

**Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg**

Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 und ihr Ligand in astrozytären Tumoren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Vorgelegt von Constanze Eßbach
aus Magdeburg

Magdeburg 2015

Dokumentationsblatt

Bibliographisches Verzeichnis

Constanze Eßbach:

Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 und ihr Ligand in astrozytären Tumoren – 2015, 67 Blätter, 8 Abbildungen, 1 Tabelle, 7 Anlagen

Schlüsselwörter

FLT3, FLT3L, astrozytäre Tumoren, Glioblastom, ITD, Punktmutation D835, Rezeptortyrosinkinase

Kurzreferat

Die schlechte Prognose nach konventioneller Therapie von Patienten, die an einem Glioblastoma multiforme (GBM) erkranken, macht es unausweichlich nach effektiven, schonenden, kurativen Behandlungsansätzen zu suchen. Hierdurch rücken molekulartherapeutische Ansätze für astrozytäre Tumoren mehr und mehr in den Mittelpunkt der Forschung. Einer dieser Ansätze beinhaltet die Therapie mit dem Liganden des FLT3-Rezeptors, der das Immunsystem und so die körpereigene Tumorabwehr stimulieren soll. Da bisher nicht sicher gesagt werden konnte, ob astrozytäre Tumoren nicht selbst den FLT3-Rezeptor exprimieren und durch Stimulation eventuell eine unerwünschte Therapiefolge hervorgerufen würde, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob und in welchen Mengen der Rezeptor und sein Ligand in astrozytären Tumoren der WHO Grade II-IV und fünf Glioblastomzelllinien vorkommen. Da der FLT3-Rezeptor selbst in bestimmten Subtypen hämatologischer neoplastischer Erkrankungen Mutationen tragen kann, wurde dieser auf die häufigsten Mutationen in den o. g. Tumoren und Zelllinien untersucht. Nur eine minimale Expression der mRNA des Rezeptors wurde in den meisten Proben nachgewiesen, obwohl diejenige des Liganden stets in gut quantifizierbarer Zahl von Kopien messbar war. Rezeptor-Mutationen fanden sich nicht. Insgesamt spricht das Ergebnis gegen Befürchtungen einer unerwünschten Wachstumsstimulation des Tumors im Falle der angedachten immunstimulierenden Therapie.

Publikationen

Eßbach, C., et al., *Abundance of Flt3 and its ligand in astrocytic tumors*. *Oncotargets Ther*, 2013. **6**: p. 555-61.

Inhaltsangabe

1	Einleitung	1
1.1	Astrozytäre Tumoren	2
1.1.1	Das Glioblastoma multiforme (GBM)	2
1.1.2	Das diffuse Astrozytom	7
1.1.3	Das anaplastische Astrozytom	9
1.2	Vergleich astrozytärer Tumoren untereinander	10
1.3	Neue Therapieansätze für das Glioblastoma multiforme	11
1.4	Der FLT3-Rezeptor (FLT3) und sein Ligand (FLT3L)	12
1.5	Die Rolle des FLT3-Rezeptors in hämatologischen Erkrankungen	15
1.6	Ansätze zur Nutzung des FLT3-Rezeptors und seines Liganden in der Therapie des Glioblastoma multiforme	17
1.7	Ziel der Arbeit	19
2	Methoden	20
2.1	Gewebeproben und Zellkulturen	20
2.2	DNA-Isolation aus Gewebeproben bzw. Zellkulturen	21
2.3	RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi	22
2.4	Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie	23
2.5	cDNA-Synthese	23
2.6	Real-time Polymerasekettenreaktion	24
2.7	Mutationsanalysen	26
2.7.1	ITD (internal tandem duplication)	26
2.7.2	Punktmutation	27
2.8	Herstellung und Färbung der Polyacrylamid-Gele für die Gelelektrophorese	28
2.8.1	Herstellung der Polyacrylamid-Gele	28
2.8.2	Gellauf	29
2.8.3	Silberfärbung der PAGE-Gele	30
2.9	Statistische Analysen	30

3	Ergebnisse	31
3.1	Histologie der untersuchten Gliome	31
3.2	Die quantitative mRNA-Expression von FLT3 und dem FLT3-Liganden	34
3.2.1	Ligand FLT3L und Referenzgen	34
3.2.2	Rezeptortyrosinkinase FLT3	38
3.3	Test auf eine interne Tandemduplikation (internal tandem duplication, ITD)	40
3.4	Analyse der Punktmutation D835	43
4	Diskussion	45
4.1	Vorkommen von FLT3 und seinem Liganden im Zentralnervensystem (ZNS)	45
4.2	Die Rolle von FLT3 in Gliomen	47
4.3	Vorkommen von FLT3L im ZNS außerhalb dendritischer Zellen	48
4.4	Rolle von FLT3 bei der Immunaktivierung im ZNS	49
5	Zusammenfassung	51
6	Literaturverzeichnis	52
7	Anhang	56
7.1	Danksagung	56
7.2	Ehrenerklärung	57
7.3	Darstellung des Bildungsweges	58
7.4	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	59
7.5	Chemikalien	59
7.6	Geräte und Software	61
7.7	Verbrauchsmaterial	61

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
4E-BP1	eukaryotic initiation factor 4E-binding protein
6-Fam	6-Carboxyfluorescein
A	diffuses Astrozytom
AA	anaplastisches Astrozytom
AKT	Proteinkinase B
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
BAS	BCL2 associated death promoter
BCL2	B-Cell CLL/Lymphoma-2
bp	Basenpaare
CBL	Casitas-B-lineage-Lymphoma
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementaryDNA
CML	chronische myeloische Leukämie
CREB	cAMP response element binding protein
CSF	colony stimulating factor
DC	dendritische Zelle
DNA	deoxyribonucleic acid
E	Expressionslevel
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FAK	focal adhesion kinase
FLT3	FLT3-Rezeptor (fms-like tyrosine kinase 3, Synonyme CD135, FLK2 (fetal liver kinase 2), STK1 (stem cell kinase 1))
FLT3L	Ligand des FLT3-Rezeptors
g	Gramm
GAB2	GRB2 associated binding protein
GBM	Glioblastoma multiforme
GM-CSF	granulocyte and macrophage colony stimulating factor
GRB2	growth factor receptor-bound protein-2
IDH	Isozitatdehydrogenase
IFN- α	Interferon α
IL	Interleukin
ITD	internal tandem duplication
LM	Längen-Mutation
LOH	loss of heterozygosity
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MEK	MAPK/ERK kinase
mg	Milligramm
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase

MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messengerRNA
mTOR	mammalian target of Rapamycin
nm	Nanometer
NOD	non-obese diabetic
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PDA	Piperazin-Diacrylamid
pDC	plasmazytoide DC
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP3	phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate
PKB	protein kinase-B
PTEN	phosphatase and tensin homology
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RB1	retinoblastoma protein 1
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RSK	ribosomal protein S6 kinase
RT-PCR	real time PCR
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
S6K	p70 S6 kinase
SCID	severe combined immunodeficiency
SHC	Sh2-containing sequence proteins
SHIP	Sh2-domain-containing inositol phosphatase
SHP2	Sh2-domain-containing protein tyrosine phosphatase-2
STAT	signal transducer and activators of transcription
STAT5	signal transducer and activator of transcription
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- α	transforming growth factor α
TGF- β	transforming growth factor β
TIMP-3	metalloproteinase inhibitor 3
TK	thymidine kinase
TNF- α	tumor necrosis factor α
TP	tumor protein
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem
β_2 MG	β_2 -Mikroglobulin
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ mol	Mikromol

Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 und ihr Ligand in astrozytären Tumoren

1 Einleitung

Die schlechte Prognose nach konventioneller Therapie von Patienten, die an einem Glioblastoma multiforme (GBM) erkranken, macht es unausweichlich nach effektiven, schonenden, kurativen Behandlungsansätzen zu suchen. Hierdurch rücken molekulartherapeutische Ansätze für astrozytäre Tumoren mehr und mehr in den Mittelpunkt der Forschung.

Viele dieser Ansätze zielen auf die Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) ab, da einige von ihnen Mutationen zeigen, die die Tumorentstehung vorantreiben[1]. Potentiell von Interesse ist auch die bislang nicht untersuchte Aktivierung der RTK fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) bei intrakraniellen Tumoren. Bisher wurde nicht geklärt, ob FLT3 und der korrespondierende natürliche Ligand (FLT3L) in astrozytären Tumoren selbst exprimiert werden, wenngleich einige auch für astrozytäre Tumoren diskutierte Tyrosinkinaseinhibitoren neben gut untersuchten RTK auch FLT3 beeinflussen. Da in hämatologischen Erkrankungen FLT3-Mutationen beschrieben wurden, ist es bei einer therapeutischen Beeinflussung des FLT3 unbedingt notwendig zu wissen, ob er als Wildtypvariante vorkommt oder eine Mutation trägt.

Da verschiedene Mutationen von Rezeptortyrosinkinasen in astrozytären Tumoren vorkommen, z.B. die EGFR (epidermal growth factor receptor)-Amplifikation, z. T. mit zusätzlichen aktivierenden Mutationen, ist es unabdingbar zu untersuchen, ob der FLT3-Rezeptor in den Tumorzellen vorkommt, mehr noch, sogar durch eine Stimulation des Rezeptors eine Verstärkung von Tumorwachstum, Invasion oder Chemoresistenz verursacht werden könnte. So gibt es Beispiele präklinischer Studien, in denen eine erhöhte Invasivität von Tumorzellen bei Inhibition des Signalwegs für VEGF (vascular endothelial growth factor) festgestellt wurde[2, 3].

Interessant ist ebenfalls, ob astrozytäre Tumoren verschiedener Grade eine unterschiedliche Expression von FLT3 oder FLT3L aufweisen. Da bestimmte Mutationen bereits in Vorläuferläsionen der sekundären GBM, andere jedoch vornehmlich in primären GBM vorkommen, ist es unabdingbar verschiedene Grade der astrozytären Tumoren zu untersuchen.

1.1 Astrozytäre Tumoren

Die WHO (World Health Organization) teilt Hirntumoren in verschiedene Entitäten ein. Unter den neuroepithelialen Tumoren des Zentralnervensystems finden sich die astrozytären Tumoren. Zu diesen gehören unter anderem das diffuse Astrozytom (WHO Grad II), das anaplastische Astrozytom (WHO Grad III) und das Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV). Das Glioblastoma multiforme stellt mit 60 – 75 % die häufigste Neoplasie innerhalb der astrozytären Tumoren dar[4].

1.1.1 Das Glioblastoma multiforme (GBM)

Das Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV) stellt mit einem Anteil von 12 – 15 % nicht nur den häufigsten intrakraniellen Tumor dar, sondern auch denjenigen mit dem höchsten malignen Potential [4]. Unter den astrozytären und oligodendroglialen Tumoren ist er mit einer Quote von 69 % vertreten [5, 6]. Trotz des typischen zellulären Pleomorphismus zählt er aufgrund seiner prädominant astrozytären Differenzierung zu den astrozytären Tumoren [4]. Seine Inzidenz in Europa und Nordamerika beträgt 3 - 4 Fälle je 100000 Einwohner. Prinzipiell ist jede Altersgruppe betroffen, vornehmlich jedoch Erwachsene. Es besteht ein Altersgipfel bei 45 und 75 Jahren. Der Altersdurchschnitt liegt bei 61,3 Jahren. Über 80 % der Patienten sind bei Diagnosestellung über 50 Jahre alt und nur 1 % ist jünger als 20 Jahre [4]. Das männliche Geschlecht ist mit einem Verhältnis von männlich:weiblich von 1,28 bevorzugt betroffen [4].

Nach der Entstehung der GBM unterscheidet man zwei Subtypen der Erkrankung, das primäre und das sekundäre GBM. Sie unterscheiden sich bezüglich des Erkrankungsalters, ihres Mutationsspektrums und damit in ihrer Entstehung sowie letzten Endes auch in ihrer Prognose.

Der Unterschied zwischen primären und sekundären GBM wurde bereits 1940 von Hans-Joachim Scherer [7] erkannt. Die WHO zog es 1979 noch nicht in Betracht, das GBM als astrozytären Tumor zu kategorisieren, vielmehr wurde es zur Gruppe der schlecht differenzierten und embryonalen Tumoren gezählt [1]. Mit der Einführung der Immunhistologie wurde das GBM als astrozytäre Neoplasie kategorisiert [1]. Die Differenzierung in primäre und sekundäre GBM hatte jedoch aufgrund ihrer

fehlenden histopathologischen Unterscheidbarkeit, sprich der für damalige Möglichkeiten nahezu völlig fehlenden Trennbarkeit dieser Subtypen, keine Konsequenz. Erst um die Jahrtausendwende wurde ihr epidemiologisches, biologisches Verhalten und damit ihre verschiedenartige Prognose wahrgenommen [5, 6].

Während das primäre GBM de novo, d. h. ohne klinisch, radiologisch oder histologisch fassbare Vorläuferläsion [1, 4] entsteht, entwickelt sich das sekundäre GBM langsam aus klinisch (Neuroimaging) oder histologisch (Biopsie) gesicherten niedriggradigeren astrozytären Tumoren [1], aus dem diffusen Astrozytom (WHO Grad II) oder dem anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III) [4].

In der Mehrzahl der GBM-Erkrankungen (90 – 95 %) handelt es sich um primäre GBM. Mit einer Anamnese von weniger als drei Monaten entwickeln sie sich deutlich schneller als sekundäre GBM, die vor allem jüngere Patienten unter 45 Jahren betreffen. Für die Progression vom diffusen Astrozytom zum GBM wird ein Zeitraum von ein bis zehn Jahren angenommen, bei einem Mittelwert von vier bis fünf Jahren [4]. Der Progressionszeitraum für das anaplastische Astrozytom zum GBM wird mit 24 Monaten angegeben [5, 6]. Bei wesentlich schnelleren Progressionen werden von vornherein fehldiagnostizierte GBM angenommen [1]. In ihrer Genetik, den resultierenden Expressionsprofilen und letzten Endes der Prognose sind weitere Unterschiede zu finden [4].

Makroskopisch stellt sich das GBM als großer, unscharf begrenzter Tumor von inhomogener Schnittfläche mit randlich grauem Tumoranteil, zentraler gelber Nekrose und Hämorrhagien dar [4]. Histologisch sind neben dem hohen zellulären Pleomorphismus und nukleären Atypien, auch eine hohe mitotische Aktivität, eine mikrovaskuläre Proliferation und Nekrosen, nicht zuletzt wegen vaskulärer Thrombosierung der Tumorgefäße, charakteristisch [4]. Lokalisiert ist das GBM zumeist in der subkortikalen weißen Substanz der Großhirnhemisphären.

Der Tumor infiltriert den angrenzenden Kortex und breitet sich meist unilateral aus, kann aber beispielsweise über das Corpus callosum die kontralaterale Hemisphäre erreichen, was nach dem makroskopischen Aspekt als Schmetterlingsgliom bezeichnet wird. Auch kann es bei schnellem Tumorwachstum zur supratentoriellen, bilateralen Extension entlang von Myelinscheiden über die Fornices, die vordere

Kommissur und der Sehstrahlung kommen. Auch die Basalganglien und der Thalamus können, v. a. bei GBM des Kindesalters, betroffen sein, wie auch der Hirnstamm, wenngleich sehr selten. Intraventrikuläre GBM sind rar, ebenso wie GBM des Cerebellums oder das Rückenmarks [4].

Die Ausbreitung erfolgt kontinuierlich über Infiltration des benachbarten Gewebes, nur sehr selten erfolgt sie über den Arachnoidalraum oder entlang der Liquorwege, wobei auch eine Ausbreitung entlang ventrikuloperitonealer Shunts möglich ist [4]. Wenngleich sich das GBM durch seine ausgeprägte Neoangiogenese und sein perivaskuläres Wachstum auszeichnet, finden sich nur äußerst selten Gefäßeinbrüche [4].

Zu den Symptomen gehören die Zeichen eines erhöhten intrakraniellen Druckes (Kopfschmerzen, Nausea, Vomitus, Papillenödem) oder epileptische Anfälle (bei einem Drittel der Patienten). Je nach Lokalisation treten neurologische oder psychiatrische Störungen auf, wie z. B. Persönlichkeitsänderungen oder schlaganfallähnliche Symptome, vor allem bei Tumorhämorrhagien[4].

Die Therapie des GBM gestaltet sich schwierig und erlaubt bis heute keine kurativen Absichten. Sie wird zum einen durch das invasive Verhalten des Tumorgewebes, durch seine Genominstabilität, aber auch durch die Blut-Hirn-Schranke, die sowohl als Schild für die Immunabwehr als auch für Pharmaka wirkt, eingeschränkt. Auch verfügt das GBM über Reparaturmechanismen gegen Pharmaka-induzierte Schäden [4, 8].

Durch seine invasive Natur ist keine vollständige neurochirurgische Entfernung des Tumors möglich, da selbst, wenn überhaupt genügend große Sicherheitsabstände eingehalten werden könnten, diese mit nicht tragbaren Funktionsverlusten im Bereich des Hirns einhergingen [4]. Zusätzlich erfolgt eine extrakorporale Radiotherapie und eine adjuvante, simultane Chemotherapie mit dem Alkylanz Temozolomid, das in seinem Nebenwirkungsprofil eine, in hohen Dosen gar tödliche, Thrombozytopenie und Neutropenie hervorrufen kann [9]. Auch sind GBM nur bedingt sensibel, wobei sich eine Methylierung der Promotorregion des MGMT (O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase)-Gens positiv auf den Erfolg einer Chemotherapie mit Alkylanzien auswirkt [1, 4, 8].

Auch wenn die neurochirurgische Tumorreduktion in multimodalen Therapieansätzen mit radio- und chemotherapeutischer Behandlung kombiniert wird, ist die Prognose infaust mit einer medianen Überlebenszeit von 14,6 Monaten nach Diagnosestellung [9].

Das GBM gehört zu den am besten vaskularisierten Tumoren des menschlichen Körpers. Seine enorme Durchblutung erhält die Neoplasie durch direkte Aneignung von vorbestehenden Gefäßen, Neoangiogenese oder Kapillarsprossung von hirneigenen Gefäßen [4].

Des Weiteren existieren eine migrationsfördernde extrazelluläre Matrix der Tumorzellen, eine Sekretion von proteolytischen Enzymen, die die Invasion durch diese Matrix erleichtern sowie eine veränderte Zell-Zell-Adhäsion und Integrinexpression und -aktivität [4].

GBM können eine große Anzahl genetischer Veränderungen aufweisen, so z. B. verschiedene Mutationen im Tumorsuppressor TP53 [4], der Isozitatdehydrogenase 1 und 2 [10], Heterozygotieverluste (sog. loss of heterozygosity, LOH), beispielsweise der Chromosomen 10 oder 17p, sowie EGFR-Amplifikationen [4]. So handelt es sich bei der Entstehung der primären GBM, wenngleich sie als de novo entstandene Tumoren ohne erfassbare Vorläsionen gelten, kaum um eine einzelne Transformation [1]. Während der Entstehung eines primären GBM akkumulieren verschiedene Mutationen [1] (vgl. Tabelle 1 Seite 10).

Die genetischen Alterationen im EGFR/PTEN (phosphatase and tensin homology)/AKT (Proteinkinase B)/mTOR (mammalian target of Rapamycin)-Stoffwechselweg stellen grundlegende Veränderungen, vor allem für die Entstehung des primären GBM, dar [1].

Die Resultate der Aktivierung von AKT sind Zellproliferation und eine Blockade der Apoptose, wichtige Faktoren in der Karzinogenese. Das downstream-Element mTOR reguliert die Biosynthese von Proteinen, die Voraussetzung für Zellwachstum und nachfolgende Zellteilung sind [11].

Die Phosphatase PTEN antagonisiert den AKT-Signalweg durch Dephosphorylierung des lipophilen sekundären Botenstoffs PIP3 (phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate). Dadurch werden Zellwachstum und Proliferation gedrosselt. Der funktionelle Verlust dieses antagonistischen Elements durch Mutation oder Promotor-Methylierung ist ein häufig vorkommendes Ereignis in primären GBM. Ähnliche

Signalkaskaden werden auch von anderen RTK in astrozytären Tumoren, z. B. von PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) genutzt [11].

Der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR), dessen Gen auf Chromosom 7 kodiert wird, ist ein transmembranärer Rezeptor, der auf extrazelluläre Liganden wie EGF (epidermal growth factor) oder TGF- α (transforming growth factor α) reagiert. Er ist das am häufigsten amplifizierte Gen im GBM [4], was in primären GBM stets zu einer Überexpression von EGFR führt. Auch weitere Elemente des PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/PTEN/AKT-Signalwegs sind betroffen, so neben EGFR auch weitere Rezeptoren, die über Wachstumsfaktoren aktiviert werden und PI3K rekrutieren. PTEN, ein Inhibitor des PIP3-Signals, somit bedeutungsvoll für Zellmigration und Invasion [1], ist zu 15 – 40 % [12] und beinahe ausschließlich in primären GBM mutiert [5].

Der TP53/MDM2 (mouse double minute 2 homolog) /p14-Signalweg ist hingegen in 65 % der sekundären GBM und oft schon in den Vorläuferläsionen betroffen. TP53 spielt die Rolle eines übergeordneten Regulators des Zelltodes, der Zellantwort auf DNA-Schäden, der Zelldifferenzierung, der Neovaskularisation sowie dem Zelltod. Die TP53-Mutation stellt mit 65 % in der Genetik des sekundären GBM und bereits mit 53 – 60 % [4] in den Vorläuferläsionen eine der häufigsten und am frühesten detektierbaren Mutationen dar [5, 13].

Die Mutationen der Isozitatdehydrogenase 1 (IDH1) und der homologen IDH2 stellen inzwischen eine weitere Hilfe dar, um primäre und sekundäre GBM auf molekularpathologischem Weg zu unterscheiden. Darüber hinaus eignet sich der Mutationsnachweis auch, um Patienten mit gesicherten astrozytären Tumoren der WHO-Grade II - IV in eine Prognosegruppe einordnen zu können.

Die IDH1-Mutation zeigt sich bereits in 75 % der Astrozytome Grad II und Grad III, stellt das am häufigsten mutierte Gen in verschiedenen Gliomen dar. Sowohl die IDH1- als auch die IDH2-Mutation sind frühe Ereignisse in der Gliomentwicklung. Darüber hinaus finden sich, mit Ausnahme der AML (akute myeloische Leukämie), keine IDH-Mutationen in anderen onkologischen Erkrankungen [10].

Mutationen der IDH kommen kaum in primären GBM vor, jedoch sehr häufig in sekundären, vor allem bei jüngeren Patienten. Die Unterscheidung von primären und sekundären GBM mittels des Mutationsnachweises in der IDH hat eine Sensitivität von

71 – 73 % und eine Spezifität von 96 %. Darüber hinaus weisen Patienten mit Mutationsnachweis der IDH eine deutlich bessere Prognose auf. Therapeutisch ließen sich bisher allerdings keine signifikanten Korrelationen bezüglich des Vorhandenseins von IDH-Mutationen nachweisen [10].

Die Prognose eines GBM ist jedoch auch heute noch, unabhängig von der immer umfassenderen molekularpathologischen Typisierung, generell sehr schlecht. Immerhin trugen die über Jahrzehnte angesammelten molekularen Daten zur Identifizierung alterierter molekularer Signalwege bei, die sich eines Tages vielleicht als Angriffspunkte einer gezielten Therapie erweisen könnten. Wie aus dem obigen abzulesen, sind interessante Signalwege nicht selten solche, die von RTK ausgehen, von denen FLT3 bislang jedoch fast vollständig unberücksichtigt blieb.

1.1.2 Das diffuse Astrozytom

Das diffuse Astrozytom (WHO-Grad II) ist ein das Hirnparenchym diffus infiltrierender Tumor, an dem hauptsächlich junge Erwachsene erkranken. Es weist sich durch einen hohen Grad an Differenzierung und sein langsames Wachstum aus. Das diffuse Astrozytom kann das gesamte Zentralnervensystem befallen, kommt aber bevorzugt supratentoriell vor. Es macht 10 – 15 % der astrozytären Hirntumoren aus und besitzt die Tendenz zur malignen Progression zum anaplastischen Astrozytom oder gar zum Glioblastoma multiforme [4].

Es werden drei Subtypen unterschieden, das fibrilläre, gemistozytische oder protoplasmatische diffuse Astrozytom [4]. Der Häufigkeitsgipfel liegt bei 30 - 40 Lebensjahren, mit einem Mittelwert von 34 Jahren. Männer sind mit einer Rate von 1,18:1 häufiger als Frauen betroffen [4]. Die klinische Symptomatik besteht je nach Lokalisation aus unspezifischen Ausfällen oder Krampfanfällen [4]. Selten, bei Verlegung des Liquorabflusses, kann auch ein erhöhter Hirndruck auftreten. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ergibt sich gehäuft retrospektiv eine längere Anamnese als zunächst angenommen [4]. Der Tumor selbst wächst nicht destruktiv, jedoch unter Distorsion und Verdrängung des angrenzenden Gewebes [4].

Das diffuse Astrozytom zeigt häufig Mutationen, LOH oder Promotormethylierungen. So tritt z. B. eine TP53-Mutation in über 60 % der Fälle auf sowie häufig auch Mutationen der Gene IDH1 und -2. Es findet sich oft eine erhöhte mRNA-Expression

für PDGFR und eine LOH der Chromosomen 22q und 6. Eine Promotormethylierung P14^{ARF} tritt in einem Drittel, eine MGMT-Promotormethylierung in 50 % der Fälle auf. Letztere ist signifikant assoziiert mit TP53-Mutationen [4].

Therapeutisch angegangen wird das diffuse Astrozytom mit einer chirurgischen Exzision und Radiotherapie.

Die prognostischen Daten beziehen sich auf Patienten nach einer optimalen chirurgischen Therapie. Hier beträgt die Überlebensrate 6 - 8 Jahre, ist aber im Wesentlichen von der malignen Progression beeinflusst, die durchschnittlich nach 4 - 5 Jahren auftritt. Generell haben junge Patienten mit kleineren Tumoren, nach operativer Therapie, die als alleiniges Symptom Krampfanfälle zeigen, somit keine neurologischen Defizite aufweisen, die beste Prognose [4].

1.1.3 Das anaplastische Astrozytom

Das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) ist ein maligner, das umliegende Parenchym diffus infiltrierender, hirneigener Tumor. Erkrankungen treten gehäuft im Erwachsenenalter auf, zumeist in den Großhirnhemisphären. Histologisch ist das anaplastische Astrozytom durch die nukleäre Atypie, eine erhöhte Zellularität und eine signifikante Proliferation mit Mitoseraten von 5 – 10 % gekennzeichnet. Es kann de novo oder aus einem diffusen Astrozytom entstehen und in ein GBM übergehen [4]. Das anaplastische Astrozytom tritt durchschnittlich im 45. Lebensjahr auf, mit einer Präferenz für das männliche Geschlecht bei einer Quote von männlich:weiblich von 1,1 - 1,6:1 [4].

Die Klinik ähnelt der des diffusen Astrozytoms stark, wenngleich eine Erhöhung des intrakraniellen Druckes öfter zu verzeichnen ist [4]. Mit einer Häufigkeit von TP53-Mutationen in 50 – 60 % und einer LOH 17p sowie einer LOH 22q in 20 – 30 % der Fälle zeigt seine Genetik Ähnlichkeiten zum diffusen Astrozytom. Es finden sich häufig auch LOH der Chromosomen 10q, 19q und 6q sowie eine PTEN-Mutation.

Therapeutisch wird auch das anaplastische Astrozytom chirurgisch angegangen mit nachfolgender Radiotherapie. Rekurrente anaplastische Astrozytome werden darüber hinaus chemotherapeutisch mit Temozolomid behandelt.

Das anaplastische Astrozytom weist eine starke Tendenz auf, sich zu einem GBM zu transformieren, was meist innerhalb von 24 Monaten geschieht. Die Prognose bei jüngeren Patienten ist günstiger als bei älteren, wobei eine EGFR-Amplifikation als nachteilig gilt [4].

1.2 Vergleich astrozytärer Tumoren untereinander (Tabelle 1)

	Diffuses Astrozytom	Anaplastisches Astrozytom	Primäres GBM (95 %)	Sekundäres GBM (5 %)
Häufigkeit der astrozytären Tumoren	10 – 15 % [4]		60 - 75 % [4]	
Inzidenz (European Standard Population (100.000 Einwohner per annum))			3,531 [1]	0,199 [1]
Durchschnittliches Erkrankungsalter	34 Jahre [4]	45 Jahre [4]	62 Jahre [5, 6]	45 Jahre [5, 6]
Verhältnis Männer:Frauen		1,1 - 1,6:1 [4]	1,33 [5, 6]	0,65 [5, 6]
Anamnese			<3 Monaten: 68 % [6]	Vorläuferläsion Grad II: 5,3 Jahre [6]
			3 - 6 Monate: 16 % [6]	
			>6 Monate: 16 % [6]	Vorläuferläsion Grad III: 1,4 Jahre [6]
			(Durchschnitt: 6,3 Monate) [6]	
Überlebenszeit	6 - 8 Jahre [4]		14,6 Monate [9]	
Progression zu GBM	60 Monate [6]	24 Monate [5, 6]		
Genetische Alterationen				
IDH1-Mutation	74 % [10]	59 % [10]	5 % [10]	83 % [10]
IDH2-Mutation	4 % [10]	4 % [10]	0 % [10]	0 % [10]
TP53-Mutationen	60 % [4]	53 % [4]	28 % [4, 5]	65 % [4, 5]
EGFR-Amplifikation		<10 % [4]	36 % [4, 5]	8 % [4, 5]
EGFR-Überexpression			>60 % [13]	<10 % [13]
PTEN-Mutation		18 - 23 % [4]	25 % [4, 5]	4 % [4, 5]
p16INK4a-Deletion			31 % [4, 5]	19 % [4, 5]
LOH 1p			12 % [14]	15 % [14]
LOH 10p		35 - 60 % [4]	47 % [15]	8 % [4, 15]
			47 % [15]	54 % [15]
LOH 10q			70 % [4, 5]	63 % [5]
LOH 13q			12 % [14]	38 % [14]
LOH 19q		46 % [4]	6 % [14]	54 % [14]
LOH 22q	17 % [4]	20 - 30 % [4]	41 % [16]	82 % [16]
Promotormethylierung				
p14ARF	33 % [4]		6 % [17]	31 % [17]
p16INK4a			3 % [17]	19 % [17]
RB1			14 % [18]	43 % [18]
MGMT	50 % [4]		36 % [19]	75 % [19]
TIMP-3			28 % [16]	71 % [16]

Tabelle 1: Inzidenz, Alter, Überleben, genetische und epigenetische Veränderungen sowie Expressionsprofile in primären und sekundären Glioblastomen[1] (ANGEPASST).

1.3 Neue Therapieansätze für das Glioblastoma multiforme

Trotz multimodaler Therapieansätze wie der chirurgischen Tumorreduktion, Radiotherapie (extrakorporale Strahlentherapie) und Chemotherapie mit Temozolomid ist die Prognose der Patienten mit GBM schlecht. Generell zeichnet sich das GBM durch ein allenfalls geringes Ansprechen auf eine zytotoxische Therapie aus, die jedoch auch das nichtneoplastische Gewebe angreift [2, 9]. Die mediane Überlebenszeit mit dieser konventionellen Therapie beträgt 14,6 Monate, die mediane progressionsfreie Überlebenszeit 6,9 Monate [2, 9]. Das Ergebnis der konventionellen zytotoxischen Therapie ist schlecht und nicht kurativ. Es ist aus diesen Gründen selbstverständlich, dass stets nach neuen, effektiveren Behandlungsmöglichkeiten gesucht wird, im Idealfall mit einer geringeren Toxizität für nichtneoplastisches Gewebe [2].

Die Neoangiogenese wird angetrieben durch eine erhöhte VEGF-Expression neben der im Tumor herrschenden Hypoxie [2, 4, 20]. Aufgrund der enormen Neoangiogenese ist diese als Ziel für eine spezifische Therapie zu berücksichtigen. Verwirklicht wurde diese durch den Einsatz von Bevacizumab, einem humanisierten, monoklonalen, gegen VEGF gerichteten Antikörper in Kombination mit Irinotecan, einem Topoisomerase-Inhibitor, der das Outcome der Patienten signifikant verbesserte [2, 21]. Dem entgegen steht eine, in präklinischen Studien festgestellte, erhöhte Invasivität von Tumorzellen bei VEGF-Inhibition durch Nutzung präexistenter Hirngefäße des Patienten durch den Tumor [2, 3]. Diese Tatsache zeigt, dass antiangiogenetische Behandlungsansätze eine begleitende antiinvasive und Antimigrationstherapie erfordern [2].

Neue zielgerichtete Therapieansätze greifen in Signalkaskaden ein, die der Tumor zum Wachstum, Überleben, zur Invasion und Neoangiogenese benötigt. Diese zielen auf eine effektivere Therapie mit geringerer Toxizität für nichtneoplastisches Gewebe ab [2]. Einige Therapieansätze bedienen sich Substanzen wie z. B. Integrininhibitoren, da Integrine selbst von GBM in großer Anzahl exprimiert werden. Sie unterstützen das Zellüberleben, die Zellmigration sowie Neoangiogenese. Die Endstrecke der Integrinsignalkaskade wird vom FAK (focal adhesion kinase)-PI3K-MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Pathway gebildet [22, 23]. Studien mit der Substanz Cilengitide, einem $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ -

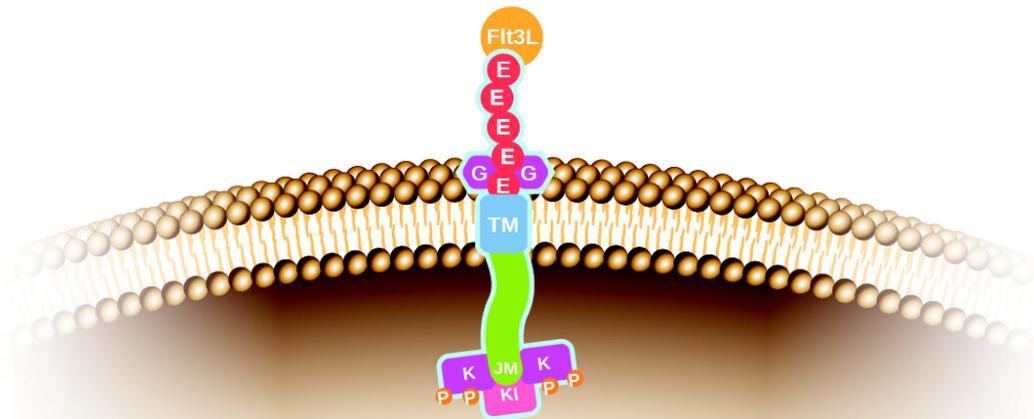
Integrininhibitor, zeigten eine synergistische Wirkung mit der extrakorporalen Radiotherapie. Hierbei wurde zunächst in ersten Studien gezeigt, dass Cilengitide antitumorös bei geringer Toxizität wirkt, auch bei Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung, die ein geringeres Ansprechen auf Temozolomid zeigen. Mehr noch erhöhte sich dieser positive Effekt in Kombination mit Temozolomid bei konstantem Toxizitätslevel [2]. Doch erreichte die klinische CENTRIC Multicenter-Studie der Phase III mit Alkylanz-sensitiven Glioblastomen (MGMT-Promotormethylierung) nicht ihren primären Endpunkt, d. h. ein längeres Überleben der Patienten, wenn zusätzlich zur etablierten Standardtherapie mit Temozolomid plus Radiatio Cilengitide verabreicht wurde [24, 25]. Dies dämpfte, trotz der augenfälligen Infiltrationsneigung des Glioblastoms, erheblich die mit der Migrationshemmung verknüpfte Hoffnung und rückt u. a. an RTK angreifende Therapien wieder mehr in den Fokus.

1.4 Der FLT3-Rezeptor (FLT3) und sein Ligand (FLT3L)

FLT3 (fms-like tyrosine kinase 3, Synonyme CD135, FLK2 (fetal liver kinase 2), STK1 (stem cell kinase 1)) ist ein Tyrosinkinaserzeptor der Klasse III, mit der LocusID (NCBI) 2322 und der Lokalisation 13q12.2[26]. Das translatierte Protein besteht aus 993 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 112,804 kDa [26].

Es handelt sich um eine Rezeptortyrosinkinase, welche aufgrund ihrer Struktur, mit C-FMS, C-Kit sowie dem Rezeptor des PDGF verwandt ist [26]. In seinem extrazellulären Anteil enthält der Rezeptor fünf immunoglobulin-like-Domänen neben einer transmembranen, einer juxtamembranösen, sowie einer intrazellulär gelegenen Tyrosinkinasedomäne. Letztere ist durch spezifische hydrophile Motive zweigeteilt. In der Immunpräzipitation imponieren zwei Banden, die eine mit einem kleineren Molekulargewicht von 130 kDa, die größere mit 155-160 kDa. Letztere gehört zu der reifen, N-glykosylierten Variante des Rezeptors, die kleinere zur unreifen, mannosereichen Form [26]. Die Glykosylierung fördert die Bindung des Rezeptors an die Zellmembran (Abbildung 1).

Abbildung 1: FLT3-Rezeptor phosphoryliert mit Ligand



Abkürzungen: FLT3L: Ligand des FLT3-Rezeptors, E: extrazelluläre immunglobulin-like-Domänen, TM: transmembrane Domäne, JM: juxtamembranöse Domäne, K: intrazellulär gelegene Tyrosinkinasedomäne KI: inserierte Zwischensequenz zwischen zwei Kinase-Domänen G: Glykosylierung

Quelle: [27] Illustriert von Rainer Böhme(BA)

Die FLT3-Expression ist essentiell für CD34-positive Knochenmarkszellen, somit zugehörig zu den multipotenten, sowohl myeloischen Vorläufer- und B-lymphatischen Progenitorzellen, als auch zu den Zellen der monozytischen Reihe und ist damit notwendig für die normale Entwicklung und Funktion dieser Zellen. Somit ist die Rezeptorexpression üblicherweise auf Zellen des Knochenmarks, Thymus und von Lymphknoten begrenzt, aber auch in Geweben wie Plazenta, Hirn, Kleinhirn, Gonaden und ebenfalls in fetalen Leberzellen nachweisbar. Außerdem findet sich ein erhöhtes Expressionslevel des FLT3-Rezeptors in Blasten der AML (akute myeloische Leukämie), CML (chronische myeloische Leukämie) und B- und T-ALL (B- und T-Zell akute lymphatische Leukämie) [28]. Die Aktivierung des Rezeptorproteins erfolgt durch den FLT3L (FLT3-Ligand).

Durch Bindung des Liganden an den FLT3-Rezeptor erfolgt die Homodimerisierung des Rezeptors, was anschließend zur Signalübertragung durch die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors führt, sprich durch die Phosphorylierung mehrerer Proteine des Zytoplasmas. Somit gehört FLT3 zu den

Rezeptortyrosinkinasen, genauer zu der CSF (colony stimulating factor)-1/PDGF-Subfamilie. Er enthält eine Immunglobulin-like-C2-Domäne und katalysiert die Reaktion von ATP und Tyrosin zu ADP und Tyrosinphosphat.

Nach Bindung des Liganden erfolgt die Signaltransduktion über eine Aktivierung des PI3K- und Ras-Weges, was zu einer erhöhten Zellproliferation sowie Apoptoseinhibition führt [29]. Die PI3K-Aktivierung selbst wird durch Interaktionen zwischen dem FLT3 mit z. B. SHC (Sh2-containing sequence proteins), SHIP (Sh2-domain-containing inositol phosphatase), SHP2 (Sh2-domain-containing protein tyrosine phosphatase-2), CBL (Casitas-B-lineage-Lymphoma) und GAB2 (GRB2 associated binding protein) reguliert. Aktivierte PI3K stimuliert downstream-Proteine wie PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1), AKT1/PKB (protein kinase-B) und mTOR, welche dann wiederum die Transkription und Translation von Regulatorgenen initiieren. Dieses geschieht durch die Aktivierung von S6K (p70 S6 kinase) und via 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein) [30].

Zusätzlich ist die Aktivität von PI3K selbst ein Apoptoseinhibitor. Dies wird realisiert durch Phosphorylierung des proapoptotisch wirkenden BAD (BCL2 associated death promoter), einem Protein der BCL2 (B-Cell CLL/Lymphoma-2)-Familie. Aktiviertes FLT3 interagiert auch mit GRB2 (growth factor receptor-bound protein-2) via SHC, welches Ras aktiviert und downstream-Effektoren, wie RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma), MEK (MAPK/ERK kinases), p38, ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinase) und RSK (ribosomal protein S6 kinase). Diese downstream-gelegenen Elemente aktivieren CREB (cAMP response element binding protein), ELK und STAT (signal transducer and activators of transcription), was zu einer Transkription von FLT3-mRNA und der Translation von FLT3 führt [27].

Der FLT3-Ligand wird von Stromazellen des Knochenmarks gebildet. Die Bindung des Liganden am Rezeptor aktiviert die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen, deren Proliferation und hat eine positive Wirkung auf deren Überleben. Funktionell spielt der FLT3L jedoch nicht nur eine wichtige Rolle auf der Entwicklungsstufe der hämatopoetischen Stammzellen, sondern ist auch ein physiologischer Regulator der folgenden B-Zell-Lymphopoese. FLT3L bildet eine Synergie mit Interleukin (IL) 7 bei der Proliferationsinduktion von B-Progenitorzellen und ihren reiferen Entwicklungsstadien. Auch Zytokine, die von aktivierten

Lymphozyten produziert werden (z. B. IL3), synergieren mit FLT3L, um die B-Zell-Entwicklung zu beschleunigen [27]. Auch kontrolliert FLT3L die Entwicklung von DC (dendritischen Zellen) [31], spielt eine Rolle für plasmazytoide, CD8-positive klassische DC und ihre CD103-positiven Pendanten im Gewebe. DC selbst stellen die Schlüsselverbindung zwischen angeborener und spezifischer Immunantwort dar, indem sie Antigene erkennen und die Antigen-spezifische Immunantwort in die Wege leiten.

Zwei der Zytokine, die die FLT3-Aktivität senken, sind TNF- α (tumor necrosis factor α) und TGF- β (transforming growth factor β), welche die FLT3-induzierte hämatopoetische Aktivität stoppen. TGF- β selbst bewirkt eine Verminderung des FLT3-Levels sowie der FLT3L-induzierten Senkung der Entwicklungszeit, die die hämatopoetischen Progenitorzellen in der G1-Phase des Zellzyklus verbringen [27].

Nach Dimerisation erfolgt die Internalisierung des Rezeptors zum Abbruch der Signalübertragung.

1.5 Die Rolle des FLT3-Rezeptors in hämatologischen Erkrankungen

Es gibt mittlerweile eine Liste FLT3-Rezeptor-Mutation-assoziiierter Erkrankungen. Ein Drittel aller Patienten, die an einer akuten myeloischen Leukämie erkranken, weisen eine FLT3-Mutation auf [32]. So sind somatische Mutationen im FLT3-Gen die häufigsten genetischen Aberrationen, welche bei der akuten myeloischen Leukämie beschrieben werden [26, 32]. Die mit 20 – 25 % der Fälle häufigste Mutation, eine interne Tandem-Duplikation [26, 33], befindet sich in der juxtamembranösen Domäne, gefolgt von der zweithäufigsten Mutation, einer Punktmutation im Codon 835 oder Deletion im Codon 836, mit 7 – 8 %. Die ständig wachsende Anzahl neu entdeckter Mutationen enthält unter anderem sowohl Punktmutationen der juxtamembranösen Domäne, als auch andere Mutationen, die das gesamte Gen betreffen können. Sehr bedeutend sind die FLT3-Rezeptor-Längen-Mutationen. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um die oben erwähnte Duplikation der inneren Tandem-Domäne (ITD, internal tandem duplication), seltener um andere Veränderungen, wie die Deletion dieser Domäne. Die ITD wird auch in 5 -10 % der myelodysplastischen Syndrome (MDS), sehr selten auch in Fällen einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) gefunden. Im Gegensatz hierzu

werden auch in AML-Fällen, in denen die Patienten nachweislich keine FLT3-Mutation aufweisen, dessen ungeachtet erhöhte Level des Wildtypproteins gefunden, was ebenfalls mit einer Prognoseverschlechterung einhergeht. Die Duplikationssequenz befindet sich auf Exon 11, kann jedoch auch Intron 11 und Exon 12 betreffen. Aufgrund der Heterogenität der Mutationen, kann auch vom allgemeinen Begriff der FLT3-LM (Längen-Mutation) gesprochen werden.

Es gibt einen deutlichen Zusammenhang einer schlechteren Prognose, basierend auf erhöhten Rückfallraten, mit FLT3-LM. Der vollständige Verlust des Wildtypallels im Laufe der Erkrankung geht mit einer deutlichen Prognoseverschlechterung einher. Prognostisch ist der PCR-basierte Nachweis einer minimal residual disease ausschlaggebend für Hochrisikopatienten mit einer AML. FLT3-LM korrelieren entweder mit einem unauffälligen Karyotyp [26] oder mit einem Karyotyp mit der Translokation $t(15;17)(q25;q21)$ [26, 34]. Diese Mutation bewirkt eine ligandenunabhängige Autophosphorylierung des Rezeptors. Die vom Wildtyp abweichende Struktur der juxtamembranösen Domäne bei LM verursacht eine Störung in einer Feedbackschleife mit negativer Rückkopplung, was in einer ständigen Aktivität des Rezeptors resultiert. Dies führt nachweislich zu einer qualitativen Veränderung des intrazellulären Signalwegs. Somit wird durch den mutierten Rezeptor kaum der MAP-Kinase- und AKT-Signalweg benutzt, als vielmehr der STAT5 (signal transducer and activator of transcription)-Signalweg. Für die erwähnten Mutationen der Codons 835 und 836 gibt es derzeit keinen klinischen Hinweis auf prognosespezifische Zusammenhänge. Auch diese Mutationen führen jedoch zu einer konsekutiven Autoaktivität des Rezeptors.

1.6 Ansätze zur Nutzung des FLT3-Rezeptors und seines Liganden in der Therapie des Glioblastoma multiforme

Einige therapeutische Ansätze zielen darauf ab, das Immunsystem zu stimulieren, welches das GBM selbst angreifen und eliminieren soll. Ein wichtiger Bestandteil ist hier die Aktivierung von dendritischen Zellen (DC), die mit Tumorantigenen sensibilisiert wurden. Hier kommt auch FLT3L zum Einsatz, als ein Wachstumsfaktor, der die Expansion von DC induziert [31]. Auch Interferon α (IFN- α), ebenfalls ein DC-Aktivator, wird für die Behandlung des GBM genutzt, aufgrund positiver Effekte bezüglich einer gegen den Tumor gerichteten Immunreaktion, aber auch bezüglich Angiogenese, Tumorzellproliferation und Tumorzelltod [35-38].

IFN- α hat einen, dem Tumor entgegenwirkenden Effekt hinsichtlich der Reduktion der Angiogenese in Rattenhirnen [37], der Inhibierung der Proliferation der GBM-Zellen [39] und der Sensibilisierung letzterer auf proapoptotisch wirkende Substanzen [38]. Auch besitzt IFN- α eine indirekte antitumoröse Aktivität in verschiedenen neoplastischen Entitäten durch die Stimulation des körpereigenen Immunsystems. So aktiviert es DC, erhöht sowohl die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplexen (major histocompatibility complexes, MHC) I und II als auch die Infiltration von Abwehrzellen in der tumorassoziierten Mikroumgebung und verbessert die zelluläre und humorale antitumoröse Immunität [36]. Der Einsatz von IFN- α ist jedoch durch seine eigene Toxizität begrenzt [38].

Auf der Suche nach Behandlungsmethoden, die ebenso effektiv gegen die neoplastischen Zellen als auch unschädlich für das umgebende, nichtneoplastische Hirnparenchym sind, wurden Zytotoxine und Zytokine mittels viraler Vektoren übertragen [23, 27, 28, 38, 40].

Zum einen kommt die Herpes-simplex-Virus-1-Thymidin-Kinase (TK) zum Einsatz, die proliferierende Zellen in Gegenwart von Ganciclovir abtötet, zum anderen FLT3L, welches Antigen-präsentierende-Zellen (APC), zu denen DC gehören, in den Tumor und seine Umgebung lockt [38]. Diese kombinierte Gentherapie zerstört manifeste intrakranielle astrozytäre Tumoren in mehreren Ratten- und Mausmodellen [38].

Diese Behandlung induziert eine gegen den Tumor gerichtete antitumoröse Immunantwort, basierend auf APC, CD4- und CD8-positiven T-Zellen [38, 40]. FLT3L ist ein Wachstumsfaktor, der die Expansion von DC induziert [31].

Die Wirkung von intrakraniell aktivem FLT3L induziert über die Expansion hinaus die Rekrutierung von plasmazytoiden DC (pDC), die eine Untergruppe von IFN- α -produzierenden DC darstellen, in das Hirnparenchym in Rattenmodellen [38]. Die Rolle von pDC in der Tumorummunologie bleibt umstritten, da pDC immunologische Toleranz oder antitumoröse Immunität bewirken können [38]. pDC können reifen, was zu einer Expression von co-stimulierenden Molekülen und inflammatorischen Zytokinen sowie Migration in die drainierenden Lymphknoten führt, um Tumorantigene zu naiven CD4-positiven T-Zellen zu bringen [38]. pDC sind professionelle IFN- α -produzierende Zellen, deren Fähigkeit, IFN freizusetzen, diejenige anderer Immunzellen um das 100- bis 1000-fache übersteigt [38].

Die Differenzierung und Proliferation von DC wird durch den FLT3-Liganden oder GM-CSF (granulocyte and macrophage colony stimulating factor) ausgelöst. IL6 (Interleukin 6) verbessert darüber hinaus die Expansion und Proliferation von FLT3L-induzierten DC. IL6 und FLT3-Ligand-induzierte DC bilden co-stimulierende Moleküle wie CD86 und CD80 aus. Die Reifung von DC mit hochreguliertem MHCII und diesen co-stimulierenden Molekülen wiederum, löst eine klonale Expansion von antigenspezifischen T-Zell-Populationen aus und somit eine Immunantwort, die in der Lage ist, Tumorzellen zu eliminieren [41].

DC, die in Tumorlysaten und unter dem Einfluss von FLT3L und IL6 generiert und so auf den Tumor sensibilisiert wurden, induzieren wiederum tumorspezifische zytotoxische T-Lymphozyten. Lewis-Ratten, die mit diesen DC systemisch vakziniert wurden, zeigten ein vollständig inhibiertes Tumorstadium und 100%iges Langzeitüberleben im Gegensatz zu den Vergleichstieren, was auf eine enorme, durch FLT3 und IL6 induzierte, antitumoröse Immunantwort schließen lässt [41].

Inzwischen wurde darüber hinaus demonstriert, dass dieser therapeutische Erfolg ein Immungedächtnis etabliert, das auch in Xenotransplantaten von GBM der kontralateralen Hirnhälften, die selbst nicht mit gentherapeutischen Vektoren injiziert wurden, zur Tumorauslöschung führte [42]. Hierfür wurde die TK in die Umgebung des Tumors injiziert, was in Gegenwart von Ganciclovir den lokalen

Zelltod der GBM-Zellen hervorrief. Zusätzlich erfolgte die Injektion von Adenoviren, die FLT3L exprimierten, was zur Aktivierung von DC führte, die für die Immunantwort und das Immungedächtnis verantwortlich sind [43].

Nach Tumorregression zeigten die Hirne der Versuchstiere lediglich einen geringen Gehalt an Immunzellen, ohne Hinweise auf größere zytotoxische Effekte [43].

1.7 Ziel der Arbeit

Trotz der oben skizzierten FLT3-abhängigen Immuntherapieansätze bei astrozytären Gliomen (Stimulation des FLT3-Rezeptors lokaler DC) und trotz der bei diesen Tumoren ebenfalls diskutierten Anwendung Wachstums-hemmender RTK-Inhibitoren (Hemmung des Rezeptors in Tumorzellen), existierten keine systematischen Studien zu FLT3 bei diesen Entitäten. Die vorliegende Doktorarbeit sollte einen ersten Schritt dazu unternehmen.

Konkret sollte die Expression von Rezeptor und Ligand an humanem Tumormaterial und abgeleiteten Zelllinien auf mRNA-Ebene bestimmt und mit PCR-basierten Verfahren nach den beiden häufigsten bislang bekannten Rezeptor-Mutationen gesucht werden. Es sollte geklärt werden, ob die Komponenten des Systems, ggf. in mutierter Form, überhaupt in den Tumoren selbst vorkommen, und ob dafür ggf. der Tumorgrad (zunehmende Anaplasie) eine Rolle spielt.

2 Methoden

2.1 Gewebeproben und Zellkulturen

Die humanen Gewebeproben der astrozytären Tumoren stammen aus der Gewebebank des Institutes für Neuropathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Es handelt sich um Operationsmaterial, das nach der jeweiligen Entnahme zu diagnostischen Zwecken bei – 80 °C eingefroren und gelagert wurde. Alle Diagnosen wurden histologisch von Herrn Prof. Dr. med. Christian Mawrin, dem Leiter des Institutes für Neuropathologie, gestellt.

Die Gewebeproben sind den folgenden Tumorentitäten zuzuordnen: Diffuses Astrozytom (A, World Health Organization Grad II), anaplastisches Astrozytom (AA, World Health Organization Grad III), Glioblastoma multiforme (GBM, World Health Organization Grad IV).

Des Weiteren wurden drei der untersuchten humanen Glioblastomzelllinien (U87MG, U138MG, U251MG) von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) erworben, LN229 und LN405 wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germany) bezogen.

Die Tumorzelllinien wurden in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff gelagert in einem Einfriermedium bestehend aus high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, PAA, Linz, Austria) mit 12 % DMSO (Dimethylsulfoxid) und 20 % fötalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum). Nach schnellem Auftauen im Wasserbad bei 37 °C wurden sie in T75-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Infrarot-gesteuerten Begasungsbrutschrank kultiviert. Dazu diente ebenfalls DMEM, jedoch mit 10 % FCS und der vom Hersteller (PAA) vorgesehenen Konzentration eines Gemisches aus Penicillin und Streptomycin. Die Aufteilung von Kulturen auf neue Flaschen geschah kurz vor der Konfluenz. RNA-Extraktionen (s.u.) erfolgten stets aus aktiv wachsenden, nicht-konfluenten Kulturen. Die Identität der Zelllinien wurde mit Hilfe eines AmpFSTR-Kit und der GeneMapper ID-Software, Version 3.2 von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) bestätigt. Diese ermittelt automatisch sowohl die Allele von polymorphen DNA-Markern verschiedener Chromosome als auch des Geschlechtsmarkers Amelogenin.

2.2 DNA-Isolation aus Gewebeproben bzw. Zellkulturen

Die DNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des Macherey-Nagel-Kits nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden die Gewebeproben in Reaktionsgefäße transferiert und in einem Inkubator bei 56 °C erwärmt. Der Elutionspuffer wurde vor dem Auswaschen auf 70 °C erhitzt.

Die DNA-Isolation wurde vorbereitet, indem je 25 mg der humanen astrozytären Tumoren in kleine Stücke geschnitten und in ein Reaktionsgefäß transferiert wurden. Jeweils 180 µl Lyse-Puffer (T1), 25 µl Proteinase-K-Lösung und 20 µl RNase-A-Lösung wurden in die Reaktionsgefäße gegeben und mit einem Vortexgerät gemischt. Die Proben wurden für 5 min bei Raumtemperatur und anschließend 180 min bei 56 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert.

Danach wurden die Proben, nach erneutem Mischen auf dem Vortexgerät, mit 200 µl Puffer B3 versetzt, nochmals gemischt und für 10 min bei 70 °C inkubiert, danach wieder gemischt. Von den Zellkulturen wurden 10^7 Zellen auf ein Volumen von insgesamt 200 µl mit dem Lyse-Puffer (T1) aufgefüllt, mit 25 µl Proteinase-K-Lösung und 200 µl Puffer B3 versetzt und bei 70 °C für 10 –15 min inkubiert.

Sowohl die Gewebeproben aus den astrozytären Tumoren als auch die Zelllinien wurden folgend gleich bearbeitet. Für die optimalen Bindungsbedingungen wurde jede Probe mit 210 µl Ethanol versetzt (100 %) und mit einem Vortexgerät gemischt. Für die Bindung der DNA selbst wurde für jede einzelne Probe eine NucleonSpin® Gewebesäule in ein Sammelreaktionsgefäß gestellt, die lysierten Proben in die Säule gegeben und diese für einen Zeitraum von 60 s bei 11000 rpm zentrifugiert. Die gesammelte Durchlauf Flüssigkeit wurde verworfen und die Gewebesäule zurück in das Sammelreaktionsgefäß gestellt. Die Säulen, die nach der ersten Zentrifugation noch einen flüssigen Überstand in der Säule aufwiesen, wurden erneut für eine Minute bei 11000 rpm zentrifugiert.

Das Waschen der Silikatmembran erfolgte in zwei Waschschritten. Für den ersten Schritt wurden 500 µl BW-Puffer zu jeder Probe hinzugefügt, die Proben für 60 s bei 11000 rpm zentrifugiert, die Durchflussflüssigkeit verworfen und die Gewebesäule in das Sammelreaktionsgefäß zurückgegeben. Für den zweiten Waschschriff wurden jeweils 600 µl Puffer-B5 in die Säule gegeben und erneut für

60 s bei 11000 rpm zentrifugiert. Abermals wurde die Durchflussflüssigkeit verworfen und die Gewebesäule in das Sammelreaktionsgefäß zurückgegeben. Für das Trocknen der Membranen erfolgte ein erneutes Zentrifugieren bei 11000 rpm für 60 s, womit der residuale Alkohol entfernt wurde.

Das Eluieren der reinen DNA geschah durch Einbringen der Gewebesäule in ein neues, 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß unter Zugabe von 100 µl auf 70 °C erwärmten Puffer BE. Nach Inkubation bei Raumtemperatur in den folgenden 60 s erfolgte eine Zentrifugation bei 11000 rpm für 60 s. Falls nicht sofort zur Mutationsanalyse verwendet, wurde die DNA bei – 20 °C eingefroren.

2.3 RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mittels TRIzolreagenz (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Das Arbeiten erfolgte streng unter RNase-freien Bedingungen und Verwendung nur für RNA-Arbeiten reservierter Chemikalien.

Maximal 30 mg einer Gewebeprobe oder der Inhalt einer Zellkulturflasche nach Spülen mit PBS (Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, PAA) wurden für die Extraktionen verwendet. Für die Lyse der Zellen und Inaktivierung von Enzymen, inklusive RNAsen, wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen je 1 ml TRIzolreagenz zu den Proben zugesetzt und kurz homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat in Reaktionsgefäße mit dem Fassungsvermögen von 1,5 ml überführt und für einen Zeitraum von 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform, manuelles Schütteln der Reaktionsgefäße für 15 s und eine Inkubation bei Raumtemperatur für 3 min. Die Proben wurden anschließend bei 14000 rpm bei 4 °C für 15 min zentrifugiert.

Für die RNA-Präzipitation erfolgte ein Transfer der oberen, farblos wässrigen, RNA-haltigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 0,6 ml Isopropanol ausgefällt und die Probe erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das RNA-Pellet wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C gewonnen. Für die RNA-Reinigung wurde der Überstand abpipettiert, die RNA mit 1 ml 70%igem, RNase-freiem, kaltem Ethanol gewaschen, mithilfe eines Vortexgerätes gemischt und bei 14000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde abpipettiert, das RNA-Pellet für einen

Zeitraum von 60 min luftgetrocknet und anschließend in 50 µl DEPC-Wasser durch Aufsaugen mit der Pipette resuspendiert und anschließend für 10 min bei 57 °C vollständig gelöst. Falls sie nicht sofort weiterverwendet wurde, wurde die gewonnene RNA bei – 80 °C aufbewahrt.

2.4 Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie

Die optische Dichte bei $\lambda = 260$ nm (OD260, Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und bei $\lambda = 280$ nm (OD280, Absorptionsmaximum von Proteinen) wurde für die Konzentrationsbestimmung mit einem Photometer gemessen. Der Quotient aus der OD260 und OD280 lag bei sämtlichen Proben um ca. 2,0.

Bei der Annahme, dass eine OD260 von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht, wurde die RNA-Konzentration mit folgender Formel bestimmt:

Konzentration [µg/ml] = OD260 × 40 µg/ml × Verdünnungsfaktor

2.5 cDNA-Synthese

Die Herstellung von komplementärer DNA aus jeweils 1 µg Gesamt-RNA erfolgte durch die Reversetranskriptasereaktion unter Verwendung von Hexanukleotid-Random-Primern von Bioline (Luckenwalde, Deutschland). Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes einer jeden Probe betrug 20 µl.

Das Volumen, das jeweils 1 µg Gesamt-RNA aus der TRIzol-Präparation enthielt (s. o.) wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert und zu einem Gesamtvolumen von 11,35 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen wurden die Lösungen für einen Zeitraum von 10 Minuten bei 70 °C denaturiert, anschließend für einen Zeitraum von fünf Minuten auf Eis gelegt.

Ein Mastermix aus jeweils:

- 4 µl mitgeliefertem 5-fach-Puffer der reversen Transkriptase (Bioline)
- 4 µl Hexanukleotid-Primern (50 ng/µl, Bioline)
- 0,4 µl Nukleotiden (25 mM, Bioline)
- 0,25 µl reverser Transkriptase (Bioline)

wurde hergestellt und jede Probe mit 8,65 µl des Mastermixes versetzt.

Die Reaktionsgefäße wurden in die PCR-Maschine transferiert. Die Synthese des ersten cDNA-Stranges erfolgte bei 42 °C für 55 Minuten, gefolgt von einem 15-minütigen Intervall bei einer Temperatur von 70 °C für die Denaturierung der reversen Transkriptase.

2.6 Real-time Polymerasekettenreaktion (Real-time polymerasechain reaction, RT-PCR)

Insgesamt 31 Tumorproben (6 × A, 11 × AA, 14 × GBM) von Patienten beider Geschlechter und die Zelllinien wurden untersucht.

Die quantitative RT-PCR wurde am ABI Prism 7000-SDS (Applied Biosystems) mit 1 µl cDNA, ABI SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Die PCR fand für die Systeme β_2 -Mikroglobulin, FLT3 und FLT3L gesondert statt. Bezüglich des Mastermixes wurden lediglich die spezifischen Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer je nach System eingesetzt. Für das System β_2 -Mikroglobulin wurden Primer der Sequenzen CCAGCAGAGAATGGAAAGTC (vorwärts) und GATGCTGCTTACATGTCTCG (rückwärts) eingesetzt, für das System FLT3 handelt es sich um Primer der Sequenzen AATGATGATGCCCAATTTACC (vorwärts) und GTAACACTTCTTCCAGGTCC (rückwärts), für das System FLT3L um die Sequenzen AGACTGTGCTGGGTCCAAG (vorwärts) und GCTCGGAGGTCTCCTGCAG (rückwärts).

Drei Mastermixansätze für die drei Primersysteme (Chemikalien von Applied Biosystems) wurden hergestellt, die sich wie folgt zusammensetzten:

- 5 µl Puffer
- 3 µl Magnesiumchlorid
- 4 µl Nukleotide
- 4 µl (=4 pmol) Primer vorwärts
- 4 µl (=4 pmol) Primer rückwärts
- 0,2 µl Polymerase
- 27,8 µl Wasser

Jedes Reaktionsgefäß wurde mit 48 µl des jeweiligen Mastermixes versetzt. Hinzu wurden jeweils 2 µl cDNA pipettiert bzw. 2 µl Aqua dest. für die Negativkontrollen. Die Real-Time-PCR wurde je System zweifach durchgeführt mit je 25 µl des Probenansatzes. Die Denaturierung der DNA-Stränge erfolgte für einen Zeitraum von 60 s bei 93 °C, das Annealing für 45 s bei 55 °C und die Amplifikation für einen Zeitraum von 60 s bei 72 °C. Es wurden 40 Reaktionszyklen durchgeführt und nach dem letzten Zyklus schloss sich automatisch eine zehnminütige Phase des langsamen Aufschmelzens der PCR-Produkte an, um anhand der Schmelzkurven die Reinheit zu beurteilen.

β₂-Mikroglobulin wurde als Referenzsystem genutzt. Negativkontrollen ohne Matrize wurden bei jedem Experiment mitgeführt. Die C_t-Werte wurden automatisch über die PCR-Maschine berechnet. Die jeweiligen relativen Expressionslevel (E) der Zielgene wurden mithilfe folgender Formel kalkuliert:

$$E = 1/2^{\Delta C_t}, \Delta C_t = C_t(\text{target}) - C_t(\beta_2)$$

Alle Schmelzkurven wurden auf angemessene T_m-Werte analysiert. Durch die sehr hohen C_t-Werte (mit Werten von ca. 30), dem geringen Gehalt der mRNA für FLT3 geschuldet, wurden die Reaktionsprodukte des FLT3-RT-PCR-Systems jeweils zusätzlich auf ein 8%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Elektrophorese und Silberfärbung dargestellt (s. u. 2.8.). Dadurch konnten die einzelnen PCR-Produkte visualisiert und zur Verifizierung der PCR-spezifischen T_m-Werte benutzt werden.

2.7 Mutationsanalysen

2.7.1 ITD (internal tandem duplication)

Insgesamt 46 Tumoren (6 × A, 6 × AA, 34 × GBM) von Patienten beider Geschlechter wurden untersucht. Glioblastomzelllinien sind in die Analyse auf die ITD mit einbezogen worden. Jedes Experiment wurde mitsamt eines Leerwertes ohne DNA-Matrize durchgeführt.

Für den PCR-Ansatz wurde ein Mastermix mit folgenden Chemikalien je Probe hergestellt:

- 2 µl (=2 pmol) Primer TCCAGGATAATACACATCACAG (vorwärts) - 6-FAM-markiert
- 2 µl (=2 pmol) Primer ACCATGATAACGACACAACAC (rückwärts)
- 1,5 µl (2 mM) Desoxynukleotide
- 4 µl 5-fach Polymerasepuffer
- 9,4 µl Aqua dest
- 0,1 µl Hotstart-Polymerase

Insgesamt 19 µl des Mastermixes wurden mit je 1 µl DNA bzw. Aqua dest. für den Leerwert versetzt.

Nach einer anfänglichen (hot start) Erhitzungsphase auf 95 °C für einen Zeitraum von 9 min und einer folgenden Abkühlung auf 56 °C fanden 35 Reaktionszyklen statt. Die Denaturierungstemperatur lag bei 95 °C für 30 s, das Annealing für 60 s bei 56 °C und die Amplifikation für einen Zeitraum von 2 min bei 72 °C. Nach dem letzten Zyklus schloss sich eine siebenminütige Phase von 72 °C an, gefolgt von der Kühlung auf 4 °C.

Die Vorwärtsprimer, die für die Untersuchung auf eine ITD benutzt wurden, waren am 5'-Ende mit 6-FAM markiert. Auf diese Weise wurden DNA-Fragmente amplifiziert, die durch Kapillarelektrophorese und einen Fluoreszenz-Kapillar-Sequenzier (ABI-310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) visualisiert werden konnten. In der folgenden Elektrophorese mit ROX-markiertem Standardfragment (ROX-standard 500, Applied Biosystems), konnte so die Länge der 6-FAM-markierten Fragmente automatisch durch die GeneScan-Software (Applied Biosystems) berechnet werden. Die tatsächliche Länge der Amplikons beträgt

330 bp für die chromosomale DNA ohne ITD. Der präzise Wert, der durch die GeneScan-Software kalkuliert wurde, in Abhängigkeit von der Retentionszeit, betrug $330,07 \pm 0,37$ bp (Durchschnitt \pm Standardabweichung). Die jeweiligen GeneScan-Ergebnisse waren mit der Abweichung von einem Basenpaar zwischen den Minimal- und Maximalwerten reproduzierbar. Fragmente mit einer Länge bis 500 bp wurden analysiert, während die zu erwartende mittlere Fragmentlänge für die ITD bei circa 400 bp liegt.

2.7.2 Punktmutation

Die PCR-Produkte wurden mittels einer PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse untersucht um eine mögliche D835-Mutation zu detektieren. Das Amplikon weist eine Länge von 237 bp auf.

Für den PCR-Ansatz wurde ein Mastermix mit folgenden Chemikalien je Probe hergestellt:

- 2 μ l (=2 pmol) Primer GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC (vorwärts)
- 2 μ l (=2 pmol) Primer CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC (rückwärts)
- 1,5 μ l (2 mM) Desoxynukleotide
- 4 μ l 5-fach Polymerasepuffer
- 9,4 μ l Aqua dest.
- 0,1 μ l Hotstart-Polymerase

Insgesamt 19 μ l des Mastermixes wurden mit je 1 μ l DNA bzw. Aqua dest. für den Leerwert versetzt.

Nach einer anfänglichen (hot start) Erhitzungsphase auf 95 °C für einen Zeitraum von 10 min und einer folgenden Abkühlung auf 56 °C fanden 34 Reaktionszyklen statt. Die Denaturierungstemperatur lag bei 94 °C für 45 s, das Annealing für 60 s bei 60 °C und die Amplifikation für einen Zeitraum von 60 s bei 72 °C. Nach dem letzten Zyklus schloss sich eine zehnminütige Phase von 72 °C an, gefolgt von einer Kühlung auf 4 °C.

Die amplifizierte DNA wurde durch das Restriktions-Enzym EcoRV (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), nach Anweisungen des Herstellers, gespalten. Nach Einsatz von EcoRV liegen zwei Fragmente des Ursprungs-Amplikons, mit Längen

von 97 bp und 140 bp vor, sofern es sich um Wildtyp-DNA handelt. Durch die Eliminierung der Schnittstelle von EcoRV wird DNA mit dem mutierten Codon nicht geschnitten. Die Reaktionsprodukte wurden auf 9%igem Polyacrylamidgel durch Elektrophorese separiert und mittels Silberfärbung visualisiert.

2.8 Herstellung und Färbung der Polyacrylamid-Gele für die Gelelektrophorese (PAGE)

2.8.1 Herstellung der Polyacrylamid-Gele

8%iges Polyacrylamid-Gel

Für die Darstellung von PCR-Produkten mit einer Länge von 130-160 bp wurde ein 8%iges Poly-Acrylamid-Gel gegossen mit dem Ansatz:

- 22,8 ml Acryl-PDA (13 % Acrylamid, 0,68 % PDA)
- 17,2 ml Tris-Puffer (120 mM)
- 400 µl APS (Ammoniumpersulfat, 10 %)
- 40 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

Für den Gelansatz wurden die genannte Komponenten gemischt und anschließend ohne Luftblasen zwischen zwei horizontale Glasplatten gegossen, die durch Abstandsstreifen von 0,5 mm Dicke getrennt waren. Auf die untere der beiden Glasplatten war dabei eine dünne Kunststoffolie aufgelegt. Diese erlaubte später nach Entfernen der Glasplatten das Auflegen der polymerisierten Gele auf den Keramik-Kühlkörper einer Horizontal-Elektrophoresekammer von Pharmacia (Uppsala, Schweden).

9%iges Poly-Acrylamid-Gel

Für die Darstellung von PCR-Produkten mit der Länge 97 - 140 bp wurde ein 9%iges Polyacrylamidgel gegossen mit dem Ansatz:

- 25,6 ml Acryl-PDA (13 % Acrylamid, 0,68 % PDA)
- 12,4 ml Tris-Puffer (120 mM)
- 400 µl APS (10 %)
- 40 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

Die Polymerisation aller Gele erfolgte über Nacht.

2.8.2 Gellauf

Nach dem Auflegen eines Gels auf den Wasser-gekühlten Keramik-Kühlkörper der Elektrophoresekammer, wurde das Gel mit Nukleinsäure-Proben (PCR-Produkten) beladen. Dazu wurden zunächst entlang der Basislinie vorgefertigte Filterpapier-Stückchen aufgelegt (sog. sample application pieces, Pharmacia), die mit jeweils 7 µl der Proben beladen wurden. Eine Negativkontrolle in Form von Aqua dest. und ein Marker für die Fragmentlängen (DNA des Virus Phi-X-174, gespalten mit dem Restriktionsenzym HaeIII) wurden mitgeführt. Die Zufuhr der elektrischen Spannung erfolgte über Puffer-getränkte Papierstreifen auf der Geloberseite, auf denen Platinelektroden platziert waren. Zur optischen Markierung der Lauffront enthielt der Puffer dieser Streifen den Farbstoff Bromphenol-Blau. Der Gellauf erfolgte für 20 Minuten bei 5 Watt und danach für den Rest der mehrstündigen Elektrophorese bei 15 Watt.

2.8.3 Silberfärbung der PAGE-Gele

Zur Darstellung der Reaktionsprodukte nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde eine Silberfärbung durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde das Gel mit 3%iger Salpetersäure (60 ml 65%ige Salpetersäure und 1240 ml Aqua dest.) inkubiert und anschließend dreimalig mit Aqua dest. gespült. Nach Zugabe von frisch hergestellter 0,2%iger Silbernitratlösung (0,4 g Silbernitrat und 200 ml Aqua dest.) wurde das Gel zur Inkubation für 20 min auf eine Wippe gestellt. Sämtlicher silbernittrathaltiger Abfall wurde separat im vorgesehenen Sondermüll entsorgt.

Nach dreimaligem Spülen mit Aqua dest. wurde das Gel mit Natriumcarbonat und Formalin (0,5 ml Formalin, 30 g Natriumcarbonat und 1000 ml Aqua dest.) versetzt, bis die Banden erschienen. Anschließend wurde die Reaktion mit 10%iger Essigsäure (20 ml Essigsäure und 180 ml Aqua dest.) gestoppt. Nach dreimaligem Spülen und Versetzen mit 5%iger Glycerollösung (25 ml Glycerol und 475 ml Aqua dest.) bei einer Einwirkzeit von 5 min erfolgte die Lufttrocknung.

2.9 Statistische Analysen

Jegliche Statistiken wurden mit dem Statistical Package for Social Sciences version 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) erstellt. Prüfungen von Mittelwerten der FLT3L-Expression auf signifikante Unterschiede zwischen den drei Tumorgaden (WHO-Grade II bis IV) wurden mit ANOVA und nachgeschaltetem Tukey-post-hoc-Test durchgeführt, Mittelwertdifferenzen zwischen zwei Gruppen mit dem *t*-test geprüft. Das Signifikanzniveau bei allen Tests ist auf $P \leq 0,05$ festgelegt worden.

3 Ergebnisse

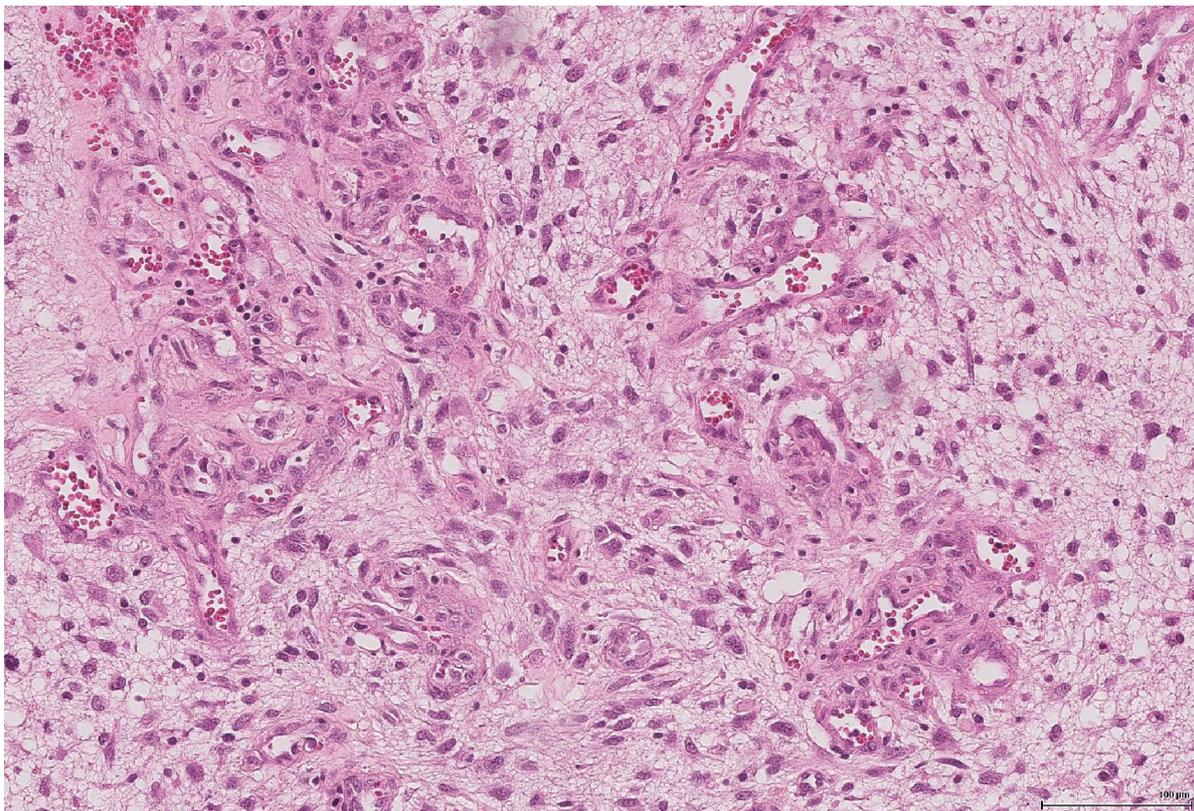
3.1 Histologie der untersuchten Gliome

In der vorliegenden Arbeit wurden astrozytäre Tumoren aller im Erwachsenenalter vorkommender WHO-Grade untersucht, also diffuse Astrozytome (WHO-Grad II), anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III) und Glioblastome (WHO-Grad IV). Entsprechend ihrer dominierenden prozentualen Häufigkeit unter den astrozytären Tumoren bildeten die Glioblastome die größte Gruppe. Es konnte jedoch selbst für die Expressionsstudien, die RNA hinreichender Qualität erforderten, eine ausreichende Zahl von Tumorproben auch der Grade II und III aus dem tiefgefrorenen Material des Instituts für Neuropathologie entnommen werden. Alle Tumorproben entstammten Lokalisationen im Gehirn und repräsentierten archiviertes Restmaterial aus der neurochirurgischen Resektion, das nach Abschluss der histologischen Diagnostik für Forschungszwecke verwandt werden durfte. Die Auswahl geschah lediglich nach Tumordiagnose und qualitativer Eignung der Proben, d. h. hinreichender RNA-Qualität, ohne weitere Selektionskriterien. Die RNA-Qualität wurde dabei als ausreichend betrachtet, wenn eine Real-Time-PCR (s. u.) des ubiquitär exprimierten Referenzgens β_2 -Mikroglobulin (β_2 MG) unter Standardbedingungen, d. h. bei Einsatz von 1 μ l cDNA und einer Grenzwerteinstellung (threshold) von 0,16, einen C_t -Wert von maximal 22 ergab.

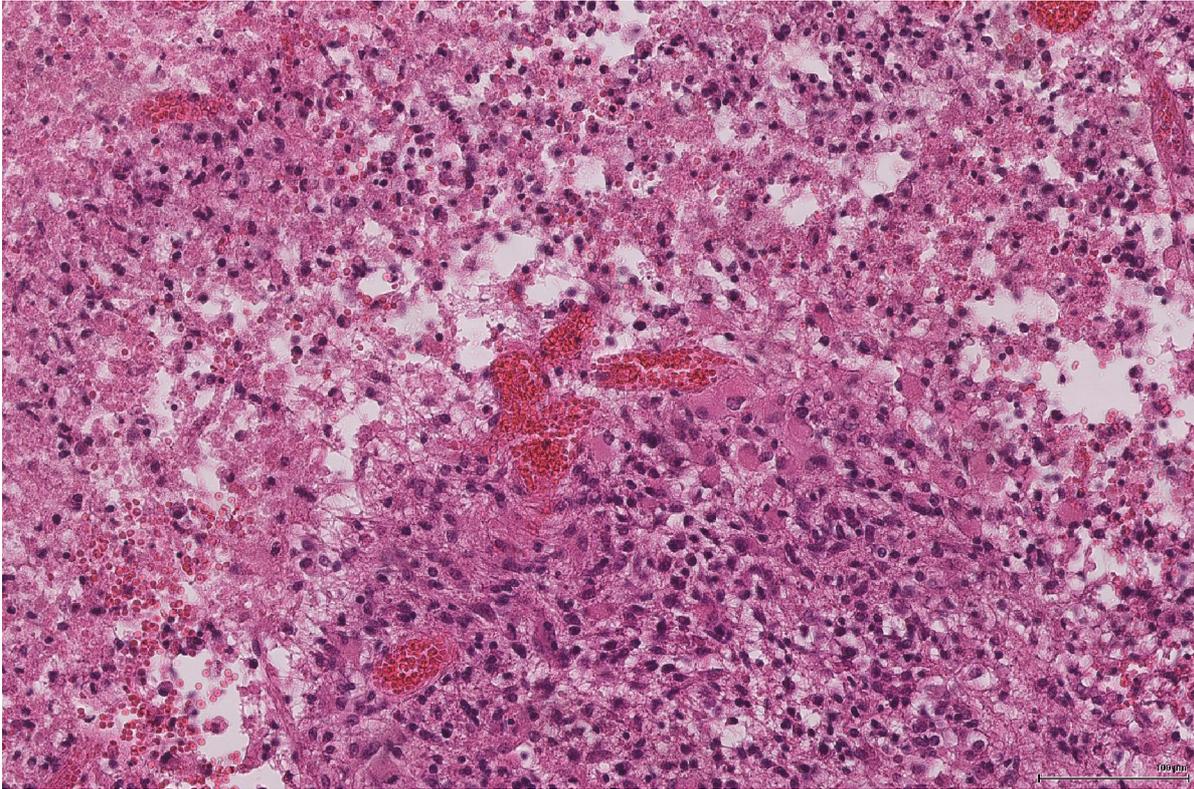
Abbildung 2 zeigt eine exemplarische Auswahl typischer Histologien. Die typischen Kennzeichen in Proben des Glioblastoma multiforme (GBM) waren von Pseudopallisaden umgebene Nekrosen, teils glomeruloide Gefäßproliferate, hyperämische Gefäße, Riesenzellen mit zum Teil auffällig segmentierten Kernen, Areale mit hoher Zelldichte und Kernpolymorphie, ein hoher Ki67-Index in der Immunhistochemie als Indikator der teilungsaktiven Zellfraktion, sowie z. T. p53-positive Kerne als Zeichen einer nukleären Akkumulation dieses Zellzyklus-Regulators, möglicherweise infolge einer Mutation.

Obwohl eine detaillierte molekulargenetische Charakterisierung der Tumorproben hinsichtlich IDH1-Mutation, p53-Mutation, chromosomaler Stückverluste (LOH), EGFR-Amplifikation etc. nicht vorlag, ist aufgrund der dominierenden Häufigkeit des primären GBM unter den Glioblastomen und aufgrund des Fehlens besonders junger Patienten im Untersuchungsgut davon auszugehen, dass es sich mehrheitlich oder ausschließlich um primäre und kaum um sekundäre GBM handelte. Ohne gezielte Selektion junger GBM-Patienten mit bekannter Vorgeschichte astrozytärer Tumoren niederen Grades, lassen sich die gefundenen Ergebnisse also nicht mit Gewissheit auf die vergleichsweise seltenen sekundären GBM übertragen. Andererseits gehen sekundäre GBM aus den in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersuchten Tumoren der Grade II und III hervor.

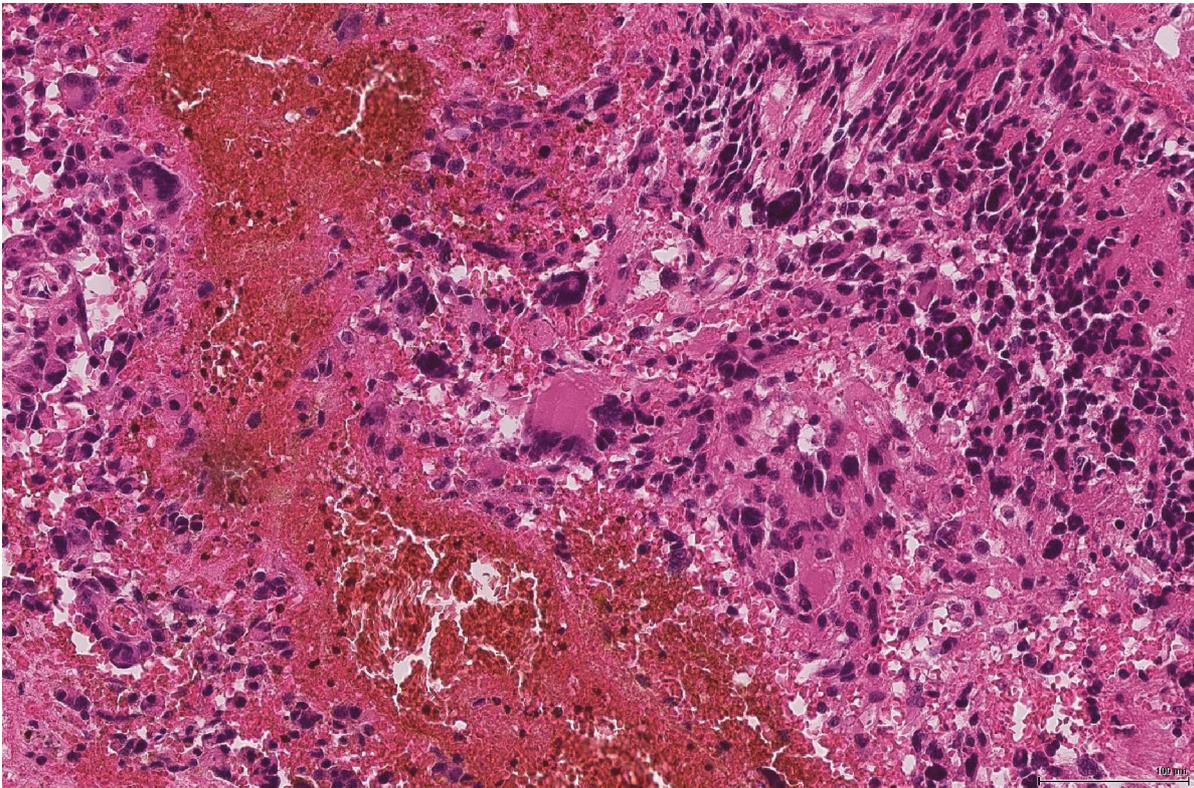
Abbildung 2: Histologie



A *In der H&E-Färbung dieses Glioblastoms sind vor allem glomeruloide Gefäßproliferate zu erkennen (20-fach vergrößerndes Objektiv).*



B In dieser Mikrofotografie eines eher kleinzelligen Glioblastoms hoher Zelldichte (H&E, 20 x-fach vergrößerndes Objektiv) erkennt man gut nekrotische Areale und hyperämische Gefäße.



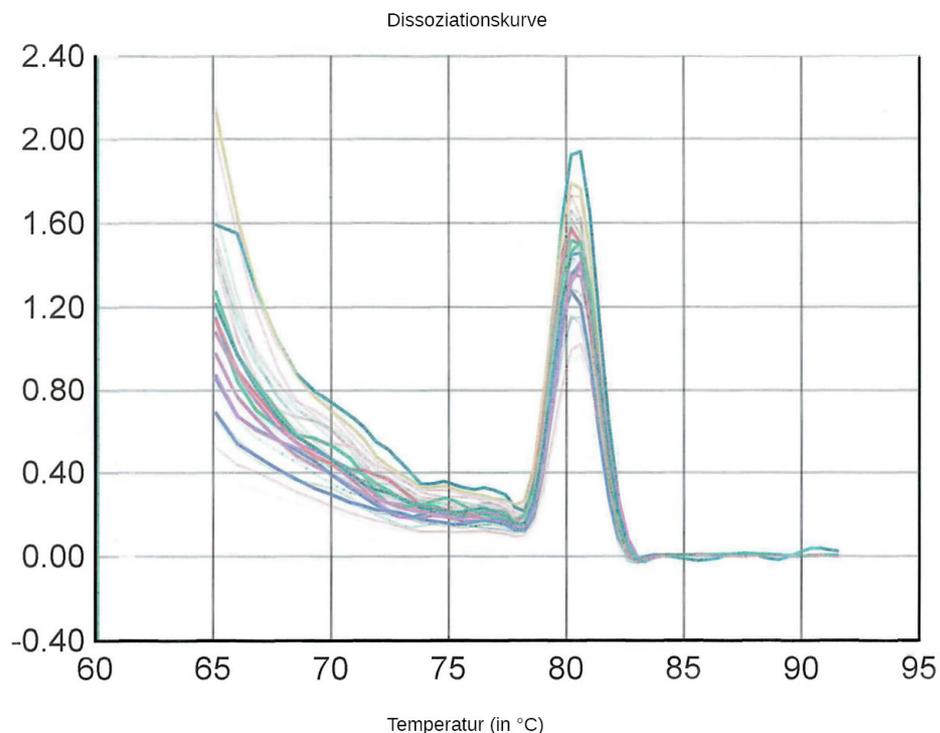
C In der Histologie dieses Glioblastoms (H&E, 20 x-fach vergrößerndes Objektiv) imponiert neben teils von Pseudopallisaden umgebenen Nekrosen vor allem die hohe Zell- und Kernpolymorphie mit Riesenzellen.

3.2. Die quantitative mRNA-Expression von FLT3 und dem FLT3-Liganden

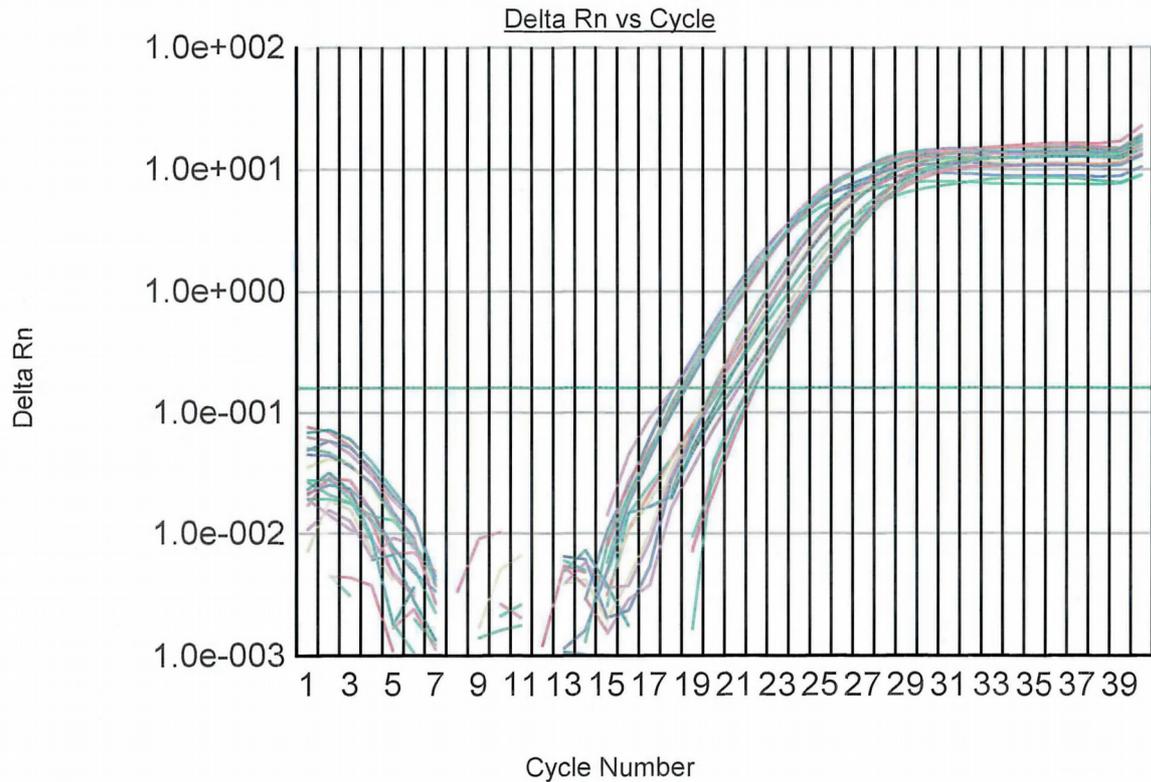
3.2.1. Ligand FLT3L und Referenzen

Insgesamt 31 Tumoren, darunter sechs diffuse Astrozytome, elf anaplastische Astrozytome und 14 Glioblastome wurden mittels der quantitativen Real-Time-PCR untersucht. Als Referenzen zur Berechnung der relativen Genexpression diente β_2 -Mikroglobulin, dessen Schmelzkurven übereinstimmend die erwarteten Peaks für ein Maximum der zeitlichen Fluoreszenzänderung bei ca. 81 °C zeigten, wie Abbildung 3A für eine Reihe von Beispielen zu entnehmen ist. Die logarithmischen Amplifikationsplots zeigten über weite Bereiche das erwartete lineare Verhalten (Abbildung 3B) und bei Festlegung des Fluoreszenz-Grenzwertes (horizontale grüne Linie) auf 0,16 in der Regel die erwarteten C_T -Werte im Bereich bis maximal 22 als Hinweis auf eine hinreichende RNA-Qualität und effiziente cDNA-Synthese.

Abbildung 3: Real-Time-PCR für mRNA des Referenzgens β_2 -Mikroglobulin



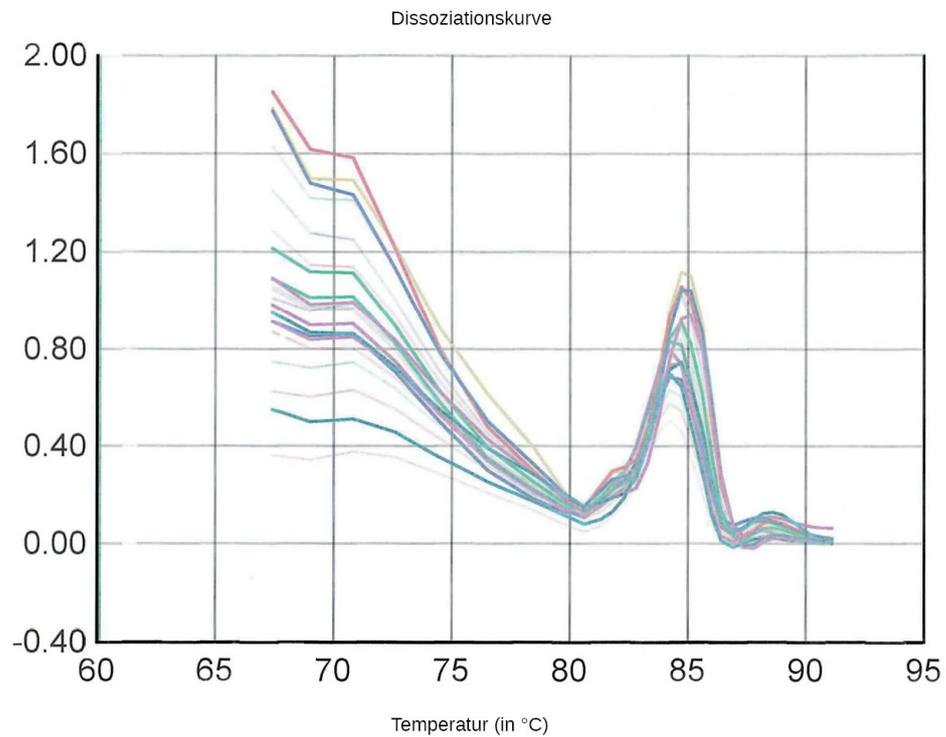
A Dissoziationskurve für Referenzgen β_2 -Mikroglobulin, bei der die zeitliche Änderung der Fluoreszenz (erste Ableitung der Fluoreszenz nach der Zeit) in willkürlichen Einheiten auf der y-Achse gegen die Temperatur (in °C) aufgetragen ist.



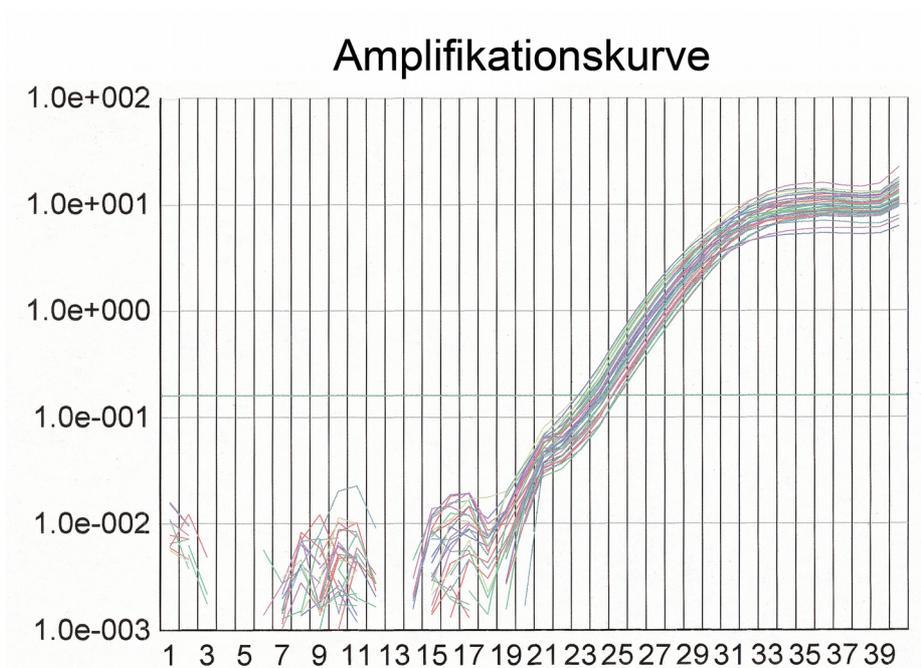
B Amplifikationsplot des Referenzgens β_2 -Mikroglobulin, bei dem die Fluoreszenz in logarithmischen Einheiten gegen die Zahl der PCR-Zyklen auf der x-Achse aufgetragen ist.

Die in dieser Arbeit neu etablierte Real-Time-PCR für den Liganden FLT3L zeigte übereinstimmend in den Schmelzkurven Peaks bei ca. 84 °C (Abbildung 4A) sowie ebenfalls über einen weiten Bereich einen linearen Fluoreszenzanstieg in der logarithmischen Darstellung, d. h. die erwartete exponentielle Vermehrung der DNA während ca. 10 PCR-Zyklen (Abbildung 4B).

Abbildung 4: Real-Time-PCR für FLT3L-mRNA



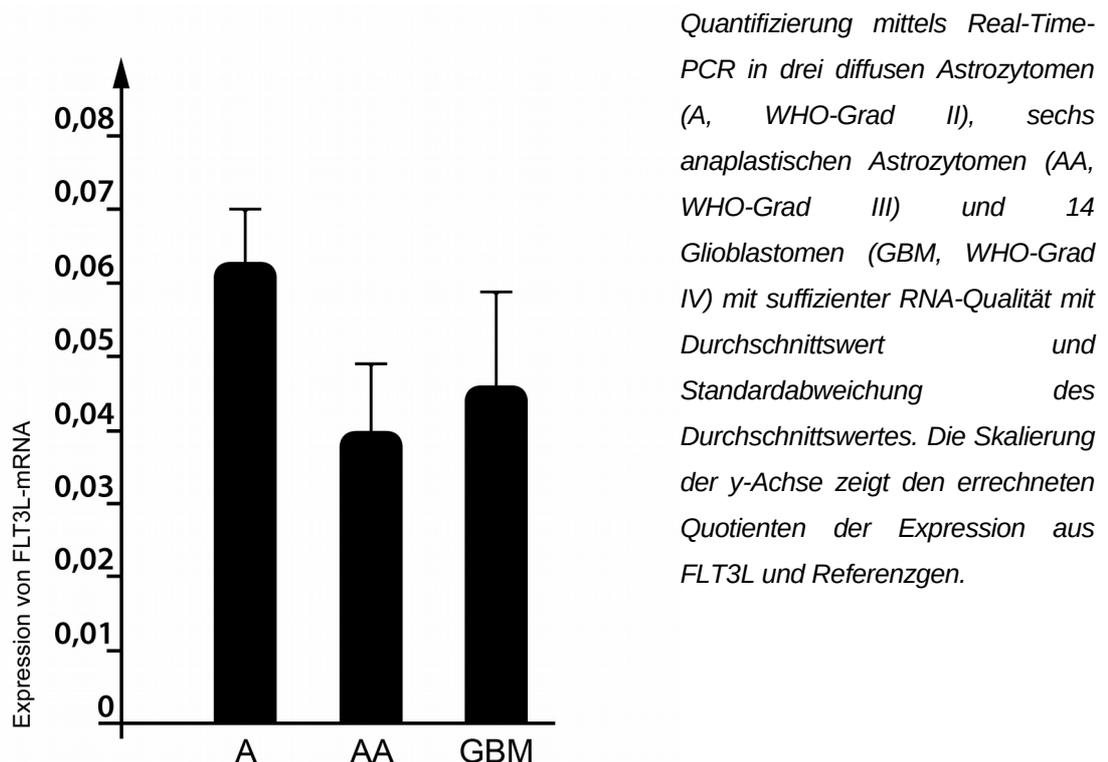
A Dissoziationskurve für FLT3L bei der die zeitliche Änderung der Fluoreszenz (erste Ableitung der Fluoreszenz nach der Zeit) in willkürlichen Einheiten auf der y-Achse gegen die Temperatur (in °C) aufgetragen ist.



B Amplifikationsplot des FLT3L, bei dem die Fluoreszenz in logarithmischen Einheiten gegen die Zahl der PCR-Zyklen auf der x-Achse aufgetragen ist.

Wie vermutet schnitten die Amplifikationsplots eine identisch zum Referenzgen festgelegte Grenzwert-Linie (horizontale grüne Linie beim Wert 0,16) in der Regel bei nur moderat höheren C_T -Werten im Vergleich zum Maximalwert des Referenzgens (22), nämlich bei Werten zwischen 23 und 25. Dies ließ bereits einen mittleren Expressionsgrad des Liganden in allen Tumorgaden vermuten. Die C_T -Werte waren stets gering genug (deutlich < 30), um von einer reproduzierbaren Quantifizierung sprechen zu können und die für jedes PCR-System über alle Proben übereinstimmenden Schmelzkurven-Maxima sprachen für die Reinheit der PCR-Produkte. Die Berechnung der relativen Genexpression des Liganden, normiert auf β_2 -Mikroglobulin mithilfe der im Methodenteil erläuterten ΔC_T -Methode, lag in allen humanen Tumoren auf einem Niveau von 4 % bis 6 % der Expression des Referenzgens (Abbildung 5).

Abbildung 5: Expression von FLT3L-mRNA in astrozytären Tumoren



Abkürzungen: GBM: Glioblastoma multiforme, FLT3: fms-like tyrosine kinase 3, FLT3L: fms-like tyrosine kinase 3 ligand.

Um den Fehler auszuschließen, dass die nachgewiesene FLT3L-mRNA-Menge aus dem, in humanen Tumoren vorkommenden, entzündlichen Infiltrat aus z. B. Lymphozyten und Makrophagen oder aus anderen tumorfremden Gewebeanteilen stammte (z. B. Gefäßendothelien und Anteile präexistenten Hirngewebes in Infiltrationszonen), wurden die aus humanen Glioblastomen abgeleiteten Zelllinien U87MG und U251MG in die Experimente einbezogen. Normiert auf die mRNA des Referenzgens β_2 -Mikroglobulin lag die relative Expression von FLT3L-mRNA in den Zelllinien bei 8 % bzw. 25 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Ligand zu den Genen mit intermediärem Expressionslevel in humanen astrozytären Tumoren der WHO-Grade II bis IV in erwachsenen Patienten zählt.

In Anbetracht der geringen Anzahl verfügbarer diffuser Astrozytome (WHO-Grad II) mit suffizienter mRNA zum Zeitpunkt der Untersuchung (n = 3), muss noch offen bleiben, ob die fehlende statistische Signifikanz zwischen den drei WHO-Graden z. T. diesem Umstand geschuldet ist. Dennoch legen die Ergebnisse nahe, dass nicht von einer graduellen Verringerung der mRNA-Expression mit steigendem Tumorgrad auszugehen ist, auch da im Gegensatz zu dieser Annahme der FLT3L-mRNA-Gehalt der untersuchten Glioblastomzelllinien besonders hoch ist.

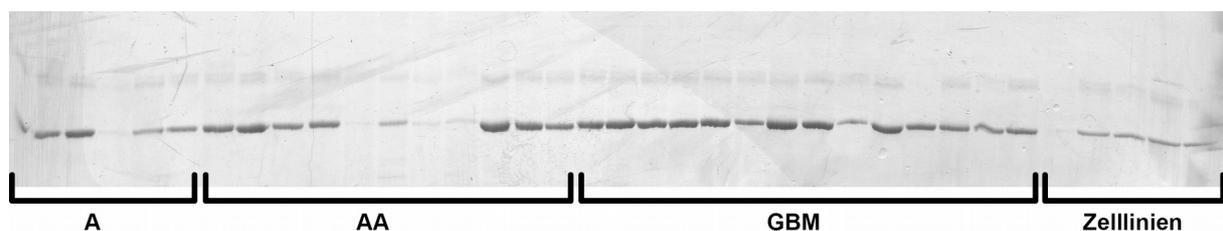
3.2.2. Rezeptortyrosinkinase FLT3

Die Expression des FLT3-Liganden in astrozytären Tumoren hätte funktionell nur Bedeutung, wenn auch der korrespondierende FLT3-Rezeptor anwesend wäre. Die mRNA-Expression des Rezeptors lag jedoch wesentlich unter der des Liganden. Nicht einmal mittels SYBR-Green-basierter Real-Time-PCR konnte eine verlässliche Quantifizierung erreicht werden. Hier lagen die C_t -Werte in der Regel in der Nähe des Wertes 30, was erfahrungsgemäß keine zuverlässige Aussage über das quantitative Vorkommen der Rezeptor-mRNA zulässt. Entsprechend waren die C_t -Werte rein messtechnischer Wiederholungen identischer cDNA auch schlecht reproduzierbar, so dass von einem detektierbaren, aber mittels der etablierten Real-Time-PCR nicht korrekt quantifizierbarem mRNA-Gehalt des Rezeptors auszugehen war. Dass dies tatsächlich eine Folge niedriger Expression und nicht ein technisches Versagen der neu etablierten Real-Time-PCR war, konnte belegt werden durch einen Real-Time-PCR-Lauf mit Referenzproben extrem hohen

FLT3-Gehaltes (reine PCR-Produkte des FLT3-Gens), bzw. durch Verdünnung dieser Proben auf mittleres und grenzwertig detektierbares Niveau. Diese drei Verdünnungen ergaben Amplifikationsplots, die den auf 0,16 festgesetzten Fluoreszenz-Grenzwert wie erwartet erreichten, nämlich relativ am Anfang des durch die PCR-Maschine festgelegten Messfensters (Zyklus 15 bis 40) ca. bei Zyklus 17 (höchste Konzentration), im mittleren Bereich bei Zyklus 25 (intermediäre Konzentration) und kurz hinter der üblicherweise definierten Messgrenze (Zyklus 30) bei Zyklus 32 für die extrem niedrige Konzentration. Im Rahmen der Messgenauigkeit bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung der eingesetzten PCR-Produkte entsprachen diese C_T -Werte dem Erwartungswert.

Um unabhängig von den um C_T -Werte von 30 sich einpendelnden Amplifikationsplots der humanen Tumorproben den qualitativen Nachweis einer Rezeptor-mRNA-Expression in humanen astrozytären Tumoren der WHO-Grade II bis IV zu untermauern, wurden die Fragmente der Real-Time-PCR elektrophoretisch auf einem 8 %igem Silbergel separiert. Die Fragmente hatten vorher also jeweils 40 Zyklen der Real-Time-PCR durchlaufen. Positive Ergebnisse zeigten sich bei fünf von sechs untersuchten diffusen Astrozytomen, in acht von elf anaplastischen Astrozytomen und in allen 14 untersuchten Glioblastomen. Somit konnte bewiesen werden, dass tatsächlich ein cDNA-Fragment amplifiziert wurde, welches die Fragmentlänge von FLT3 aufweist (Abbildung 6).

Abbildung 6: Silberpolyacrylamid-Gel mit Expression von FLT3-mRNA



Silberpolyacrylamid-Gel mit Expression von FLT3-mRNA in diffusen Astrozytomen (A, WHO-Grad II), anaplastischen Astrozytomen (AA, WHO-Grad III) und Glioblastomen (GBM, WHO-Grad IV) sowie den Glioblastomzelllinien.

Anmerkung: Für diesen Versuch wurden alle zur Verfügung stehenden Proben genutzt. Schwache und fehlende Banden korrelieren mit niedriger RNA-Qualität.

Auch die Glioblastomzelllinien wurden untersucht, um bei gerade den geringen Mengen der nachgewiesenen mRNA die Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse durch Kontamination mit entzündlichem Tumorinfiltrat aus Lymphozyten und Makrophagen etc. gering zu halten. Auch in den Zelllinien, ausgenommen U251MG, konnte eine Expression nachgewiesen werden. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die FLT3-Rezeptor-mRNA ubiquitär in humanen astrozytären Tumoren des Erwachsenenalters exprimiert wird, wenn auch nur in sehr geringen Mengen. Der Vergleich des als zuverlässig reproduzierbare Messgrenze definierten C_t -Wertes von 30, der in der PCR für FLT3 in der Regel überschritten wurde, mit dem durchschnittlichen C_t -Wert des Referenzgens von ca. 19, erlaubte zumindest eine Abschätzung, welches quantitative Expressionslevel in den laut Gelfärbung positiven Proben nicht erreicht wurde. Da ein ΔC_t von 11 einer relativen Expression von 0,049 % entspricht, kann abgeschätzt werden, dass die relative Expression des Rezeptors in den humanen Tumorproben unterhalb von ca. 0,05 % derjenigen des Referenzgens lag. Diese in der Regel nicht erreichte Obergrenze der Rezeptor-mRNA entspräche ca. 1 % des mRNA-Levels des Liganden.

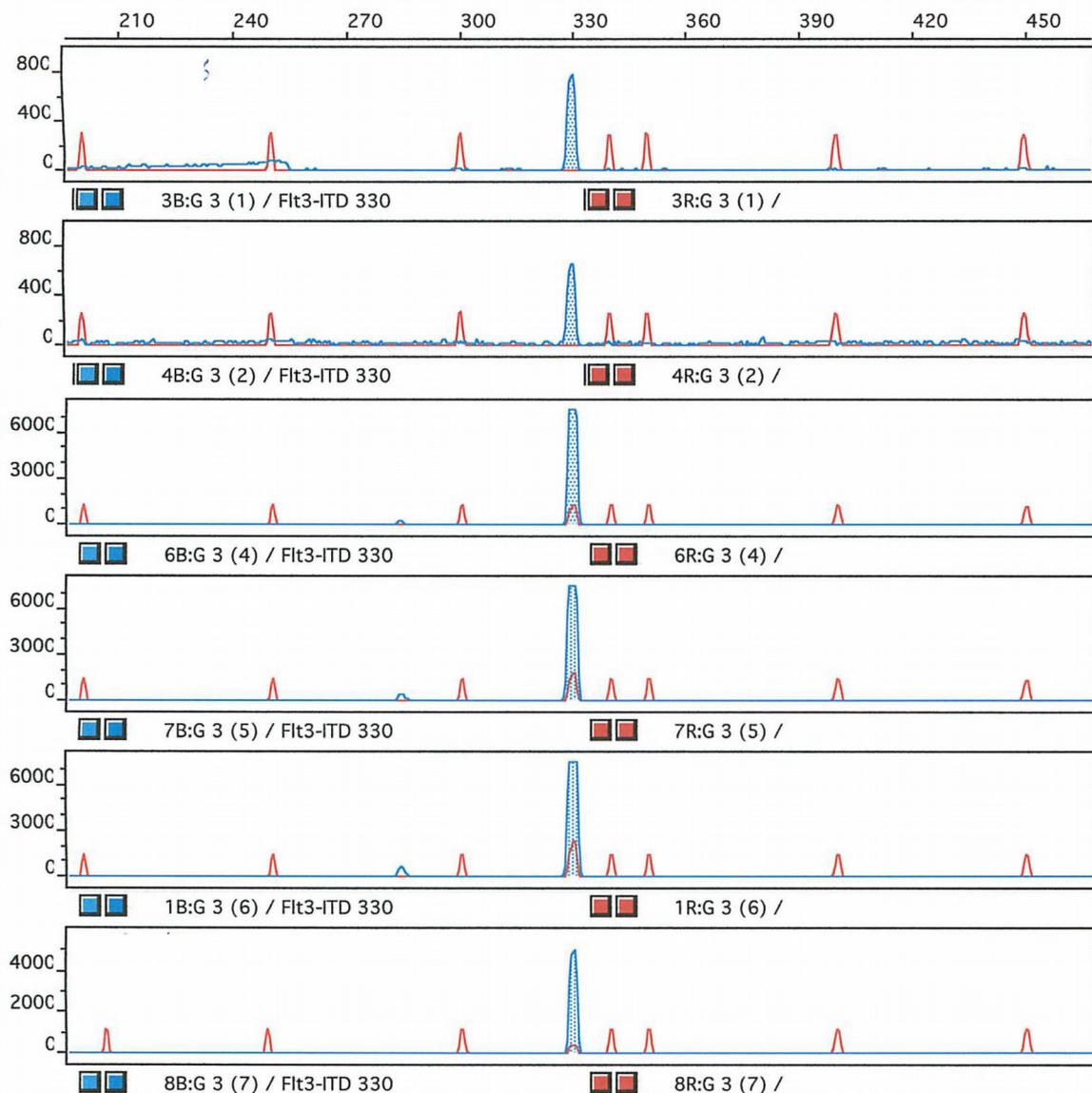
3.3. Test auf eine interne Tandemduplikation (internal tandem duplication, ITD)

Die Anzahl der untersuchten astrozytären Tumoren, bei der die Analysen genomischer DNA, statt mRNA, stattfanden, liegt deutlich höher. Der Mangel an Proben für die mRNA-Analyse kommt dadurch zustande, dass die Arbeit mit mRNA aus humanen Tumorproben obligatorisch an Proben stattfinden muss, die umgehend nach der operativen Entfernung, in z. B. flüssigem Stickstoff, schockgefroren wurden, um reproduzierbare, verlässliche Ergebnisse zu erhalten.

In der DNA-Analyse konnten insgesamt 46 Tumoren (davon sechs diffuse Astrozytome, sechs anaplastische Astrozytome, 34 Glioblastome) und die fünf Glioblastomzelllinien untersucht werden. Wie im Methodenteil beschrieben, erfolgte eine PCR der relevanten Region des Rezeptorgens, die ggf. ITD aufweisen kann, wobei einer der benutzten Primer Fluoreszenz-markiert war, um die PCR-Produkte im Zuge einer Kapillarelektrophorese auf einem ABI-310C-Sequenziergerät für den Fluoreszenz-Detektor sichtbar zu machen. Dies erlaubt eine sehr genaue Bestimmung der Fragmentlängen (GeneScan) anhand mitlaufender fluoreszierender Standard-Fragmente. Abbildung 7 zeigt eine Reihe von Beispielen der resultierenden Elektropherogramme.

Gemäß der automatisierten Analyse durch die GeneScan-Software, besitzen alle untersuchten Fragmente eine Länge von $330,07 \pm 0,37$ bp. ITD hingegen weisen eine durchschnittliche Fragmentlänge von 400 bp auf. Untersucht wurde in diesem Experiment bis zu der Fragmentlänge von 500 bp. Somit konnte in keinem der Tumoren, gleichgültig welchen Grades, und keiner der Zelllinien eine ITD nachgewiesen werden.

Abbildung 7: Elektropherogramm ITD-Analyse



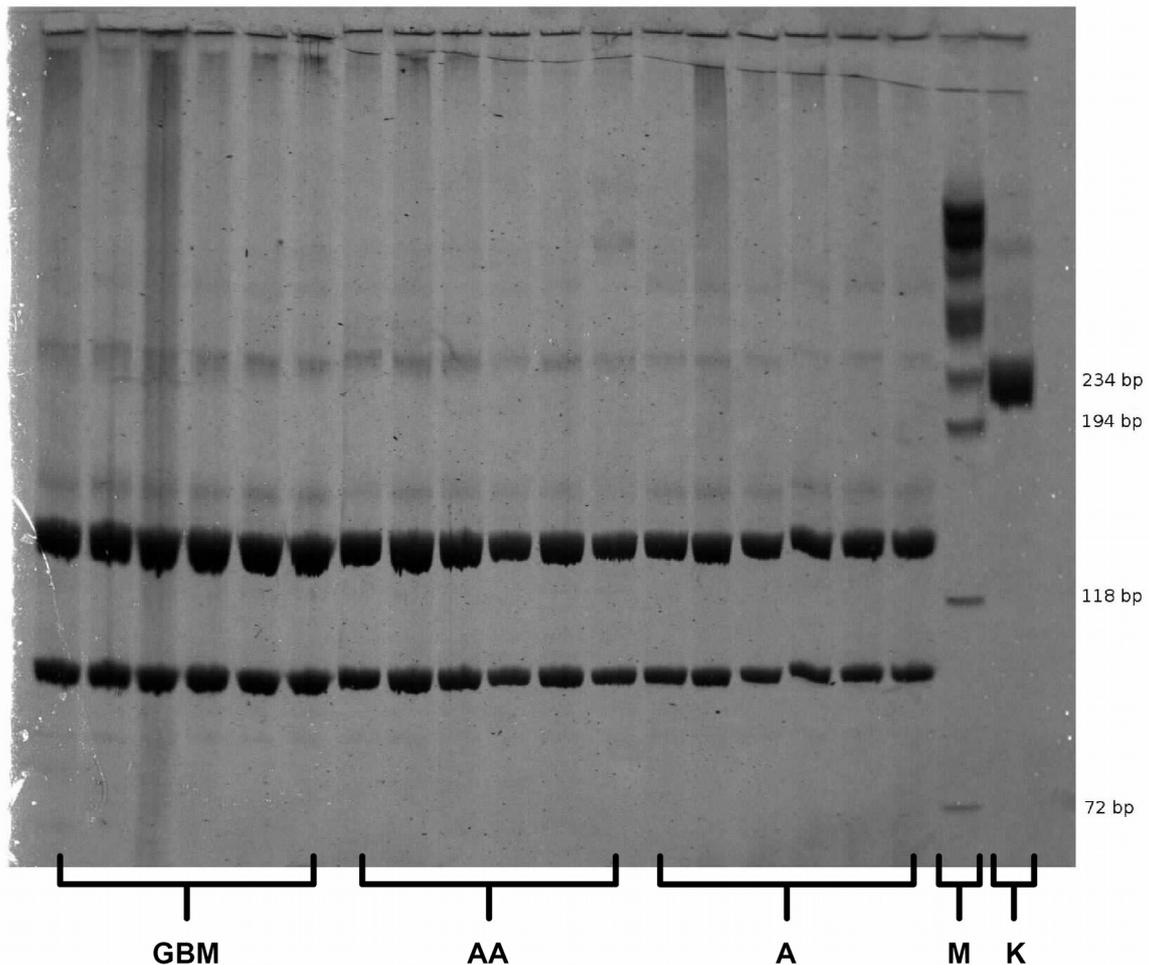
Fehlender Nachweis einer ITD in astrozytären Tumoren (von oben nach unten 2 x GBM, 2 x AA, 2 x A) mittels Kapillarelektrophorese und GeneScan-Analyse. Gezeigt ist der relevante Größenbereich der Analyse mit Referenzfragmenten zwischen ca. 200 und 500 bp (rote Peaks). Für die analysierten PCR-Produkte (blaue Peaks) erkennt man nur eine konstante Fragmentlänge von 330 bp (Wildtyp) und keine zusätzlichen schwereren Fragmente zwischen 330 und 500 bp. Die x-Achsen-Skalierung (oben) zeigt die Fragmentlängen in bp, die y-Achse (links) die relative Höhe der Fluoreszenz als Maßstab für die Effizienz der PCR, die in allen Fällen ausreichend war.

3.4. Analyse der Punktmutation D835

Die Mutationsanalyse wurde an 46 Tumoren (davon sechs diffuse Astrozytome, sechs anaplastische Astrozytome, 34 Glioblastome) und den fünf Glioblastomzelllinien durchgeführt. Die Länge der Amplikons betrug 237 bp. Das Enzym EcoRV spaltet das Produkt der PCR-Reaktion in zwei Fragmente von 97 bp bzw. 140 bp, wenn eine Wildtyp-DNA vorliegt. Bei einer Punktmutation D835 findet keine Spaltung statt und das Produkt der PCR-Reaktion behält seine Länge von 237 bp. Bei einer somatischen Mutation D835 oder anderen Veränderungen in Form von Basensubstitution oder -deletion in der Restriktionsstelle, wären nach dem Einsatz von EcoRV ähnliche Mengen von gespaltener und ungespaltener DNA zu erwarten. Im Resultat wären auf dem Silbergel dann drei Banden der erwarteten Längen mit gleicher Intensität zu sehen.

Dadurch, dass alle 46 Tumorproben nur die beiden kurzen Fragmente zeigten (Abbildung 8), war evident, dass keine Punktmutationen, unabhängig vom Tumorgrad, vorlagen.

Abbildung 8: Untersuchung auf das Vorliegen der D835-Punktmutation



Diffuse Astrozytome (A, WHO-Grad II), anaplastische Astrozytome (AA, WHO-Grad III) und Glioblastome (GBM, WHO-Grad IV) wurden auf das Vorliegen der D835-Punktmutation untersucht. K: Kontrolle (PCR-Produkt ohne EcoRV-Restriktion als Indikator der im Falle einer mutierten Restriktionsstelle zu erwartenden Fragmentlänge). M:Marker (Phi-X-174-DNA nach Restriktion mit HaeIII). Y-Skala: Relevante Fragmentlängen des Markers in bp. Es ist zu beachten, dass die zarten Banden im Bereich oberhalb von 234 bp nicht genau mit der Kontrollprobe (K) korrespondieren. Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass sie Spuren ungespaltener PCR-Produkte repräsentieren. Dies wäre jedoch durch eine auch bei Wildtyp nicht immer 100 % vollständige Spaltung erklärbar. Die Signalintensität (DNA-Menge) ist deutlich zu gering, um mit den äquimolaren Mengen gespaltener und ungespaltener DNA kompatibel zu sein, die im Falle einer Mutation auftreten.

4. Diskussion

4.1. Vorkommen von FLT3 und seinem Liganden im Zentralnervensystem (ZNS)

Viele, bereits in der Einleitung erwähnte, Forschungsprojekte haben bereits die immunmodulatorische Wirkung von FLT3L im Zentralnervensystem von Rattenhirnen nachgewiesen, so dass zumindest die dort vorhandenen Zellen des Immunsystems über einen Rezeptor verfügen müssen, auf den der Ligand wirken kann. Doch auch beim Menschen haben FLT3 und FLT3L bereits im Rahmen entzündlicher Prozesse Aufsehen erregt, z. B. in neurodegenerativen Erkrankungen (s. u.). Im gesunden adulten, humanen Zentralnervensystem und in den häufigsten aus ihm hervorgehenden Tumoren fehlte aber bisher der Nachweis von FLT3/FLT3L.

Es wurde im Maushirn jedoch eine Expression von FLT3-mRNA in neuralen Stamm-/Progenitorzellen, die die Proliferationsfähigkeit behalten (subependymale Zone), per in-situ-Hybridisierung nachgewiesen sowie eine sogar deutlich stärkere Expression in manchen Neuronen im Zentral- und im peripheren Nervensystem [44]. Diese hohe Expression in manchen Typen differenzierter Neurone wurde auch im ZNS adulter Mäuse beobachtet. Der Nachweis einer FLT3-Expression in einer Subpopulation neuraler Stamm-/Progenitorzellen geht interessanterweise mit einer Inhibition der Proliferation durch FLT3L einher, wenngleich sich ein hohes Level von FLT3 in einer Subpopulation differenzierter Neurone nachweisen lässt. Eine Kombination aus FLT3L und NGF (nerve growth factor) verbesserte jedoch *in vitro* die Überlebensfähigkeit der Neurone. Somit kommt FLT3/L im Nervensystem eine andere Rolle als im hämatopoetischen System zu, nämlich möglicherweise diejenige der Unterstützung des Überlebens terminal differenzierter Neurone. Hierbei ist anzumerken, dass auch im hämatopoetischen System die alleinige Zufuhr von FLT3L keine Proliferation auslöst, sondern auch hierfür eine Kombination verschiedener Faktoren von Nöten ist [44].

Die Anzahl FLT3-exprimierender Zellen des Neokortex war gering. Weiterhin kann man einer in-situ-Hybridisierung trotz guter räumlicher Auflösung der Signale ihre

zelluläre Zuordnung bei komplex aus unterschiedlichen Zelltypen zusammengesetzten Geweben, wie dem ZNS, nicht in jedem Fall ansehen, mit Ausnahme einiger Spezialfälle wie CA-Pyramidenzellen. Hierdurch bleibt oft offen, ob es sich bei den Signalen um neurale, gliale mRNA oder gar um ein Gemisch aus beidem handelt. Ähnliches wurde ebenfalls in Arbeiten nachgewiesen [45, 46], in denen zusätzlich Western Blots angefertigt wurden. Weiterhin wurden in diesen Arbeiten keine Real-Time-PCR-Analysen durchgeführt, so dass die Ergebnisse stark von der Qualität der ISH-Sonden und den Hybridisierungsbedingungen abhängen.

Jedoch liegen auch Forschungsergebnisse vor, die dem Nachweis einer FLT3-Expression im Hirnparenchym bzw. daraus hervorgegangenen Tumoren eher entgegen stehen [47]. Das genutzte Verfahren war hier eine teilweise automatisierte Real-Time-PCR auf alle damals bekannten humanen Rezeptortyrosinkinasen (u. a. FLT3), die auch 35 Hirntumoren einschloss. Als Referenzwerte wurden hier Standardkurven aus seriellen Verdünnungen von gemischter cDNA aus Zelllinien, Normal- und Tumorgewebe genutzt. Wenngleich die Arbeit zeigt, dass Hirntumoren generell viele Rezeptortyrosinkinasen (RTK) exprimieren, konnte hier kein Nachweis einer FLT3-Expression gefunden werden. Diese Aussage ist jedoch nicht als absolut anzusehen aus mindestens drei Gründen. Zunächst wurden die Hirntumoren nicht genauer benannt, da ihre differenzierte Betrachtung nicht das Ziel dieser Übersichtsstudie über RTK war. Es bleibt also unklar, ob es sich vorwiegend um Gliome oder gar im Besonderen um astrozytäre Tumoren handelte. Zum Zweiten wurden die in die Eichung eingegangenen cDNA-Gemische nicht näher definiert, sondern es wurde auf ein breites Spektrum von Zelllinien, Normal- und Tumorgeweben verwiesen. Es ist daher durchaus wahrscheinlich, dass dieses komplexe cDNA-Gemisch keine Eichkurven ergab, in deren Messbereich bei der automatischen Analyse noch die C_t -Werte sehr schwach FLT3-positiver Proben fielen. Da das von den Autoren eingesetzte Sondenverfahren für die PCR sicher hochspezifisch ist, wären ggf. auch äußerst geringe Expressionslevel noch quantifizierbar gewesen bei Verwendung separater Eichkurven für „schwach FLT3-positiv Proben“ anstelle eines breiten cDNA-Gemisches. Allerdings war dies sicher nicht kompatibel mit dem Ziel der automatisierten Analyse aller humaner RTK. Drittens wurde hier auch nicht der Nachweis von FLT3L versucht. Dennoch spricht der Ansatz dafür, dass generell keine erhebliche Expression von FLT3 in astrozytären Tumoren zu erwarten ist, zumindest in unbehandelten.

Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte bei vielen Proben kein Reaktionsprodukt mit dem SybrGreen-basierten Real-Time-PCR-Verfahren reproduzierbar quantifiziert werden, doch konnten Spuren des Produktes auf dem Polyacrylamid-Gel mit anschließender Silberfärbung dargestellt werden. Dies zeigt, dass der Nachweis einer FLT3-mRNA in astrozytären Tumoren gelingt und bei Anwendung eines hinreichend sensiblen Verfahrens künftig auch eine Quantifizierung möglich sein sollte. Denkbare Verfahren, wie Taq-Man-RT-PCR oder radioaktive Methoden konnten in der vorliegenden Doktorarbeit jedoch nicht angewandt werden. Allerdings ist festzuhalten, dass die Quantität der FLT3-mRNA astrozytärer Tumoren im Vergleich zu vielen anderen zellulären mRNA sehr gering sein muss ($< 0,05\%$ des Referenzgens), durchaus in Übereinstimmung mit ihrem fehlenden Nachweis in der Literatur [47].

Durch das perientzündliche Infiltrat könnte prinzipiell jeglicher Nachweis von FLT3 auf die Zellen der Immunantwort des Hirns zurückzuführen sein. Dass der Nachweis einer Expression in der vorliegenden Doktorarbeit auch an den Gliomzelllinien erfolgte, unterstützt jedoch die These, dass es sich bei der nachgewiesenen mRNA auch im Tumorgewebe zumindest zum Teil um mRNA der astrozytären Tumorzellen selbst handelt und nicht ausschließlich um solche aus Zellen des Immunsystems, z. B. aus dendritischen Zellen.

4.2. Die Rolle von FLT3 in Gliomen

Dass FLT3 trotz der geringen Expression in der Entstehung von Gliomen eine Rolle spielen könnte, zeigt eine signifikante Assoziation eines genetischen Polymorphismus im FLT3-Gen mit Glioblastomen in Han-Chinesen (OR, 1,44; 95 % KI, 1,00-2,08; $p = 0,048$) [48].

Wenngleich durch den Nachweis einer statistischen Assoziation noch kein direkter Nachweis einer funktionellen Abhängigkeit gegeben ist, da beispielsweise ein dem FLT3-Gen benachbartes Gen für die Erkrankung verantwortlich sein könnte und keine Untersuchungen an Vergleichspopulationen anderer Länder erfolgten, spricht diese genetische Analyse doch eher für die Relevanz einer Untersuchung der Expression und Funktion von FLT3 in Gliomerkrankungen.

4.3. Vorkommen von FLT3L im ZNS außerhalb dendritischer Zellen

Die lösliche Variante von FLT3L wird vom Blut aus in allen Organen verteilt und ist mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) als Protein nachweisbar und quantifizierbar. Im Liquor hat der Ligand Aufsehen erregt. Zunächst wurde versucht Hinweise zu finden, ob aufgrund der FLT3L-Level im Liquor zwischen den Entitäten des Formenkreises der Synukleinopathien eine genauere Differenzierung möglich ist. Wenngleich sich letzten Endes kein Unterschied des Expressionslevels zwischen einem Morbus Parkinson, einer Multisystematrophie und einer supranukleären Lähmung feststellen ließ [49], zeigen die Versuche eine Nachweisbarkeit von FLT3L, sogar eine Erhöhung bzw. Verminderung der Expression in verschiedenen neurologischen Erkrankungen des Hirns. Auch beim Sjögren-Syndrom sind Messungen von FLT3L im Liquor durchgeführt wurden, wobei hier eine starke Korrelation zwischen FLT3L und Tau-Proteinen besteht [50]. All dies zeigt unabhängig von dem im Einzelnen verfolgten Fragestellungen, dass mit konventionellen ELISA im Liquor nachweisbare Konzentrationen von FLT3L beim Menschen existieren. Diese Beobachtung stützt somit eine basale Rolle des FLT3/L-Systems im ZNS trotz der vergleichsweise wenigen und eher auf eine marginale Expression des Rezeptors im ZNS hindeutenden Daten (s. o.).

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nicht der Liquor, sondern die astrozytären Tumoren selbst auf das Vorhandensein von FLT3L-mRNA untersucht. In den Tumoren wurde mittels Real-Time-PCR die mRNA in erheblichen Mengen nachgewiesen, was bedeutet, dass, wenn nicht FLT3, zumindest FLT3L in erheblichen Mengen von den Tumoren produziert wird und nicht nur in seiner auch anderen Orts produzierten, löslichen Form passiv in die Tumoren gelangt.

4.4. Rolle von FLT3 bei der Immunaktivierung im ZNS

Eine Rolle von FLT3 in der Immunantwort im Zentralnervensystem ist hingegen bewiesen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, spielt FLT3 eine wichtige Rolle in der Immunaktivierung, in dendritischen Zellen und wird für Immuntherapieversuche von Gliomen in Rattenexperimenten genutzt. Dies legt natürlich nahe, dass das Protein selbst in menschlichen astrozytären Tumoren untersucht werden muss, um eine mögliche negative Reaktion bei Immunstimulationsversuchen mit FLT3L einschätzen zu können.

Jedoch wird die Stimulation des Immunsystems durch FLT3 auch in der Therapie anderen Tumorerkrankungen genutzt, z. B. in der antitumoralen Immuntherapie durch dendritische Zellen in kolorektalen Karzinomen [51]. Hier wurde eine Expansion der dendritischen Zellen durch FLT3L *in vivo* beobachtet. Ähnlich den antitumoralen Experimenten in Glioblastomen wurde hier eine adenovirale Immuno-Gen-Therapie mit FLT3L in einem weiblichen BALB/c-Mausmodell nach subkutaner Tumoringjektion durchgeführt. Durch Applikation von FLT3L konnte so *in vivo* und *in vitro* die Anzahl dendritische Zellen erhöht werden. Die Behandlung bremste so das Tumorwachstum, erhöhte dadurch die Überlebensrate.

Es gibt Hinweise darauf, dass FLT3 nicht nur auf dendritischen Zellen, sondern auch auf Mikroglia bei Entzündungsvorgängen im Zentralnervensystem eine Rolle spielt [52]. Hierfür wurde die FLT3-Expression im perivaskulär plaquenahen Hirnparenchym und läsionsfreier grauer und weißer Substanz in Hirnen von Patienten mit multipler Sklerose untersucht.

Die Therapie dieser Erkrankung setzt im Immunsystem an. Der Gedanke, dass auch Mikroglia hierbei genutzt werden könnten, bietet vielleicht erweiterte Möglichkeiten. So wurden zwei Populationen von Zellen mit FLT3-Expression nachgewiesen und nicht, wie erwartet, nur eine. Bei einer handelt es sich um dendritische Zellen, bei der anderen möglicherweise um Mikroglia [52].

Ein Kritikpunkt in der Idee, das Immunsystem vermehrt in der antitumoralen Therapie von Glioblastomen zu nutzen bestand darin, dass die konventionelle Therapie dieses in großem Maße schwächt und ein positiver Effekt durch eine Immunaktivierung zu gering wäre. Hinzu kommt, dass nicht nur die fehlende Wirkung ein Problem darstellt, sondern auch die Tatsache, dass diese Therapie mit Nebenwirkungen verbunden ist.

Es zeigt sich bei der Therapie maligner Gliome mit Kortikoiden, Temozolomid und Bestrahlung eine Lymphopenie [53], einhergehend mit Infektionen und einer verminderten körpereigenen Abwehr von Tumorzellen. Die Kortikoide selbst wirken zwar immunsuppressiv, sind jedoch nötig zur Behandlung des peritumoralen Ödems und auch nach der operativen Tumorreduktion, die zwar nicht heilend ist, jedoch essentiell für ein längeres Überleben durchgeführt werden muss.

Auch bei der Wahl der Anzahl der CD4-positiven Lymphozyten als Marker für das Maß der Immunsuppression, da eine Immunsuppression nicht immer mit tatsächlichen Infektionen gleichzusetzen ist, zeigen sich ähnliche Ergebnisse [54]. Die Reduktion der CD4-positiven Lymphozyten von Patienten mit einem hochgradigen Gliom unter Bestrahlung und Behandlung mit Temozolomid findet tatsächlich statt, doch auch die Strahlung allein führt zu einer Senkung.

Ansätze, die die Vorgänge im Immunsystem untersuchen, bieten Hinweise darauf, dass die therapiebedingte Immunsuppression die Immuntherapie nicht ausschließt [55]. Bisher wurden die zirkulierenden T-Lymphozyten für die FLT3L-Produzenten gehalten, was jedoch mit der Tatsache kollidiert, dass in der aplastischen Phase des blutbildenden Systems die FLT3L-Konzentration erhöht und nicht vermindert oder ausgelöscht ist. Versuche an aplastischen und T-Lymphozyten-defizienten NOD (non-obese diabetic)-SCID (severe combined immunodeficiency)-Mäusen zeigten, dass FLT3L gleichermaßen erhöht war sowie, dass eine negative Korrelation mit der Anzahl der hämatopoetischen Progenitorzellen, mRNA und FLT3L in allen Organen beider Gruppen bestand.

Es gibt Versuche, an Mäusen mit intrakraniellem Glioblastom oder metastasierten Melanomen, wo eine Kombination von Temozolomid und FLT3L intratumoral injiziert wurde [56]. Zusätzlich kamen FLT3L-tragende Adenoviren oder mit Herpes-Simplex-Virus1-Thymidinkinase versehene Pendant zum Einsatz. Thymidinkinase aktiviert systemisch appliziertes Ganciclovir. Unter der Kombination von klassischem Alkylanz (Temozolomid), Thymidinkinase/Ganciclovir und Immunstimulation durch FLT3L konnte eine erhebliche Verbesserung des Überlebens beobachtet werden im Vergleich zu Temozolomid allein oder im Vergleich zur Kombination Temozolomid/FLT3L. Abschließend zeigen bereits jetzt Experimente an Patienten nach Injektion aus dendritischen Zellen mit Tumorlysaten eine erhöhte Überlebenszeit.

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Relevanz des FLT3-/FLT3L-Systems für das Wachstum bis dahin pharmakologisch unbehandelter Gliome unwahrscheinlich ist. Dies steht im Einklang mit einem Nutzen der Immuntherapie, die die Überlebenszeit der Patienten mit einer Glioblastomerkrankung verlängern kann und dem Wunsch der Heilbarkeit der Erkrankung etwas näher rückt. Eine Analyse der Expression beider Komponenten unter Temozolomid, Radiatio und anderen Therapieansätzen ist jedoch weiterhin von Nöten, um mögliche Wechselwirkungen zu erkennen. Wenn dies abgeschlossen ist, könnte eine Kombination von Immunstimulation und konventioneller Behandlung versucht werden. Erst klinische Versuche können zeigen, ob die immunsuppressive Wirkung von Temozolomid tatsächlich nicht die lokale Immunstimulation von Ad-FLT3L verhindert, sondern eine synergistische Wirkung eintritt.

Die in der hier vorgelegten Doktorarbeit erstmals erfolgte Expressionsanalyse von FLT3 und Ligand in astrozytären Tumoren aller Grade lässt vermuten, dass eine ungewollte Wachstumsstimulation des Tumorrests nach Resektion im Zuge einer nachfolgenden Immuntherapie beim Menschen nicht zu befürchten wäre. Sie verdeutlicht jedoch gleichzeitig die Notwendigkeit noch eingehenderer FLT3-Studien vor Beginn und begleitend zu einer adjuvanten Immuntherapie der oben skizzierten Art.

6. Literaturverzeichnis

1. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
2. Reardon, D.A., et al., *Cilengitide: an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme*. Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(8): p. 1225-35.
3. Rubenstein, J.L., et al., *Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption*. Neoplasia, 2000. **2**(4): p. 306-14.
4. Louis, D.N., *WHO Classification of Tumours, Volume 1*
IARC WHO Classification of Tumours, No 1
Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., ed. O.D.W. Hiroko Ohgaki, Webster K. Cavenee. 2007. 13-52.
5. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6892-9.
6. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(6): p. 479-89.
7. Peiffer, J. and P. Kleihues, *Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research*. Brain Pathol, 1999. **9**(2): p. 241-5.
8. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
9. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
10. Kloosterhof, N.K., et al., *Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma? The Lancet Oncology*. **12**(1): p. 83-91.
11. De Witt Hamer, P.C., *Small molecule kinase inhibitors in glioblastoma: a systematic review of clinical studies*. Neuro Oncol, 2010. **12**(3): p. 304-16.
12. Knobbe, C.B., A. Merlo, and G. Reifenberger, *Pten signaling in gliomas*. Neuro Oncol, 2002. **4**(3): p. 196-211.
13. Watanabe, K., et al., *Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas*. Brain Pathol, 1996. **6**(3): p. 217-23; discussion 23-4.
14. Nakamura, M., et al., *Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(6): p. 539-43.
15. Fujisawa, H., et al., *Loss of Heterozygosity on Chromosome 10 Is More Extensive in Primary (De Novo) Than in Secondary Glioblastomas*. Lab Invest, 1999. **80**(1): p. 65-72.
16. Nakamura, M., et al., *Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas*. Lab Invest, 2005. **85**(2): p. 165-75.
17. Nakamura, M., et al., *p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas*. Brain Pathol, 2001. **11**(2): p. 159-68.

18. Nakamura, M., et al., *Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas*. Lab Invest, 2001. **81**(1): p. 77-82.
19. Nakamura, M., et al., *Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene*. Carcinogenesis, 2001. **22**(10): p. 1715-9.
20. Fischer, I., et al., *Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology*. Brain Pathol, 2005. **15**(4): p. 297-310.
21. Vredenburgh, J.J., et al., *Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme*. J Clin Oncol, 2007. **25**(30): p. 4722-9.
22. Bello, L., et al., *Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery*. Neurosurgery, 2001. **49**(2): p. 380-9; discussion 390.
23. Gladson, C.L., *Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors*. J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(11): p. 1143-9.
24. *Merck: Phase III Trial of Cilengitide Did Not Meet Primary Endpoint in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma*. Available from: <http://www.merckgroup.com/en/media/extNewsDetail.html?newsId=BE2FE07AD630830EC1257B1D001F007B&newsType=1>.
25. Roger Stupp, et al, *Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and methylated O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene promoter: Key results of the multicenter, randomized, open-label, controlled, phase III CENTRIC study*.; Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/112780-132>.
26. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/FLT3ID144.html>
27. *FLT3 Signaling*. Available from: http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=FLT3_Signaling. Illustriert von Rainer Böhme
28. Drexler, H.G., *Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells*. Leukemia, 1996. **10**(4): p. 588-99.
29. Lavagna-Sevenier, C., et al., *The CBL-related protein CBLB participates in FLT3 and interleukin-7 receptor signal transduction in pro-B cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 14962-7.
30. Zhang, S. and H.E. Broxmeyer, *p85 subunit of PI3 kinase does not bind to human Flt3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and a tyrosine-phosphorylated 100-kDa protein in Flt3 ligand-stimulated hematopoietic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **254**(2): p. 440-5.
31. Watowich, S.S. and Y.J. Liu, *Mechanisms regulating dendritic cell specification and development*. Immunol Rev, 2010. **238**(1): p. 76-92.
32. Takahashi, S., *Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications*. J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 13.

33. Yokota, S., et al., *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines.* *Leukemia*, 1997. **11**(10): p. 1605-9.
34. Noguera, N.I., et al., *Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol.* *Leukemia*, 2002. **16**(11): p. 2185-9.
35. Sgorbissa, A., et al., *Type I IFNs signaling and apoptosis resistance in glioblastoma cells.* *Apoptosis*, 2011. **16**(12): p. 1229-44.
36. Borden, E.C., et al., *Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine.* *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(12): p. 975-90.
37. De Bouard, S., et al., *Antiangiogenic therapy against experimental glioblastoma using genetically engineered cells producing interferon-alpha, angiostatin, or endostatin.* *Hum Gene Ther*, 2003. **14**(9): p. 883-95.
38. Candolfi, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cells in the tumor microenvironment: immune targets for glioma therapeutics.* *Neoplasia*, 2012. **14**(8): p. 757-70.
39. Tsuno, T., et al., *IRF9 is a key factor for eliciting the antiproliferative activity of IFN-alpha.* *J Immunother*, 2009. **32**(8): p. 803-16.
40. Candolfi, M., et al., *Release of HMGB1 in response to proapoptotic glioma killing strategies: efficacy and neurotoxicity.* *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(13): p. 4401-14.
41. Mineharu, Y., et al., *Engineering the brain tumor microenvironment enhances the efficacy of dendritic cell vaccination: implications for clinical trial design.* *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(14): p. 4705-18.
42. King, G.D., et al., *Flt3L and TK gene therapy eradicate multifocal glioma in a syngeneic glioblastoma model.* *Neuro Oncol*, 2008. **10**(1): p. 19-31.
43. King, G.D., et al., *Combined Flt3L/TK gene therapy induces immunological surveillance which mediates an immune response against a surrogate brain tumor neoantigen.* *Mol Ther*, 2011. **19**(10): p. 1793-801.
44. Brazel, C.Y., et al., *The FLT3 tyrosine kinase receptor inhibits neural stem/progenitor cell proliferation and collaborates with NGF to promote neuronal survival.* *Mol Cell Neurosci*, 2001. **18**(4): p. 381-93.
45. Ito, A., et al., *Developmental expression of flt3 mRNA in the mouse brain.* *J Mol Neurosci*, 1993. **4**(4): p. 235-43.
46. deLapeyriere, O., et al., *Expression of Flt3 tyrosine kinase receptor gene in mouse hematopoietic and nervous tissues.* *Differentiation*, 1995. **58**(5): p. 351-9.
47. Müller-Tidow, C., et al., *High-Throughput Analysis of Genome-Wide Receptor Tyrosine Kinase Expression in Human Cancers Identifies Potential Novel Drug Targets.* *Clinical Cancer Research*, 2004. **10**(4): p. 1241-1249.
48. Jin, T.B., et al., *Association of polymorphisms in FLT3, EGFR, ALOX5, and NEIL3 with glioblastoma in the Han Chinese population.* *Med Oncol*, 2013. **30**(4): p. 718.
49. Silajdzic, E., et al., *Flt3 ligand does not differentiate between Parkinsonian disorders.* *Mov Disord*, 2014. **29**(10): p. 1319-22.

50. Dehlin, M., et al., *Cerebrospinal Flt3 ligand correlates to tau protein levels in primary Sjogren's syndrome*. Scand J Rheumatol, 2013. **42**(5): p. 394-9.
51. Riediger, C., et al., *Fms-like tyrosine kinase 3 receptor ligand (Flt3L)-based vaccination administered with an adenoviral vector prevents tumor growth of colorectal cancer in a BALB/c mouse model*. J Cancer Res Clin Oncol, 2013. **139**(12): p. 2097-110.
52. DeBoy, C.A., et al., *FLT-3 expression and function on microglia in multiple sclerosis*. Exp Mol Pathol, 2010. **89**(2): p. 109-16.
53. Susannah Yovino¹ and Stuart A Grossman¹, J.H.U.S.o. ¹The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, and O.S. Medicine, Suite 1M-16, Baltimore, MD 21231, USA, *Severity, etiology and possible consequences of treatment-related lymphopenia in patients with newly diagnosed high-grade gliomas*. 2012.
54. Grossman, S.A., et al., *Immunosuppression in patients with high-grade gliomas treated with radiation and temozolomide*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(16): p. 5473-80.
55. Prat, M., et al., *Radiation-induced increase in plasma Flt3 ligand concentration in mice: evidence for the implication of several cell types*. Radiat Res, 2005. **163**(4): p. 408-17.
56. Candolfi, M., et al., *Temozolomide does not impair gene therapy-mediated antitumor immunity in syngeneic brain tumor models*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(6): p. 1555-65.

7. Anhang

7.1. Danksagung

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Elmar Kirches und den Leiter des Institutes, Herrn Prof. Dr. med. habil Christian Mawrin, richten, ohne die ich niemals ein Licht am Ende der Doktorarbeit gesehen hätte. Auch möchte ich dem Team des Institutes für Neuropathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und meinem Mann danken, die nicht nur meine schlechte Laune und meine Zeiten der überstrapazierten Nerven geduldet und überstanden haben, sondern mir mit Ihrem Fachwissen, konstruktiver Kritik und vielen Ideen immer wieder die nötige Motivation gegeben haben, auch wenn meine Silbergele platzten wie Seifenblasen.

7.2. Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 und ihr Ligand in astrozytären Tumoren“

im Zentrum/Institut/Krankenhaus/in der Klinik

Institut für Neuropathologie

mit Unterstützung durch

Prof. Dr. med. habil Christian Mawrin und Prof. Dr. rer. nat. Elmar Kirches

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den **15.02.2015**

Unterschrift

7.3. Darstellung des Bildungsweg

		geboren	17.09.1987 in Magdeburg
2006	Allgemeine Hochschulreife	Geschwister-Scholl-Gymnasium	Magdeburg
2006 - 2012	Studium Humanmedizin	Otto-von-Guericke Universität	Magdeburg
2008	1. Abschnitt Famulaturen	der ärztl. Prüfung Neurophathologie Hämatologie / Onkologie Dermatologie Pädiatrie Kardiologie Hämatologie / Onkologie Dermatologie	bestanden am 19.09.2008 Institut Stationärer Bereich Ambulanter Bereich
2009	Beginn experimentelle Doktorarbeit	Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 und ihr Ligand in astrozytären Tumoren	Institut für Neuropathologie Leitung: Prof. Dr. med. Mawrin Magdeburg
2010 - 2011	Zusatzkurs	zur Übernahme der Funktion eines Trasfusionsbeauftragten	
2011 - 2012	praktisches Jahr	Universitätsklinikum Magdeburg	Pathologie Innere Medizin: Gastroenterologie Chirurgie: Kinderchirurgie Allgemeinchirurgie
2012	2. Abschnitt	der ärztl. Prüfung	bestanden am 08.11.2012
2013	Beginn Facharztausbildung	Assistenzärztin für Pathologie Diagnostik Mitglied der Organgruppe Verantwortlich für Koordination	Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg an Biopsien und Operationspräparaten aus der Gastroenterologie, Abdominalchirurgie und Gynäkologie Gynäkologie der ärztlichen Nutzung der Instituts-IT
			Constanze Eßbach

7.4. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: „Vergleich astrozytärer Tumoren untereinander“ S.10

Abb. 1: „FLT3-Rezeptor phosphoryliert mit Ligand“ S.13

Abb. 2: „Histologie“, S.32-33

Abb. 3: „Real-Time-PCR für mRNA des Referenzgens β 2-Mikroglobulin“ S.34-35

Abb. 4: „Real-Time-PCR für FLT3L-mRNA“ S.36

Abb. 5: „Expression von FLT3L-mRNA in astrozytären Tumoren.“ S.37

Abb. 6: „Silberpolyacrylamid-Gel mit Expression von FLT3-mRNA“ S.39

Abb. 7: „Elektropherogramm ITD-Analyse“ S.42

Abb. 8: „Untersuchung auf das Vorliegen der D835-Punktmutation“ S.44

7.5. Chemiealien

5-fach Polymerasepuffer	Fermentas
5-fach-Puffer der reversen Transkriptase	Bioline
6-FAM-markierter Primer	Biomers.Net
Acryl-PDA (13 % Acrylamid, 0,68 % PDA)	Roth
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
AmpFSTR-Kit	Applied Biosystems
Aqua dest.	AMPUWA, Fresenius Kabi
Bromphenol-Blau	Merck
Chloroform	Roth
DEPC-Wasser	Sigma-Aldrich
Desoxynukleotide	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide
Formalin	Roth
Glycerollösung	Merck
Hexanukleotid-Random-Primer	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)
Hexanukleotid-Primer	Bioline
high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium	DMEM , PAA, Linz, Austria

Hotstart-Polymerase	Fermentas
Isopropanol	Merck
Kälberserum	PAA
Macherey-Nagel-Kits	Macherey-Nagel
Magnesiumchlorid	Applied Biosystems
Marker für die Fragmentlängen	DNA des Virus Phi-X-174, gespalten mit dem Restriktionsenzym HaeIII , New England Biolabs
Natriumcarbonat	Merck
Nukleotide	Bioline
Nukleotide	Applied Biosystems
Penicillin	PAN
Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung	PBS, PAA
Polymerase	Applied Biosystems
Primer (diverse)	Biomers.Net
Puffer	Applied Biosystems
Restriktions-Enzym EcoRV	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
reverse Transkriptase	Bioline
Salpetersäure	Roth
Streptomycin	PAN
Tetramethylethyldiamin	TEMED, Sigma-Aldrich
Tris-Puffer	PAN
TRIZolreagenz	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

7.6. Geräte und Software

ABI Prism 7000-SDS (Applied Biosystems)	Applied Biosystems
Fluoreszenz-Kapillar-Sequenzier (ABI-310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems)	Applied Biosystems
Gefrierschrank	Fermentas
GeneMapper ID-Software, Version 3.2 von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)	Applied Biosystems
GeneScan-Software (Applied Biosystems)	Applied Biosystems
Horizontal-Elektrophoresekammer von Pharmacia (Uppsala, Schweden)	Pharmacia
Inkubator	Nunc
PCR-Maschine	Eppendorf
Photometer mit Küvetten	Eppendorf
Pipetten diverser Volumina der Firma Eppendorf	Eppendorf
ROX-standard 500, Applied Biosystems	Applied Biosystems
Schüttelinkubator	Eppendorf
Statistical Package for Social Sciences version 18	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
Vortexgerät	Heidolph
Zentrifuge	Heraeus

7.7. Verbrauchsmaterialien

Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Filterpapier-Stückchen	sample application pieces, Pharmacia
NucleonSpin® Gewebesäule	peqlab
Pipettenspitzen	Eppendorf
T75-Zellkulturflaschen	Greiner