Genetik maligner Gliome	12
1.2 Der INK4A/INK4B-Genloкус in der Chromosomenregion 9p21	13
1.2.1 Alternatives Spleißen am INK4A/ARF-Lokus	13
1.2.2 Der INK4B-Lokus	13
1.2.3 Funktion von p16 und p15	13
1.2.4 Funktion des p14/ARF-Proteins	14
1.2.5 Biologische Bedeutung von p16 und p14/ARF für maligne Gliome	14
1.3 Der Einfluss der INK4A/ARF-Produkte auf die Zytostatikasensitivität von Gliomen	16
1.3.1 Zytostatikawirkung im Zellzyklus	16
1.3.2 Molekularbiologie	16
1.4 Fragestellungen der Arbeit	16
1.4.1 Problematik	16
1.4.2 Experimenteller Ansatz	17
2 Materialien und Methoden	18
2.1 Tumorzelllinien	18
2.1.1 Induzierbare Subklone	18
2.2 Zytostatika	21
2.3 Western Blot	21
2.3.1 Verwendete Reagenzien	21
2.3.2 Verfahren	22
2.4 Transfektion von U87-MG-Zellen mit pBabe+p14/ARF- und pBabePuro-Vektoren und Züchtung monoklonaler Subklone	22

2.5	RT-PCR	23
2.6	Klonogenitätsmessung durch MTS-Assay	23
2.7	Vergleich von Zytostatikawirkungen	23
2.7.1	Vorüberlegungen zur Erstellung von Dosiswirkungsbeziehungen	23
2.7.2	Erstellen eines optimierten Protokolls	25
2.7.3	Statistische Analyse	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Analyse der p16-Expression in induzierbaren U87+p16tTA- bzw. U373+p16tTA-Zellen und der p14/ARF-Expression in U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen	29
3.1.1	Zeitliches Profil der p16-Expression in induzierbaren U373+p16tTA- und U87+p16tTA- Zellen nach Tetrazyklinzugabe	29
3.1.2	Zeitliches Profil der p16-Expression in induzierbaren U373+p16tTA- und U87+p16tTA- Zellen nach erneuter Tetrazyklinzugabe	30
3.1.3	Nachweis der p14/ARF-Expression auf mRNA-Ebene in den transfizierten U87+pBabePuro+p14/ARF-Subklonen	31
3.2	Vergleich von Zytostatikawirkungen in Abhängigkeit vom p16-Expressionsniveau in induzierbaren Gliomzelllinien	32
3.2.1	Behandlung von U373+p16tTA-Zellen mit Vincristin	32
3.2.2	Behandlung von U373+p16tTA-Zellen mit BCNU	35
3.2.3	Behandlung von U87+p16tTA-Zellen mit Vincristin	38
3.2.4	Behandlung von U87+p16tTA-Zellen mit BCNU	41
3.3	Vergleich von Zytostatikawirkungen in U87+pBabe+p14/ARF- und U87+pBabePuro-Subklonen	44
3.3.1	Behandlung mit BCNU	44
3.3.2	Behandlung mit Vincristin	49
4	Diskussion	53
4.1	Bewertung der Ergebnisse	53
4.1.1	Einfluss der p16-Expression auf die Zytostatikasensitivität induzierbarer U373+p16tTA- und U87+p16tTA-Zellen	53
4.1.2	Einfluss ektoper p14/ARF-Expression auf die Zytostatikasensitivität von U87-Subklonen	53
4.1.3	Vergleich mit der Literatur	54
4.1.4	Mögliche biologische Hintergründe	55
4.2	Methodenkritik	56
4.2.1	In-vitro-Zytostatikasensitivitätstestung	56
4.2.2	Funktionelle Analyse durch Gentransfer und induzierbare Expression	57

4.3 Mögliche Bedeutung für die Klinik: Ausblick	57
Zusammenfassung	60
Abbildungsverzeichnis	61
Literaturverzeichnis	64
Danksagung	77

Abkürzungsverzeichnis

\bar{x}	Mittelwert
$\sigma_{\bar{x}}$	Standardfehler des Mittelwertes
A	Adenin
AA	Acrylamid
ACNU	Aminomethylpyrimidylmethyl-Chloräthyl-Nitroso-Urea (Nimustin)
Akt	aus dem Retrovirus AKT8 isoliertes Onkoprotein (Synonyme: Proteinkinase B, v-akt murine thymoma viral oncogene)
AP	Alkalische Phosphatase
ARF	Alternative Reading Frame (Alternatives Leseraster; Synonym für p14)
ATCC	American Type Culture Collection
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-Phosphat
BCNU	Bis-Chloräthyl-Nitroso-Urea (Carmustin)
Bis-AA	Bisacrylamid
C	Cytosin
CCNU	Cyclohexyl-Chloräthyl-Nitroso-Urea (Lomustin)
CDK	Cyclin Dependent Kinase (Cyclinabhängige Kinase)
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor (Hemmer zyklinabhängiger Kinasen) 2A
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
Cip1	CDK-Interacting Protein 1 (mit CDK interagierendes Protein 1; Synonym für p21)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E2F(1)	Transskriptionsfaktor E2F(1)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Rezeptor des Epidermalen Wach-

	tumorfaktors)
FBS	Fetal Bovine Serum (Kälberserum)
G	Guanin
G ₁ -, G ₂ -, G ₀ -Phase	Zwischenphasen (Gap) des Zellzyklus
HCl	Salzsäure
HeLa	Tumorzelllinie, die auf das Zervixkarzinom der Patientin Henrietta Lacks zurückgeht
ID ₅₀	halbmaximale Hemmdosis
IgG	Immunglobulin G
INK4A	Inhibitor of cyclin dependent Kinase 4A (Hemmer der zyclinabhängigen Kinase 4A)
INK4B	Inhibitor of cyclin dependent Kinase 4B (Hemmer der zyclinabhängigen Kinase 4B)
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
K-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (Onkoprotein)
K562	Humane Leukämiezelllinie
kD	kiloDalton
M	Molar (mol/l)
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
Mdm2	Mouse double minute 2 Homolog (Onkoprotein)
MEM	Minimum Essential Medium (minimal-essentielles Medium)
MGMT	O ₆ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MIM	Mendelian Inheritance in Man (Gendatenbank)
mM	milliMolar (mmol/l)
mRNA	messenger Ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
MTS1	Multiple tumor suppressor (Suppressor multipler Tumore) 1
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NBT	Nitroblautetrazolium
Neo	Neomycin(-haltiges Medium)
NeoTet	Neomycin- und Tetrazyklinhaltiges Medium
OptiMEM	Optimized Minimum Essential Medium (optimiertes minimal-essentielles Medium)
p14, p15, p16, p19, p21, p53	(Tumorsuppressor-)Proteine mit 14, 15, 16, 19, 21 und 53kD Molekularmasse

PAGE	Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
pBabe+p14/ARF	Plasmid mit Puromycinresistenz und p14/ARF-cDNA
pBabePuro	Plasmid mit Puromycinresistenz
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Ketten Reaktion)
PCV	Chemotherapieregime, das Procarbacin, CCNU (Lomustin) und Vincristin enthält
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (von Plättchen stammender Wachstumsfaktor)
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor (Rezeptor des von Plättchen stammenden Wachstumsfaktors)
pH	potentia Hydrogenii (negativ dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenaktivität)
PMS	Phenazine Methosulfate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
Puro	Puromycin(-haltiges Medium)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastom(a)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Reverse Transcriptase (Reverse Transkriptase)
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
sc	subclone (Subklon)
ScaI	Restriktionsendonuklease aus <i>Streptomyces caespitosus</i>
SDS	Sodium Dodecylsulfate
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (-Polymerase)
TBS	Tris-Buffered Saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
Tet	Tetrazyklin(-haltiges Medium)
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta (Transformierender Wachstumsfaktor Beta)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	tetracycline-controlled TransActivator (tetrazyklinkontrollierter Transaktivator) nach Gossen und Bujard (1992)
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität: 1 U entspricht der Menge Enzym, welche 1 Mikromol Substrat pro Minute umsetzt)
U87+p16tTA, U373+p16tTA	Gliomzelllinien mit induzierbarer p16-Expression nach Simon <i>et al.</i> (1999)

U87-MG, U373-MG	Gliomzelllinien
w/v	weight/volume (Masse/Volumen)
Waf1	Wildtype p53-Activated Fragment 1 (Fragment 1, das durch Wildtyp-p53 aktiviert wird; Synonym für p21)
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

1

Einleitung

1.1 Maligne Gliome

1.1.1 Klassifikation glialer Tumoren

Gliome, also Tumoren, die ähnliche morphologische und immunhistochemische Charakteristika aufweisen wie Astrozyten, Oligodendrozyten oder deren Vorläuferzellen, machten in der Neurochirurgischen Universitätsklinik Bonn im Zeitraum von 1996 bis 2002 etwa 35% der operierten Hirntumoren aus (Simon, unveröffentlicht). Nach der 2007 überarbeiteten WHO-Klassifikation werden aufgrund histopathologischer Kriterien wie Kernatypien, Mitosen, Gefäßproliferationen und Nekrosen vier Malignitätsgrade unterschieden. Die WHO-Grade korrelieren mit dem klinischen Verlauf der Erkrankungen (Kleihues *et al.*, 2007c; Louis *et al.*, 2007). Klinisch wichtige Tumoren mit astrozytärer Differenzierung sind das fibrilläre, das protoplasmatische und das gemistozytische Astrozytom (jeweils WHO-Grad II) (von Deimling *et al.*, 2007a), das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) (Kleihues *et al.*, 2007b) sowie das entdifferenzierte, hochmaligne, Nekrosen und Gefäßproliferationen enthaltende Glioblastom (WHO-Grad IV) mit den besonderen Ausprägungen des Riesenzellglioblastoms und des Gliosarkoms (Kleihues *et al.*, 2007a). Sonderstellungen nehmen die hoch differenzierten pilozytischen Astrozytome (WHO-Grad I), die pilomyxoiden Astrozytome (WHO-Grad II) (Scheithauer *et al.*, 2007) und die seltenen pleomorphen Xanthoastrozytome (WHO-Grad II) ein (Giannini *et al.*, 2007). Oligodendrogliomen und den aus Anteilen mit oligodendroglialer und astrozytärer Differenzierung bestehenden Mischgliomen lässt sich der WHO-Grad II (Reifenberger *et al.*, 2007b; von Deimling *et al.*, 2007c) und deren anaplastischen Pendanten der WHO-Grad III zuordnen (Reifenberger *et al.*, 2007a; von Deimling *et al.*, 2007b). Ependymome leiten sich von Zellen des Ventrikelependyms ab und wachsen meist langsam (WHO-Grad II) (McLendon *et al.*, 2007d). Es kommen jedoch auch anaplastische Ependymome (WHO-Grad III) (McLendon *et al.*, 2007c) und Tumoren mit WHO-Grad I vor (McLendon *et al.*, 2007a,b). Glioneuronale Tumoren enthalten sowohl Elemente neuronaler als auch glialer Differenzierung (Becker *et al.*, 2007; Brat *et al.*, 2007; Daumas-Duport *et al.*, 2007; Hainfellner *et al.*, 2007; Nakazato *et al.*, 2007).

Die Klassifikation von “Glioblastomen mit oligodendroglialer Komponente”, d.h. von malignen glialen Tumoren, die einerseits die histologischen Merkmale eines Glioblastoms aufweisen, andererseits aber signifikante oligodendrogliale Anteile enthalten, als WHO-Grad IV ist nicht unproblematisch. Diese Tumoren unterscheiden sich offensichtlich signifikant in Biologie und Prognose von typischen Glioblastomen (Homma *et al.*, 2006; Kraus *et al.*, 2000, 2001; Louis *et al.*, 2007).

Glioblastome entstehen zum Teil als primäre Glioblastome de novo und zum Teil aus niedrigmalignen Astrozytomen, Oligodendrogliomen bzw. Gliomen allgemein als sekundäre Glioblastome (Kleihues *et al.*, 2007a; Scherer, 1940). Primäre und sekundäre Glioblastome unterscheiden sich auch genetisch (Ohgaki und Kleihues, 2007) (→ Seite 12).

1.1.2 Therapie maligner Gliome

Die überwiegende Mehrzahl maligner Gliome (WHO-Grade III und IV) ist astrozytär oder gemischt differenziert (Kleihues *et al.*, 2007a,b; von Deimling *et al.*, 2007b). Auf anaplastische Oligodendrogliome entfallen nur wenige Prozent (Reifenberger *et al.*, 2007a).

In verschiedenen Studien ergeben sich mediane Überlebenszeiten für Patienten mit anaplastischen Astrozytomen von ca. 14–62 Monaten und für Patienten mit Glioblastomen von ca. 9–18 Monaten (Nelson *et al.*, 1985; Salcman, 1980; Salcman *et al.*, 1994; Stummer *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 1979; Weller *et al.*, 2003). Patienten mit Tumoren mit oligodendroglialer Differenzierung überleben signifikant länger (Cairncross *et al.*, 2006; Fortin *et al.*, 2001; Kristof *et al.*, 2002; Kyritsis *et al.*, 1993; van den Bent *et al.*, 2006).

Für Glioblastome und anaplastische Astrozytome hat sich die operationsmikroskopisch möglichst komplette Resektion (gross total resection) mit anschließender Radiatio als Standardtherapie etabliert (Lacroix *et al.*, 2001; Stummer *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 1980). Der Wert einer primären Chemotherapie beim Glioblastom wurde lange kontrovers diskutiert (Fine *et al.*, 1993; Medical Research Council Brain Tumor Working Party, 2001; Stewart, 2002). Basierend auf aktuellen Studienergebnissen wird heute das Alkylanz Temozolomid regelhaft begleitend zur Bestrahlung (Radiochemotherapie) und zur anschließenden Konsolidierung eingesetzt (Stupp *et al.*, 2002, 2005a, 2006). Temozolomid ist auch beim Glioblastomrezidiv wirksam (Burton und Prados, 1999; Martikainen *et al.*, 2005; Trent *et al.*, 2002; Yung *et al.*, 2000). Für die Wirksamkeit einer Chemotherapie beim anaplastischen Astrozytom gibt es in der Rezidivsituation gute Belege (Levin *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 1999; Yung *et al.*, 1999). Eine adjuvante Chemotherapie wird kontrovers beurteilt (Fine *et al.*, 1993; Medical Research Council Brain Tumor Working Party, 2001; Prados *et al.*, 1999; Stupp *et al.*, 2006).

Patienten mit anaplastischen Oligodendrogliomen profitieren von einer Chemotherapie, z. B. nach dem PCV-Schema (Procarbazin, CCNU, Vincristin) (Cairncross *et al.*, 1994, 2006; van den Bent *et al.*, 2006) oder mit Temozolomid (van den Bent *et al.*, 2003a,b).

Positive Effekte einer PCV-Zytostase bei einigen Langzeitüberlebenden von Glioblastomen sind aber möglicherweise auch nur Ergebnis einer ungenauen histopathologischen Diagnostik, die einer kritischen Re-

evaluation nicht standhält (Kraus *et al.*, 2000; Levin *et al.*, 1990).

1.1.3 Genetik maligner Gliome

Man geht heute davon aus, dass eine maligne Transformation von Zellen durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bzw. die Aktivierung von Onkogenen verursacht wird. Tumorsuppressorgene kodieren Proteine mit zumeist wachstumsregulierendem Charakter. Sie arretieren den Zellzyklus, aktivieren DNA-Reparaturmechanismen oder induzieren den programmierten Zelltod (Apoptose). Durch Punktmutationen, Deletionen, Chromosomenaberrationen oder Hemmung der Proteinexpression können sie funktionell inaktiviert werden. In Gliomen wurden häufig Verluste auf den Chromosomen 1p, 9p, 10, 13q, 17p, 19q und 22q beobachtet, die zum Allelverlust oder zur homozygoten Deletion von Tumorsuppressorgenen führen (Ohgaki und Kleihues, 2007; Schmidt *et al.*, 2002).

Onkogene hingegen kodieren für wachstumsstimulierende Proteine. Häufig sind dies Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren. In Gliomen wurden Amplifikationen des "Epidermal Growth Factor Receptor" (EGFR) und des "Platelet-derived Growth Factor" (PDGF) bzw. dessen Rezeptors (PDGFR) gefunden (Hermanson *et al.*, 1996; Louis, 2006; Reifenberger *et al.*, 1994; von Deimling *et al.*, 1993).

Während in niedergradigen Astrozytomen vor allem 22q-Verluste, Aktivierungen des PDGF-Systems und p53-Inaktivierungen vorkommen, sind für den Übergang zum Grad III Verluste auf den Chromosomen 9p, 13q und 19q oder funktionelle Inaktivierungen der hier kodierten Tumorsuppressorproteine kennzeichnend (Louis und Gusella, 1995). Zu den für Tumoren oligodendrogialer Herkunft typischen Verlusten auf 1p und 19q kommen beim Übergang zum Grad III Verluste auf den Chromosomen 9p und 10q hinzu. Insbesondere bei Oligoastrozytomen werden auch 17p-Verluste beobachtet (Louis, 2006; Reifenberger *et al.*, 1994).

Funktionelle Zielstrukturen solcher chromosomaler Verluste sind offensichtlich die Tumorsuppressorgene INK4A/ARF und INK4B bei 9p-Verlusten (\rightarrow Seite 14), Rb bei 13q-Verlusten (Henson *et al.*, 1994), p53 bei 17p-Verlusten (Reifenberger *et al.*, 1994) und PTEN bei Verlusten des Chromosoms 10q (Wang *et al.*, 1997). Ob bzw. welche Tumorsuppressorgene auf den Chromosomen 1p, 19q und 22q lokalisiert sind, ist noch unklar.

Die häufigsten Veränderungen in Glioblastomen sind Amplifikationen des Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gens (EGFR) sowie Verluste auf den Chromosomen 10q, 17p und 9p (Labuhn *et al.*, 2001; von Deimling *et al.*, 1993). EGFR-Amplifikationen und p53-Inaktivierungen scheinen bei Glioblastomen selten gemeinsam vorzukommen und definieren somit genetische Subgruppen. Während man EGFR-Amplifikationen und auch INK4A-Deletionen überwiegend in primären Glioblastomen findet, sind p53-Mutationen und PDGFR-Amplifikationen typisch für aus Astrozytomen hervorgegangene sekundäre Glioblastome (Biernat *et al.*, 1997; Hermanson *et al.*, 1996; Ohgaki und Kleihues, 2007; von Deimling *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1996).

1.2 Der INK4A/INK4B-Genlocus in der Chromosomenregion 9p21

1.2.1 Alternatives Spleißen am INK4A/ARF-Lokus

Das auf Chromosom 9 in der Region 9p21 lokalisierte zunächst als MTS1 (multiple tumor suppressor 1) und inzwischen als INK4A (inhibitor of cyclin dependent kinase 4A) oder CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A) bezeichnete Gen kodiert das Tumorsuppressorprotein p16 (Kamb, 1996). p16 wurde erstmals 1993 als CDK4-Inhibitor, also als negativer Zellzyklusregulator, beschrieben (Serrano *et al.*, 1993).

In manchen Familien mit hereditären Melanomen segregiert die Erkrankung mit Chromosom 9p-Markern (Bahuaui *et al.*, 1998; Cannon-Albright *et al.*, 1992). Ausgehend von Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 konnte durch genetische Analysen in zahlreichen Tumoren, Tumorzelllinien und Familien mit hereditären Melanomen dann 1994 INK4A bzw. p16 als das gesuchte Tumorsuppressorgen bzw. -protein identifiziert werden (Cannon-Albright *et al.*, 1994; Fountain *et al.*, 1992; Kamb *et al.*, 1994b; Petty *et al.*, 1993). INK4A-Punktmutationen fanden sich in einer Vielzahl von Familien mit hereditärem Melanom, aber auch in einigen sporadischen Melanomen und in zahlreichen Tumorzelllinien (Bahuaui *et al.*, 1997; Kamb, 1996; Kamb *et al.*, 1994a).

INK4A kodiert nicht nur für p16 mit seinen Exons 1 α , 2 und 3, sondern auch für eine bei der Maus p19/ARF und beim Menschen p14/ARF genannte Spleißvariante, wobei ARF für Alternatives Leseraster (Alternative Reading Frame) steht. Dieses Protein wird vom dem Zentromer näher gelegenen Exon 1 β und vom gemeinsamen Exon 2 codiert, hat aber aufgrund eines verschobenen Leserasters keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit dem p16-Protein. Die Transkription von p19/ARF terminiert innerhalb von Exon 2 (Mao *et al.*, 1995; Stone *et al.*, 1995b). Interessanterweise besitzt auch p19/ARF bzw. p14/ARF zellzyklusregulatorische und tumorsupprimierende Eigenschaften. Während die p16-Funktion aber über Rb vermittelt wird, ist Zielprotein von p14/ARF das Tumorsuppressorprotein p53 (Haber, 1997; Quelle *et al.*, 1995).

1.2.2 Der INK4B-Lokus

In unmittelbarer Nachbarschaft des INK4A/ARF-Lokus wird am INK4B-Lokus das mit p16 strukturell verwandte p15-Protein codiert. 82% der Aminosäurenstruktur von p16 und p15 sind identisch. Auch funktionell scheinen p16 und p15 weitgehend äquivalent zu sein (Fuxe *et al.*, 2000; Hannon und Beach, 1994; Simon *et al.*, 1999). Hier ist es während der Evolution offenbar zu einer Genduplikation gekommen (Gilley und Fried, 2001; Kim *et al.*, 2003), was funktionell wohl den Vorteil einer differenzierten CDK4-Regulation mit sich bringt.

1.2.3 Funktion von p16 und p15

Das p16-Protein hemmt die Bildung zellzyklusphasenspezifischer Cyclin-CDK-Komplexe, die über eine Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins Rb den Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus kontrollieren. p16 bindet an die cyclinabhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 und verhindert so deren As-

soziation mit D-Cyclin. Infolgedessen kommt es zu einer verminderten Phosphorylierung des Rb-Proteins und damit zu vermehrter Bindung von Rb mit E2F-Komplexen, welche in dieser Form hemmend auf die Expression von Genen wirken, die für den G₁/S-Übergang benötigt werden (Berger und Bardeesy, 2007; Haber, 1997; Sherr, 1996). Durch Überexpression von p16 konnte experimentell eine Arretierung des Zellzyklus in der G₁-Phase erreicht werden (Shapiro *et al.*, 1995). p16 wirkt also wie eine Zellzyklusbremse. Wie p16 bindet auch p15 an CDK 4 und 6 und hat ähnliche zellzyklusregulierende und wachstumshemmende Funktionen (Fuxe *et al.*, 2000). Die p15-Expression wird jedoch durch den “Transforming Growth Factor Beta” (TGF- β) induziert (Hannon und Beach, 1994; Stone *et al.*, 1995a), während p16 eine wichtige Rolle bei der Zellalterung zu spielen scheint (Kim und Sharpless, 2006; Krishnamurthy *et al.*, 2004; Zindy *et al.*, 1997). p16 wird in Zelllinien von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Fibroblasten für die Blockade des Zellzyklus am G₁/S-Übergang als Reaktion auf DNA-Schäden, wie sie zum Beispiel durch Zytostatikatherapie verursacht werden, benötigt (Shapiro *et al.*, 1998). Fehlende p16-Expression ermöglicht also nicht nur unkontrollierte Zellvermehrung, sondern kann in den genannten Zelllinien auch die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen verhindern.

1.2.4 Funktion des p14/ARF-Proteins

Das seit langem bekannte Tumorsuppressorprotein p53 verhindert ein Fortschreiten des Zellzyklus durch Induktion der p21/Waf1/Cip1-Expression, kann DNA-Reparaturmechanismen aktivieren und den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten (Hickman *et al.*, 2002). p14/ARF wirkt durch Mdm2-vermittelte Inhibitions hemmung indirekt begünstigend auf die p53-Expression. p53 wirkt seinerseits im Sinne einer Rückkopplungshemmung inhibitorisch auf die p14/ARF-Expression (Besson und Yong, 2001; Harris und Levine, 2005; Sherr, 1998, 2001). Entsprechend konnte in Zellen ohne p53-Expression eine erhöhte Expression des p14/ARF Proteins bzw. seines Maushomologs p19/ARF gemessen werden (Quelle *et al.*, 1995; Stott *et al.*, 1998). Zusätzlich scheint p14/ARF aber auch von p53 unabhängige wachstums- und zellzyklusregulierende Funktionen zu entfalten (Ha *et al.*, 2007). Reguliert wird die p14/ARF-Expression seinerseits durch E2F1, sodass auch funktionell eine Verbindung zwischen der p16/CDK/Rb- und der p14/Mdm2/p53-Kaskade besteht (Dimri *et al.*, 2000; Gil und Peters, 2006; Lowe und Sherr, 2003). Sowohl am G₁/S- als auch am G₂/M-Übergang konnte unter p14/ARF-Überexpression ein Zellzyklusarrest beobachtet werden (Ivanchuk *et al.*, 2001; Modestou *et al.*, 2001).

1.2.5 Biologische Bedeutung von p16 und p14/ARF für maligne Gliome

Deletionen am INK4A/ARF-Lokus, die zum Teil auch INK4B einschlossen, konnten 1997 als Ursache des familiären Melanom-Astrozytom-Syndroms (MIM 155755) und weiterer familiär gehäuft auftretender Tumoren des Nervensystems identifiziert werden (Bahuaui *et al.*, 1997, 1998). Vor allem in höhergradigen Gliomen spielen Deletionen am INK4A/ARF-Lokus und Inaktivierungen der Expression von p16 und p14/ARF eine wichtige Rolle (Louis, 2006). Systematische Analysen an 136 Glioblastomen und 39 anaplastischen Astrozytomen

zeigten, dass in etwa zwei Drittel aller Glioblastome gleichzeitig Mutationen vorliegen, die zur funktionellen Inaktivierung der beiden zellzyklusregulatorischen Signalwege (\rightarrow Seite 13) aus Rb, CDK4 und p16/INK4A einerseits und p53, Mdm2 und p14/ARF andererseits führen (Ichimura *et al.*, 2000). Am einfachsten geschieht dies durch Kodeletionen der benachbarten INK4A/ARF- und INK4B-Gene auf Chromosom 9p21 (Besson und Yong, 2001; Labuhn *et al.*, 2001). Gelegentlich führen Punktmutationen und Deletionen zu mutierten, zum Teil instabilen Transkripten, und in vielen Tumoren hemmt eine Promotor-Methylierung und eine Chromatinkondensation die Expression von p16, p15, p14/ARF, Rb oder des O₆-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Enzyms (MGMT) (so genanntes “transcriptional silencing”) (Costello *et al.*, 1996; Esteller *et al.*, 2000; Fueyo *et al.*, 1996; Merlo *et al.*, 1995; Ohta *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1997). Dabei gibt es Hinweise dafür, dass Inaktivierungen von MGMT und p14/ARF praktisch nicht gemeinsam vorkommen (Watanabe *et al.*, 2007).

In 96% der Glioblastome mit Störungen von Rb, CDK4, p16/INK4A oder p15/INK4B finden sich auch Veränderungen von p14/ARF, p53 oder Mdm2 (Ichimura *et al.*, 2000). Mäuse mit ausgeschalteter INK4A/ARF-Expression entwickelten vermehrt Lymphome und Sarkome, während Mäuse, bei denen das Exon 1 β inaktiviert und damit nur die Expression von p14/ARF ausgeschaltet wurde, zusätzlich auch zu 10% Gliome entwickelten (Ivanchuk *et al.*, 2001). Durch Transfer von EGFR-Genen in für INK4A/ARF heterozygote Mäuse konnten gliomähnliche Läsionen induziert werden. Im Gegensatz dazu war bei Wildtyp-Tieren und für p53 heterozygoten Mäusen zusätzlich ein Transfer von CDK4-Genen erforderlich (Holland *et al.*, 1998).

Höherer histologischer Grad korreliert bei Astrozytomen mit p16-Expressionsverlust (Miettinen *et al.*, 1999), und bei anaplastischen Oligodendrogliomen (WHO-Grad III) finden sich ebenfalls häufiger Störungen der p16/CDK4/Rb-Signalkaskade als bei niedergradigen Oligodendrogliomen (Watanabe *et al.*, 2001). In Untersuchungen von 36 Astrozytomen und 42 Oligodendrogliomen korrelierte in beiden Gruppen ein p16-Expressionsverlust mit kürzerer Überlebenszeit der Patienten (Miettinen *et al.*, 1999). In Zellkultur und im Mausmodell begünstigten zusätzliche INK4A/ARF-Inaktivierungen die Entwicklung von PDGF-induzierten Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen, und insbesondere p14/ARF-Expressionsverluste resultierten in einem höheren Grad der erzeugten Tumoren (Dai *et al.*, 2001; Tchougounova *et al.*, 2007). Ähnliche Befunde ergaben sich auch bei durch die Onkoproteine K-ras und Akt induzierten Gliomen (Uhrbom *et al.*, 2002, 2005).

Sowohl in vitro als auch in vivo spielen Inaktivierungen beider von INK4A/ARF beeinflusster zellzyklusregulatorischer Signalwege also eine wichtige Rolle bei der Gliomentstehung. Störungen der INK4A/ARF-Expression sind insgesamt typisch für Gliome der WHO-Grade III und IV.

1.3 Der Einfluss der INK4A/ARF-Produkte auf die Zytostatikasensitivität von Gliomen

1.3.1 Zytostatikawirkung im Zellzyklus

Einige Zytostatika wirken zellzyklusphasenspezifisch, also nur auf Zellen, die sich in einer bestimmten Phase des Zellzyklus befinden. So wirken Vinca-Alkaloide und Taxane auf die Mikrotubuli der Mitosespindel und somit hauptsächlich in der M-Phase. Vincristin hemmt zum Beispiel die intrazelluläre Tubulinsynthese und arretiert die Zellen in der Metaphase der Mitose. Antimetaboliten wie Methotrexat und 5-Fluorouracil wirken besonders in der S-Phase. Die zytostatischen Effekte von Alkylanzien und Anthrazyklinen sind zellzyklusphasenunabhängig. BCNU und CCNU alkylieren DNA, RNA und Proteine und wirken auf Zellen in allen Zellzyklusphasen, d. h. auch auf ruhende Zellen, die sich in der G₀-Phase befinden (Keilholz *et al.*, 2006).

1.3.2 Molekularbiologie

Eine DNA-Schädigung durch Zytostatika führt bei subletalen Dosen zum Zellzyklusarrest und zumindest zum Versuch einer Reparatur der eingetretenen Schädigung. Diese Vorgänge werden wesentlich, wie beschrieben (→ Seite 13), durch die zellzyklusregulatorischen Signalwege p16/CDK/Rb und p14/Mdm2/p53 gesteuert (Ivanchuk *et al.*, 2001). Ein Ziel einer Zytostatikatherapie ist die Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) in der Tumorzelle (Hannun, 1997; Makin, 2002). An der Steuerung des programmierten Zelltodes nehmen verschiedene Proteine teil, zum Beispiel p53 (Li *et al.*, 1998; Zunino *et al.*, 1997), Rb und E2F (Hickman *et al.*, 2002). p53 kann dabei durch eine Vielzahl unterschiedlicher, zum Teil synergistisch wirkender, genetischer, metabolischer und physikalischer Stimuli aktiviert werden, was entweder zur Einleitung der Apoptose oder zu einem Zellzyklusarrest führt (Giaccia und Kastan, 1998; Pawlik und Keyomarsi, 2004). Insbesondere scheint eine gleichzeitige p53-Aktivierung durch DNA-Schäden und durch p14/ARF zur Induktion des programmierten Zelltodes zu führen (de Stanchina *et al.*, 1998).

Die geschilderten Befunde lassen vermuten, dass auch p16 und p14/ARF die Zytostatikawirkung bei Gliomen beeinflussen können (Cairncross *et al.*, 1998; Mason *et al.*, 1997).

1.4 Fragestellungen der Arbeit

1.4.1 Problematik

Leider kann bisher der individuelle Erfolg einer Zytostatika-Therapie bei Gliomen allein aufgrund histomorphologischer Kriterien nicht befriedigend vorausgesagt werden. Molekulargenetische Analysen könnten die Identifikation von Gliomen ermöglichen, welche auf eine Zytostatikatherapie ansprechen (Hegi *et al.*, 2005; Ino *et al.*, 2000; Mason *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2002; Weller *et al.*, 1998).

Eine retrospektive Korrelation der Tumorgenetik mit dem klinischen Ansprechen auf eine Zytostase (Cairncross *et al.*, 1998; Esteller *et al.*, 2000; Hegi *et al.*, 2005; Krex *et al.*, 2007) kann Hinweise auf genetische Marker liefern, die als positive oder negative Prädiktoren in Frage kommen. Zur Aufklärung der funktionellen Relevanz einzelner Proteine bieten sich Zellkulturuntersuchungen an.

Die zu Beginn der Arbeit an dieser Dissertation vorliegenden in-vitro-Untersuchungen zur Rolle von p16 bei der Zytostatikasensitivität hatten zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt (Fueyo *et al.*, 1998; Fukuoka *et al.*, 1997; Hama *et al.*, 1998; Prabhu *et al.*, 1999; Stone *et al.*, 1996).

Zum Einfluss des p14/ARF-Proteins auf die Zytostatikasensitivität lagen zu Beginn der Arbeit keinerlei Erkenntnisse vor.

1.4.2 Experimenteller Ansatz

Ausgehend von Vorarbeiten (Simon *et al.*, 1999) wurden für die Untersuchungen zum Einfluss von p16 auf die Zytostatikasensitivität die beiden induzierbaren Gliomzelllinien U87+p16tTA und U373+p16tTA verwendet. Das dort benutzte von Gossen und Bujard entwickelte induzierbare tTA-System erlaubt, durch den Einsatz eines Tetrazyklin-abhängigen Promotors die Expression von p16 in identischen Zellen durch Variation der Tetrazyklinkonzentration im Nährmedium zu regulieren (Gossen und Bujard, 1992).

Beide Zelllinien exprimieren kein endogenes p16, p15 oder p14/ARF, wohl aber Rb-Protein. U87-MG, die Stammlinie von U87+p16tTA, exprimiert im Gegensatz zu U373-MG Wildtyp-p53 (Simon *et al.*, 1999). Die Transfektion von U87+p16tTA-Zellen mit einem p14/ARF-Expressionsvektor führt zu einer deutlichen Tumorsuppression in vitro, bestätigt also die Expression von p53 in diesen Zellen (Köster und Simon, unveröffentlicht). Somit konnten zwei unterschiedliche genetische Umgebungen studiert werden.

Für die Untersuchungen zum Einfluss von p14/ARF auf die Zytostatikasensitivität wurde in Zellen der p53-exprimierenden U87-MG-Zelllinie stabil ektopes p14/ARF transfiziert.

Da einige Zytostatika zellzyklusspezifisch und andere zellzyklusunspezifisch wirken und deshalb ein unterschiedliches Verhalten zu erwarten ist, sollte aus jeder Gruppe exemplarisch ein Zytostatikum herausgegriffen werden. In der zytostatischen Behandlung von Gliomen spielen in der Klinik das aus Procarbazin, CCNU und Vincristin bestehende PCV-Schema sowie Nitrosoharnstoffe (z. B. ACNU, BCNU) und neuerdings Temozolomid als Monotherapie eine Rolle. Vincristin wirkt als Spindelgift zellzyklusspezifisch in der Mitose-Phase. Procarbazin, Nitrosoharnstoffe und Temozolomid sind als Alkylanzien alle der zellzyklusunspezifischen Gruppe zuzurechnen. Untersucht wurden daher Vincristin und BCNU.

2

Materialien und Methoden

2.1 Tumorzelllinien

Die humanen Gliomzelllinien U373-MG und U87-MG und die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Alle Zelllinien wurden standardmäßig in mit 10%igem Kälberserum (FBS), nicht-essentiellen Aminosäuren, Vitaminen und Antibiotika-Antimykotika angereicherter MEM (minimum essential medium von Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein (Deutschland)) gezüchtet.

2.1.1 Induzierbare Subklone

Mit dem von Gossen und Bujard (Gossen und Bujard, 1992) beschriebenen, Tetrazyklin-kontrollierten Expressionssystem wurden von Simon et al. Gliomzelllinien mit induzierbarer p16-Expression hergestellt (Simon et al., 1999). Durch Zugabe von Tetrazyklin zum Nährmedium kann die p16-Expression in diesen Zelllinien reversibel unterdrückt werden. Als Selektionsmedium für die Transfektion des induzierbaren Systems wurde Neomycin verwendet. In Neomycin- und Tetrazyklin-haltigem Medium, das im weiteren NeoTet oder Suppressionsmedium genannt wird, ist daher keine p16-Proteinexpression zu erwarten, während in ausschließlich Neomycin-haltigem, das analog als Neo oder Anschlagmedium bezeichnet wird, mit einer p16-Expression zu rechnen ist. Für die hier beschriebenen Analysen wurden die Zelllinien U87+p16tTA und U373+p16tTA verwendet.

Charakterisierung des An- und Abschaltverhaltens von U87+p16tTA- und U373+p16tTA-Zellen mit induzierbarer p16-Expression

Zur Analyse des Anschlagverhaltens wurden induzierbare Zellen in NeoTet-Medium ausgesät und 24 Stunden später das Medium durch Neo ersetzt und zum ersten Mal Protein isoliert. Nach einer, zwei, vier, acht, zwölf, 24, 36, 48, 72, 96 und 144 Stunde(n) wurde erneut Protein isoliert. Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde bestimmt, und äquivalente Proteinmengen wurden zur Proteinelektrophorese eingesetzt. Nach

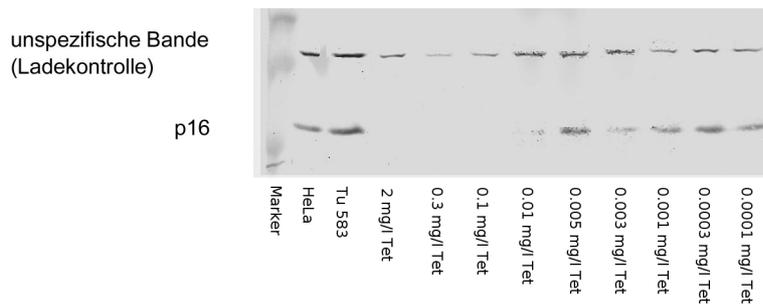


Abbildung 1: Titrierbarkeit des p16-Expressionsniveaus in Abhängigkeit von der Tetrazyklinkonzentration in U87+p16tTA-Zellen (HeLa=p16 exprimierende Zervixkarzinomzelllinie als Positivkontrolle; Tu 583=p16 exprimierender Tumor als Positivkontrolle; Tet=Tetrazyklin) (Köster und Simon, unveröffentlichte Abbildung)

doppelter Immunoblotfärbung in Western-Blot-Technik mit Anti-p16-Antikörper ließ sich semiquantitativ die p16-Expression zum Zeitpunkt der Proteinisolierung bestimmen.

Zur Analyse des Abschaltverhaltens wurden induzierbare Zellen eine Woche in Neo-Medium kultiviert, dann (zum Zeitpunkt $t = -1d$) wurde erstmals Protein isoliert und 24 Stunden später das Medium gewechselt und bei der Hälfte der Kulturschalen durch NeoTet ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt ($t = 0d$), nach zwölf, 24, 36 und 48 Stunden sowie nach drei, vier, sechs, acht, zehn und zwölf Tagen wurde jeweils in beiden Gruppen wiederum Protein isoliert. Die Western-Blot-Analyse wurde auch hier nach dem beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Abhängigkeit des p16-Expressionsniveau von der Tetrazyklinkonzentration in induzierbaren U87+p16tTA- und U373+p16tTA-Zellen

Nach den in der Arbeitsgruppe erhobenen Daten (Simon *et al.*, 1999), bei denen semiquantitativ die p16-Expression in U87+p16tTA- und U373+p16tTA-Zellen mittels Western-Blot-Analyse in Abhängigkeit von der Tetrazyklinkonzentration im Medium bestimmt wurde, ist in den verwendeten induzierbaren Zelllinien die p16-Expression titrierbar (Abbildungen 1, 2 und 3 auf den Seiten 19 und 20).

Bei einer Tetrazyklinkonzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ mg/l ist in beiden Zelllinien eine ungefähr halbmaximale p16-Expression zu beobachten. Im Anhaltmedium wurde daher eine geringe restliche Tetrazyklinkonzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ mg/ml eingestellt, um ein mittleres p16-Expressionsniveau einzustellen, welches in etwa mit der p16-Expression in den als Kontrollen mitgeführten Zelllinien HeLa und der U373-MG-Stammzelllinie vergleichbar ist. Diese enthalten keine INK4A-Mutationen und können daher als Modell eines p16-exprimierenden Tumors gelten (Simon *et al.*, 1999).

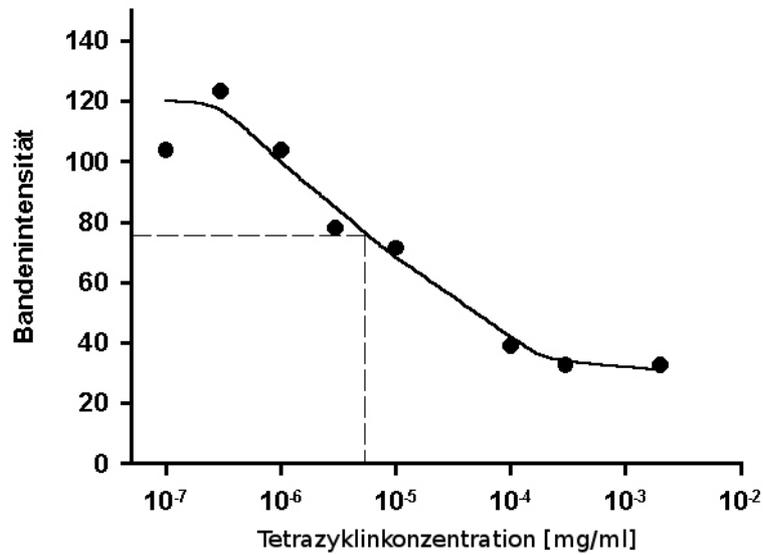


Abbildung 2: Titrierbarkeit des (semiquantitativ mit einem digitalen Bildauswerter bestimmten) p16-Expressionsniveaus in U87+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der Tetrazyklkonzentration im Medium (Köster und Simon, unveröffentlichte Abbildung)

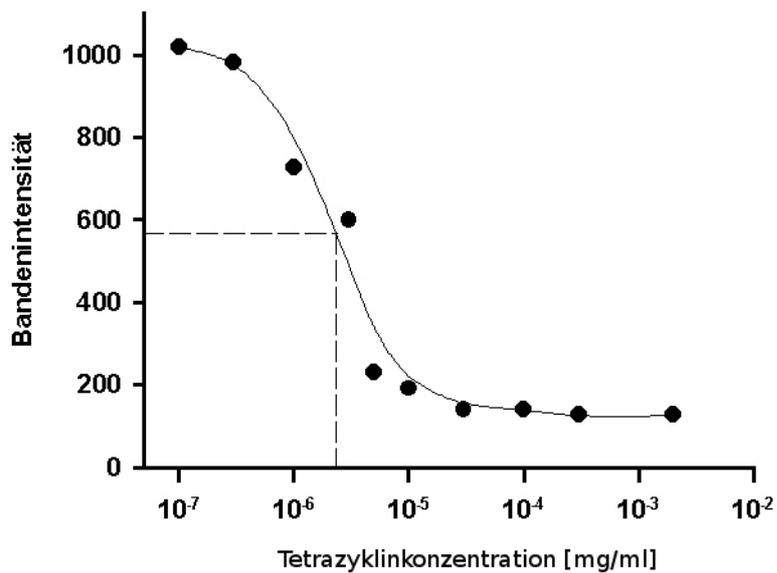


Abbildung 3: Titrierbarkeit des (semiquantitativ mit einem digitalen Bildauswerter bestimmten) p16-Expressionsniveaus in U373+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der Tetrazyklkonzentration im Medium (Simon et al., 1999)

2.2 Zytostatika

Vincristin wurde als "Vincristin Liquid, Lilly" von Lilly, Gießen, bezogen. BCNU (Carmustin) wurde als "Carmubris" von Bristol-Myers Squibb, München, bezogen.

2.3 Western Blot

2.3.1 Verwendete Reagenzien

- Protein-Lysepuffer: 0.25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P-40 (Nonylphenylpolyethylene glycol), 0.02% NaN_3 , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin A , 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF
- SDS-PAGE-Ladepuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 6.8) plus 4% SDS, 2% Mercaptoethanol, 0.2% Bromphenolblau, 20% Glycerin
- Tris-HCl-Puffer für Sammelgel 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)
- Tris-HCl-Puffer für Trenngel 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)
- Elektrophorese-Puffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0.5% (w/v) SDS
- Transfer-Puffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20% Methanol (pH ca. 8.3)
- TBS: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl
- Tween-TBS: TBS plus 0.1% Tween 20
- Block-Puffer: Tween-TBS (s.o.) plus 5% Trockenmilch (BioRad, München)
- Antikörper-Puffer: Tween-TBS plus 0.1% Rinderserumalbumin
- Wasch-Puffer: Tween-TBS plus 0.25% Trockenmilch
- BCIP = 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-Phosphat (AP-Substrat)
- NBT = Nitroblautetrazolium

Die Chemikalien wurden bezogen von Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Methanol von Merck, Darmstadt.

- Antikörper: monoklonaler Maus-anti-Human-p16-Antikörper (Pharmingen, San Diego, CA, USA), Ziege-anti-Maus-IgG AP-konjugiert (Jackson, West Grove, PA, bezogen über Dianova, Hamburg)

2.3.2 Verfahren

Die kultivierten Zellen wurden mit Serum-freiem Medium gewaschen, in möglichst wenig Protein-Lysepuffer (100 μ l pro 3.5-cm-Schale) gesammelt, mit einem Ultraschallhomogenisator unter Kühlung mit Eis für 30 Sekunden lysiert und 20 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert. Nach der photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration in den Überständen mit Hilfe des Bicinin-Säure-Assays (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden die Proben bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Für die SDS-PAGE (Natrium-Dodecyl-Sulfat/Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) wurden Aliquots entsprechend 30 μ g Protein 1:1 mit SDS-PAGE-Ladepuffer gemischt, zehn Minuten lang bei 90°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Zusammen mit einem vorgefärbten Molekulargewichtsstandard (Kaleidoscope Prestained Standard, BioRad, München) wurden die Proben auf SDS-PAGE-Gele geladen [Sammelgel: 4% AA / Bis-AA (19:1) in 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) plus 1% SDS; Trenngel: 15% AA / Bis-AA (19:1) in 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) plus 1% SDS] und für 90 Minuten bei 60-70 mA elektrophoretisch getrennt. Durch Elektroblothen in Transferpuffer für zwei Stunden bei 100 Volt im Kühlraum wurden sie auf PVDF-Membranen übertragen. Die Membranen wurden zur Fixierung der Proteine etwa 10 Sekunden lang mit Methanol behandelt, 15 Minuten an der Luft getrocknet und in Block-Puffer für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Dann wurden sie über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen Maus-anti-Human p16-Antikörper (1:500 verdünnt in Antikörper-Puffer) sowie, nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer, mit dem AP-konjugierten Ziege-anti Maus IgG (1:2000 verdünnt in Antikörper-Puffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur) inkubiert. Die Banden wurden mit NBT-BCIP unter Sichtkontrolle entwickelt und mit einem digitalen Bildauswerter semiquantitativ analysiert. Als Maß für die relative Bandenstärke dienten Fläche und Farbintensität der Banden, die mit dem Alpha-Innotec-Imager bestimmt wurden.

2.4 Transfektion von U87-MG-Zellen mit pBabe+p14/ARF- und pBabePuro-Vektoren und Züchtung monoklonaler Subklone

Die Transfektion der Zellen wurde mit Lipofectin (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) nach Herstellerangaben unter optimierten Bedingungen durchgeführt: 10^5 Zellen pro 3.5 cm-Schale wurden mit 2-4 μ l Lipofectin und 2 μ g (mit ScaI linearisierter) pBabePuro-p14/ARF-Plasmid-DNA in 2 ml OptiMEM (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) für 12-24 Stunden inkubiert. Transfektionen mit äquimolaren Mengen pBabePuro wurden als Negativkontrolle benutzt. Zur Regeneration und Vermehrung wurden die Zellen zunächst in Normalmedium (MEM) ausgesät. Nach 48-72 Stunden wurden die Zellen in 4 μ g/ml Puromycin enthaltendes Selektionsmedium umgesetzt, um die effektiv transfizierten Zellen, welche die für die Puromycin-Resistenz kodierende DNA enthalten, zu selektieren. Aus einzelnen Zellen, die in Puromycin-Selektionsmedium überlebten, wurden monoklonale Subklone gezüchtet.

2.5 RT-PCR

Die Gesamt-RNA wurde mithilfe von Trizol (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) isoliert. Mit dem "SuperScript II Reverse Transcriptase Kit" (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) wurde Einzelstrang-cDNA synthetisiert. Die Bedingungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden mit Hilfe des Optimizer Kits (Invitrogen, Leek, Niederlande) in Bezug auf pH-Wert, Magnesium-Konzentration und "Annealing"-Temperatur optimiert.

Eine Standard-PCR enthielt "Optimizer-Puffer F" (pH 9.0) mit einer 2.0 mM Magnesium-Endkonzentration, 0.2–0.5 ng Einzelstrang-cDNA, 0.5–1.0 pmol jedes Primers, 5% DMSO, 0.25mM dNTP's und 0.2 U Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim, Deutschland). Als Primer für die RT-PCR-Analyse der p14/ARF-Expression wurden die Nukleotidsequenzen 5'-GAG TGA GGG TTT TCG TGG TTC-3' und 5'-AGC TCC TCA GCC AGG TCC AC-3' verwendet. Es wurden 37 Zyklen mit "Annealing" bei 58°C für 40 Sekunden und mit "Extention" bei 72°C für 60 Sekunden durchgeführt.

2.6 Klonogenitätsmessung durch MTS-Assay

Von den Mikrotiterplatten wurden die Medien abgesaugt und diese einmal mit OptiMEM gespült. Zu den Zellen enthaltenden Vertiefungen und einer zusätzlichen Reihe als Reagenzienkontrolle wurden 100 μ l OptiMEM und 20 μ l nach Herstellerangaben angesetzte kombinierte MTS/PMS-Lösung aus dem "CellTiter 96[©] Aqueous-Kit" (Promega, Madison, WI, USA) pipettiert. Die Platten wurden zwischen einer und vier Stunden bei 37°C vor Licht geschützt in befeuchteter 5%-CO₂-Atmosphäre inkubiert. Danach wurden die Reaktionen durch Zugabe von 25 μ l 10%iger SDS-Lösung gestoppt und in einem Mikrotiterplatten-Leser bei 490 nm die Extinktionen bestimmt. Die mit dem MTS-Assay ermittelten Extinktionswerte repräsentieren keine absoluten Zellzahlen, sondern verhalten sich lediglich innerhalb eines Experimentes proportional zur Zahl der noch lebenden Zellen.

2.7 Vergleich von Zytostatikawirkungen

2.7.1 Vorüberlegungen zur Erstellung von Dosiswirkungsbeziehungen

Um Zytostatikawirkungen in vitro zu vergleichen, bietet sich die Erstellung von Dosiswirkungskurven an, bei denen die relative Überlebensrate der Zellen gegen die Zytostatikadosis aufgetragen wird. Im Idealfall erwartet man sigmoidale Kurven, die auf der Abszisse gegeneinander verschoben sind. Durch die graphische Bestimmung der halbmaximalen Hemmdosen in diesen Kurven kann diese Verschiebung und damit die Größe des Effekts auf die Zytostatikasensitivität veranschaulicht werden. Von klinischer Relevanz wäre ein Effekt der im Bereich der erreichbaren Tumorgewebekonzentrationen von Vincristin und BCNU läge, zu deren Abschätzung vereinfachend die maximal erreichbaren Plasmakonzentrationen herangezogen wurden (Jackson Jr. *et al.*, 1981; Levin *et al.*, 1978; Newton *et al.*, 1999; Owellsen *et al.*, 1977).

Es sollte ein Dosisbereich beobachtet werden, der die in vivo erreichbare Plasmakonzentration beim Menschen einschließt und in dem mit hoher Wahrscheinlichkeit die halbmaximale Hemmdosis (ID_{50}) für die zu untersuchenden Zelllinien U373+p16tTA und U87+p16tTA liegt. Die erreichbaren maximalen Plasmakonzentrationen von Vincristin liegen im Bereich von $4 \cdot 10^{-4}$ mg/ml (Owells *et al.*, 1977) und die von BCNU im Bereich von $2 \cdot 10^{-3}$ mg/ml (Levin *et al.*, 1978). Bei in-vitro-Sensitivitätsprüfungen an Astrozytombiopsaten konnten bei Vincristinbehandlung halbmaximale Hemmdosen (ID_{50}) zwischen 10^{-10} und 10^{-6} mg/ml gemessen werden. Bei CCNU-Behandlung lagen diese für einige empfindliche Tumoren zwischen 10^{-4} und 10^{-3} mg/ml und für die restlichen deutlich über der erreichbaren Plasmakonzentration (Morgan *et al.*, 1983). Vor dem Hintergrund dieser Daten wurde für Vincristin ein Bereich von 10^{-8} bis 10^{-2} mg/ml und für BCNU ein Bereich $3 \cdot 10^{-4}$ bis $3 \cdot 10^{-1}$ mg/ml zur Beobachtung gewählt, der jeweils in sieben logarithmisch skalierte Dosisstufen eingeteilt wurde.

Da bei biologischen Prozessen wie dem Zellwachstum eine große Streuung zu erwarten ist, wurde pro Dosisstufe für die am Ende ermittelte Zellzahl der Mittelwert von acht Kulturschalen zugrunde gelegt. Bei sieben Dosisstufen zuzüglich der Nullkontrolle ohne Zytostatikum und der zelloosen Reagenzienkontrolle für den MTS-Assay ergaben sich somit pro Zelllinie und Zytostatikum 72 Kulturschalen. Am einfachsten ist eine solche Zahl auf 96er-Mikrotiterplatten unterzubringen, die zudem die Möglichkeit bieten, den zur Auswertung zu verwendenden MTS-Assay sehr effizient ohne zusätzliche Fehlerquellen mit einem Mikrotiterplatten-Leser abzulesen und zu dokumentieren.

Allerdings ergeben sich durch die Verwendung von Mikrotiterplatten auch Probleme, die direkt aus der geringen Größe der einzelnen Vertiefungen resultieren. Zunächst muss verhindert werden, dass Vertiefungen zu voll wachsen. Wenn nämlich in nur einer Subpopulation (erwartungsgemäß am ehesten in der zytostatikaloosen Nullkontrolle) ein ungestörtes Zellwachstum nicht mehr gewährleistet ist, weil das Verhältnis zwischen Nährstoffangebot und Zellzahl nicht mehr optimal ist bzw. die Nährstoffversorgung von Teilen der Population mechanisch behindert wird oder je nach verwendetem Klon Kontaktinhibitionseffekte auftreten, wäre die gesamte Dosiswirkungskurve verfälscht und nicht zu verwenden. Mit brauchbaren Ergebnissen ist also nur zu rechnen, wenn sich alle im Experiment verwendeten Zellpopulationen von der Aussaat bis zur Auswertung mittels MTS-Assay in exponentieller Wachstumsphase befinden. Die Zeit von der Aussaat bis zur Auswertung sollte daher so kurz wie möglich gehalten werden. Außerdem muss die Zellzahl, die ausgesät wird, für jede verwendete Zelllinie einzeln experimentell optimiert werden. Bei zu großer Zellzahl wird bei den Subpopulationen mit geringer Zytostatikadosis und insbesondere den Nullkontrollen die exponentielle Wachstumskinetik verlassen. Wird die Zellzahl zu gering gewählt, kann ein bei der Aussaat und bei Medienwechseln unvermeidlicher Verlust von lebendem Zellmaterial nicht ausreichend abgefangen werden, und der gesuchte Effekt wird im Verhältnis zu den gleich bleibenden Störeffekten und Fehlerquellen zu klein.

2.7.2 Erstellen eines optimierten Protokolls

Zellverlust durch Medienwechsel

Der unkontrollierte Verlust von Zellmaterial bei jedem Medienwechsel durch Absaugung ist bei 96er-Mikrotiterplatten beträchtlich. Zur Beurteilung des Zellverlusts als Fehlerquelle wurden jeweils 1000 Zellen von U373+p16tTA und U87+p16tTA in 80 Vertiefungen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde bei der Hälfte der Vertiefungen das Medium dreimal hintereinander zunächst mit normalem Pumpensog abgesaugt und dann erneuert. Nach wiederum 48 Stunden wurden die überlebenden Zellen durch MTS-Assay quantifiziert. Sowohl bei den U373+p16tTA- als auch bei den U87+p16tTA-Zellen ging dabei durch die Medienwechsel im Vergleich zur Kontrollgruppe bis zu 80% des Zellmaterials verloren. Außerdem nahm die Standardabweichung im Verhältnis zum Mittelwert bei U373+p16tTA-Zellen von 6% auf 20% und bei U87+p16tTA-Zellen von 15% auf 29% zu.

Nachdem beim Absaugen die Sogstärke reduziert und im Rahmen der Protokolloptimierung die Zahl der Medienwechsel auf ein Minimum reduziert wurde, konnten deutlich geringere Streuungen der gemessenen Extinktionswerte erreicht werden.

Klonogenitätseffekte der Zielgene

Für beide zu untersuchenden Proteine p16 und p14/ARF wurde bereits ein wachstumshemmender Effekt auf Gliomzellen *in vitro* nachgewiesen. Die Zahl der koloniebildenden Einheiten sank acht Tage nach Aktivierung der p16-Expression im induzierbaren tTA-System durch Tetrazyklin-Entzug hochsignifikant gegenüber den Kontrollgruppen für U373+p16tTA unter 35% und für U87+p16tTA unter 15% (Simon *et al.*, 1999).

In U87-MG-Zellen konnten drei bis vier Wochen nach Transfektion mit pBabe+p14/ARF ca. 90% weniger koloniebildende Einheiten als nach Transfektion mit pBabePuro gezählt werden. In Zelllinien mit mutiertem p53 war der wachstumshemmende Effekt weniger stark ausgeprägt (Simon *et al.*, 1999).

Von Zellen, in denen diese Gene exprimiert werden, ist also ein deutlich geringeres Zellwachstum zu erwarten. Daher wurden die unter Zytostatikabehandlung gemessenen Zellzahlen jeweils prozentual zu Kontrollen ohne Zytostatikaexposition ins Verhältnis gesetzt.

Aktivierung des induzierbaren tTA-Systems

Bei den induzierbaren Zelllinien wurde das $2 \cdot 10^{-3}$ mg/ml Tetrazyklin enthaltende Suppressionsmedium 24 Stunden nach der Aussaat entfernt und in der Gruppe mit p16-Expression durch Medium mit einer Rest-Tetrazyklinkonzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ mg/ml ersetzt, sodass eine ungefähr halbmaximale p16-Expression eingestellt war (\rightarrow Seite 19). In der Vergleichsgruppe ohne p16-Expression wurde wieder Suppressionsmedium zugegeben. Der gesuchte, die Zytostatikawirkung modulierende, p16-Effekt kann erst beobachtet werden, nachdem sowohl eine ausreichende p16-Expression erreicht ist als auch die Zytostatikaexposition begonnen wurde. Der störende wachstumshemmende p16-Effekt manifestiert sich jedoch unabhängig von der Zytostatikaexposition mit Beginn der p16-Expression. Die Zytostatikaexposition sollte daher möglichst zeitgleich

mit dem Erreichen einer ausreichenden p16-Expression beginnen, damit einerseits während der gesamten Expositionszeit p16 ausreichend exprimiert wird und andererseits der störende wachstumshemmende p16-Effekt minimiert wird. Die Zeit bis zum Beginn der Zytostatikaexposition musste daher dem individuellen Anschaltverhalten (\rightarrow Seite 29) der induzierbaren Zelllinien angepasst werden.

Während bei U373+p16tTA nach 24 Stunden eine ausreichende p16-Expression zu beobachten war, war das bei U87+p16tTA erst nach 72 Stunden der Fall (\rightarrow Seite 29). Entsprechend wurde je nach Zelllinie 24 bzw. 72 Stunden gewartet.

In einem Vorversuch wurden jeweils 7000 Zellen von U87+p16tTA in 36 Kulturschalen und jeweils 4000 Zellen von U373+p16tTA in 36 Kulturschalen in Suppressionsmedium ausgesät. Dann wurde pro Zelllinie in jeweils 24 Kulturschalen dem Zeitplan entsprechend das induzierbare System angeschaltet, während in jeweils zwölf Kulturschalen das Suppressionsmedium nur gewechselt wurde. Nach 72 Stunden bei U87+p16tTA und 24 Stunden bei U373+p16tTA wurde die Zellzahl durch MTS-Assay verglichen.

Durch die p16-vermittelte Wachstumshemmung lagen die Zellzahlen bei den p16 exprimierenden Gruppen nach dieser Wartezeit für U87+p16tTA bei 70% der Zellzahlen der p16 nicht exprimierenden Vergleichsgruppe. Für U373+p16tTA lagen sie bei 73% der Vergleichsgruppe. Die Standardabweichungen lagen dabei zwischen fünf und neun Prozent der Mittelwerte.

Zytostatikaexposition und Erholungszeit

Nach der jeweils notwendigen Wartezeit wurde das Medium entfernt und unter Beachtung der erforderlichen Sicherheitsvorkehrungen durch ein Medium mit Zytostatikazusatz in den gewünschten Dosisstufen zuzüglich der Nullkontrolle ohne Zytostatikazusatz ersetzt. Dann musste so lange gewartet werden, bis mindestens ein Zellzyklus durchlaufen war. Nach der Zytostatikaexposition wurde den Zellen eine Erholungszeit eingeräumt, damit sich der eigentliche zytostatische Späteeffekt manifestieren konnte. Zellen, die durch den genetischen Schaden zwar nicht abgetötet wurden, die aber ihre Teilungsfähigkeit verloren hatten, sollten dann im Kollektiv der nach wie vor teilungsfähigen Zellen untergehen. Nach dem Ende der Expositionszeit wurde daher das zytostatikahaltige Medium entfernt und gegen zytostatikafreies Medium ersetzt. Je länger die Zeit zwischen Beginn der Zytostatikaexposition und der abschließenden Messung gewählt würde, desto deutlicher würde sich ein p16-Effekt auswirken. Andererseits musste die Gesamtexperimentdauer aus genannten Gründen (p16-vermittelte, konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Wachstumseffekte durch zunehmende Zelldichte) kurz gehalten werden.

Bei U373+p16tTA liegt in der langsamer wachsenden Gruppe mit p16-Expression die mittlere Verdopplungszeit und damit die Zellzykluslänge bei 32 Stunden. Für U87+p16tTA konnten jedoch ca. 70 Stunden gemessen werden (Köster und Simon, unveröffentlicht). Es wurden daher im Rahmen der Optimierung des Protokolls zwei Zeitpläne mit Expositionszeiten von 48 und 96 Stunden bei Erholungszeiten von jeweils 48 Stunden miteinander verglichen. Bei der längeren Expositionszeit war zur Sicherstellung einer ausreichenden Nährstoffversorgung nach 48 Stunden ein zusätzlicher Medienwechsel erforderlich. Im Ergebnis führte der längere Zeitplan zu inakzeptabel großen Streuungen der gemessenen Zellzahlen, mögli-

cherweise mitverursacht durch den zusätzlichen Medienwechsel. In den Gruppen ohne p16-Expression konnte außerdem bei 96 Stunden Exposition zum Teil ein Vollaushängen der Kulturschalen und somit ein Verlassen der exponentiellen Wachstumskinetik beobachtet werden. Daher wurde für beide Zelllinien ein Zeitplan mit 48 Stunden Expositionszeit und 48 Stunden Erholungszeit gewählt. Während der Gesamtzeit von 96 Stunden durchlief U373+p16tTA nach den vorliegenden Messungen zur Zellzykluslänge also ungefähr drei Zellzyklen und U87+p16tTA mindestens einen. Die noch teilungsfähigen Zellen müssten also gegenüber den nicht teilungsfähigen nach 96 Stunden einen Klonogenitätsvorteil um den Faktor acht für U373+p16tTA und um mindestens Faktor zwei für U87+p16tTA haben.

Optimierung der auszusäenden Anfangskonzentrationen

Nach dem beschriebenen Zeitplan ergab sich für die U87+p16tTA-Zellen von der Aussaat bis zur Messung mittels MTS-Assay eine Gesamtexperimentdauer von acht Tagen. Bei der Kultivierung unterschiedlicher Konzentrationen von U87+p16tTA-Zellen über diesen Zeitraum erwies sich eine Anfangskonzentration von 1000 Zellen pro Vertiefung als optimal. Für die U373+p16tTA-Zellen konnte analog für eine Gesamtexperimentdauer von sechs Tagen eine optimale Anfangskonzentration von 5000 Zellen pro Vertiefung ermittelt werden. Bei den U87+pBabePuro(+p14/ARF)-Subklonen ergab sich eine Gesamtexperimentdauer von fünf Tagen, weil kein induzierbares System aktiviert werden musste. Die optimale Anfangskonzentration wurde unter Berücksichtigung der Optimierungsergebnisse für U87+p16tTA und der Verdopplungszeiten der U87-MG-Stammlinie auf 5000 festgelegt.

Zellen der zu vergleichenden Klone wurden trypsiniert und aufgeschwemmt. Die Konzentration lebender Zellen wurde jeweils in drei exemplarisch gewonnenen mit Trypan-Blau gefärbten Proben mit je zwei Zählkammer-Füllungen mikroskopisch bestimmt. Aus dem Mittelwert wurde die für die optimale Anfangskonzentration notwendige Verdünnung mit (Selektiv-)Medium errechnet und die Zellsuspension auf Mikrotiterplatten ausgesät.

Optimierte Protokolle

U373+p16tTA

Zeitpunkt

0h	Aussaat von 5000 Zellen pro Vertiefung in Suppressionsmedium (NeoTet)
24h	Medienwechsel mit Aktivierung des p16-tTA-Systems: Suppressionsmedium (NeoTet) für p16-aus-Zellen Anschaltmedium (Neo+5·10 ⁻⁶ mg/ml Tetrazyklin) für p16-an-Zellen
48h	Medienwechsel mit Zytostatikazusatz im jeweiligen Medium
96h	Medienwechsel mit zytostatikalosem Medium
144h	MTS-Assay

U87+p16tTA

Zeitpunkt

0h	Aussaat von 1000 Zellen pro Vertiefung in Suppressionsmedium (NeoTet)
24h	Medienwechsel mit Aktivierung des p16-tTA-Systems: Suppressionsmedium (NeoTet) für p16-aus-Zellen Anschaltmedium (Neo+ $5 \cdot 10^{-6}$ mg/ml Tetrazyklin) für p16-an-Zellen
96h	Medienwechsel mit Zytostatikazusatz im jeweiligen Medium
144h	Medienwechsel mit zytostatikalosem Medium
168h	MTS-Assay

U87+pBabePuro- und U87+pBabe+p14/ARF-Subklone

Zeitpunkt

0h	Aussaat von 5000 Zellen pro Vertiefung in Selektionsmedium (Puro)
24h	Medienwechsel mit Zytostatikazusatz im Medium
72h	Medienwechsel mit zytostatikalosem Medium
120h	MTS-Assay

2.7.3 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde der t-Test für unverbundene Stichproben mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von fünf Prozent (zweiseitig) eingesetzt. Bei der Vincristintherapie der induzierbaren U373+p16tTA- und U87+p16tTA-Zellen wurden bei den Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-4} mg/ml die relativen Überlebensraten jeweils mit und ohne p16-Expression gegeneinander getestet. Bei der BCNU-Therapie wurde bei den Konzentrationen 10^{-3} und $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml getestet. Für die U87+pBabe+p14/ARF- und U87+pBabePuro-Subklone wurden bei den entsprechenden Konzentrationen Mittelwerte der relativen Überlebensraten der beiden Gruppen gebildet und gegeneinander getestet.

3

Ergebnisse

3.1 Analyse der p16-Expression in induzierbaren U87+p16tTA- bzw. U373+p16tTA-Zellen und der p14/ARF-Expression in U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen

3.1.1 Zeitliches Profil der p16-Expression in induzierbaren U373+p16tTA- und U87+p16tTA-Zellen nach Tetrazyklinenzug

In U373+p16tTA zeigte sich acht Stunden nach Anschalten des induzierbaren Systems eine monoton steigende p16-Expression, die ihr Maximum nach 24 Stunden erreichte (Abbildung 4 auf Seite 29). Für U87+p16tTA konnte erst nach 72 Stunden eine p16-Expression beobachtet werden, die ihr Maximum nach 96 Stunden erreichte. Die maximale p16-Expression lag sowohl bei U373+p16tTA als auch bei U87+p16tTA höher als die maximale p16-Expression der als Positivkontrolle mitgeführten HeLa-Zelllinie. Die Daten wurden vorab veröffentlicht (Simon *et al.*, 1999).

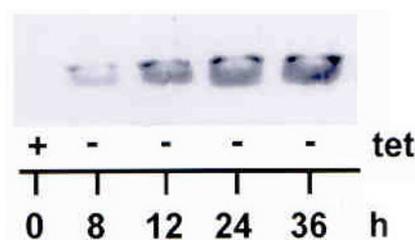


Abbildung 4: Induktion der p16-Expression durch Tetrazyklinenzug in U373+p16tTA-Zellen. 8 Stunden (h) nach dem Tetrazyklinenzug (tet -) kann eine p16-Expression nachgewiesen werden, die ihr Maximum nach 24 Stunden erreicht (Abbildung vorab veröffentlicht in Simon *et al.*, 1999).

3.1.2 Zeitliches Profil der p16-Expression in induzierbaren U373+p16tTA- und U87+p16tTA-Zellen nach erneuter Tetrazyklinzugabe

Neben der Bestätigung des Answitchverhaltens zeigte sich in der Neo-Kontrollgruppe, dass die p16-Expression über den gesamten Beobachtungszeitraum also mindestens zwölf Tage konstant bleibt. In den in NeoTet kultivierten U373+p16tTA-Zellen war zwölf Stunden nach dem Abschalten des induzierbaren Systems eine verringerte und 36 Stunden danach keine p16-Expression mehr nachweisbar (Abbildung 5 auf Seite 30). In den mit NeoTet kultivierten U87+p16tTA-Zellen war zwölf Stunden nach dem Abschalten eine auf 62% verringerte, 24 Stunden nach dem Abschalten eine auf 29% verringerte und 72 Stunden nach dem Abschalten keine p16-Expression mehr nachweisbar (Abbildung 6 auf Seite 31) (Simon *et al.*, 1999).

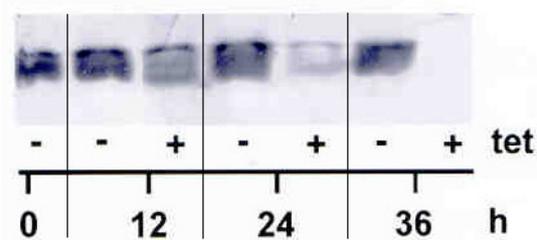


Abbildung 5: Suppression der p16-Expression durch Tetrazyklinzugabe in U373+p16tTA-Zellen. Im Vergleich zu den weiterhin im Medium ohne Tetrazyklinzusatz (tet -) wachsenden Zellen, führt die Zugabe von 2 µg/ml Tetrazyklin zum Medium (tet +) nach 12 Stunden (h) zu einer verringerten p16-Expression. 36 Stunden nach Tetrazyklinzugabe (tet +) ist keine p16-Expression mehr nachweisbar (Abbildung vorab veröffentlicht in Simon *et al.*, 1999).

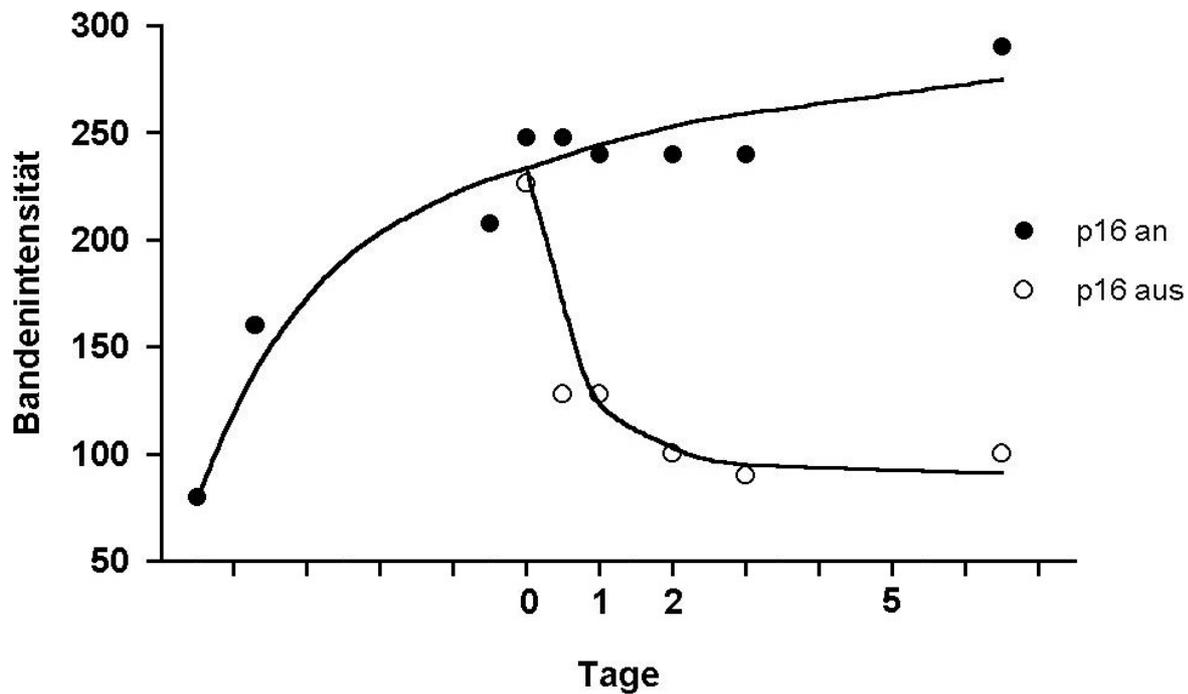


Abbildung 6: Semiquantitative Darstellung des zeitlichen Verlaufs der p16-Expression in U87+p16tTA-Zellen ohne Tetrazyklinzugabe (p16 an) und Abschaltverhalten mit Tetrazyklinzugabe zum Zeitpunkt $t=0d$ (p16 aus)

3.1.3 Nachweis der p14/ARF-Expression auf mRNA-Ebene in den transfizierten U87+pBabePuro+p14/ARF-Subklonen

In den Subklonen der mit pBabePuro+p14/ARF transfizierten Gruppe wurde RNA isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und durch PCR amplifiziert. In 13 von 16 Subklonen war dabei p14/ARF-cDNA in unterschiedlicher Konzentration nachweisbar. Besonders hoch war die Konzentration in den Subklonen 7, 10 und 12, die deshalb für die weitere Analyse ausgewählt wurden. Als Vergleich wurden die als Kontrolle mit pBabePuro transfizierten Subklone 1, 3 und 4 benutzt, die in puromycinhaltigem Selektionsmedium gut wachsen.

Ein direkter Nachweis der p14/ARF-Expression auf Proteinebene war mangels kommerziell verfügbarer Antikörper nicht möglich.

3.2 Vergleich von Zytostatikawirkungen in Abhängigkeit vom p16-Expressionsniveau in induzierbaren Gliomzelllinien

3.2.1 Behandlung von U373+p16tTA-Zellen mit Vincristin

Bei der Vincristinbehandlung von U373+p16tTA-Zellen konnte keine wesentliche Modulation der Zytostatikawirkung durch die p16-Expression beobachtet werden. Die Dosiswirkungskurven für beide Gruppen waren im Rahmen der biologischen Streuungen praktisch deckungsgleich. Die halbmaximalen Hemmdosen lagen um 10^{-4} mg/ml (Abbildung 7 auf Seite 33). Bei den getesteten Dosisstufen 10^{-4} und 10^{-5} mg/ml ergab sich kein signifikanter p16-Effekt (Abbildung 8 auf Seite 34) (Tabelle 1 auf Seite 32).

Vincristin-konzentration [mg/ml]	Relative Überlebensraten von U373+p16tTA-Zellen ohne p16-Expression [$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$]	Relative Überlebensraten von U373+p16tTA-Zellen mit p16-Expression [$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$]
0	1.00±0.11	1.00±0.09
10^{-8}	1.00±0.07	0.96±0.05
10^{-7}	0.69±0.06	0.86±0.05
10^{-6}	0.62±0.05	0.67±0.07
10^{-5}	0.55±0.05	0.61±0.03
10^{-4}	0.52±0.07	0.50±0.05
10^{-3}	0.49±0.04	0.45±0.04
10^{-2}	0.38±0.07	0.38±0.05

Tabelle 1: Relative Überlebensraten induzierbarer U373+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der Vincristinkonzentration ohne und mit p16-Expression (\bar{x} =Mittelwert, $\sigma_{\bar{x}}$ =Standardfehler des Mittelwertes). Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.

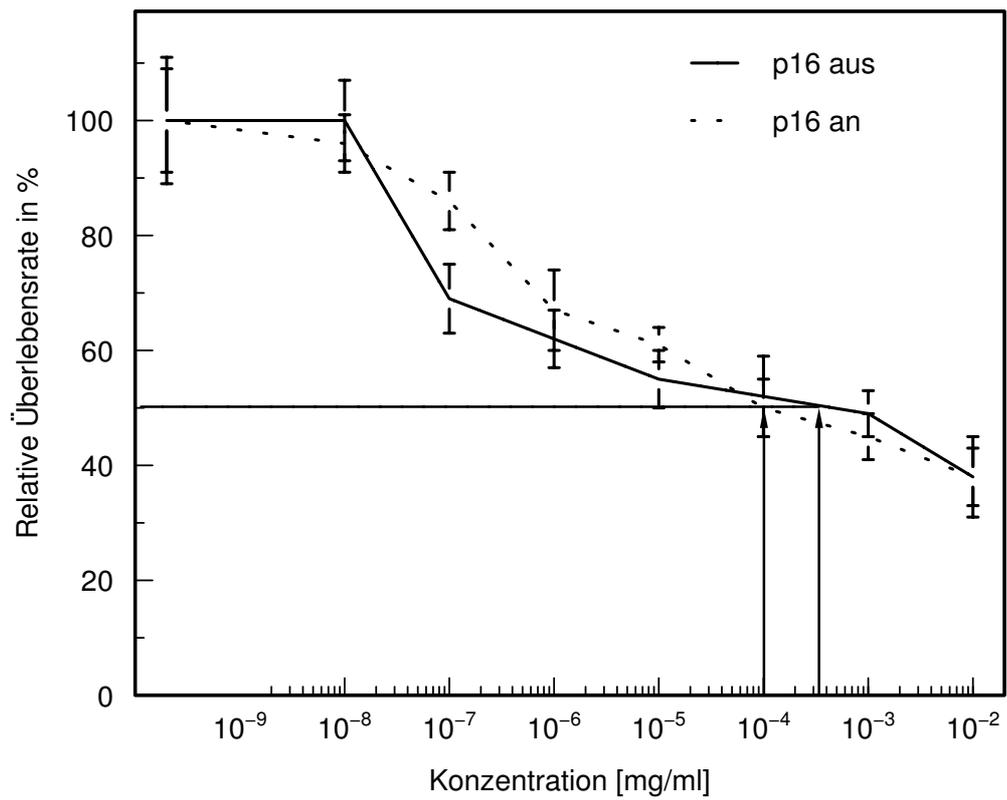


Abbildung 7: Relative Überlebensraten induzierbarer U373+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der Vincristinkonzentration ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Die halbmaximalen Hemmdosen lagen in beiden Fällen im Bereich einer Vincristinkonzentration von 10^{-4} mg/ml. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.

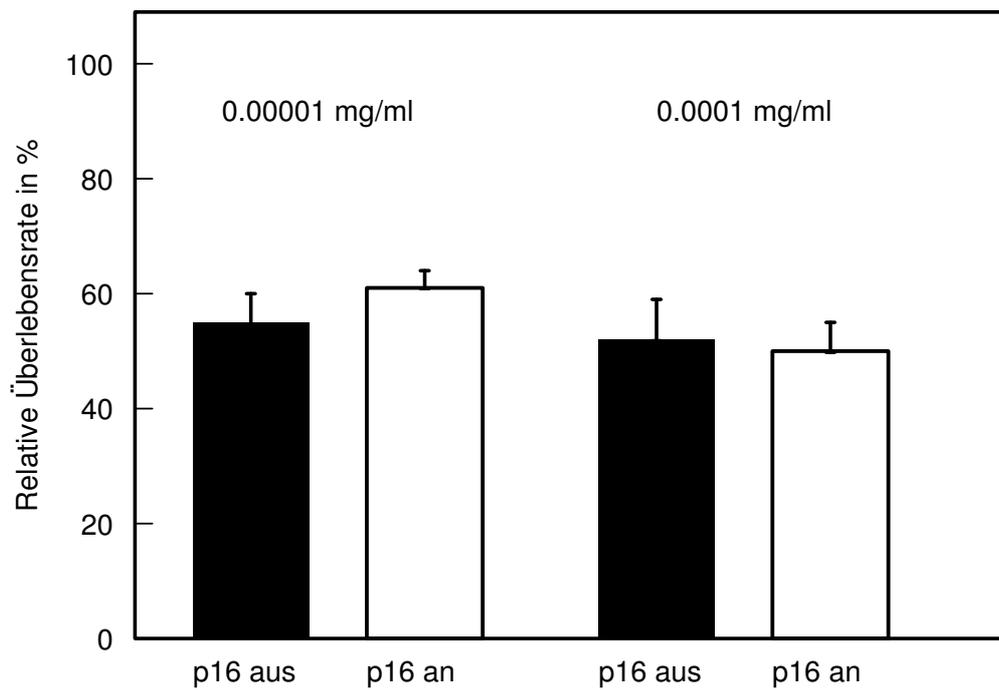


Abbildung 8: Relative Überlebensraten induzierbarer U373+p16tTA-Zellen unter Behandlung mit Vincristin bei den Dosisstufen 10^{-5} und 10^{-4} mg/ml ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.

3.2.2 Behandlung von U373+p16tTA-Zellen mit BCNU

Auch bei der BCNU-Therapie von U373+p16tTA-Zellen verliefen die Dosiswirkungskurven nahezu deckungsgleich. Die halbmaximalen Hemmdosen lagen im sehr hohen Dosisbereich zwischen 0.03 und 0.1 mg/ml (Abbildung 9 auf Seite 36). Bei den getesteten Dosisstufen von 10^{-3} und $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml ergab sich kein signifikanter p16-Effekt (Abbildung 10 auf Seite 37) (Tabelle 2 auf Seite 35).

BCNU-Konzentration [mg/ml]	Relative Überlebensraten von U373+p16tTA-Zellen ohne p16-Expression [$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$]	Relative Überlebensraten von U373+p16tTA-Zellen mit p16-Expression [$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$]
0	1.00±0.09	1.00±0.04
$3 \cdot 10^{-4}$	1.02±0.06	1.03±0.09
10^{-3}	0.99±0.10	0.99±0.05
$3 \cdot 10^{-3}$	0.89±0.07	0.88±0.03
10^{-2}	0.77±0.12	0.78±0.07
$3 \cdot 10^{-2}$	0.64±0.14	0.70±0.07
10^{-1}	0.04±0.07	0.27±0.05
$3 \cdot 10^{-1}$	0.04±0.00	0.04±0.00

Tabelle 2: Relative Überlebensraten induzierbarer U373+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der BCNU-Konzentration (Carmustinkonzentration) ohne und mit p16-Expression (\bar{x} =Mittelwert, $\sigma_{\bar{x}}$ =Standardfehler des Mittelwertes). Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.

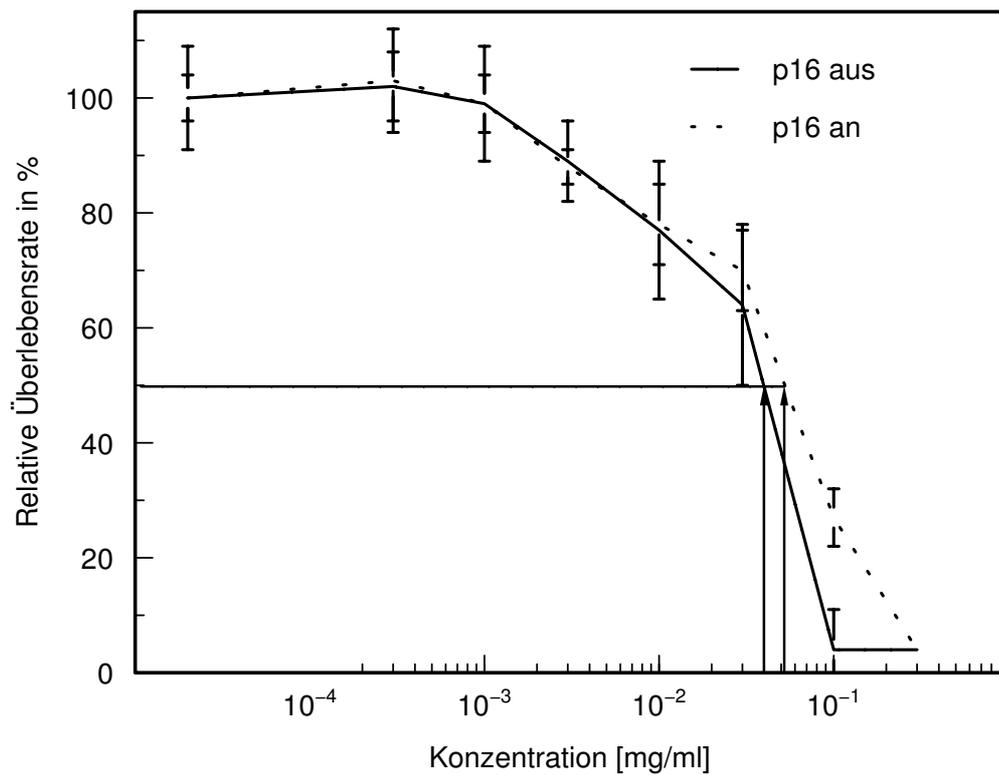


Abbildung 9: Relative Überlebensraten induzierbarer U373+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der BCNU-Konzentration (Carmustinkonzentration) ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Die halbmaximalen Hemmdosen lagen im sehr hohen Dosisbereich oberhalb von 0.03 mg/ml. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.

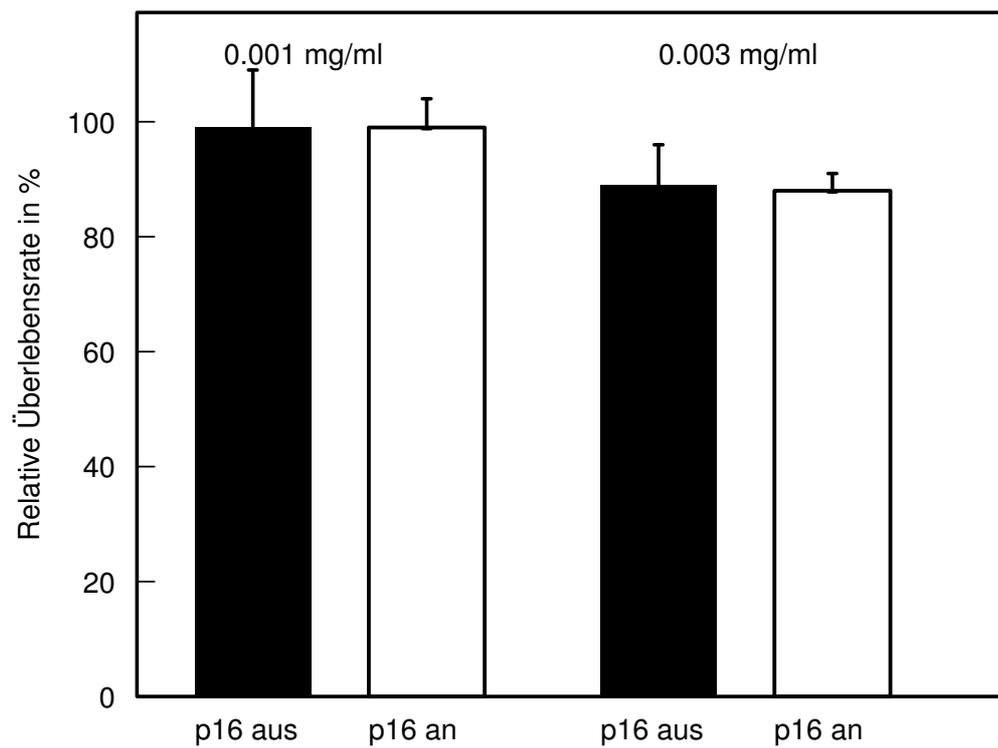


Abbildung 10: Relative Überlebensraten induzierbarer U373+p16tTA-Zellen unter Behandlung mit BCNU (Carmustin) bei den Dosisstufen 10^{-3} und $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.

3.2.3 Behandlung von U87+p16tTA-Zellen mit Vincristin

Bei der Vincristin-Therapie von U87+p16tTA-Zellen unterschied sich der Verlauf der Dosiswirkungskurven in Abhängigkeit vom p16-Status deutlich. Während die halbmaximale Hemmdosis ohne p16-Expression zwischen 10^{-8} und 10^{-7} mg/ml lag, lag sie bei p16-Expression zwischen 10^{-4} und 10^{-3} mg/ml (Abbildung 11 auf Seite 39). Bei den getesteten Dosisstufen 10^{-5} und 10^{-4} mg/ml war ein signifikanter p16-Effekt im Sinne einer Sensitivierung gegenüber Vincristin zu messen (Abbildung 12 auf Seite 40) (Tabelle 3 auf Seite 38).

Vincristin- konzentration [mg/ml]	Relative Überlebensraten von U87+p16tTA-Zellen ohne p16-Expression [$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$]	Relative Überlebensraten von U87+p16tTA-Zellen mit p16-Expression [$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$]
0	1.00±0.05	1.00±0.12
10^{-8}	0.81±0.06	0.62±0.21
10^{-7}	0.65±0.08	0.40±0.10
10^{-6}	0.65±0.08	0.32±0.12
10^{-5}	0.65±0.05 *	0.32±0.12 *
10^{-4}	0.54±0.07 *	0.23±0.10 *
10^{-3}	0.40±0.05	0.39±0.14
10^{-2}	0.37±0.04	0.22±0.07

Tabelle 3: Relative Überlebensraten induzierbarer U87+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der Vincristinkonzentration ohne und mit p16-Expression (\bar{x} =Mittelwert; $\sigma_{\bar{x}}$ =Standardfehler des Mittelwertes; ★=signifikant bei einem Signifikanzniveau von 5%). Bei den Dosisstufen 10^{-5} und 10^{-4} mg/ml ergab sich ein signifikanter Effekt im Sinne einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Vincristin durch p16.

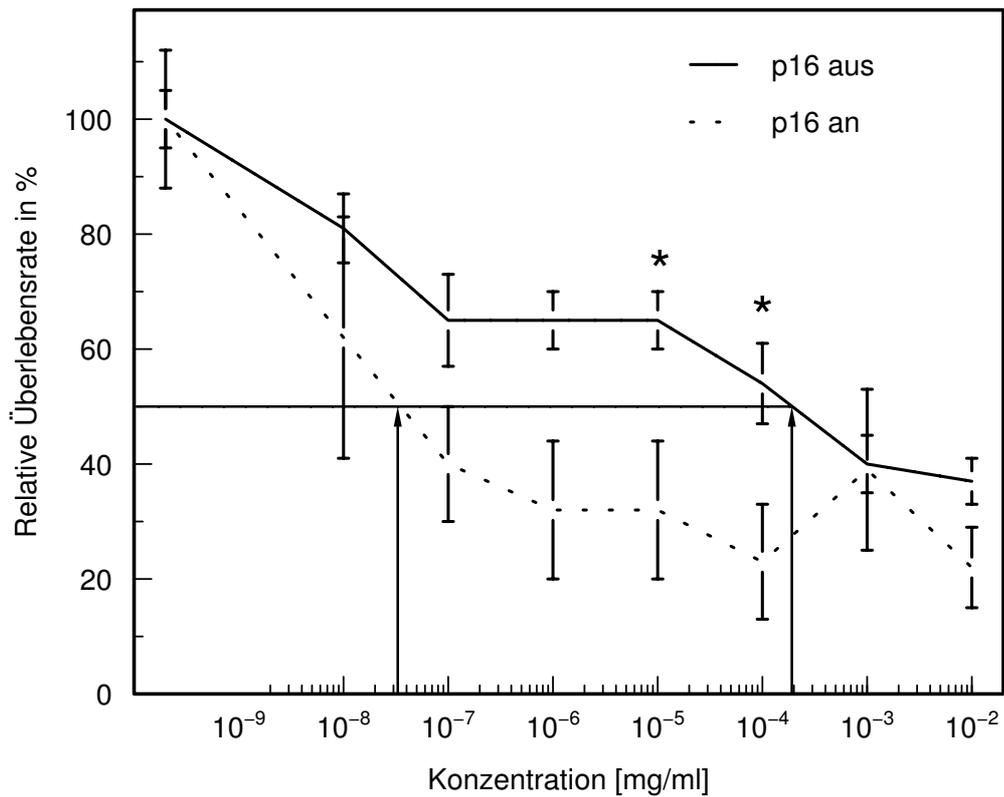


Abbildung 11: Relative Überlebensraten induzierbarer U87+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der Vincristindosis ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression (*=signifikant bei einem Signifikanzniveau von 5%). Die halbmaximale Hemmdosis ohne p16-Expression lag zwischen 10^{-8} und 10^{-7} mg/ml. Mit p16-Expression lag sie zwischen 10^{-4} und 10^{-3} mg/ml.

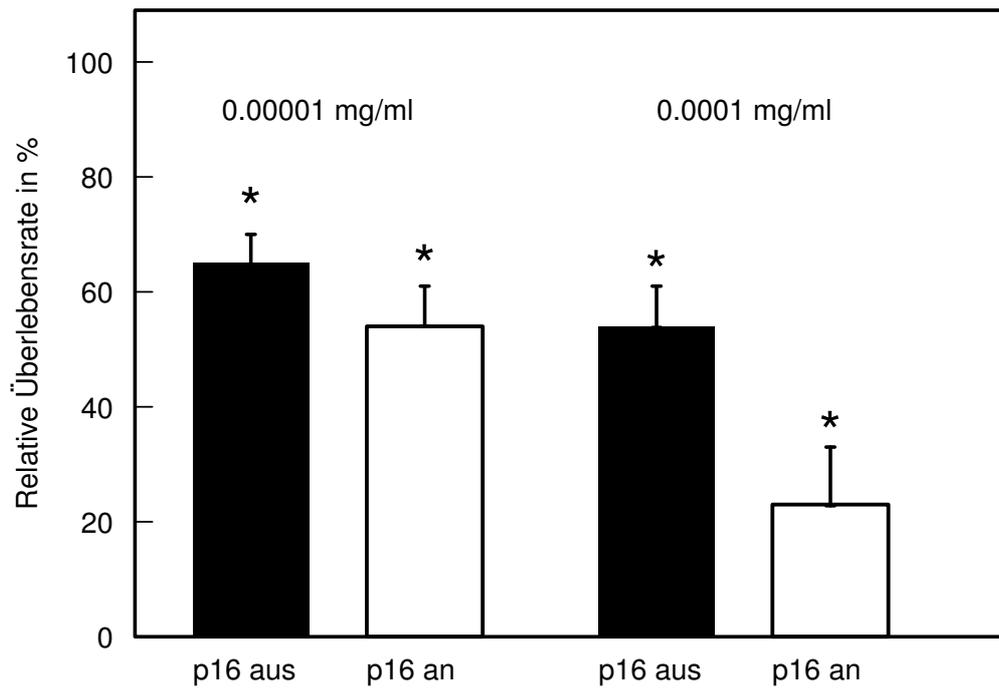


Abbildung 12: Relative Überlebensraten induzierbarer U87+p16tTA-Zellen unter Behandlung mit Vincristin bei den Dosisstufen 10^{-5} und 10^{-4} mg/ml ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression (*=signifikant bei einem Signifikanzniveau von 5%). Es ergab sich ein signifikanter Effekt im Sinne einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Vincristin durch p16 bei beiden Dosisstufen.

3.2.4 Behandlung von U87+p16tTA-Zellen mit BCNU

Auch bei der BCNU-Therapie schien p16 einen sensitivierenden Effekt auf die U87+p16tTA-Zellen zu entfalten. Die halbmaximalen Hemmdosen unterschieden sich jedoch um deutlich weniger als eine Zehnerpotenz (Abbildung 13 auf Seite 42), und bei den getesteten Dosisstufen 10^{-3} und $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml war dieser Effekt statistisch nicht signifikant (Abbildung 14 auf Seite 43) (Tabelle 4 auf Seite 41).

BCNU-Konzentration [mg/ml]	Relative Überlebensraten von U87+p16tTA-Zellen ohne p16-Expression [$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$]	Relative Überlebensraten von U87+p16tTA-Zellen mit p16-Expression [$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$]
0	1.00±0.07	1.00±0.26
$3 \cdot 10^{-4}$	0.95±0.04	0.70±0.14
10^{-3}	0.95±0.05	0.77±0.18
$3 \cdot 10^{-3}$	0.93±0.06	0.65±0.18
10^{-2}	0.91±0.09	0.57±0.18
$3 \cdot 10^{-2}$	0.88±0.05	0.56±0.17
10^{-1}	0.41±0.06	0.19±0.04
$3 \cdot 10^{-1}$	0.03±0.00	0.05±0.01

Tabelle 4: Relative Überlebensraten induzierbarer U87+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der BCNU-Konzentration (Carmustinkonzentration) ohne und mit p16-Expression (\bar{x} =Mittelwert, $\sigma_{\bar{x}}$ =Standardfehler des Mittelwertes). Der gemessene p16-Effekt im Sinne einer Sensitivierung der Zellen gegenüber BCNU war statistisch nicht signifikant.

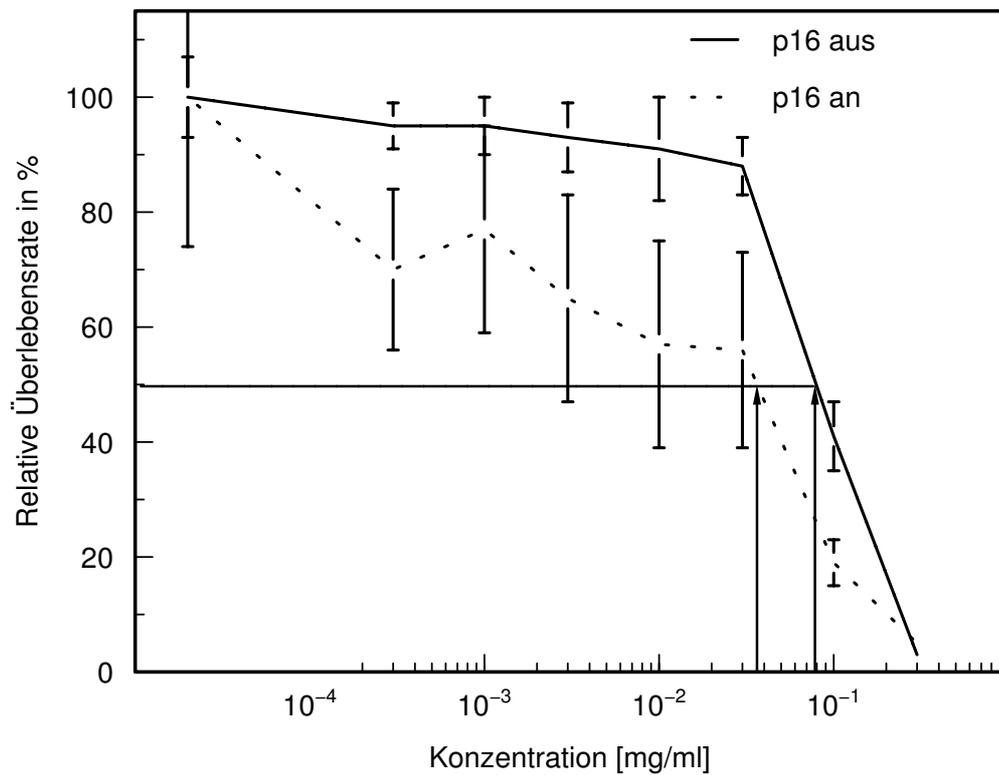


Abbildung 13: Relative Überlebensraten induzierbarer U87+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der BCNU-Konzentration (Carmustinkonzentration) ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Die halbmaximalen Hemmdosen unterschieden sich um deutlich weniger als eine Zehnerpotenz und lagen im hohen Dosisbereich oberhalb von 0.03 mg/ml. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.

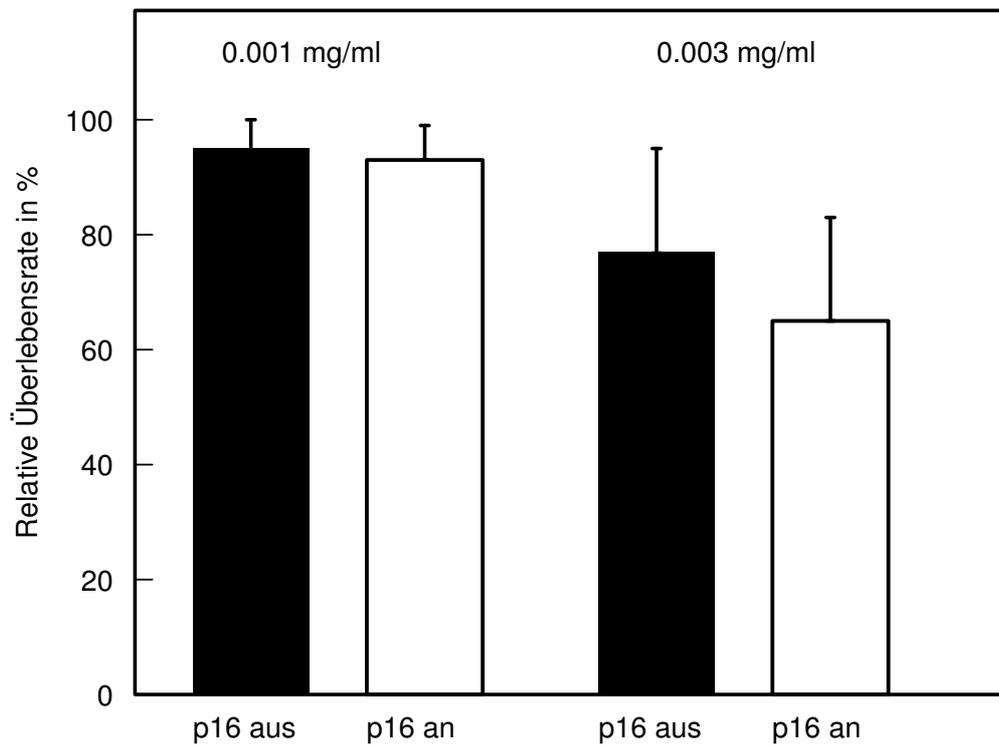


Abbildung 14: Relative Überlebensraten induzierbarer U87+p16tTA-Zellen unter Behandlung mit BCNU (Carmustin) bei den Dosisstufen 10^{-3} und $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.

3.3 Vergleich von Zytostatikawirkungen in U87+pBabe+p14/ARF- und U87+pBabePuro-Subklonen

3.3.1 Behandlung mit BCNU

Bei der BCNU-Behandlung der ausgewählten Subklone 7, 10, 12 mit p14/ARF-Expression (Abbildung 15 auf Seite 45) und 3, 4, 1 ohne p14/ARF-Expression (Abbildung 16 auf Seite 46) fiel vor allem ein sehr unterschiedlicher Verlauf der Dosiswirkungskurven der p14/ARF exprimierenden Subklone auf, deren halbmaximale Hemmdosen zwischen $3 \cdot 10^{-4}$ und 10^{-1} mg/ml lag, während die Dosiswirkungskurven der Kontrollklone mit halbmaximalen Hemmdosen um 10^{-2} mg/ml relativ ähnlich verliefen. Bei den p14/ARF exprimierenden Subklonen reagierte Subklon 7 sehr viel sensibler und Subklon 10 deutlich resistenter auf BCNU, während Subklon 12 eine Mittelstellung einnahm.

Insgesamt ergab sich für die BCNU-Behandlung der U87-Subklone ein uneinheitliches Bild. Bei den getesteten Dosisstufen 10^{-3} mg/ml (Abbildung 17 auf Seite 47) und $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml (Abbildung 18 auf Seite 48) war zwischen den gemittelten relativen Überlebensraten der p14/ARF-Subklone und der Kontrollklone kein signifikanter Unterschied nachzuweisen.

Insbesondere liess sich unter den Bedingungen des plasmidvermittelten Gentransfers kein konstanter gleichsinniger Einfluss des p14/ARF-Proteins auf die BCNU-Sensitivität aus den Daten ableiten. Auffällig ist aber, dass in der Gruppe der p14/ARF exprimierenden Klone die Sensitivitätsunterschiede zwischen den Klonen deutlich größer waren als bei den Kontrollklonen.

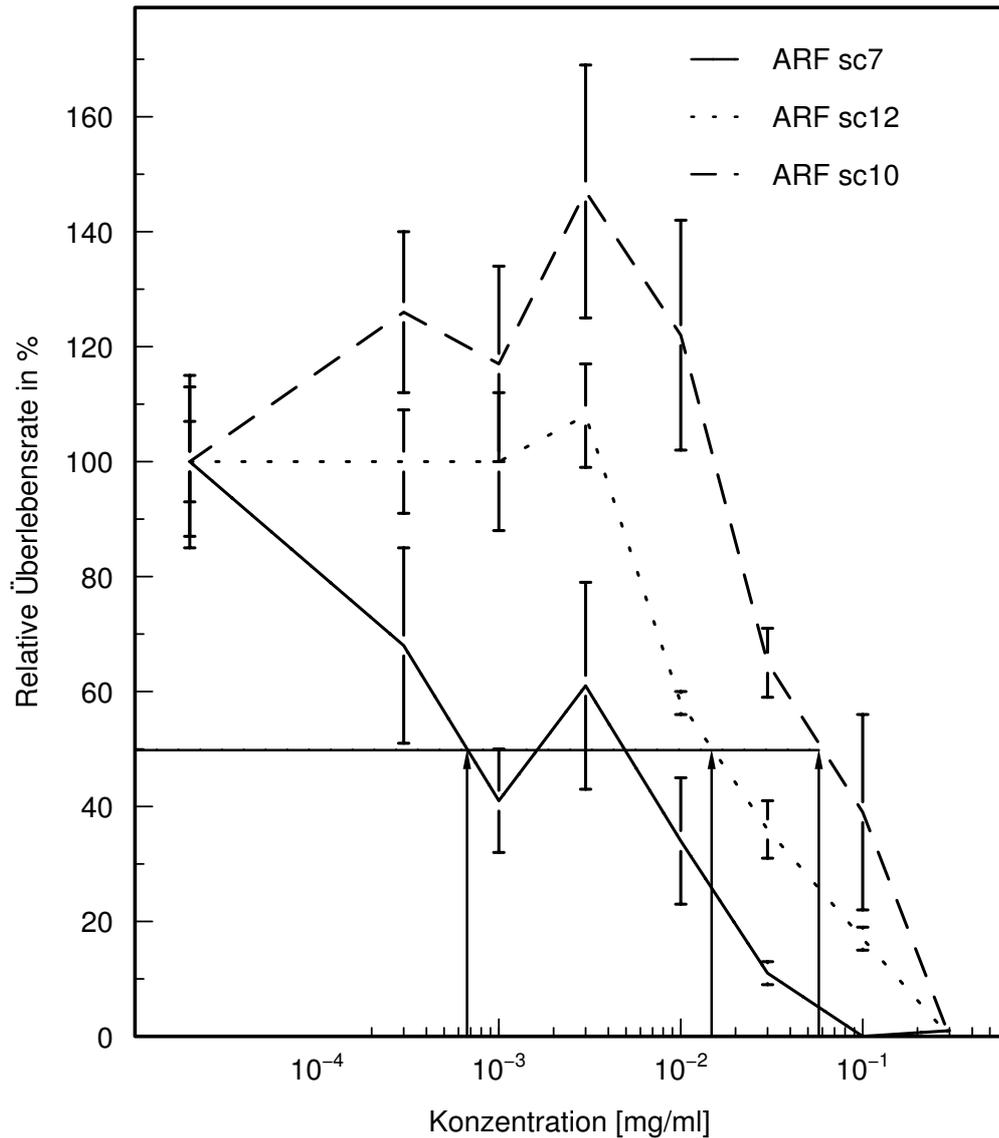


Abbildung 15: Relative Überlebensraten von U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen in Abhängigkeit von der BCNU-Konzentration (Carmustinkonzentration) (ARF=Subklone, die erfolgreich mit p14/Alternative Reading Frame transfiziert wurden; sc=subclone). Die halbmaximalen Hemmdosen lagen breit gestreut zwischen $3 \cdot 10^{-4}$ und 10^{-1} mg/ml. Beim Vergleich mit den Kontrollklonen (Abbildung 16 auf Seite 46) ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt.

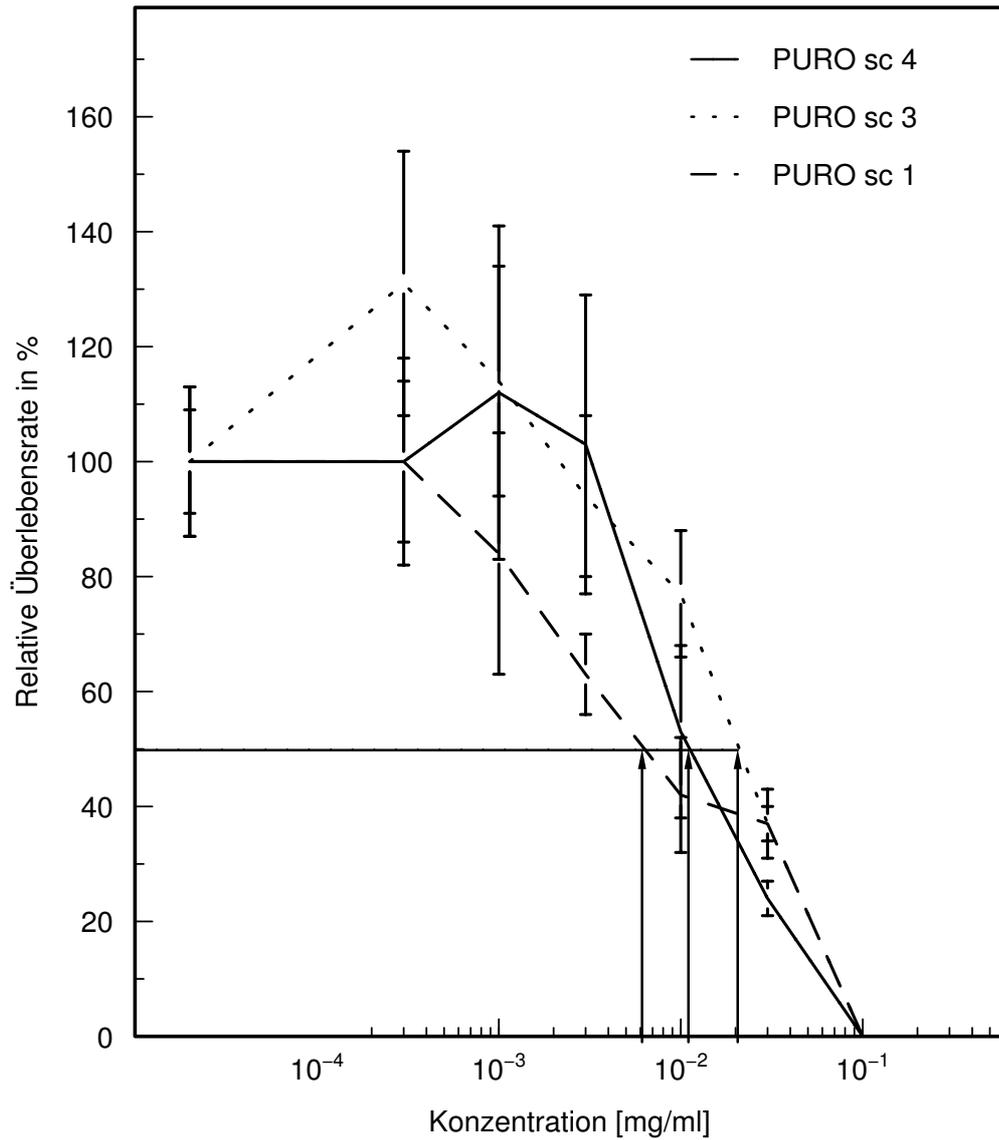


Abbildung 16: Relative Überlebensraten von U87+pBabePuro-Subklonen in Abhängigkeit von der BCNU-Konzentration (Carmustinkonzentration) (PURO=Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; sc=subclone). Die halbmaximalen Hemmdosen lagen alle relativ nah an 10^{-2} mg/ml. Beim Vergleich mit den p14/ARF-Klonen (Abbildung 15 auf Seite 45) ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt.

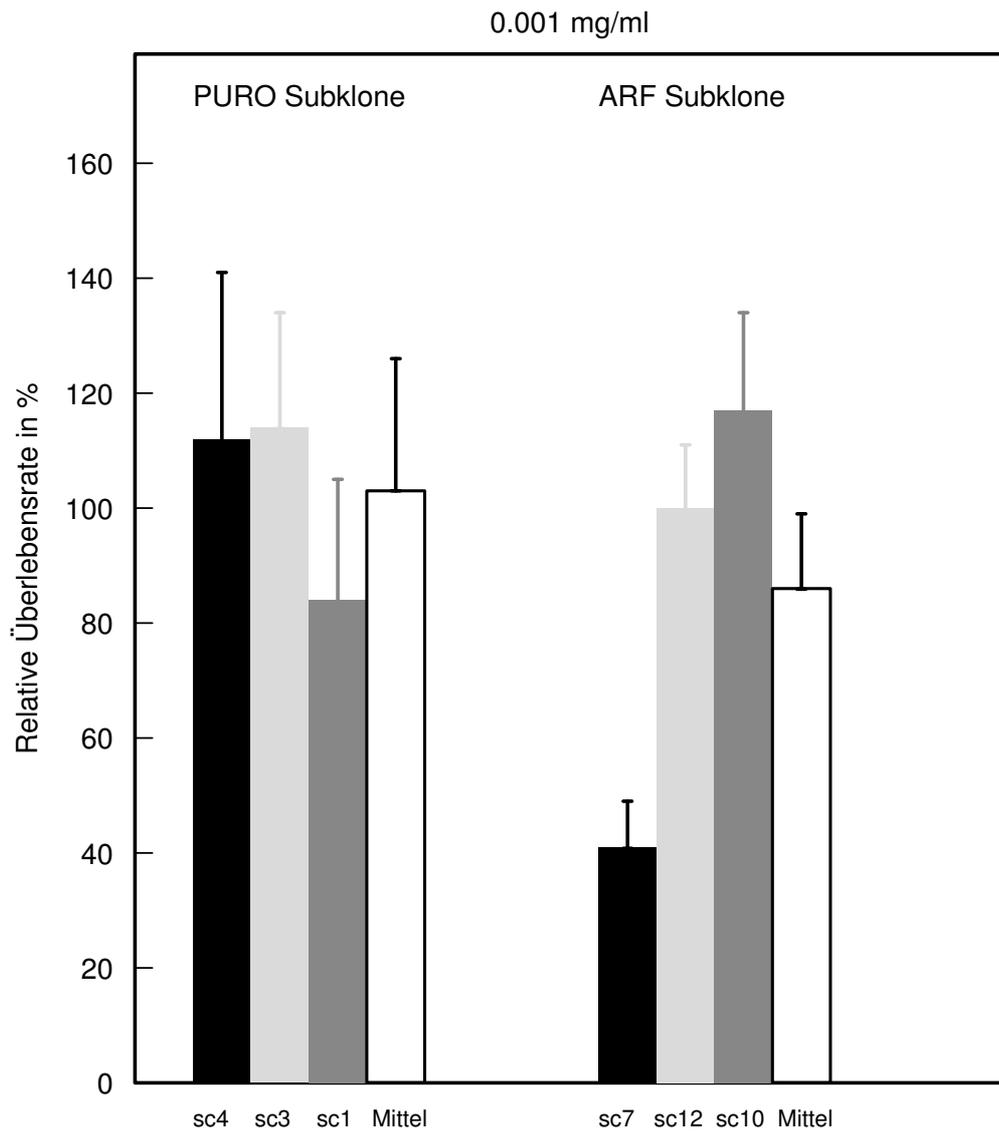


Abbildung 17: Vergleich der relativen Überlebensraten von *U87+pBabePuro*- und *U87+pBabe+p14/ARF*-Subklonen unter Behandlung mit BCNU (Carmustin) bei der Dosisstufe 10^{-3} mg/ml (PURO= Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; ARF=Subklone, die erfolgreich mit *p14/Alternative Reading Frame* transfiziert wurden; sc=subclone). Beim Vergleich der Mittelwerte ergab sich kein signifikanter *p14/ARF*-Effekt.

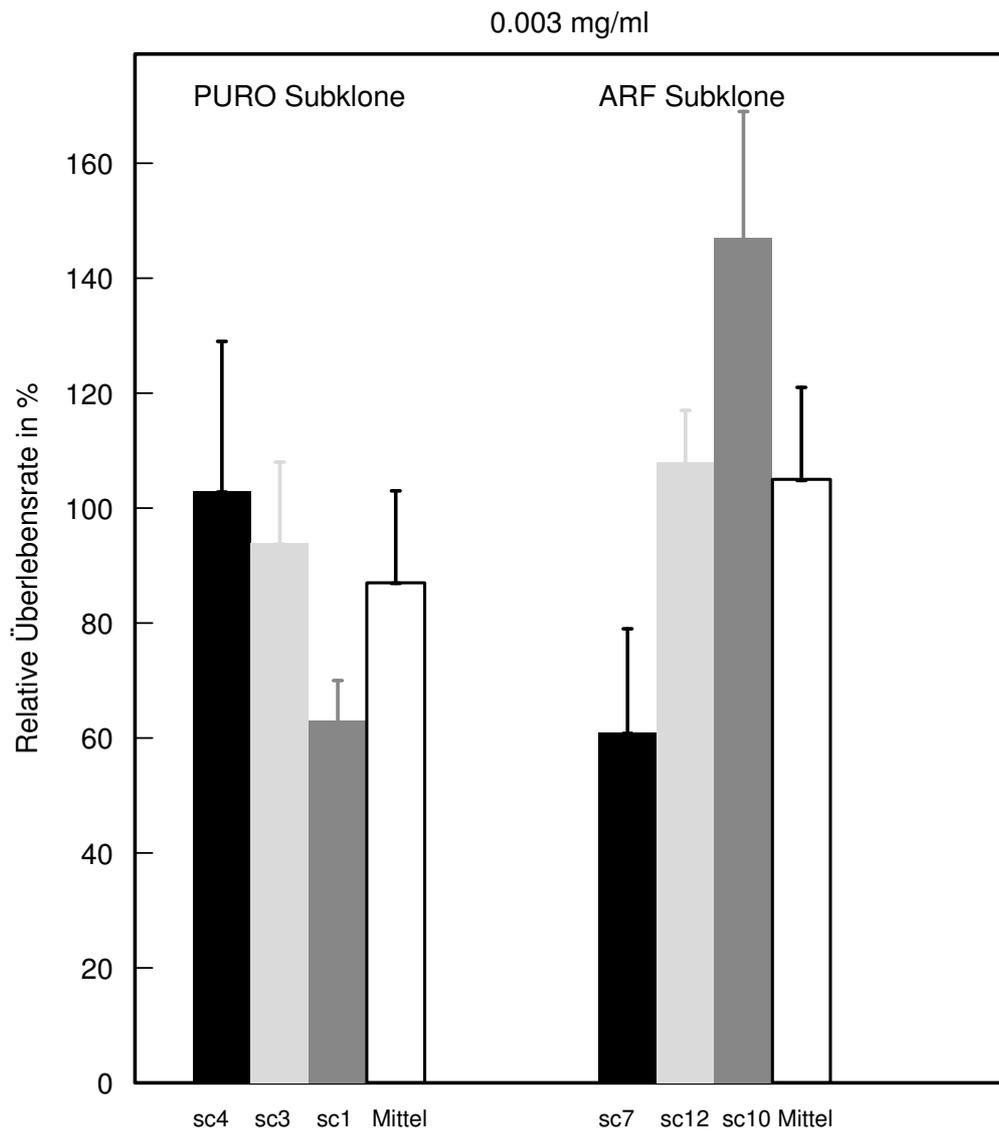


Abbildung 18: Vergleich der relativen Überlebensraten von U87+pBabePuro- und U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen unter Behandlung mit BCNU (Carmustin) bei der Dosisstufe $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml (PURO=Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; ARF=Subklone, die erfolgreich mit p14/Alternative Reading Frame transfiziert wurden; sc=subclone). Beim Vergleich der Mittelwerte ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt.

3.3.2 Behandlung mit Vincristin

Bei der Vincristinbehandlung der gleichen Subklone mit und ohne p14/ARF-Expression unterschieden sich die Dosiswirkungskurven der einzelnen Subklone insgesamt weniger voneinander als bei der Behandlung mit BCNU (\rightarrow Seite 44). Die halbmaximalen Hemmdosen lagen für alle Klone unabhängig vom p14/ARF-Status zwischen 10^{-7} und 10^{-6} mg/ml (Abbildung 19 auf Seite 50) (Abbildung 20 auf Seite 50). Insgesamt waren alle untersuchten Subklone gegenüber Vincristin ähnlich sensibel. Ein signifikanter Unterschied der gemittelten relativen Überlebensraten bei den getesteten Dosisstufen 10^{-5} mg/ml (Abbildung 21 auf Seite 51) und 10^{-4} ml/mg (Abbildung 22 auf Seite 52) war zwischen den p14/ARF-Klonen und den Kontrollklonen nicht nachweisbar.

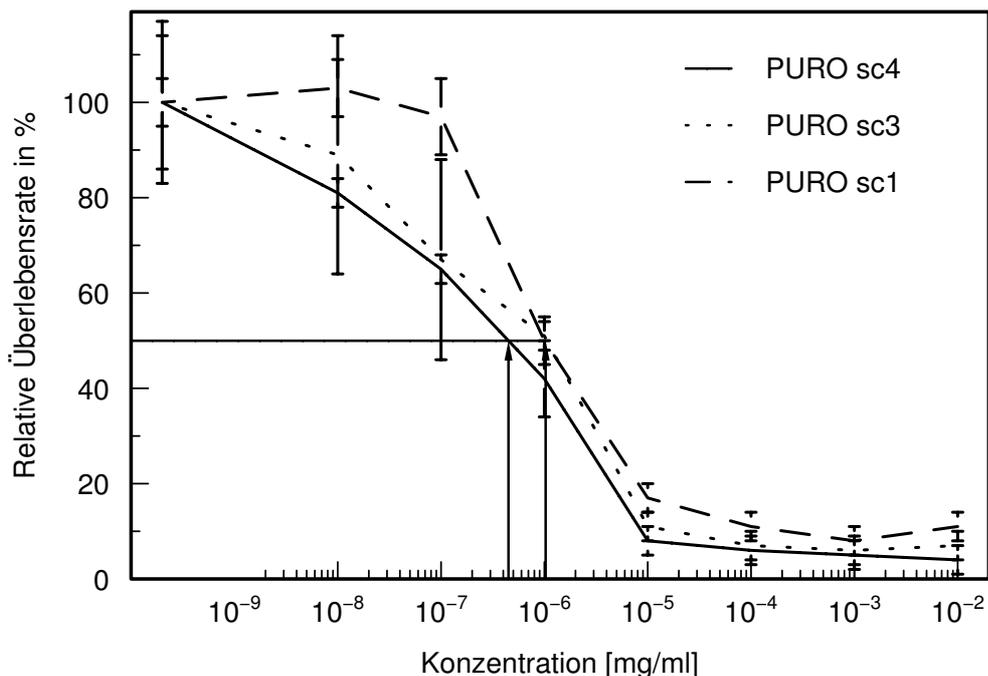


Abbildung 19: Relative Überlebensraten von U87+pBabePuro-Subklonen in Abhängigkeit von der Vincristinkonzentration (PURO=Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; sc=subclone). Die halbmaximalen Hemmdosen lagen zwischen 10^{-7} und 10^{-6} mg/ml. Beim Vergleich mit den p14/ARF-Klonen (Abbildung 20 auf Seite 50) ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt.

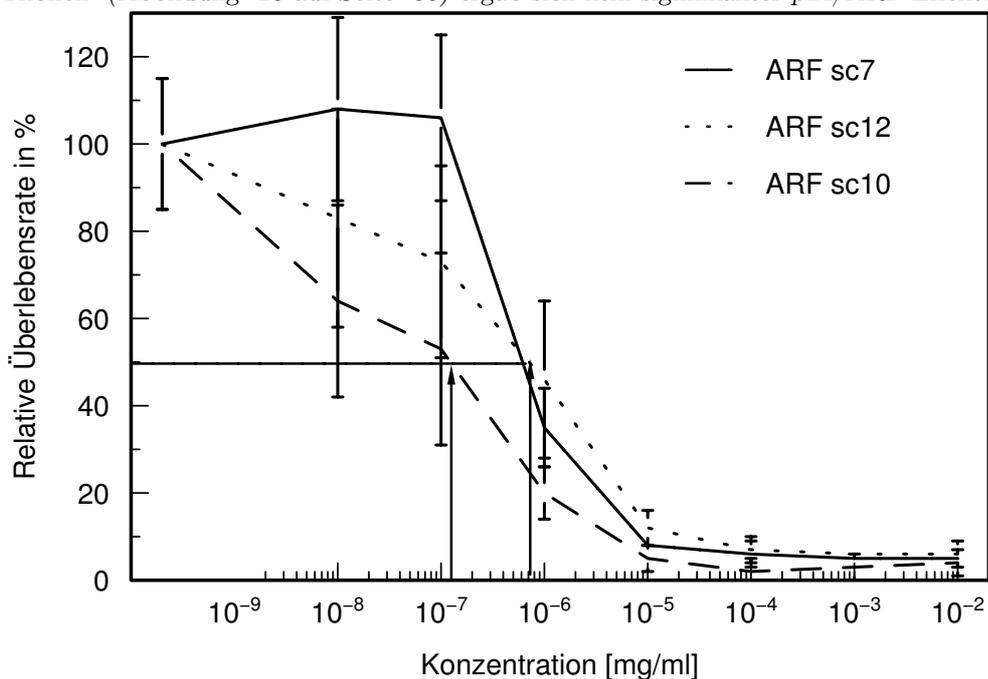


Abbildung 20: Relative Überlebensraten von U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen in Abhängigkeit von der Vincristinkonzentration (ARF=Subklone, die erfolgreich mit p14/Alternative Reading Frame transfiziert wurden; sc=subclone). Die halbmaximalen Hemmdosen lagen zwischen 10^{-7} und 10^{-6} mg/ml. Beim Vergleich mit den Kontrollklonen (Abbildung 19 auf Seite 50) ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt.

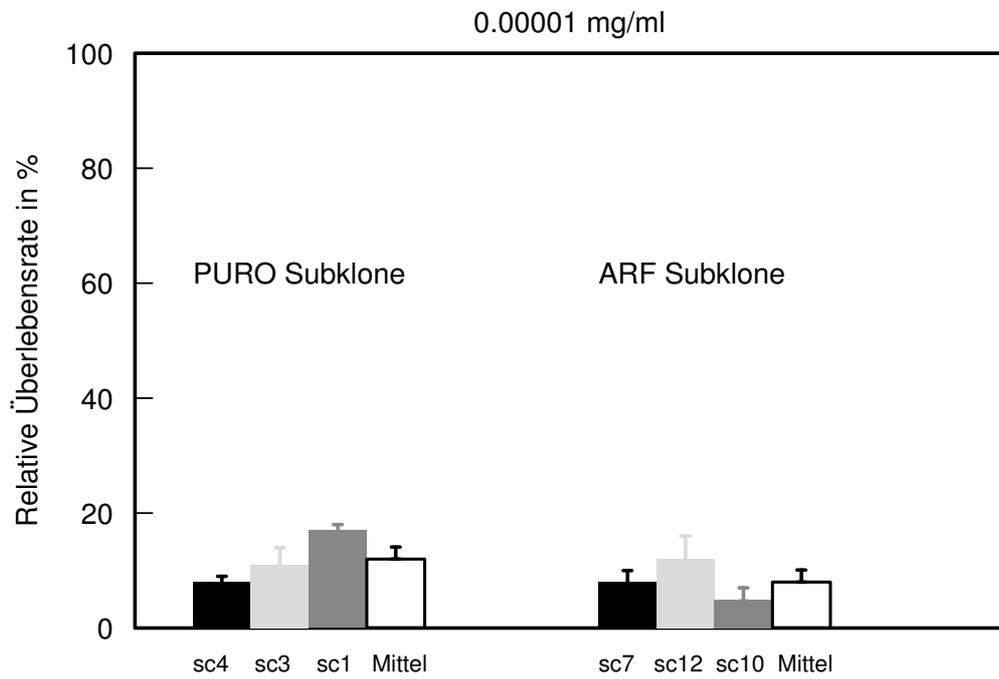


Abbildung 21: Vergleich der relativen Überlebensraten von U87+pBabePuro- und U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen unter Behandlung mit Vincristin bei der Dosisstufe 10^{-5} mg/ml (PURO=Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; ARF=Subklone, die erfolgreich mit p14/Alternative Reading Frame transfiziert wurden; sc=subclone). Beim Vergleich der Mittelwerte ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt.

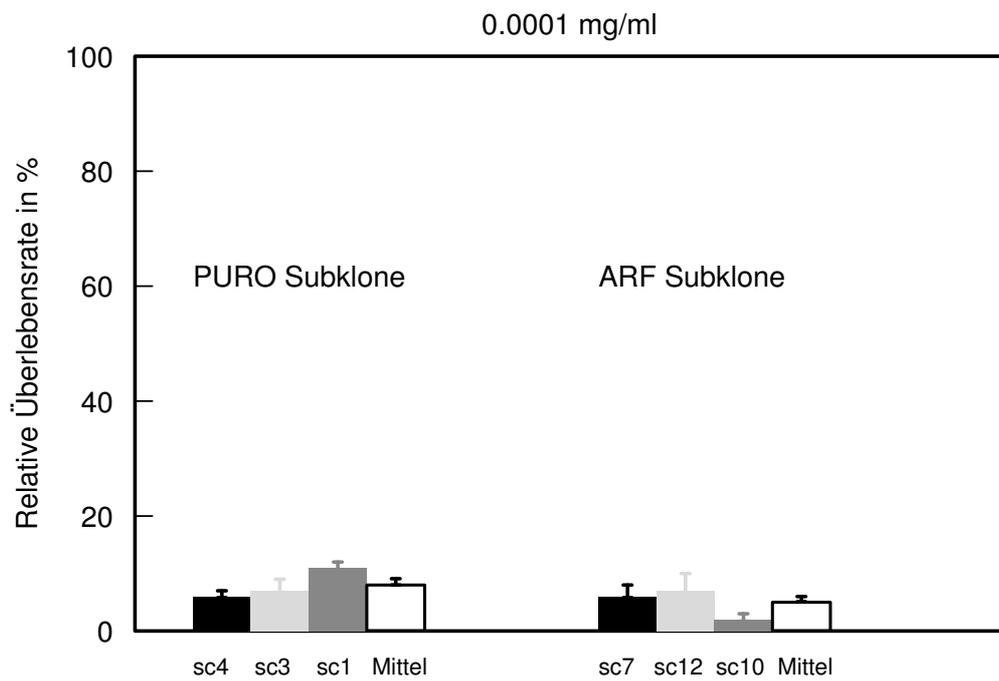


Abbildung 22: Vergleich der relativen Überlebensraten von U87+pBabePuro- und U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen unter Behandlung mit Vincristin bei der Dosisstufe 10^{-4} mg/ml (PURO=Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; ARF=Subklone, die erfolgreich mit p14/Alternative Reading Frame transfiziert wurden; sc=subclone). Beim Vergleich der Mittelwerte ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt.

4

Diskussion

4.1 Bewertung der Ergebnisse

4.1.1 Einfluss der p16-Expression auf die Zytostatikasensitivität induzierbarer U373+p16tTA- und U87+p16tTA-Zellen

Zusammenfassend lässt sich bei den U87+p16tTA-Zellen eine Sensitivierung gegenüber Vincristin durch p16 und eventuell ein gleichsinniger Effekt gegenüber BCNU beobachten. Bei den U373+p16tTA-Zellen lässt sich kein Effekt von p16 auf die Vincristinsensitivität erkennen. Gegenüber BCNU sind U373+p16tTA-Zellen offenbar unabhängig vom p16-Status weitgehend resistent.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Untersuchungen ist also, dass p16 die Zytostatikawirkung beeinflussen kann. Auf der anderen Seite wird die Zytostatikasensitivität der beiden untersuchten Zelllinien durch das in physiologischer Menge exprimierte p16-Protein unterschiedlich beeinflusst. Ein vom genetischen Kontext unabhängiger p16-Effekt auf die Zytostatikasensitivität kann also nicht bestätigt werden.

Ein weiteres Ergebnis ist, dass der die Zytostatikawirkung modulierende Effekt von p16 vermutlich begrenzt ist.

4.1.2 Einfluss ektopter p14/ARF-Expression auf die Zytostatikasensitivität von U87-Subklonen

Erstmalig wurde experimentell auch der Einfluss von p14/ARF auf die Zytostatikasensitivität von Gliomzelllinien untersucht. Aus den Experimenten ergibt sich jedoch kein Hinweis auf einen die Zytostatikawirkung beeinflussenden Effekt von p14/ARF, der sich deutlich von den interindividuellen Schwankungen der Sensitivität zwischen den genetisch unterschiedlichen, durch Transfektion erzeugten Subklonen abheben würde. Ein wesentlicher, zu weiteren Untersuchungen motivierender Effekt der p14/ARF-Expression auf die Zytostatikasensitivität von U87-Subklonen ist aus den erhobenen Daten nicht abzuleiten. Offensichtlich spielen andere, durch die Transfektion oder anschließende klonale Selektion zufällig ebenfalls beeinflusste Gene eine

mindestens ebenso große Rolle für die Zytostatikasensitivität wie p14/ARF.

Interessant ist aber, dass die Sensitivität der p14/ARF exprimierenden Klone gegenüber den beiden Zytostatika sehr substanzabhängig ist. Insbesondere Subklon 10 fällt durch besondere Resistenz gegenüber BCNU auf und ist gleichzeitig sehr sensibel gegenüber Vincristin. Subklon 7 hingegen zeichnet sich durch besondere Sensitivität gegenüber BCNU aus, während seine Vincristinsensitivität als zumindest durchschnittlich einzustufen ist. Auch die auffällig großen Unterschiede bei der BCNU-Sensitivität der p14/ARF exprimierenden Subklone bieten Raum für Spekulationen.

4.1.3 Vergleich mit der Literatur

p16 und Zytostatikasensitivität

In Melanom-Zelllinien konnte eine mehr als 100fach erhöhte Resistenz gegenüber Vinblastin durch einen p16-induzierten Zellzyklusarrest gemessen werden. Im induzierbaren IPTG-System wurde dort durch kurzzeitige Induktion der p16-Expression ein reversibler, durch DNA-Flow-Zytometrie dokumentierter Zellzyklusarrest in der G₁-Phase erreicht. Während dieses Zellzyklus-Arrestes wurden die Zellen mit Methotrexat, Vinblastin oder Cisplatin behandelt. Es zeigte sich eine signifikant größere Resistenz der arretierten Zellen gegenüber allen Zytostatika, insbesondere gegenüber Vinblastin (Stone *et al.*, 1996). In Osteosarkomzellen konnte im auch bei den eigenen Untersuchungen verwendeten induzierbaren tTA-System unter p16-Expression eine signifikante Resistenz der Zellen gegenüber Etoposid und Taxol, nicht jedoch gegenüber Adriamycin beobachtet werden (Prabhu *et al.*, 1999). Das p16-Expressionsniveau wurde bei beiden Experimenten jedoch nicht quantifiziert und die Erkenntnisse wohl unter den Bedingungen eines völligen Zellzyklus-Arrestes gewonnen. Auch in Gliomzelllinien konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin und ACNU (Hama *et al.*, 1998) bzw. Paclitaxel und Topotecan (Fueyo *et al.*, 1998) durch ektope Überexpression von p16 und einen dadurch hervorgerufenen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase beobachtet werden.

Es ist zu unterstellen, dass bei allen vorgenannten Untersuchungen ein unphysiologisch hohes Expressionsniveau des p16-Proteins zu einem vollständigen, reversiblen oder irreversiblen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase geführt hat. Zytostatisch behandelt wurden somit wahrscheinlich nicht proliferierende Zellen, was sich in einer weitgehenden Zytostatikaresistenz niederschlug. Diese Bedingungen bilden aber die Verhältnisse im Tumorgewebe in vivo vermutlich nur sehr unvollständig ab.

Für eine Zelllinie nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome liegen interessanterweise gegenteilige Ergebnisse im Sinne einer erhöhten Sensitivität gegenüber Topoisomerasehemmern durch plasmidvermittelte ektope Überexpression von p16 vor (Fukuoka *et al.*, 1997). Auch in einer Magenkarzinom-Zelllinie konnte durch plasmidvermittelte ektope p16-Überexpression eine erhöhte Etoposidsensitivität beobachtet werden (Jeong *et al.*, 2003). Dies könnte einerseits an anderen genetischen Voraussetzungen liegen, andererseits aber auch an der bei beiden Gruppen verwendeten Technik des plasmidvermittelten Gentransfers, der mit einer im Vergleich zur Verwendung viraler Vektoren geringeren Transfektionseffizienz und klonaler Selektion einhergeht.

Bei Experimenten, in denen mit ektope Überexpression durch Adenovirus- oder plasmidvermitteltem

p16-Transfer gearbeitet wurde, könnten auch zufällige Kollateralveränderungen am Genom zu systematischen Fehlern durch unkontrollierbare Sekundäreffekte geführt haben. Bei den eigenen durch plasmidvermittelten Gentransfer von p14/ARF in U87-MG-Zellen erzeugten Subklonen fiel ebenfalls ein sehr uneinheitliches Verhalten in Bezug auf die Zytostatikasensitivität auf.

Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit ein System mit induzierbarer p16-Expression in Gliomzelllinien benutzt und auch erstmals das p16-Expressionsniveau auf eine mittlere Größe eingestellt. Das verwendete Modell ist frei von genetischen Seiteneffekten, weil genetisch identische Zellen miteinander verglichen werden, welche sich lediglich durch das Expressionsniveau des p16-Proteins unterscheiden. Ferner erlaubt der gewählte Ansatz auch, ein mittleres p16-Expressionsniveau zu analysieren, wie es auch in realen Tumoren vorliegt. Die Ergebnisse sind daher vermutlich aussagekräftiger als die bisheriger Untersuchungen.

In der Zusammenschau mit den hier dargestellten Befunden anderer Arbeitsgruppen ergibt sich also, dass p16 die Chemosensitivität von Gliomzellen beeinflussen kann. Diese Effekte sind aber uneinheitlich und hängen mutmaßlich von vielen Randbedingungen (z. B. eingesetzte Zytostatika, p16-Expressionsniveau, genetischer Kontext etc.) ab.

p14/ARF und Zytostatikasensitivität

Während eine mögliche Rolle von p16 bei der Chemosensitivität von Tumoren im Allgemeinen und Gliomen im Besonderen schon mehrfach Gegenstand von in-vitro-Untersuchungen war, liegen kaum Daten für p14/ARF vor. Die hier vorgestellte Arbeit untersucht erstmals den Einfluss von p14/ARF auf die Zytostatikasensitivität von Gliomzellen. Dabei fanden sich keine signifikanten Effekte von p14/ARF auf die Zytostatikasensitivität.

In einer humanen Fibrosarkom-Zelllinie mit induzierbarer p14/ARF-Expression konnte zwar eine vermehrte Resistenz gegenüber Folsäureantagonisten beobachtet werden, aber in der gleichen Zelllinie ergab sich kein p14/ARF-Effekt bei Behandlung mit Cytarabin, Hydroxyharnstoff und Doxorubicin. Nitrosoharnstoffe oder Vinca-Alkaloide wurden nicht untersucht (Ino *et al.*, 2000). Inwieweit p14/ARF bei der Chemosensitivität von Gliomen eine Rolle spielt, lässt sich ausgehend von diesen Daten schwer beurteilen. Die eigenen Ergebnisse lassen aber eher keine relevanten Effekte annehmen.

4.1.4 Mögliche biologische Hintergründe

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Modulation der Zytostatikasensitivität durch die p16-Expression in U373+p16tTA- und U87+p16tTA-Zellen ist der unterschiedliche Status des p53-Proteins in den beiden Zelllinien. Dass die apoptotische Reaktion von Tumorzellen auf Zytostatika-induzierte DNA-Schäden bei Vincristinbehandlung von p53 abhängig ist, konnte in Melanom-Zelllinien bereits gezeigt werden (Li *et al.*, 1998). Denkbar wäre, dass das physiologisch exprimierte p16-Protein diese p53-induzierte Einleitung der Apoptose unterstützend beeinflusst, während es in Abwesenheit von p53 diesen Effekt nicht entfalten kann oder durch seine bremsende Wirkung auf den Zellzyklus sogar protektiv gegenüber Zytostatikabehandlung

wirkt. Möglicherweise spielt die Verzahnung der p16/Rb- mit der p14/p53-Kaskade über E2F hier eine Rolle. Eine synergistische Funktion von p16 und p53 bei der Induktion der Apoptose konnte auch in der humanen Leukämie-Zelllinie K562 bereits beobachtet werden (Rui und Su, 2002). Der ebenfalls unterschiedliche, aber nicht so deutlich ausgeprägte Effekt der p16-Expression auf die BCNU-Sensitivität der beiden Zelllinien wäre mit dieser Hypothese ebenfalls zu erklären. Dies ist aber nur eine mögliche Interpretation, und ebenso gut ist auch ein Einfluss anderer Unterschiede im Genom der beiden Zelllinien möglich. Die Vermutung, dass p16 und möglicherweise auch p14/ARF nur in Verbindung mit einem Wildtyp-p53-Gen eine gegenüber Zytostatika sensitivierende Wirkung entfalten, ist für das Verständnis der Zellzyklusbiologie und der Pharmakodynamik von Zytostatika interessant. Insbesondere höhergradige Gliome tragen, wie eingangs erwähnt (\rightarrow Seite 12), fast immer Inaktivierungen von p53, p16 oder von beiden. Eventuell erklärt sich so auch die weitgehende Resistenz dieser Tumoren gegenüber Zytostatika.

Über die biologischen Hintergründe der Ergebnisse zur Zytostatikasensitivität der mit p14/ARF-Plasmiden transfizierten U87-Subklone lässt sich nur spekulieren, da anders als bei den induzierbaren Zelllinien über das Genom der Subklone nach Transfektion praktisch nur bekannt ist, dass sie p14/ARF exprimieren. Im Rahmen der Transfektion ist es offensichtlich zu genetischen Veränderungen gekommen, welche zu einer Modulation der Zytostatikasensitivität geführt haben. Insbesondere bei der BCNU-Behandlung der Subklone sind deutliche Sensitivitätsunterschiede zu beobachten. Es fällt dagegen auf, dass die mit pBabePuro-Plasmiden transfizierten Kontrollklone relativ geringe Sensitivitätsunterschiede aufweisen. Das kann Zufall sein. Eine mögliche Erklärung wäre aber auch, dass p14/ARF im Zusammenspiel mit anderen Genen an der Vermittlung der Zytostatikawirkung beteiligt ist und dass diese Gene in den Subklonen 7, 10 und 12 bei der Transfektion unterschiedlich beeinflusst wurden. Hier kämen z. B. wiederum die Zielgene von p14/ARF wie p53, Mdm2 oder E2F in Frage. Die unterschiedliche Sensitivität einiger Subklone gegenüber den beiden Zytostatika BCNU und Vincristin könnte damit zusammenhängen, dass Vincristin zellzyklusspezifisch in der Mitose und BCNU zellzyklusunspezifisch wirkt. In diesem Fall läge es nahe anzunehmen, dass p14/ARF oder andere Zellzyklusregulatoren oder ein Zusammenwirken solcher Gene für dieses unterschiedliche Verhalten verantwortlich ist, z. B. indem sie eine Akkumulation von Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen bewirken.

4.2 Methodenkritik

4.2.1 In-vitro-Zytostatikasensitivitätstestung

Während eine Zytostatikasensitivität von Tumorgewebe *in vitro* lediglich in etwa 60% der Fälle auch mit einem Ansprechen auf die Substanz *in vivo* einhergeht, ist eine *in-vitro*-Zytostatikaresistenz zu 97% mit einem Nicht-Ansprechen auch *in vivo* assoziiert (Salmon *et al.*, 1980).

In der klinischen Onkologie spielen *in-vitro*-Sensitivitätstests daher für die Therapieentscheidung nur eine untergeordnete Rolle, da anders als in der antimikrobiellen Therapie der positive prädiktive Wert zu gering ist. Aufgrund des gleichzeitig sehr hohen negativen prädiktiven Wertes sind sie bei der präklinischen Auswahl

und Bewertung neuer Substanzen aber sehr wichtig (Morgan *et al.*, 1983). Zur genaueren Aufklärung der Pharmakodynamik von Zytostatika, der zellulären Reaktion und der genetischen Einflussfaktoren auf die Wirksamkeit einer Zytostase sind Zellkulturexperimente absolut unverzichtbar (de Stanchina *et al.*, 1998).

4.2.2 Funktionelle Analyse durch Gentransfer und induzierbare Expression

Ektoper Überexpression von Zellzyklusregulatoren oder anderen Genen durch Transfektion ist eine einfache Methode zur groben Analyse ihrer Funktion in der Zelle. Die Übertragbarkeit der damit gewonnenen Erkenntnisse auf den lebenden Organismus ist aber eingeschränkt, da es durch die Transfektion zu unkontrollierbaren Kollateralveränderungen am Genom kommt, deren Folgen kaum abschätzbar sind. Auch das Niveau der Genexpression ist bei der Transfektion unkontrollierbar und wahrscheinlich häufig unrealistisch hoch. Im Fall von Zellzyklusregulatoren kann dadurch *in vitro* ein kompletter Zellzyklusarrest auftreten, womit die Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf die Situation *in vivo* sehr fraglich ist. Es bedarf also einer Überprüfung der durch Transfektion gewonnenen Erkenntnisse mit weiteren Methoden.

Beim tTA-System besteht die Möglichkeit genetisch identische Zellen miteinander zu vergleichen und ausschließlich die Expression des Zielgens durch Zugabe von Tetrazyklin zu modulieren. Eventuelle Tetrazyklineffekte sind dabei besser kontrollierbar und in ihrer Größe gut abschätzbar. Außerdem kann das Genom der induzierbaren Zelllinien genauer charakterisiert und auf die Expression anderer beteiligter Gene untersucht werden. Es können je nach Anforderungen und Zielsetzung gezielt induzierbare Zelllinien mit bestimmtem genetischen Kontext ausgewählt werden (Simon *et al.*, 1999, 2002).

Die Proteinexpression kann außerdem auf eine Größenordnung eingestellt werden, welche in der Natur physiologisch oder zum Beispiel in Tumorgewebe tatsächlich vorkommt. Es können sogar unterschiedliche Expressionsniveaus untersucht und miteinander verglichen werden. Das tTA-System ist daher zur genaueren Untersuchung der Funktion einzelner Gene in einem sauberen Modell hervorragend geeignet.

Der bei ektopter Überexpression beobachtete wachstumshemmende Effekt des p16-Gens konnte auch im induzierbaren System bestätigt werden (Simon *et al.*, 1999). Ein relevanter, die Zytostatikawirkung modulierender Effekt von p16 dagegen ist bei mittlerem Expressionsniveau im induzierbaren System zumindest von weiteren Faktoren abhängig. Da über den genetischen Kontext der induzierbaren Zelllinien bereits Informationen vorliegen, ergeben sich hier Anhaltspunkte für weiterführende Untersuchungen. Gegebenenfalls kann auch das Genom der induzierbaren Zelllinien noch genauer untersucht werden, um Zusammenhänge und Wechselwirkungen von p16 mit anderen Zellzyklusregulatoren, Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen aufzuklären.

4.3 Mögliche Bedeutung für die Klinik: Ausblick

Da die p16-Expression die Zytostatikasensitivität der beiden untersuchten induzierbaren Zelllinien unterschiedlich beeinflusste, scheint p16 allein als Prädiktor für Zytostatikasensitivität in der Klinik kaum geeignet.

Der unterschiedliche genetische Kontext der induzierbaren Zelllinien ist offensichtlich für ihre Zytostatikasensitivität von größerer Bedeutung als die p16-Expression.

Die sehr uneinheitliche Modulation der Zytostatikasensitivität durch ektope p14/ARF-Überexpression lässt annehmen, dass auch p14/ARF isoliert betrachtet keinen systematischen Einfluss auf die Chemosensitivität maligner Gliome hat. p14/ARF eignet sich also ebenfalls eher nicht als Chemosensitivitätsmarker. Eine inzwischen vorliegende Untersuchung der in-vitro-Sensitivität von 56 astrozytären Tumoren gegenüber unterschiedlichen Zytostatika zeigte analog zu diesen Ergebnissen keine signifikanten Veränderungen der Sensitivität gegenüber Alkylanzien und Vinca-Alkaloiden in Abhängigkeit von Deletion oder Mutationen des p16-Gens. Lediglich gegenüber Antimetaboliten, die aber in der klinische Gliomtherapie keine Rolle spielen, erwiesen sich Tumoren mit p16-Veränderungen als empfindlicher (Iwadata *et al.*, 2000).

Die Idee, genetische Faktoren zur individuellen Therapieentscheidung in der Onkologie hinzuzuziehen, ist sicherlich zukunftssträchtig. Falls kleine genetische Untergruppen von Tumoren besser auf eine Zytostase ansprechen als die breite Masse einer histologisch homogenen Gruppe, könnten sie bisher in Studien untergegangen sein. Andererseits könnte die Identifizierung therapieresistenter genetischer Subgruppen Patienten vor Nebenwirkungen und Risiken einer Zytostase bewahren und dem Gesundheitssystem auch erhebliche Kosten für eine nicht wirksame Therapie ersparen. Als Prädiktoren für den Erfolg einer PCV-Chemotherapie von anaplastischen Oligodendrogliomen wurden schon 1998 neben p16-Deletionen auch kombinierte Verluste auf den Chromosomen 1p und 19q diskutiert (Cairncross *et al.*, 1998), was sich auch in aktuellen Studien bestätigt hat (Cairncross *et al.*, 2006). Auch bei Langzeitüberlebenden mit anderen malignen Gliomen konnten entsprechende Veränderungen gefunden werden (Ino *et al.*, 2000). Glioblastompatienten mit Promotormethylierungen des O₆-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Enzym-Gens (MGMT) profitierten besonders von einer Temozolomidtherapie (Hegi *et al.*, 2005; Stupp *et al.*, 2005b).

Möglicherweise eröffnet ein verbessertes Verständnis der Molekularbiologie maligner Gliome zukünftig auch gentherapeutische Optionen (Gottesman, 2003). Auch eine Kombination von konventioneller Zytostatikatherapie mit einem Gentransfer ist denkbar. Welche Gene oder Signalwege dabei eine entscheidende Rolle spielen werden, ist noch unklar. Regulatoren von Zellzyklus und programmiertem Zelltod sind aber aussichtsreiche Kandidaten. Ihre Funktion und Interaktion besser verstehen zu lernen, ist daher nicht nur biologisch interessant, sondern kann schließlich auch klinische Bedeutung bekommen.

Einleitung von Apoptose oder Reparaturmechanismen als Reaktion auf zytostatikainduzierte DNA-Schäden werden von einem komplizierten Netzwerk unterschiedlicher Regulatoren gesteuert (Giaccia und Kastan, 1998; Shapiro *et al.*, 1998). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mit dem induzierbaren tTA-System und dem etablierten Protokoll einzelne an diesem Prozess beteiligte Gene auf ihre funktionelle Relevanz untersucht werden können, weil verschiedene Proteinexpressionszustände in sonst genetisch identischen Zellen miteinander verglichen werden können. Der Status weiterer beteiligter Gene in den mit dem tTA-System ausgestatteten Zelllinien ist dabei bekannt oder kann zumindest überprüft werden. Falls nötig, weil zum Beispiel neue beteiligte Gene entdeckt werden, können die induzierbaren Zelllinien auch zu einem späteren Zeitpunkt noch genauer genetisch charakterisiert werden. Der Einfluss einzelner Gene auch auf so komplexe Vorgänge,

wie sie bei der Zytostatikatherapie in der Zelle ablaufen, kann so aufgeklärt werden.

Wenn funktionelle Analysen der Regulatoren von Zellzyklus und Apoptose mit Erkenntnissen aus Pathologie und Klinik kombiniert werden, kann dies nicht nur das Verständnis der Tumorbiologie verbessern, sondern wird auch die klinische Onkologie entscheidend voranbringen.

Zusammenfassung

Die Überlebenszeiten von Patienten mit malignen Gliomen sind nach wie vor unbefriedigend, und der Erfolg einer Zytostatikatherapie ist mit histomorphologischen Kriterien allein nur schwer vorauszusagen. Genetische Charakteristika könnten zusätzlich als Prädiktoren für eine Zytostatikasensitivität dienen. Die Tumorsuppressorproteine p16 und p14/ARF sind als Zellzyklusregulatoren an der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden beteiligt und könnten daher die Zytostatikasensitivität maligner Gliome beeinflussen. Zur Chemotherapie maligner Gliome werden v. a. Alkylanzien (z. B. Nitrosoharnstoffderivate wie ACNU und BCNU) eingesetzt, daneben aber auch andere Zytostatika wie das Mitosespindelgift Vincristin als Bestandteil des PCV-Protokolls. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von p16 und p14/ARF exemplarisch auf die BCNU- und Vincristinsensitivität maligner Gliomzellen *in vitro* untersucht.

In U87+p16tTA- und U373+p16tTA-Zellen mit induzierbarer p16-Expression ließ sich angesichts widersprüchlicher Vorbefunde in der Literatur der p16-Effekt dosisabhängig und ohne Kontamination durch endogenes p16 evaluieren. Dabei ergab sich bei der Vincristintherapie von U87+p16tTA-Zellen eine signifikante Sensitivierung durch p16. Bei der BCNU-Therapie von U87+p16tTA-Zellen war der Sensitivierungseffekt von p16 nicht signifikant, und in U373+p16tTA-Zellen konnte weder bei der BCNU- noch bei der Vincristinbehandlung ein p16-Effekt auf die Zytostatikasensitivität beobachtet werden. Für die ektope p14/ARF-Überexpression in U87-Zellen konnte kein Effekt auf die BCNU- oder Vincristinsensitivität nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass zumindest p16 die Zytostatikasensitivität maligner Gliome beeinflussen kann. Das verwendete induzierbare tTA-System hat sich als gut geeignet erwiesen, den Einfluss einzelner Gene auf die Zytostatikasensitivität von Gliomzelllinien zu untersuchen.

Abbildungsverzeichnis

1	Titrierbarkeit des p16-Expressionsniveaus in Abhängigkeit von der Tetrazyklinkonzentration in U87+p16tTA-Zellen (HeLa=p16 exprimierende Zervixkarzinomzelllinie als Positivkontrolle; Tu 583=p16 exprimierender Tumor als Positivkontrolle; Tet=Tetrazyklin) (Köster und Simon, unveröffentlichte Abbildung)	19
2	Titrierbarkeit des (semiquantitativ mit einem digitalen Bildauswerter bestimmten) p16-Expressionsniveaus in U87+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der Tetrazyklinkonzentration im Medium (Köster und Simon, unveröffentlichte Abbildung)	20
3	Titrierbarkeit des (semiquantitativ mit einem digitalen Bildauswerter bestimmten) p16-Expressionsniveaus in U373+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der Tetrazyklinkonzentration im Medium (Simon <i>et al.</i> , 1999)	20
4	Induktion der p16-Expression durch Tetrazyklinentzug in U373+p16tTA-Zellen. 8 Stunden (h) nach dem Tetrazyklinentzug (tet -) kann eine p16-Expression nachgewiesen werden, die ihr Maximum nach 24 Stunden erreicht (Abbildung vorab veröffentlicht in Simon et al., 1999).	29
5	Suppression der p16-Expression durch Tetrazyklinzugabe in U373+p16tTA-Zellen. Im Vergleich zu den weiterhin im Medium ohne Tetrazyklinzusatz (tet -) wachsenden Zellen, führt die Zugabe von 2 µg/ml Tetrazyklin zum Medium (tet +) nach 12 Stunden (h) zu einer verringerten p16-Expression. 36 Stunden nach Tetrazyklinzugabe (tet +) ist keine p16-Expression mehr nachweisbar (Abbildung vorab veröffentlicht in Simon et al., 1999).	30
6	Semiquantitative Darstellung des zeitlichen Verlaufs der p16-Expression in U87+p16tTA-Zellen ohne Tetrazyklinzugabe (p16 an) und Abschaltverhalten mit Tetrazyklinzugabe zum Zeitpunkt t=0d (p16 aus)	31
7	Relative Überlebensraten induzierbarer U373+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der Vincristinkonzentration ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Die halbmaximalen Hemmdosen lagen in beiden Fällen im Bereich einer Vincristinkonzentration von 10 ⁻⁴ mg/ml. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.	33

8	Relative Überlebensraten induzierbarer U373+p16tTA-Zellen unter Behandlung mit Vincristin bei den Dosisstufen 10^{-5} und 10^{-4} mg/ml ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.	34
9	Relative Überlebensraten induzierbarer U373+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der BCNU-Konzentration (Carmustinkonzentration) ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Die halbmaximalen Hemmdosen lagen im sehr hohen Dosisbereich oberhalb von 0.03 mg/ml. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.	36
10	Relative Überlebensraten induzierbarer U373+p16tTA-Zellen unter Behandlung mit BCNU (Carmustin) bei den Dosisstufen 10^{-3} und $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.	37
11	Relative Überlebensraten induzierbarer U87+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der Vincristindosis ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression (*=signifikant bei einem Signifikanzniveau von 5%). Die halbmaximale Hemmdosis ohne p16-Expression lag zwischen 10^{-8} und 10^{-7} mg/ml. Mit p16-Expression lag sie zwischen 10^{-4} und 10^{-3} mg/ml.	39
12	Relative Überlebensraten induzierbarer U87+p16tTA-Zellen unter Behandlung mit Vincristin bei den Dosisstufen 10^{-5} und 10^{-4} mg/ml ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression (*=signifikant bei einem Signifikanzniveau von 5%). Es ergab sich ein signifikanter Effekt im Sinne einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Vincristin durch p16 bei beiden Dosisstufen.	40
13	Relative Überlebensraten induzierbarer U87+p16tTA-Zellen in Abhängigkeit von der BCNU-Konzentration (Carmustinkonzentration) ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Die halbmaximalen Hemmdosen unterschieden sich um deutlich weniger als eine Zehnerpotenz und lagen im hohen Dosisbereich oberhalb von 0.03 mg/ml. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.	42
14	Relative Überlebensraten induzierbarer U87+p16tTA-Zellen unter Behandlung mit BCNU (Carmustin) bei den Dosisstufen 10^{-3} und $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml ohne (p16 aus) und mit (p16 an) p16-Expression. Ein signifikanter p16-Effekt ergab sich nicht.	43
15	Relative Überlebensraten von U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen in Abhängigkeit von der BCNU-Konzentration (Carmustinkonzentration) (ARF=Subklone, die erfolgreich mit p14/Alternative Reading Frame transfiziert wurden; sc=subclone). Die halbmaximalen Hemmdosen lagen breit gestreut zwischen $3 \cdot 10^{-4}$ und 10^{-1} mg/ml. Beim Vergleich mit den Kontrollklonen (Abbildung 16 auf Seite 46) ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt.	45
16	Relative Überlebensraten von U87+pBabePuro-Subklonen in Abhängigkeit von der BCNU-Konzentration (Carmustinkonzentration) (PURO=Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; sc=subclone). Die halbmaximalen Hemmdosen lagen alle relativ nah an 10^{-2} mg/ml. Beim Vergleich mit den p14/ARF-Klonen (Abbildung 15 auf Seite 45) ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt.	46

- 17 Vergleich der relativen Überlebensraten von U87+pBabePuro- und U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen unter Behandlung mit BCNU (Carmustin) bei der Dosisstufe 10^{-3} mg/ml (PURO=Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; ARF=Subklone, die erfolgreich mit p14/Alternative Reading Frame transfiziert wurden; sc=subclone). Beim Vergleich der Mittelwerte ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt. 47
- 18 Vergleich der relativen Überlebensraten von U87+pBabePuro- und U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen unter Behandlung mit BCNU (Carmustin) bei der Dosisstufe $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml (PURO=Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; ARF=Subklone, die erfolgreich mit p14/Alternative Reading Frame transfiziert wurden; sc=subclone). Beim Vergleich der Mittelwerte ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt. 48
- 19 Relative Überlebensraten von U87+pBabePuro-Subklonen in Abhängigkeit von der Vincristinkonzentration (PURO=Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; sc=subclone). Die halbmaximalen Hemmdosen lagen zwischen 10^{-7} und 10^{-6} mg/ml. Beim Vergleich mit den p14/ARF-Klonen (Abbildung 20 auf Seite 50) ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt. 50
- 20 Relative Überlebensraten von U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen in Abhängigkeit von der Vincristinkonzentration (ARF=Subklone, die erfolgreich mit p14/Alternative Reading Frame transfiziert wurden; sc=subclone). Die halbmaximalen Hemmdosen lagen zwischen 10^{-7} und 10^{-6} mg/ml. Beim Vergleich mit den Kontrollklonen (Abbildung 19 auf Seite 50) ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt. 50
- 21 Vergleich der relativen Überlebensraten von U87+pBabePuro- und U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen unter Behandlung mit Vincristin bei der Dosisstufe 10^{-5} mg/ml (PURO=Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; ARF=Subklone, die erfolgreich mit p14/Alternative Reading Frame transfiziert wurden; sc=subclone). Beim Vergleich der Mittelwerte ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt. 51
- 22 Vergleich der relativen Überlebensraten von U87+pBabePuro- und U87+pBabe+p14/ARF-Subklonen unter Behandlung mit Vincristin bei der Dosisstufe 10^{-4} mg/ml (PURO=Kontrollklone, die nur mit Puromycinresistenz transfiziert wurden; ARF=Subklone, die erfolgreich mit p14/Alternative Reading Frame transfiziert wurden; sc=subclone). Beim Vergleich der Mittelwerte ergab sich kein signifikanter p14/ARF-Effekt. 52

Literaturverzeichnis

- Bahuau M, Vidaud D, Kujas M, Palangie A, Assouline B, Chaignaud-Lebreton M, Prieur M, Vidaud M, Harpey JP, Lafourcade J, Caille B. Familial aggregation of malignant melanoma/dysplastic naevi and tumours of the nervous system: an original syndrome of tumour proneness. *Ann Genet* 1997; **40**: 78–91
- Bahuau M, Vidaud D, Jenkins RB, Bieche I, Kimmel DW, Assouline B, Smith J, Alderete B, Cayuela JM, Harpey JP, Caille B, Vidaud M. Germ-line deletion involving the INK4 locus in familial proneness to melanoma and nervous system tumors. *Cancer Res* 1998; **58**: 2298–2303
- Becker AJ, Wiestler OD, Figarella-Branger D, Blümcke I. Ganglioglioma and gangliocytoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007: 103–105
- Berger JH, Bardeesy N. Modeling INK4/ARF tumor suppression in the mouse. *Curr Mol Med* 2007; **7**: 63–75
- Besson A, Yong VW. Mitogenic signaling and the relationship to cell cycle regulation in astrocytomas. *J Neurooncol* 2001; **51**: 245–264
- Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997; **94**: 303–309
- Brat DJ, VandenBerg SR, Figarella-Branger D, Taratuto AL. Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007: 96–98
- Burton E, Prados M. New chemotherapy options for the treatment of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 1999; **11**: 157–161
- Cairncross G, Macdonald D, Ludwin S, Lee D, Cascino T, Buckner J, Fulton D, Dropcho E, Stewart D, Schold Jr. C. Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. national cancer institute of canada clinical trials group. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 2013–2021
- Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Mehta M, Curran W. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with

- radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 2707–2714
- Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 1473–1479
- Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, Hegi ME, Wiseman RW, Petty EM, Bale AE. Assignment of a locus for familial melanoma, mlm, to chromosome 9p13-p22. *Science* 1992; **258**: 1148–1152
- Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Neuhausen S, Gruis NA, Anderson DE, Lewis CM, Jost M, Tran TD, Nyguen K, Kamb A, et al.. Localization of the 9p melanoma susceptibility locus (MLM) to a 2-cM region between D9S736 and D9S171. *Genomics* 1994; **23**: 265–268
- Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK. Silencing of p16/cdkn2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 1996; **56**: 2405–2410
- Dai C, Celestino JC, Okada Y, Louis DN, Fuller GN, Holland EC. PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes Dev* 2001; **15**: 1913–1925
- Daumas-Duport C, Pietsch T, Hawkins C, Shankar S. Dysembryoplastic neuroepithelial tumour. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007: 99–102
- de Stanchina E, McCurrach ME, Zindy F, Shieh SY, Ferbeyre G, Samuelson AV, Prives C, Roussel MF, Sherr CJ, Lowe SW. E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 1998; **12**: 2434–2442
- Dimri GP, Itahana K, Acosta M, Campisi J. Regulation of a senescence checkpoint response by the e2f1 transcription factor and p14(arf) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 273–285
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1350–1354
- Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 1993; **71**: 2585–2597
- Fortin D, Macdonald DR, Stitt L, Cairncross JG. Pcv for oligodendroglial tumors: in search of prognostic factors for response and survival. *Can J Neurol Sci* 2001; **28**: 215–223

- Fountain JW, Karayiorgou M, Ernstoff MS, Kirkwood JM, Vlock DR, Titus-Ernstoff L, Bouchard B, Vijayasaradhi S, Houghton AN, and JL. Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 10557–10561
- Fueyo J, Gomez-Manzano C, Bruner JM, Saito Y, Zhang B, Zhang W, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP. Hypermethylation of the cpG island of p16/cdkn2 correlates with gene inactivation in gliomas. *Oncogene* 1996; **13**: 1615–1619
- Fueyo J, Gomez-Manzano C, Puduvalli VK, Martin-Duque P, Perez-Soler R, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP. Adenovirus-mediated p16 transfer to glioma cells induces g1 arrest and protects from paclitaxel and topotecan: implications for therapy. *Int J Oncol* 1998; **12**: 665–669
- Fukuoka K, Adachi J, Nishio K, Arioka H, Kurokawa H, Fukumoto H, Ishida T, Nomoto T, Yokote H, Tomonari A, Narita N, Yokota J, Saijo N. p16ink4 expression is associated with the increased sensitivity of human non-small cell lung cancer cells to dna topoisomerase i inhibitors. *Jpn J Cancer Res* 1997; **88**: 1009–1016
- Fuxe J, Akusjarvi G, Goike HM, Roos G, Collins VP, Pettersson RF. Adenovirus-mediated overexpression of p15INK4B inhibits human glioma cell growth, induces replicative senescence, and inhibits telomerase activity similarly to p16INK4A. *Cell Growth Differ* 2000; **11**: 373–384
- Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998; **12**: 2973–2983
- Giannini C, Paulus W, Louis DN, Liberski P. Pleomorphic xanthoastrocytoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007: 22–24
- Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**: 667–677
- Gilley J, Fried M. One INK4 gene and no ARF at the Fugu equivalent of the human INK4A/ARF/INK4B tumour suppressor locus. *Oncogene* 2001; **20**: 7447–7452
- Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 5547–5551
- Gottesman MM. Cancer gene therapy: an awkward adolescence. *Cancer Gene Ther* 2003; **10**: 501–508
- Ha L, Ichikawa T, Anver M, Dickins R, Lowe S, Sharpless NE, Krimpenfort P, Depinho RA, Bennett DC, Sviderskaya EV, Merlino G. ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 10968–10973
- Haber DA. Splicing into senescence: the curious case of p16 and p19arf. *Cell* 1997; **91**: 555–558

- Hainfellner JA, Scheithauer BW, Giangaspero F, Rosenblum MK. Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007: 115–116
- Hama S, Heike Y, Naruse I, Takahashi M, Yoshioka H, Arita K, Kurisu K, Goldman CK, Curiel DT, Saijo N. Adenovirus-mediated p16 gene transfer prevents drug-induced cell death through g1 arrest in human glioma cells. *Int J Cancer* 1998; **77**: 47–54
- Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; **371**: 257–261
- Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 1997; **89**: 1845–1853
- Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; **24**: 2899–2908
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 997–1003
- Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, von Deimling A, Fassbender F, Xu HJ, Benedict WF, Yandell DW, Louis DN. The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann Neurol* 1994; **36**: 714–721
- Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermarck B, Heldin CH, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A, Nister M. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res* 1996; **56**: 164–171
- Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and prb in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002; **12**: 60–66
- Holland EC, Hively WP, DePinho RA, Varmus HE. A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of g1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes Dev* 1998; **12**: 3675–3685
- Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, Ohgaki H. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; **65**: 846–854
- Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP. Deregulation of the p14arf/mdm2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with g1-s transition control gene abnormalities. *Cancer Res* 2000; **60**: 417–424

- Ino Y, Zlatescu MC, Sasaki H, Macdonald DR, Stemmer-Rachamimov AO, Jhung S, Ramsay DA, von Deimling A, Louis DN, Cairncross JG. Long survival and therapeutic responses in patients with histologically disparate high-grade gliomas demonstrating chromosome 1p loss. *J Neurosurg* 2000; **92**: 983–990
- Ivanchuk SM, Mondal S, Dirks PB, Rutka JT. The ink4a/arf locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. *J Neurooncol* 2001; **51**: 219–229
- Iwadate Y, Mochizuki S, Fujimoto S, Namba H, Sakiyama S, Tagawa M, Yamaura A. Alteration of cdkn2/p16 in human astrocytic tumors is related with increased susceptibility to antimetabolite anticancer agents. *Int J Oncol* 2000; **17**: 501–505
- Jackson Jr. DV, Sethi VS, Spurr CL, McWhorter JM. Pharmacokinetics of vincristine in the cerebrospinal fluid of humans. *Cancer Res* 1981; **41**: 1466–1468
- Jeong YW, Kim KS, Oh JY, Park JC, Baek WK, Suh SI, Suh MH, Lee JC, Cho JW. Exogenous wild-type p16INK4A gene induces delayed cell proliferation and promotes chemosensitivity through decreased pRB and increased E2F-1 expressions. *Int J Mol Med* 2003; **12**: 61–65
- Kamb A. Human melanoma genetics. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996; **1**: 177–182
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994a; **264**: 436–440
- Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, et al.. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 1994b; **8**: 23–26
- Keilholz U, Knoth H, Sauer H. Substanzprofile: Zytostatika, Hormone, Zytokine. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K, eds.. *Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie*. Heidelberg: Springer, 2006: 1547–1727
- Kim SH, Mitchell M, Fujii H, Llanos S, Peters G. Absence of p16INK4a and truncation of ARF tumor suppressors in chickens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 211–216
- Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 2006; **127**: 265–275
- Kleihues P, Burger PC, Aldape KD, Brat DJ, Biernat W, Bigner DD, Nakazato Y, Plate KH, Giangaspero F, von Deimling A, Ohgaki H, Cavenee WK. Glioblastoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007a: 33–47
- Kleihues P, Burger PC, Rosenblum MK, Paulus W, Scheithauer BW. Anaplastic astrocytoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007b: 30–32

- Kleihues P, Louis DN, Wiestler OD, Burger PC, Scheithauer BW. WHO grading of tumours of the central nervous system. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007c: 10–11
- Kraus JA, Wenghoefer M, Schmidt MC, von Deimling A, Berweiler U, Roggendorf W, Dietsch S, Dietzmann K, Muller B, Heuser K, Reifenberger G, Schlegel U. Long-term survival of glioblastoma multiforme: importance of histopathological reevaluation. *J Neurol* 2000; **247**: 455–460
- Kraus JA, Lamszus K, Glesmann N, Beck M, Wolter M, Sabel M, Krex D, Klockgether T, Reifenberger G, Schlegel U. Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001; **101**: 311–320
- Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 2007; **130**: 2596–2606
- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 2004; **114**: 1299–1307
- Kristof RA, Neuloh G, Hans V, Deckert M, Urbach H, Schlegel U, Simon M, Schramm J. Combined surgery, radiation, and PCV chemotherapy for astrocytomas compared to oligodendrogliomas and oligoastrocytomas WHO grade III. *J Neurooncol* 2002; **59**: 231–237
- Kyritsis AP, Yung WK, Bruner J, Gleason MJ, Levin VA. The treatment of anaplastic oligodendrogliomas and mixed gliomas. *Neurosurgery* 1993; **32**: 365–370
- Labuhn M, Jones G, Speel EJ, Maier D, Zweifel C, Gratzl O, Van Meir EG, Hegi ME, Merlo A. Quantitative real-time pcr does not show selective targeting of p14(arf) but concomitant inactivation of both p16(ink4a) and p14(arf) in 105 human primary gliomas. *Oncogene* 2001; **20**: 1103–1109
- Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001; **95**: 190–198
- Levin VA, Hoffman W, Weinkam RJ. Pharmacokinetics of BCNU in man: a preliminary study of 20 patients. *Cancer Treat Rep* 1978; **62**: 1305–1312
- Levin VA, Silver P, Hannigan J, Wara WM, Gutin PH, Davis RL, Wilson CB. Superiority of post-radiotherapy adjuvant chemotherapy with ccnu, procarbazine, and vincristine (pcv) over bcnu for anaplastic gliomas: Ncog 6g61 final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; **18**: 321–324
- Li G, Tang L, Zhou X, Tron V, Ho V. Chemotherapy-induced apoptosis in melanoma cells is p53 dependent. *Melanoma Res* 1998; **8**: 17–23

- Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol* 2006; **1**: 97–117
- Louis DN, Gusella JF. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet* 1995; **11**: 412–415
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; **114**: 97–109
- Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 2003; **13**: 77–83
- Makin G. Targeting apoptosis in cancer chemotherapy. *Expert Opin Ther Targets* 2002; **6**: 73–84
- Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res* 1995; **55**: 2995–2997
- Martikainen JA, Kivioja A, Hallinen T, Vihinen P. Economic evaluation of temozolomide in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Pharmacoeconomics* 2005; **23**: 803–815
- Mason W, Louis DN, Cairncross JG. Chemosensitive gliomas in adults: which ones and why? *J Clin Oncol* 1997; **15**: 3423–3426
- McLendon RE, Rosenblum MK, Schiffer D, Wiestler OD. Myxopapillary ependymoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007a: 72–73
- McLendon RE, Schiffer D, Rosenblum MK, Wiestler OD. Subependymoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007b: 70–71
- McLendon RE, Wiestler OD, Kros JM, Korshunov A, Ng HK. Anaplastic Ependymoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007c: 79–80
- McLendon RE, Wiestler OD, Kros JM, Korshunov A, Ng HK. Ependymoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007d: 74–78
- Medical Research Council Brain Tumor Working Party. Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 509–518
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/cdkn2/mts1 in human cancers. *Nat Med* 1995; **1**: 686–692

- Miettinen H, Kononen J, Sallinen P, Alho H, Helen P, Helin H, Kalimo H, Paljarvi L, Isola J, Haapasalo H. Cdkn2/p16 predicts survival in oligodendrogliomas: comparison with astrocytomas. *J Neurooncol* 1999; **41**: 205–211
- Modestou M, Puig-Antich V, Korgaonkar C, Eapen A, Quelle DE. The alternative reading frame tumor suppressor inhibits growth through p21-dependent and p21-independent pathways. *Cancer Res* 2001; **61**: 3145–3150
- Morgan D, Freshney RI, Darling JL, Thomas DG, Celik F. Assay of anticancer drugs in tissue culture: cell cultures of biopsies from human astrocytoma. *Br J Cancer* 1983; **47**: 205–214
- Nakazato Y, Figarella-Branger D, Becker AJ, Scheithauer BW, Rosenblum MK. Papillary glioneuronal tumour. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007: 113–114
- Nelson DF, Nelson JS, Davis DR, Chang CH, Griffin TW, Pajak TF. Survival and prognosis of patients with astrocytoma with atypical or anaplastic features. *J Neurooncol* 1985; **3**: 99–103
- Newton HB, Turowski RC, Stroup TJ, McCoy LK. Clinical presentation, diagnosis, and pharmacotherapy of patients with primary brain tumors. *Ann Pharmacother* 1999; **33**: 816–832
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007; **170**: 1445–1453
- Ohta T, Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Yachi K, Ogino A, Komine C, Fukushima T. Aberrant promoter hypermethylation profile of cell cycle regulatory genes in malignant astrocytomas. *Oncol Rep* 2006; **16**: 957–963
- Owells RJ, Root MA, Hains FO. Pharmacokinetics of vindesine and vincristine in humans. *Cancer Res* 1977; **37**: 2603–2607
- Park SH, Jung KC, Ro JY, Kang GH, Khang SK. 5' cpG island methylation of p16 is associated with absence of p16 expression in glioblastomas. *J Korean Med Sci* 2000; **15**: 555–559
- Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **59**: 928–942
- Petty EM, Gibson LH, Fountain JW, Bologna JL, Yang-Feng TL, Housman DE, Bale AE. Molecular definition of a chromosome 9p21 germ-line deletion in a woman with multiple melanomas and a plexiform neurofibroma: implications for 9p tumor-suppressor gene(s). *Am J Hum Genet* 1993; **53**: 96–104
- Prabhu NS, Somasundaram K, Tian H, Enders GH, Satyamoorthy K, Herlyn M, El-Deiry WS. The administration schedule of cyclin-dependent kinase inhibitor gene therapy and etoposide chemotherapy is a major determinant of cytotoxicity. *Int J Oncol* 1999; **15**: 209–216

- Prados MD, Scott C, Curran Jr. WJ, Nelson DF, Leibel S, Kramer S. Procarbazine, lomustine, and vincristine (pcv) chemotherapy for anaplastic astrocytoma: A retrospective review of radiation therapy oncology group protocols comparing survival with carmustine or pcv adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 3389–3395
- Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the ink4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; **83**: 993–1000
- Reifenberger G, Kros JM, Louis DN, Collins VP. Anaplastic Oligodendroglioma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007a: 60–62
- Reifenberger G, Kros JM, Louis DN, Collins VP. Oligodendroglioma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007b: 54–59
- Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994; **145**: 1175–1190
- Rui HB, Su JZ. Co-transfection of p16(ink4a) and p53 genes into the k562 cell line inhibits cell proliferation. *Haematologica* 2002; **87**: 136–142
- Salzman M. Survival in glioblastoma: historical perspective. *Neurosurgery* 1980; **7**: 435–439
- Salzman M, Scholtz H, Kaplan RS, Kulik S. Long-term survival in patients with malignant astrocytoma. *Neurosurgery* 1994; **34**: 213–219
- Salmon SE, Alberts DS, Meyskens FL, Durie BGM, Jones SE, Soehnen B, Young L, Chen HSG, Moon TE. Clinical Correlations of In Vitro Drug Sensitivity. In: Alberts DS, Chen H-S G, eds.. Cloning of human tumour stem cells. New York: AR Liss, 1980: 223–245
- Scheithauer BW, Hawkins C, Tihan T, VandenBerg SR, Burger PC. Pilocytic astrocytoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007: 14–21
- Scherer HD. Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am J Cancer* 1940; **1**: 159–198
- Schmidt EE, Ichimura K, Messerle KR, Goike HM, Collins VP. Infrequent methylation of cdkn2a(mts1/p16) and rare mutation of both cdkn2a and cdkn2b(mts2/p15) in primary astrocytic tumours. *Br J Cancer* 1997; **75**: 2–8
- Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, Mueller W, Kuklik A, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Louis DN, Fimmers R, von Deimling A. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; **61**: 321–328

- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin d/cdk4. *Nature* 1993; **366**: 704–707
- Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, Mao L, Merlo A, Sidransky D, Ewen ME, Rollins BJ. Multiple mechanisms of p16ink4a inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1995; **55**: 6200–6209
- Shapiro GI, Edwards CD, Ewen ME, Rollins BJ. p16ink4a participates in a g1 arrest checkpoint in response to dna damage. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 378–387
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; **274**: 1672–1677
- Sherr CJ. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev* 1998; **12**: 2984–2491
- Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 731–737
- Simon M, Köster G, Menon AG, Schramm J. Functional evidence for a role of combined cdkn2a (p16-p14(arf))/cdkn2b (p15) gene inactivation in malignant gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; **98**: 444–452
- Simon M, Simon C, Köster G, Hans VH, Schramm J. Conditional expression of the tumor suppressor p16 in a heterotopic glioblastoma model results in loss of pRB expression. *J Neurooncol* 2002; **60**: 1–12
- Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 2002; **359**: 1011–1018
- Stone S, Dayananth P, Jiang P, Weaver-Feldhaus JM, Tavtigian SV, Cannon-Albright L, Kamb A. Genomic structure, expression and mutational analysis of the p15 (mts2) gene. *Oncogene* 1995a; **11**: 987–991
- Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A. Complex structure and regulation of the p16 (mts1) locus. *Cancer Res* 1995b; **55**: 2988–2994
- Stone S, Dayananth P, Kamb A. Reversible, p16-mediated cell cycle arrest as protection from chemotherapy. *Cancer Res* 1996; **56**: 3199–3202
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998; **17**: 5001–5014
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006; **7**: 392–401
- Stupp R, Dietrich PY, Kraljevic SO, Pica A, Maillard I, Maeder P, Meuli R, Janzer R, Pizzolato G, Miralbell R, Porchet F, Regli L, de Tribolet N, Mirimanoff RO, Leyvraz S. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 1375–1382

- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005a; **352**: 987–996
- Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME. Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2005b; **5**: 198–206
- Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, Mason WP, Weller M, Mirimanoff RO, Cairncross JG. Changing paradigms—an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist* 2006; **11**: 165–180
- Tchougounova E, Kastemar M, Brasater D, Holland EC, Westermark B, Uhrbom L. Loss of Arf causes tumor progression of PDGFB-induced oligodendroglioma. *Oncogene* 2007; **26**: 6289–6296
- Trent S, Kong A, Short S, Traish D, Ashley S, Dowe A, Hines F, Brada M. Temozolomide as second-line chemotherapy for relapsed gliomas. *J Neurooncol* 2002; **57**: 247–251
- Uhrbom L, Dai C, Celestino JC, Rosenblum MK, Fuller GN, Holland EC. Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt. *Cancer Res* 2002; **62**: 5551–5558
- Uhrbom L, Kastemar M, Johansson FK, Westermark B, Holland EC. Cell type-specific tumor suppression by Ink4a and Arf in Kras-induced mouse gliomagenesis. *Cancer Res* 2005; **65**: 2065–2069
- van den Bent MJ, Chinot O, Boogerd W, Bravo Marques J, Taphoorn MJ, Kros JM, van der Rijt CC, Vecht CJ, De Beule N, Baron B. Second-line chemotherapy with temozolomide in recurrent oligodendroglioma after PCV (procarbazine, lomustine and vincristine) chemotherapy: EORTC Brain Tumor Group phase II study 26972. *Ann Oncol* 2003a; **14**: 599–602
- van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Brandes AA, Menten J, Stupp R, Frenay M, Chinot O, Kros JM, van der Rijt CC, Vecht CJ, Allgeier A, Gorlia T. Phase II study of first-line chemotherapy with temozolomide in recurrent oligodendroglial tumors: the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group Study 26971. *J Clin Oncol* 2003b; **21**: 2525–2528
- van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MC, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 2715–2722

- von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol* 1993; **3**: 19–26
- von Deimling A, Burger PC, Nakazato Y, Ohgaki H, Kleihues P. Diffuse astrocytoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007a: 25–29
- von Deimling A, Reifenberger G, Kros JM, Louis DN, Collins VP. Anaplastic Oligoastrocytoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007b: 66–67
- von Deimling A, Reifenberger G, Kros JM, Louis DN, Collins VP. Oligoastrocytoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds.. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007c: 63–65
- Walker MD, Strike TA, Sheline GE. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; **5**: 1725–1731
- Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander Jr. E, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley Jr. M, Mealey Jr. J, Owens G, Ransohoff J, Robertson JT, Shapiro WR, Smith Jr. KR, Wilson CB, Strike TA. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 1980; **303**: 1323–1329
- Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D, Parsons R. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1997; **57**: 4183–4186
- Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996; **6**: 217–223
- Watanabe T, Yokoo H, Yokoo M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Concurrent inactivation of rb1 and tp53 pathways in anaplastic oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; **60**: 1181–1189
- Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Yachi K, Ohta T, Ogino A, Komine C, Fukushima T. Aberrant hypermethylation of p14ARF and O6-methylguanine-DNA methyltransferase genes in astrocytoma progression. *Brain Pathol* 2007; **17**: 5–10
- Weller M, Rieger J, Grimm C, Van Meir EG, de Tribolet N, Krajewski S, Reed JC, von Deimling A, Dichgans J. Predicting chemoresistance in human malignant glioma cells: the role of molecular genetic analyses. *Int J Cancer* 1998; **79**: 640–644
- Weller M, Muller B, Koch R, Bamberg M, Krauseneck P. Neuro-Oncology Working Group 01 trial of nimustine plus teniposide versus nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 3276–3284

- Wong ET, Hess KR, Gleason MJ, Jaeckle KA, Kyritsis AP, Prados MD, Levin VA, Yung WK. Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 2572
- Yung WK, Prados MD, Yaya-Tur R, Rosenfeld SS, Brada M, Friedman HS, Albright R, Olson J, Chang SM, O'Neill AM, Friedman AH, Bruner J, Yue N, Dugan M, Zaknoen S, Levin VA. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 2762-2771
- Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W, Glantz M, Greenberg H, Selker RG, Vick NA, Rampling R, Friedman H, Phillips P, Bruner J, Yue N, Osoba D, Zaknoen S, Levin VA. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer* 2000; **83**: 588-593
- Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 1997; **15**: 203-211
- Zunino F, Perego P, Pilotti S, Pratesi G, Supino R, Arcamone F. Role of apoptotic response in cellular resistance to cytotoxic agents. *Pharmacol Ther* 1997; **76**: 177-185

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Matthias Simon, danke ich für die gute Betreuung. Insbesondere danke ich ihm und dem Zweitgutachter Herrn Professor Dr. med. Ulrich Herrlinger auch für die schnelle Erstellung der Gutachten. Herrn Professor Dr. med. Johannes Schramm danke ich für die Möglichkeit, in der Neurochirurgischen Universitätsklinik Bonn promovieren zu können. Für die Unterstützung bei allen Laborarbeiten danke ich Frau Dr. rer. nat. Gertraud Köster und Herrn Ralph Mahlberg.